



HAL
open science

Etudes in silico et expérimentale de la DXR & synthèse de D- et L-GAP énantiomériquement purs

Fanny Krebs

► **To cite this version:**

Fanny Krebs. Etudes in silico et expérimentale de la DXR & synthèse de D- et L-GAP énantiomériquement purs. Autre. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAF059 . tel-01672058v1

HAL Id: tel-01672058

<https://theses.hal.science/tel-01672058v1>

Submitted on 23 Dec 2017 (v1), last revised 19 Jan 2018 (v2)

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, UMR 7177

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

THÈSE présentée par :

Fanny KREBS

soutenue le : **21 décembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Etudes *in silico* et expérimentale de la
DXR & synthèse de D- et L-GAP
énantiomériquement purs**

THÈSE dirigée par :

Mme Grosdemange-Billiard Catherine

M. Stote Roland

Professeur, Université de Strasbourg

Directeur de Recherche, CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. Michielin Olivier

Mme Pellegrini-Moïse Nadia

Professeur, Université de Lausanne

Maître de conférence, HDR, Université de Lorraine

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme Prévost Martine

Mme Tarnus Céline

Chargée de Recherche, Université Libre de Bruxelles

Professeur, Université de Haute-Alsace

Etudes *in silico* et expérimentale de la DXR & synthèse de D- et L-GAP énantiomériquement purs

Résumé

Cette thèse a porté sur l'étude des deux premières enzymes de la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP): la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) et la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR). La voie du MEP conduit à la biosynthèse des isoprénoïdes chez la plupart des bactéries, incluant des pathogènes. Etant absente chez l'homme, les enzymes de cette voie cible idéale pour la recherche de nouveaux antimicrobiens.

L'objectif principal était d'améliorer le développement de nouveaux antimicrobiens. Nous avons utilisé des outils computationnels, tels que les méthodes de docking et de mécanique moléculaire couplée à l'analyse des décompositions d'énergie libre par résidu grâce à la méthode MM/PBSA. Nous avons identifié les résidus contribuant significativement à la fixation d'un ligand dans le site actif de la DXR. Ces résultats ont été utilisés lors de la conception de nouveaux candidats inhibiteurs de type bisubstrat, biligand et α,α -difluoro phosphonate, dont deux ont pu être synthétisés durant ces travaux.

Nous avons également développé une méthode de synthèse donnant accès au L- et D-glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) énantiomériquement purs, dans le but d'étudier l'énantiospécificité de la DXS face à son substrat D-GAP

Mots clés : MEP, DXR, DXS, modélisation moléculaire, simulation de dynamiques moléculaire, MM/PBSA, docking, étude de site actif, GAP

Abstract

This thesis concerns the study of the two first enzymes of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR). The MEP pathway permits the biosynthesis of isoprenoids in most bacteria, including pathogenic one. As it is not present in human, enzymes of this pathway are effective targets in the research of new antimicrobial compounds.

The objective was to advance the development of new antimicrobial compounds. We used computational tools, like molecular docking and molecular dynamics simulations coupled with an MM/PBSA approach that allows for the decomposition of binding free energies per residue. We were able to identify residues that contribute significantly to the ligand binding in the DXR active site. These results were used to guide the conception of new inhibitor models, such as bisubstrates, biligands and α,α -difluoro phosphonates, two of which were synthesized.

We also developed a synthesis method to obtain L- et D-glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) as enantiomerically pure compounds. The goal was to study the enantiospecificity of DXS to its substrate, D-GAP.

Keywords: MEP, DXR, DXS molecular modeling, molecular dynamics simulation, MM/PBSA, docking, active site study, GAP

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ceux qui se sont partagés la direction de ma thèse. Merci à ma directrice de thèse Catherine Grosdemange-Biliard pour avoir accepté la responsabilité de diriger ma thèse et de m'avoir encouragée à poursuivre en Chimie. Merci à mon codirecteur de thèse Michel Rohmer pour ses conseils, sa disponibilité et ses discussions diverses et variées. Merci à mon codirecteur de thèse Roland Stote pour avoir accepté de m'initier à la modélisation moléculaire, pour son aide, sa patience, sa gentillesse et son soutien.

Je remercie les membres de mon jury, Olivier Michielin, Nadia Pellegrini-Moïse, Martine Prévost et Céline Tarnus, qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse et qui me font l'honneur d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier les collègues de travail que j'ai côtoyé durant mes travaux à la paillasse : Aurore D. (sponsorisée par Black&Decker) et Mathilde M. (même si elle chante très mal sur du Balavoine) qui étaient toujours disponibles pour l'apéro, rester tard ou chercher du solvant, Clément G., Nader M., Wen Jun L., Agatha L., Elias S., Jeanne T., Denis T.. Je remercie mes collègues du laboratoire de modélisation moléculaire. Ils m'ont aidée lorsque je me trouvais face à une tête de mort récurrente (les CHARMMistes comprendront) ou quand il m'arrivait de faire planter un programme, souvent de manière surprenante, incompréhensible. Surtout, ils m'ont accompagnée et guidée lors de mon apprentissage. Merci à Annick Dejaegere pour son dynamisme et de m'avoir acceptée dans son équipe. Merci à Jérémy E. pour sa patience, et pour m'avoir apprise à « pseudo-coder ». Merci à Jérôme E. pour sa disponibilité et son aide notamment concernant les ordinateurs. Merci à Karine V. pour son humour et son rire communicatif. Merci à Yasmine C. pour son soutien et ses encouragements (force et honneur !). Merci à Yoann C. pour ses conseils sportifs. Merci à Laurent B. pour ses discussions. Merci à Claude L. pour me dépanner avec des adaptateurs et des câbles en tout genre.

Un grand merci à mes amis (Oriane W., Nico K., Julien H., Elodie H., Laëtitia W., Florence S., Charlotte, Fanny d.T., Marion B., Lucie B., Sophie H., etc.), à mes parents, ma sœur, mon beau-frère, les petits et Elfy et tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin. Vous avez cru en moi, vous m'avez encouragée et soutenue en toutes circonstances. Si ce travail de thèse a pu aboutir, c'est en partie grâce à vous.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| I. Introduction | 5 |
| A. Isoprénoïdes | 6 |
| A.1. Découverte et définition des isoprénoïdes | 6 |
| A.2. Formation des isoprénoïdes..... | 7 |
| A.3. Classification | 8 |
| A.4. Deux voies de biosynthèses des isoprénoïdes..... | 13 |
| A.5. Distribution et évolutions des deux voies de biosynthèses des isoprénoïdes | 13 |
| B. Voie du Mévalonate (MVA)..... | 13 |
| B.1. Découverte de la voie de biosynthèse | 13 |
| B.2 Description générale de la voie de biosynthèse..... | 14 |
| C. Voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP)..... | 15 |
| C.1. Découverte de la voie de biosynthèse..... | 15 |
| C.2. Description générale de la voie de biosynthèse..... | 17 |
| C.3. 1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate Synthase (DXS)..... | 18 |
| C.4 1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate Réductoisomérase (DXR/IspC) | 23 |
| C.5. Observation générale sur les inhibiteurs..... | 47 |
| II. Présentation des objectifs de thèse | 59 |
| III. Structures protéiques et structures de la DXR..... | 63 |
| A. Macromolécules : Les protéines..... | 63 |
| A.1. Les acides aminés et la liaison peptidique..... | 63 |
| A.2. La structure primaire | 65 |
| A.3. La structure secondaire..... | 66 |
| A.4. La structure tertiaire..... | 68 |
| A.5. La structure quaternaire | 68 |
| B. La diffraction aux rayons X..... | 69 |
| C. Structures cristallographiques de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate Réductoisomérase (DXR)..... | 70 |
| IV. Méthodes computationnelles standard | 79 |
| A. Mécanique Moléculaire | 80 |
| A.1. Fonction d'énergie potentielle | 81 |
| A.2 Termes liés..... | 82 |
| A.2. Termes non liés..... | 87 |

| | |
|---|------------|
| A.3. Traitement des liaisons hydrogène..... | 89 |
| A.4. Traitement des interactions longues distances des voisins non liés..... | 89 |
| A.5. Traitement du solvant en dynamique moléculaire..... | 93 |
| A.6. Minimisation de l'énergie d'un système..... | 95 |
| B. Simulation de Dynamique Moléculaire | 99 |
| B.1. Les algorithmes d'intégrations..... | 99 |
| B.1. Simulation de dynamique moléculaire à constantes..... | 106 |
| C. Amarrage moléculaire ou <i>Docking</i> moléculaire..... | 110 |
| C.1. Fonction de score..... | 110 |
| C.2. Définition de la grille de recherche..... | 111 |
| C.3. Algorithme génétique de Lamarckien | 111 |
| D. Génération de paramètres pour de nouveaux ligands | 111 |
| E. Application de l'équation de Poisson-Boltzmann..... | 112 |
| E.1. Principe..... | 112 |
| E.2. Méthode | 113 |
| F. Analyses des simulations de dynamique moléculaire | 115 |
| F.1. Déviation des positions atomique : RMSD..... | 115 |
| F.2. Fluctuation des positions atomique : RMSF..... | 116 |
| V. Etude structurale et énergétique de la DXR | 121 |
| A. Introduction | 121 |
| B. Objectifs | 125 |
| C. Préparation des systèmes | 126 |
| C.1. Modélisation des complexes..... | 126 |
| C.2. Préparation des simulations de dynamique moléculaire..... | 127 |
| D. Résultats et discussion..... | 128 |
| D.1. Identification des acides aminés importants pour la fixation de ligand..... | 128 |
| D.2. Analyses des énergies totales des sites actifs | 131 |
| D.3. Analyses d'efficacité des acides aminés | 137 |
| D.4. Décomposition énergétique par résidu | 139 |
| E. Conclusion..... | 141 |
| VI. Etude comparative des interactions de plusieurs inhibiteurs de la DXR chez trois organismes..... | 147 |
| A. Introduction..... | 148 |
| B. Matériel et méthodes | 153 |
| B.1. Alignement et comparaison de séquences..... | 153 |

| | |
|---|------------|
| <i>B.2. Construction des complexes de l'étude</i> | 153 |
| <i>B.3. Simulations de dynamique moléculaire et d'analyses MM/PBSA</i> | 154 |
| C. Alignement et comparaison de séquences et de structures cristallographiques..... | 155 |
| D. Analyses des contributions d'énergie libre totale par résidu | 160 |
| <i>D.1. Résultats et discussion des analyses MM/PBSA</i> | 161 |
| <i>D.2. Résumé des analyses MM/PBSA</i> | 163 |
| E. Hydratation des complexes | 164 |
| F. Conclusion..... | 170 |
| VII. Etude computationnelle d'analogues phosphates d'inhibiteurs de la DXR | 177 |
| A. Introduction | 177 |
| B. Méthodes..... | 182 |
| <i>B.1. Préparation des complexes pour le Docking</i> | 182 |
| <i>B.2. Préparation des simulations de dynamique moléculaire</i> | 184 |
| C. Résultats et discussion | 185 |
| <i>C.1. Etudes de docking</i> | 185 |
| <i>C.2. Comparaison des inhibitions avec les résultats issus du docking</i> | 186 |
| <i>C.3. Etudes MM/PBSA</i> | 188 |
| <i>C.4. Cas particulier du HX-phos 76 - Implication potentielle de la fonction chélatante</i> | 191 |
| D. Conclusion | 195 |
| VIII. Conception d'inhibiteurs potentiels de la DXR de type bisubstrat et biligand | 203 |
| A. Introduction | 204 |
| B. Le docking ou amarrage moléculaire..... | 206 |
| C. Site actif de la DXR..... | 209 |
| <i>C.1. Caractéristiques et critères</i> | 209 |
| <i>C.2. Détermination de la charge du métal divalent du site actif de la DXR</i> | 210 |
| D. Approche bisubstrat..... | 212 |
| <i>D.1. Méthodes</i> | 215 |
| <i>D.2. Résultats et discussion</i> | 216 |
| <i>D.3. Conclusion approche bisubstrat</i> | 224 |
| E. Approche biligand | 225 |
| <i>E.1. Méthodes</i> | 226 |
| <i>E.2. Première méthode : Etude à partir de fragments</i> | 227 |
| <i>E.3. Deuxième méthode : construction à partir de fragments commerciaux</i> | 238 |
| <i>E.4. Conclusion Approche biligand</i> | 244 |
| F. Conclusion générale..... | 244 |

| | |
|--|------------|
| IX. Etudes d'affinités et synthèses de potentiels inhibiteurs de la DXR de type α,α-difluoro phosphonate | 251 |
| A. Introduction..... | 252 |
| B. Etudes d'affinités par analyses de Docking..... | 256 |
| <i>B.1. Méthode - Préparation du docking</i> | 256 |
| <i>B.2. Résultats</i> | 257 |
| <i>B.3. Conclusion de l'analyse</i> | 260 |
| C. Etudes d'affinité par analyses MM/PBSA..... | 261 |
| <i>C.1. Méthodes - Préparation des systèmes</i> | 261 |
| <i>C.2. Résultats et discussion</i> | 261 |
| <i>C.3. Conclusion des analyses MM/PBSA</i> | 267 |
| D. Synthèses des analogues de type acide α,α -difluoro phosphonate hydroxamique..... | 268 |
| <i>D.1 Introduction successive des atomes de fluor</i> | 269 |
| <i>D.2 Introduction directe des deux atomes de fluor : 1^{ère} tentative</i> | 274 |
| <i>D.3 Introduction directe des deux atomes de fluor : 2^{ème} tentative</i> | 279 |
| <i>D.4. Conclusion des synthèses organiques</i> | 288 |
| E. Conclusion générale..... | 289 |
| X. Synthèse d'un analogue époxyde du désoxy-D-xylulose 5-phosphate | 297 |
| A. Introduction..... | 298 |
| <i>A.1 Etude du mécanisme réactionnel de la DXR</i> | 298 |
| <i>A.2. Inhibition irréversible potentielle chez la DXR</i> | 301 |
| B. Première approche de synthèse de l'analogue époxyde..... | 302 |
| <i>B.1. Résultats et discussion</i> | 303 |
| <i>B.2. Conclusion</i> | 312 |
| C. Seconde approche de synthèse de l'analogue époxyde du DXP..... | 313 |
| <i>C.1. Résultats et discussion</i> | 314 |
| <i>C.2. Conclusion</i> | 316 |
| D. Conclusion générale..... | 316 |
| XI. Développement d'une méthode de synthèse des D- et L- glycéraldéhyde 3-phosphates énantiomériquement purs | 321 |
| A. Le D-Glycéraldéhyde 3-phosphate, une molécule indispensable..... | 322 |
| <i>A.1. La glycolyse</i> | 322 |
| <i>A.2. La gluconéogenèse</i> | 323 |
| <i>A.3. Réaction catalysée par la DXS</i> | 325 |
| B. Etudes d'énantiosélectivité réalisées sur la DXS et objectifs..... | 325 |

| | |
|--|------------|
| C. Précédentes synthèses de GAP | 326 |
| D. Synthèses énantiosélectives développées au laboratoire | 330 |
| <i>D.1. Rétrosynthèse.....</i> | <i>332</i> |
| <i>D.2. Résultats et discussions</i> | <i>333</i> |
| <i>D.3. Réduction régiosélective d'un benzyle acétal : premiers essais.....</i> | <i>334</i> |
| <i>D.4. Mécanismes envisagés.....</i> | <i>336</i> |
| <i>D.5. Les lanthanides : une famille particulière.....</i> | <i>337</i> |
| <i>D.6. Réduction régiosélective d'un acétal de benzylidène en présence de Lanthanide.....</i> | <i>344</i> |
| <i>D.8. Poursuite de la synthèse.....</i> | <i>351</i> |
| <i>D.9. Conservation du centre stéréogène : Esters de Mosher</i> | <i>352</i> |
| <i>D.10. Activité optique des alcools primaires R- et S-249.....</i> | <i>354</i> |
| E. Conclusion..... | 355 |
| XII. Conclusion générale | 363 |
| XIII. Experimental part..... | 369 |
| Synthesis of α,α -difluoro phosphonate inhibitors of the DXR..... | 370 |
| Synthesis of an epoxide analog of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate | 391 |
| Development of a synthesis enantiomerically pure of D- and L-glyceraldehyde 3-phosphate... | 405 |
| Annexes | 413 |

Abréviations

| | |
|----------------|--|
| 9-BBN | 9-Borabicyclo(3.3.1)nonane |
| -I | Inductif attracteur |
| +I | Inductif donneur |
| +M | Mésomère donneur |
| Å | Angströme |
| ABNR | Adopted-basis Newton Raphson |
| Ac | Acétyle |
| AE (EA) | Acétate d'éthyle |
| AL | Acide de Lewis |
| Ala | Alanine |
| aq. | Aqueux |
| Ar | Aryle |
| Arg | Arginine |
| Asn | Asparagine |
| Asp | Acide aspartique |
| BAIB | [bis(acetoxy)iodo]benzène |
| Bn | Benzyle |
| Bu | Butyle |
| cAMP | Adénosine monophosphate cyclique |
| cat. | Catalytique |
| Cbz | Carboxybenzyle |
| CCM | Chromatographie sur couche mince |
| CDI | Carbonyldiimidazole |
| CHARMM | Chemistry of Harvard molecular mechanics |
| Cys | Cystéine |
| DCM | Dichlorométhane |
| DDQ | 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone |
| dif | Difluoré |
| DMAP | Diméthylaminopyridine |
| DMAPP | Diméthylallyl-pyrophosphate |
| DMF | Diméthylformamide |
| DMP | Périodinane de Dess-Martin |
| DMPU | 1,3-Diméthyl-3,4,5,6-tétrahydro-2(1H)-pyrimidinone |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| DXP | 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate |
| DXR | 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase |
| DXS | 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase |
| Ec | Escherichia coli |
| ee | Excès énantiomérique |
| EP (PE) | Ether de pétrole |

| | |
|---------------|---|
| eq | Equivalent(s) |
| ESI-MS | Spectrométrie de masse par ionisation à électrospray |
| Et | Ethyle |
| Fom | Fosmidomycine |
| Fos | Fosfoxacine |
| Fr | Fr-900098 |
| GAP | Glycéraldéhyde 3-phosphate |
| GBSA | Generalized Born Surface Area |
| Gln | Glutamine |
| Glu | Acide glutamique |
| Gly | Glycine |
| GP | Groupe protecteur |
| His | Histidine |
| HOMO | Orbitale moléculaire la plus haute occupée |
| HR-MS | Spectrométrie de masse à haute résolution |
| hx | Hydroxamique/hydroxamate |
| Hz | Hertz |
| id | Identité |
| IEX | Résine échangeuse d'ions |
| Ile | Isoleucine |
| IPP | Isopentényl-pyrophosphate |
| iPr | Isopropyle |
| IR | (Spectroscopie) infrarouge |
| LDA | Diisopropylamide de lithium |
| Leu | Leucine |
| Ln | Lanthanide |
| LUMO | Orbitale moléculaire la plus basse vacante |
| Lys | Lysine |
| m-CPBA | Acide <i>m</i> éta-chloroperbenzoïque |
| MD | Dynamique moléculaire |
| Me | Méthyle |
| MEP | 2-C-méthylérythritol-4-phosphate |
| Met | Méthionine |
| MM | Mécanique moléculaire |
| Ms | Mycobactérium smegmatis |
| Mt | Mycobactérium tuberculosis |
| MTPACl | Chlorure d' α -méthoxy- α -trifluorophénylacétyle |
| MUT | Mutant |
| NADH | Nicotinamide adénine dinucléotide |
| NADPH | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NAMD | Nanoscale molecular Dynamics |
| NFSI | <i>N</i> -fluoro-di(benzènesulfonyl)amine |
| NMO | <i>N</i> -Methylmorpholine <i>N</i> -oxyde |
| Nu (-) | Nucléophile |
| NVE | Ensemble thermodynamique microcanonique |
| NVT | Ensemble thermodynamique canonique |

Abréviations

| | |
|--------------------|--|
| OH-I | Alcool primaire |
| OH-II | Alcool secondaire |
| Otf | Trifluorométhylsulfonate |
| PBC | Periodic boundary condition |
| PBSA | Poisson Boltzmann Surface Area |
| PDB | Protein data Bank |
| Pf | Plasmodium falciparum |
| Ph | Phényle |
| Phe | Phénylalanine |
| PMB | <i>Para</i> -méthoxybenzyle |
| PME | Particle Mesh Ewald |
| Pro | Proline |
| QM | Mécanique quantique |
| Quant. | Rendement quantitatif |
| rd | Ratio diastéréoisomérique |
| régio. | Régiosélectivité |
| rfx | Reflux |
| rhx | rétro-hydroxamique/hydroxamate |
| RMN | Résonance magnétique nucléaire |
| RMSD | Root mean square deviation |
| RMSF | Root mean square fluctuation |
| SASA | Surface accesible solvent area |
| Selectfluor | 1-chlorométhyl-4-fluoro-1,4-diazoniabi-cyclo [2,2,2] octane bis(tétrafluoroborate) |
| Ser | Sérine |
| ST | Steepest descent |
| t.a. | Température ambiante |
| TBAF | Fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium |
| TBDMS | <i>Tert</i> -butyldiméthylsilyle |
| <i>t</i>Bu | <i>Tert</i> -butyle |
| TIP3P | Transferable Intermolecular Potential |
| TEA | Triméthylamine |
| THF | Tétrahydrofurane |
| Thr | Thréonine |
| TMS | Triméthylsilane |
| TPP | Thiamine pyrophosphate |
| Trp | Tryptophane |
| Tyr | Tyrosine |
| UB | Urey-Bradley |
| UHBD | University of Houston Brownian Dynamics |
| UV | Ultraviolet |
| Val | Valine |
| VLDP | Voronoi Laguerre Delaunay Protein |
| WT | Sauvage, natif, "wild type" |

I. Introduction

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| A. Isoprénoïdes | 6 |
| A.1 Découverte et définition des isoprénoïdes | 6 |
| A.2 Formation des isoprénoïdes | 7 |
| A.3 Classification | 8 |
| A.4 Deux voies de biosynthèses des isoprénoïdes | 13 |
| A.5 Distribution et évolutions des deux voies de biosynthèses des isoprénoïdes | 13 |
| B. Voie du Mévalonate (MVA) | 13 |
| B.1 Découverte de la voie de biosynthèse..... | 13 |
| B.2 Description générale de la voie de biosynthèse | 14 |
| C. Voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP)..... | 15 |
| C.1 Découverte de la voie de biosynthèse | 15 |
| C.2 Description générale de la voie de biosynthèse..... | 17 |
| C.3 1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate Synthase (DXS) | 18 |
| <i>C.3.1 Découverte et description de la DXS.....</i> | <i>18</i> |
| <i>C.3.2 Mécanisme de la réaction catalysée par la DXS.....</i> | <i>21</i> |
| <i>C.3.3 Exemples d'inhibiteurs connus de la DXS.....</i> | <i>21</i> |
| C.4 1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate Réductoisomérase (DXR/IspC)..... | 23 |
| <i>C.4.1 Découverte et description de la DXR.....</i> | <i>23</i> |
| <i>C.4.2 Mécanisme de la réaction catalysée par la DXR</i> | <i>27</i> |
| <i>C.4.3 Inhibition de la DXR – résistance et biodisponibilité de la fosmidomycine.....</i> | <i>32</i> |
| <i>C.4.4 Inhibition de la DXR – Mode d'inhibition de la DXR par fosmidomycine</i> | <i>34</i> |
| <i>C.4.5 Inhibition de la DXR – quelques exemples</i> | <i>35</i> |
| C.5 Observation générale sur les inhibiteurs..... | 47 |

A. Isoprénoïdes

A.1. Découverte et définition des isoprénoïdes

Les isoprénoïdes, également connus sous le nom de terpénoïdes, sont des molécules organiques naturelles présentes chez tous les êtres vivants. Ils font partis de la classe des métabolites secondaires et remplissent des fonctions plus ou moins cruciales. L'origine de leur nom découle de l'isoprène, petites molécules à cinq atomes de carbone. Ils proviennent tous de l'auto-assemblage de deux motifs : l'isopentényle de diphosphate (IPP) **1** et le diméthylallyle de diphosphate **2** (Schéma 1).



Schéma 1: Isopentényle de diphosphate (IPP) **1** et diméthylallyle de diphosphate (DMAPP) **2**, composés précurseurs des isoprénoïdes.

Ces deux sous unités isopréniques vont s'assembler de différentes manières et subir différentes modifications chimiques pour conduire à un vaste catalogue de plus de 30 000 molécules d'isoprénoïdes connues à ce jour.¹ Cette observation a été faite, pour la première fois, par Otto Wallach (1847-1931), chimiste allemand.² Il écrivit plus de 150 publications sur les isoprénoïdes et reçut le prix Nobel en 1910 pour ses travaux sur les composés alicycliques.^{3,4} Il avait remarqué que des produits, issus d'huiles de plantes, pouvaient être fragmentés en chaînons à cinq atomes de carbone. Le nom historique de terpène fait référence à l'arbre pistachier térébinthe (*Pistacia terebinthus*), connu dans tout le bassin méditerranéen, et d'où était à l'origine extraite l'essence de térébenthine à partir de ses exsudats.⁵

A.2. Formation des isoprénoïdes

Les isoprénoïdes se forment généralement, d'après la règle de Ruzicka (1953), par assemblage répétitif « tête à queue » entre l'IPP **1** et le DMAPP **2** suivi d'éventuelles modifications enzymatiques.⁶ La clé de ces réactions de condensation successives vient du caractère nucléophile de la double liaison terminale de l'IPP **1**. Les électrons de cette double liaison vont être capables d'attaquer le carbone allylique du DMAPP **2**, porteur du groupe partant phosphate. Cette étape engendre un carbocation qui va ensuite récupérer un électron par l'élimination d'un proton, conduisant à la formation du monoterpène **3** (Schéma 2). Notez qu'il existe une isomérase, enzyme capable d'isomériser l'IPP en DMAPP, si nécessaire.⁷

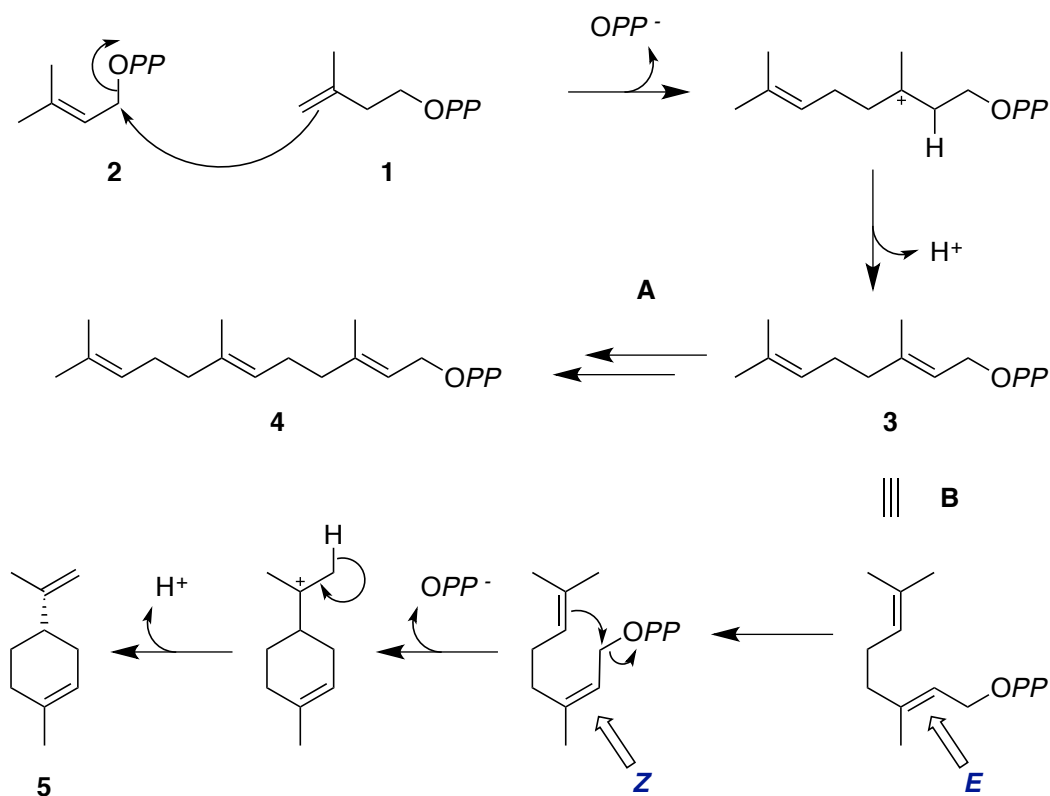


Schéma 2: A) Condensation successive de trois sous unités isopréniques conduisant à la formation du diphosphate de farnésyle **4**, un sesquiterpène ; B) isomérisation de la double liaison en configuration *Z*, et cyclisation du monoterpène conduisant au (+)-limonène **5**.

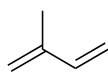
De la même façon, les condensations peuvent se poursuivre sur le diphosphate de géranyle **3** pour former, par exemple, le diphosphate de farnésyle **4** du groupe des sesquiterpènes (Schéma 2, voie A.), et ainsi de suite. Le monoterpène **3** peut subir des modifications structurales ou chimiques pour devenir plus spécifique, afin de répondre à un besoin biologique particulier. Par exemple, dans le cas de la voie B, une enzyme peut isomériser la double liaison, *E* vs. *Z*, permettant l'attaque nucléophile des électrons de l'alcène sur le carbone allylique porteur du groupement diphosphate et ainsi la cyclisation du monoterpène (Schéma 2).⁸ Dans un système biologique, cette succession d'étapes conduirait à la formation du (+)-limonène **5**.

A.3. Classification

Pour mieux distinguer les isoprénoïdes, ils ont été classés en fonction du nombre de sous unités d'isoprènes qui les composent. Dans l'ordre de complexité croissante du squelette carboné, nous trouvons, les hémiterpènes (C_5), les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les sesterterpènes (C_{25}), les triterpènes (C_{30}), les tétraterpènes (C_{40}) et les polyterpènes ($C_{n>40}$), qui englobent les isoprènes à plus de huit sous unités. Bien sûr, beaucoup de molécules vont avoir un nombre de carbones différents de celui du groupe auquel elles appartiennent. Cela est dû aux modifications spécifiques qu'elles ont subi pour pouvoir répondre aux besoins biologiques. Nous allons brièvement décrire ces différents groupes et, pour un peu de culture et de distraction, citer quelques exemples.

Hémiterpènes**C₅**

Une seule unité isoprénique

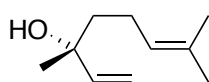
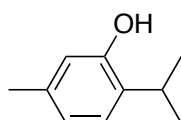


Isoprène

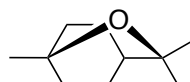
L'isoprène est un hémiterpène, produit incolore liquide et volatil. Il est produit et émis par beaucoup de plantes. Il est utilisé dans l'industrie chimique pour la fabrication de caoutchouc synthétique. Relâché dans l'atmosphère, c'est un polluant au même titre que le CO₂.

Monoterpènes**C₁₀**

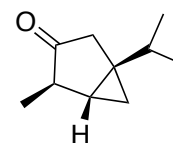
Deux sous-unités isopréniques

*(R)*-(-)-Linalool

Thymol



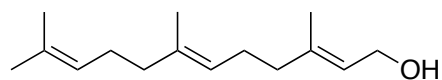
Eucalyptol

(-)- α -Thujone

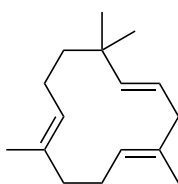
Le **(*R*)-(-)-linalool** se retrouve chez plus de 200 espèces de plantes et ses deux énantiomères sont produits dans la nature. Le **thymol** est connu pour ses propriétés antimicrobiennes. Combiné à de la pénicilline, il peut aider à diminuer la résistance bactérienne.⁹ L'**eucalyptol** est le composant majoritaire de l'huile essentielle d'eucalyptus et est un bon répulsif à insectes. La **(-)- α -thujone** est la molécule considérée comme responsable des effets hallucinogènes que l'on attribuait, à l'époque, à l'absinthe (elle est maintenant limitée à 35mg/L).^{10,11}

Sesquiterpènes**C₁₅**

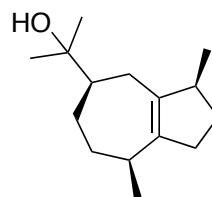
Trois sous-unités isopréniques



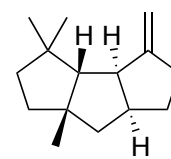
Farnésol



Humulène



Guaiol

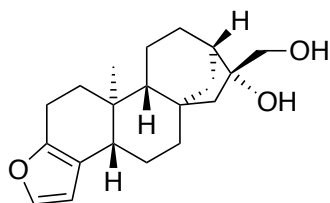


Capnellène

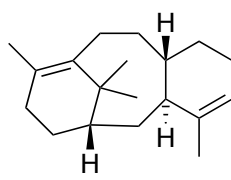
Le **farnésol** a été nommé à partir l'arbre *Vachellia farnesiana*, dont la fleur était utilisée en parfumerie. Il se retrouve dans la conception de déodorants pour ses propriétés antibactériennes.¹² Nous retrouvons l'**humulène** dans le houblon. Sa teneur varie selon la variété, ce qui va apporter plus ou moins d'arôme lors du brassage de la bière. Le **guaiol** est un des sesquiterpènes bicycliques, avec les β - et γ -eudesmols, majoritaires chez les plants de *Cannabis sativa*.¹³ Le **capnellène** est extrait de coraux (*Capnella imbricata*), se trouvant en Indonésie. Certain de ses dérivés alcooliques ont montré des propriétés anti-tumorales et neuro-inflammatoires.^{14,15}

Diterpènes**C₂₀**

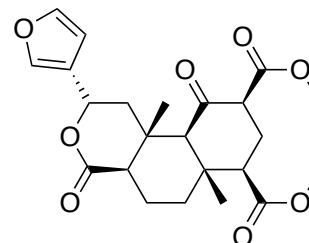
Quatre sous-unités isopréniques



Cafestol



Taxadiène

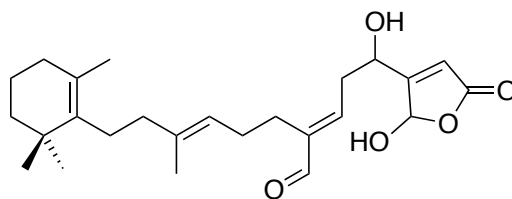


Salvinorine A

Le **cafestol**, qui se trouve dans les graines de *Coffea sp.*, est présent en grande quantité dans les préparations de cafés non filtrées (*i.e.* « cafetière à piston », appelé *caffettiera a stantuffo* en Italie, ou le café turc, en préparation ottomane). Il a montré des propriétés neuroprotectives dans des essais contre la maladie de Parkinson.¹⁶ Le **taxadiène** est le premier intermédiaire de la biosynthèse du taxol, puissant anticancéreux.¹⁷ La **salvinorine A** est la molécule active de la plante *Salvia divinorum* du Mexique, utilisée par les chamanes Mazatèques de la région d'Oaxaca, lors de leurs rituels. C'est un puissant psychotrope qui provoque des hallucinations. Des études ont montré qu'il pourrait avoir des propriétés analgésiques et servir dans le traitement des addictions à certaines drogues.

SesterterpènesC₂₅

Cinq sous-unités isopréniques

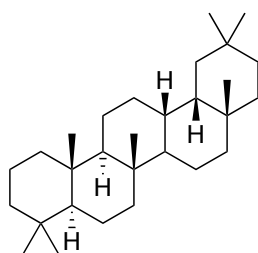


Sécomanoalide

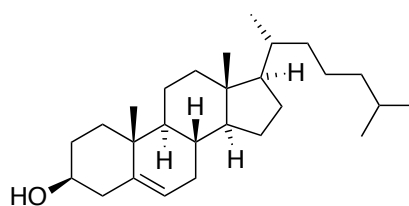
Le **sécomanoalide** provient d'une éponge marine, *Luffariella variabilis*, de la république des Palaos en Micronésie. Cette molécule possède une activité antibactérienne contre les bactéries Gram positive *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* mais est inactive contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*.¹⁸ Beaucoup de sesterterpènes recensés proviennent d'éponges marines (i.e. *Thorectandra* sp., *Fascaplysinopsis* sp., *Fasciospongia cavernosa*).¹⁹

TriterpènesC₃₀

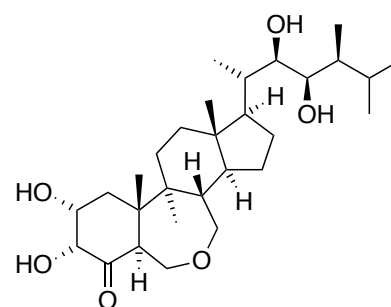
Six sous-unités isopréniques



Oléanane



Cholestérol

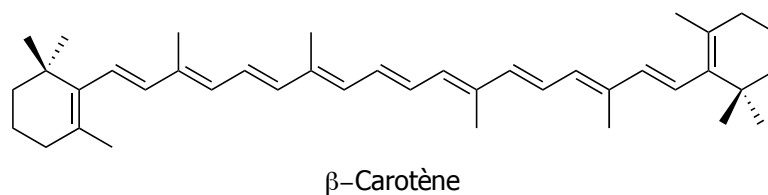


Brassinolide

Le squelette de l'**oléanane** est rencontré chez les plantes à fleurs et sert de base pour la conception de tout un panel de molécules. L'étude des collections de ces molécules a permis de connaître l'évolution des angiospermes.²⁰ Le **cholestérol**, molécule bien connue, sert à moduler la fluidification et la perméabilité de la membrane plasmique chez les animaux en s'intercalant entre les phospholipides. Le **brassinolide** est une hormone de croissance végétale.²¹

Tétraterpènes**C₄₀**

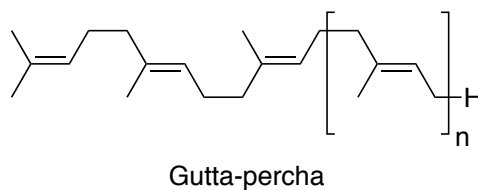
Huit sous-unités isopréniques



Le **β-carotène**, précurseur de la vitamine A, est un pigment de couleur rouge-orangé, très abondant dans les plantes et les fruits. Il est utilisé comme colorant alimentaire sous l'appellation E160a. Une surconsommation d'aliments contenant du β-carotène peut conduire à une caroténodermie, surtout chez les enfants, les végétariens ou chez les personnes ayant des problèmes de métabolisations.²²

Polyterpènes**C_n**

Plus de huit sous-unités isopréniques



Comme polymère du groupe des polyterpènes, nous pouvons citer le latex **gutta-percha**. Contrairement au caoutchouc naturel, son isomère *cis*, ce polymère *trans*-1,4-polyisoprène est plus rigide et moins élastique à température ambiante.

A.4. Deux voies de biosynthèses des isoprénoïdes

Les sous-unités isopréniques d'IPP et de DMAPP, à l'origine de cette grande diversité chimique et biologique de molécules, peuvent être obtenues selon deux voies : la voie du mévalonate (MVA) et la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP).

A.5. Distribution et évolution des deux voies de biosynthèses des isoprénoïdes

La voie du MVA apparaît chez les champignons, dans le cytoplasme des plantes, chez les animaux, chez les archéobactéries et chez quelques bactéries. La voie du MEP est présente chez la majeure partie des bactéries, incluant les pathogènes, dans les chloroplastes des plantes, chez les algues vertes unicellulaires et chez certains parasites eucaryotes.²³

B. Voie du Mévalonate (MVA)

B.1. Découverte de la voie de biosynthèse

La voie du mévalonate, présente chez l'homme, est la voie de biosynthèse des isoprénoïdes la plus connue. Tout a débuté grâce aux études de Bloch concernant la biosynthèse du cholestérol, pour lesquels il obtenu un prix Nobel en 1964.^{24, 25, 26} De nombreux travaux en ont découlé durant les deux décennies qui ont suivi, dont nous pouvons citer par exemple l'équipe de Lynen.^{27, 28}

B.2 Description générale de la voie de biosynthèse

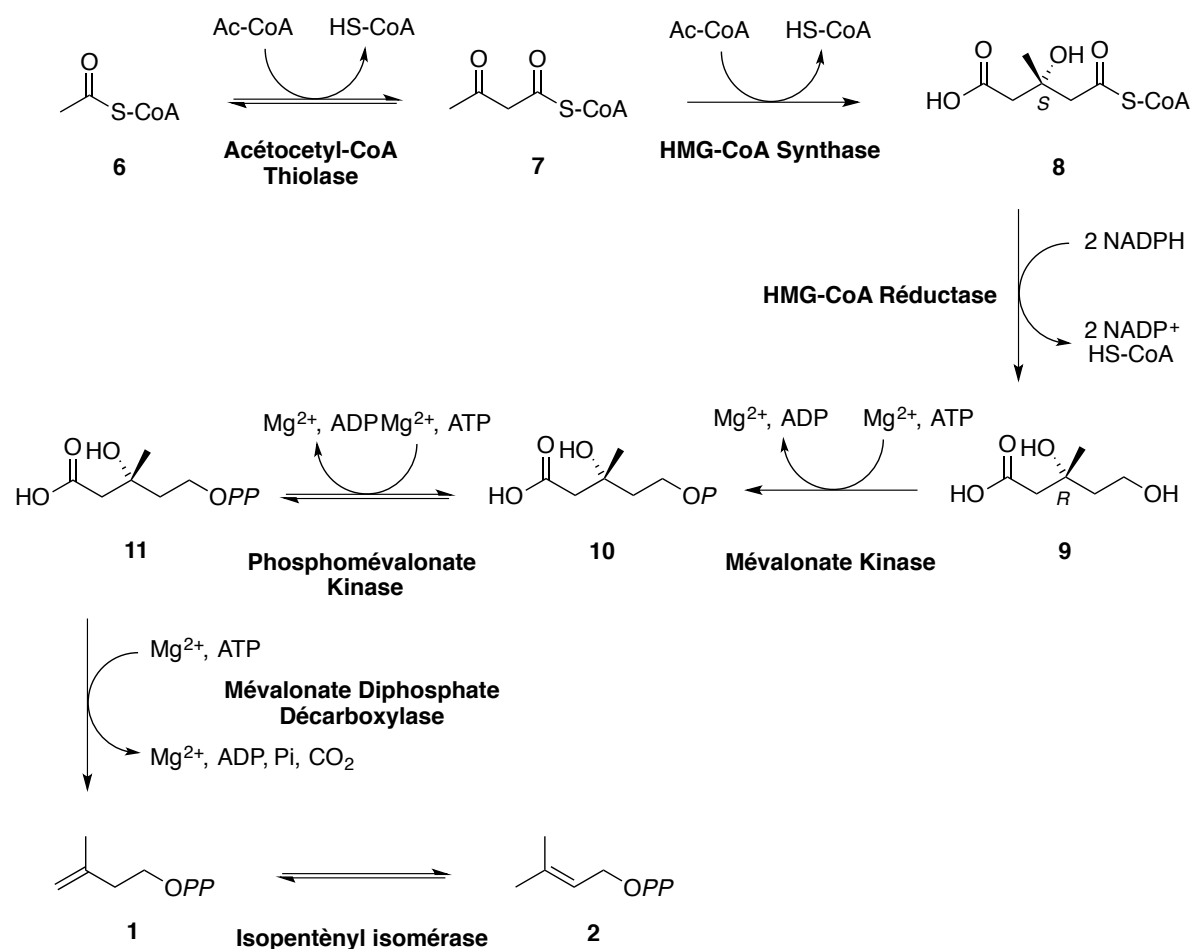


Schéma 3: Voie de biosynthèse des unités isopréniques selon la voie du mévalonate.²⁹

La première réaction enzymatique de la voie du mévalonate implique une thiolase qui effectue une condensation de Claisen en faisant réagir une première molécule d'acétyl Coenzyme A **6** (Ac-CoA), sur une seconde, conduisant à la formation de l'acétoacétyl-CoA **7** (Lynen *et al.*, 1952). Le (*S*)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) **8** est issu de la condensation d'Ac-CoA sur le composé **7** en présence de l'enzyme HMG-CoA synthase.³⁰ HMG-CoA réductase effectue ensuite deux réductions successives du thioester HMG-CoA **8**, à l'aide de deux équivalents de cofacteurs nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Cette étape va conduire à la formation du mévalonate **9**. Les deux prochaines réactions enzymatiques vont faire intervenir successivement deux kinases à la suite.

Ces enzymes catalysent les phosphorylations par transfert d'un ion phosphate provenant de l'adénosine triphosphate (ATP) vers un substrat. La mévalonate kinase va catalyser le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP, en présence d'un dication métallique Mg^{2+} , sur l'hydroxyle en position C-5 du mévalonate **9**.³¹ Il peut être intéressant de noter que deux des inhibiteurs connus de cette enzyme sont le géranyle de diphosphate **3** et le farnésyle de diphosphate **4**.³² De la même manière, la phosphomévalonate kinase permet la production du mévalonate 5-diphosphate **11**, à la différence que cette réaction peut être réversible. L'étape régie par la mévalonate diphosphate décarboxylase, en présence d'ATP et d'un dication métallique Mg^{2+} , va provoquer un dégagement de dioxyde de carbone et former l'IPP **1**.³³ Par la suite, l'isopentényle isomérase permettra de passer de l'IPP **1** au DMAPP **2**.

C. Voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP)

C.1. Découverte de la voie de biosynthèse

Longtemps, la voie du MVA a été considérée comme la seule voie de biosynthèse des isoprénoïdes. A partir des années 50, des études réalisées sur la formation des isoprénoïdes dans les compartiments cellulaires chez les végétaux vinrent y semer le doute. Certaines études, sur la formation photosynthétique d'isoprénoïdes chez des plantes et des algues impliquant des substrats marqués au ^{14}C , présentèrent des résultats inattendus.³⁴ Ils étaient en désaccord avec la voie du MVA. De plus, l'inhibition de la HMG-CoA par son inhibiteur spécifique, la mévinoline, inhibe bien l'accumulation de stérol et d'ubiquinone dans le cytosol. Par contre elle n'a aucun impact sur l'accumulation de phytols, caroténoïdes et de plastoquinone dans les chloroplastes.³⁵ Les résultats de ses travaux expérimentaux, *in vitro* ou *in vivo*, n'ont pas réussi à détecter la moindre présence d'enzymes de la voie du mévalonate dans les chloroplastes (Garcia-Peregrin *et al.* 1973 ; Buggy *et al.* 1974, Brooker et Russel 1975 ; Bickel et Schultz 1976 ; Grumbah et Forn 1980 ; Kreutz et Kleinig 1981 ; Wong *et al.* 1982 ; Arebalo et Mitchell 1984 ; Schindler *et al.* 1986 ; Lütke-Brinkhaus et Kleinig 1987).

A ce stade, il n'était pas possible de savoir avec certitude si la présence d'isoprénoïdes dans les chloroplastes était due à des mécanismes de transports entre compartiments, à des méthodes inadaptées de détection ou à une nouvelle voie de biosynthèse. Des travaux réalisés sur la biosynthèse des hopanoïdes bactériens ont permis d'explicitier ces observations expérimentales et de découvrir le pot-aux-roses. Pour identifier l'origine de la chaîne latérale rattachée au squelette carboné des molécules hopanoïdes, des expériences d'incorporation chez les bactéries d'acétate marqué au ^{13}C soit en C-1, soit en C-2, ont été réalisées.³⁶ Les résultats expérimentaux obtenus diffèrent de ceux attendus en suivant la voie du MVA. Enfin l'incorporation de glucose doublement marqué [4,5- ^{13}C -2] dans des hopanoïdes et/ou ubiquinones de plusieurs bactéries (*Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Methylobacterium fujisawaense* et *Alicyclobacillus acidoterrestris*) confirmèrent ses résultats, ne laissant plus aucun doute à l'existence d'une seconde voie de biosynthèse des isoprénoïdes.³⁷ L'incorporation de glucose ou de pyruvate marqué au ^{13}C , sur des mutants d'*E. coli* incapables de métaboliser la voie des trioses phosphate, a permis de montrer par l'analyse de l'ubiquinone Q8, que le pyruvate et le glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) sont les précurseurs. L'étude de la série des hopanoïdes chez *Zymomonas mobilis* a également montré qu'ils sont les uniques précurseurs du squelette en C₅ isopréniques de la voie du non-mévalonate.³⁸ La présence d'une compartimentation chez les plantes a été découverte par Argon et son équipe. Ils ont étudié l'incorporation de glucose marqué chez les ginkgolides, diterpènes hexacycliques que l'on retrouve chez *Ginkgo biloba*, arbre considéré comme étant une espèce panchronique.³⁹ Leurs résultats ont démontré que la formation des composés provient d'un réarrangement qui ne pouvait être issu de la voie du mévalonate. Ils ont découvert que les stérols produits par *G. biloba* sont préférentiellement synthétisés par la voie du mévalonate, alors que les ginkgolides le sont par une autre voie, celle impliquant la formation de MEP. Ils ont également mis en évidence une compartimentation de fabrication des isoprénoïdes où la voie du mévalonate s'opère dans le cytoplasme et la voie du MEP dans les plastes (*i.e.* chloroplaste). Il existe une communication entre ces compartiments permettant des échanges et régulations dont le processus est pour le moment inconnu. Cette découverte a pu être généralisée à l'ensemble des plantes supérieures.

Le nom de cette nouvelle voie de biosynthèse des isoprénoïdes, la voie du MEP, a été proposé au 4^e congrès TERPNET de Barcelone, en 1999 (congrès international de la recherche sur les terpènes et les isoprénoïdes). En effet, le 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP), est le premier composé de la voie à posséder un squelette à cinq atomes de carbones. Il fait donc partie du groupe des hémiterpènes et il est le premier intermédiaire uniquement impliqué dans la biosynthèse des isoprénoïdes.⁴⁰

C.2. Description générale de la voie de biosynthèse

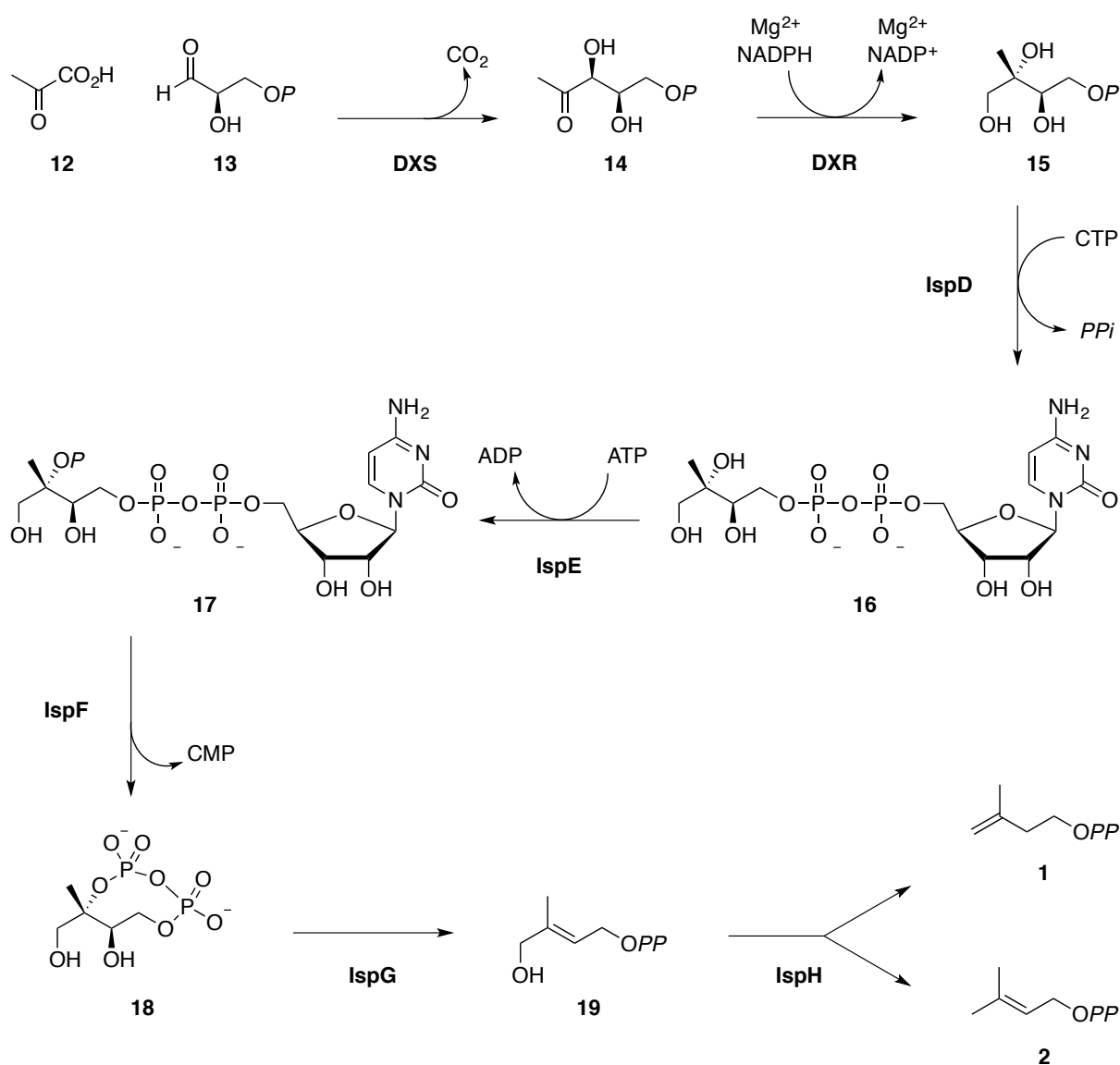


Schéma 4: Voie de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP via la voie du MEP.

La voie du MEP débute par la condensation du pyruvate **12** et le D-glycéraldéhyde 3-phosphate **13**, catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS), une enzyme diphosphate de thiamine dépendante (TDP), conduisant à une décarboxylation du pyruvate et à la formation de 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) **14**. Intervient ensuite la protéine 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR/IspC), qui, en présence d'un cation métallique divalent (*i.e.* Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺), effectue un réarrangement du DXP **14** suivi d'une réduction concomitante, réalisée par le cofacteur NADPH, afin d'obtenir la molécule de MEP **15**. Ces deux premières étapes enzymatiques (DXS et DXR) seront revues plus en détails par la suite. Le coenzyme cytidine triphosphate (CTP) est ensuite couplé au MEP **15** par la méthylérythritol cytidyl diphosphate synthase (IspD/YgbP) conduisant au produit **16** qui est phosphorylé par l'enzyme IspE, en présence d'ATP, pour donner le 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol-2-phosphate **17** (CDP-MEP). Il s'en suit une cyclisation catalysée par la protéine IspF pour conduire au 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclo-diphosphate **18** (MEcPP). La réduction du cycle de la molécule MEcPP **18** est réalisée par la 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate réductase (IspG/GcpE), protéine à cluster [4Fe-4S], pour conduire au 4-hydroxyl-3-méthyl-butényl 1-diphosphate **19** (HMBPP). Enfin, la dernière enzyme de cette voie, la 4-hydroxyl-3-méthyl-butényl 1-diphosphate réductase (IspH/LytB), également protéine à cluster [4Fe-4S], convertit HMBPP **19** soit en IPP **1**, soit en DMAPP **2**.

Dans la suite de cette partie, nous allons voir plus en détails les deux premières enzymes de la voie du MEP.

C.3. 1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate Synthase (DXS)

C.3.1. Découverte et description de la DXS

La DXS a été pour la première fois isolée et caractérisée de souches d'*E. coli*. par l'équipe de Sahm.⁴¹ C'est une protéine dépendante au cofacteur thiamine pyrophosphate (TPP) qui possède un cation divalent métallique non participatif dans son site actif (Mg²⁺, Mn²⁺).

I. Introduction

Cette enzyme TPP-dépendante catalyse la formation du DXP **14** via la condensation du pyruvate **12** avec le D-glycéraldéhyde 3-phosphate (D-GAP) **13**. La DXS est une protéine se présentant cristallisée sous forme d'homodimère d'environ 67 kD, dont chaque monomère peut être divisé en trois domaines (Figure 1).⁴²

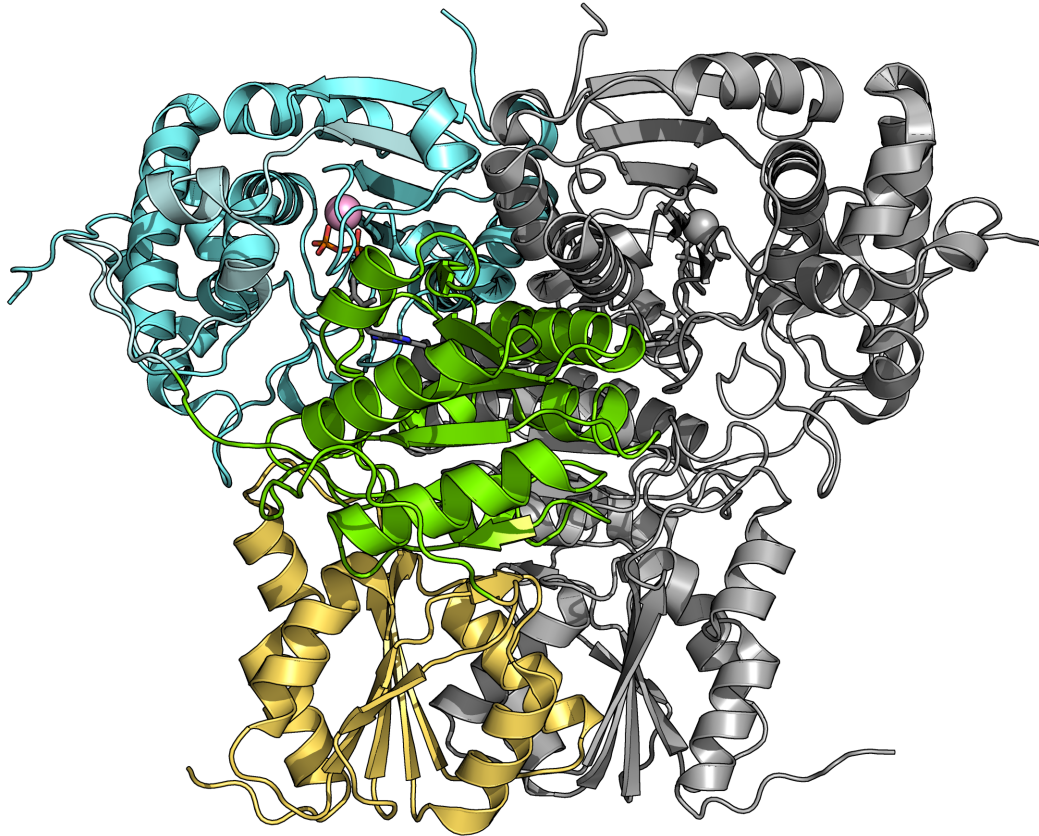


Figure 1: Représentation cristallographique d'un homodimère de la DXS de chez *Deinococcus radiodurans*, bactérie poly-extrémophile, (PDBid : 2O1X). Les trois domaines d'un monomère sont représentés en trois couleurs différentes : en bleu le domaine I (résidus 1 à 319), en vert le domaine II (résidus 320 à 495), en jaune le domaine III (résidus 496 à 629). Le deuxième monomère est représenté en gris pour plus de visibilité. Les cations métalliques Mg^{2+} sont représentés par des sphères et les cofacteurs TPP par des bâtonnets.

Son site actif est localisé à l'interface des domaines I et II. Le TPP est enfoui dans la protéine, de telle sorte que seul son cycle thioazolium, et plus particulièrement son carbone en position C-2, soient accessibles (Figure 2).

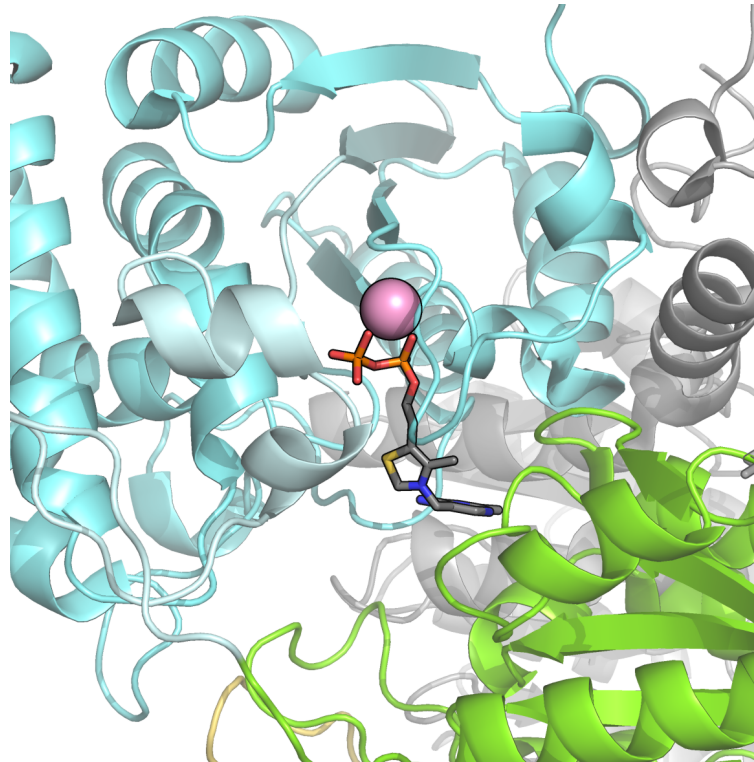


Figure 2: Site actif de la DXS (PDBid : 201X). En représentation bâtonnets apparaît le TPP et en sphère le Mg^{2+} . Les couleurs représentent les domaines décrits pour la Figure 1.

Cette conformation n'est pas anodine au vu de la participation de ce carbone lors de la réaction enzymatique. Le TPP est bien maintenue dans la protéine, notamment par de nombreuses interactions électrostatiques au niveau de sa fonction diphosphate, laquelle interagit également avec un cation divalent métallique (Mg^{2+} , Mn^{2+}). A ce jour, il n'existe pas de structure cocrystallisée avec le D-GAP dans le site actif de la protéine.

Il est intéressant de noter que le produit issu de la réaction enzymatique de la DXS, le DXP **14**, précurseur de l'IPP et du DMAPP, est également le précurseur des vitamines B1 et B6 chez certaines bactéries.^{43,44}

C.3.2. Mécanisme de la réaction catalysée par la DXS

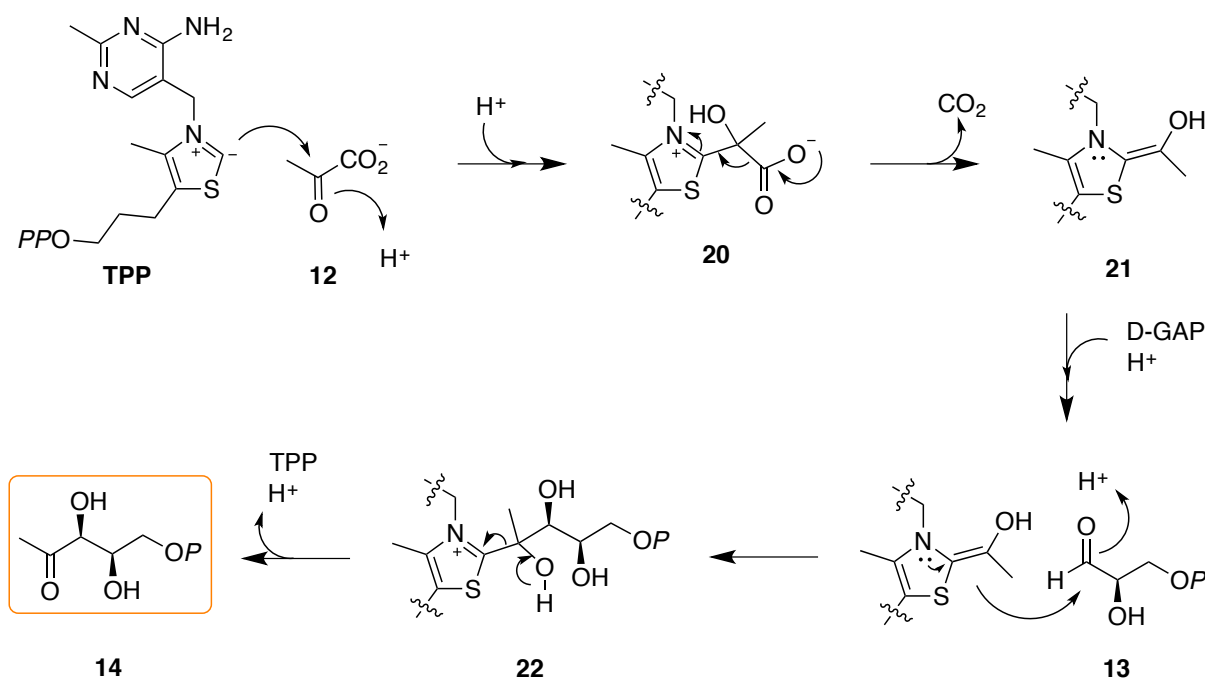


Schéma 5: Réaction enzymatique catalysée par la DXS, première enzyme de la voie du MEP.

La réaction enzymatique commence avec le cofacteur TPP, sous sa forme activée déprotonée nucléophile (Schéma 5), qui s'additionne sur la molécule de pyruvate **12**. La décarboxylation de l'adduit **20**, résultant de ce couplage, conduit à l'énamine **21**. Cette dernière effectue une attaque nucléophile sur le carbonyle du deuxième substrat, le D-GAP **13**, pour former l'adduit du TPP **22**, qui se dissocie pour régénérer le cofacteur TPP de départ et libérer le produit final, le DXP **14**.

C.3.3. Exemples d'inhibiteurs connus de la DXS

Les sous-unités isopréniques IPP et DMAPP sont décrites comme étant des inhibiteurs de la DXS, en compétition avec le TPP.⁴⁵ Chez *Populus trichocarpa*, une espèce de peupliers de la famille des Salicaceae, les valeurs de K_i $65 \pm 4 \mu\text{M}$ et $81 \pm 10 \mu\text{M}$ ont été obtenues pour les molécules d'IPP et de DMAPP, respectivement.

Outre l'identité entre les chaînes diphosphate des sous-unités isopréniques et du TPP, des interactions hydrophobes interviennent également. Cette observation a été confirmée par l'inactivité comme inhibiteur du diphosphate de sodium sur la DXS. De plus, la fixation d'une de ces molécules à l'un des dimères, réduit la capacité de fixation d'une seconde molécule au second dimère. Cette coopérativité négative a été démontrée à l'aide de l'équation logistique de Hill, dont les valeurs des coefficients obtenues sont $H = 0,69 \pm 0,03$ pour l'IPP et $H = 0,61 \pm 0,06$ pour le DMAPP. Ces deux derniers métabolites de la voie du MEP auraient alors une fonction de régulation de cette dite voie via une action inhibitrice sur la DXS. D'autres études ont également montré l'importance de cette enzyme dans le contrôle du flux de la voie du MEP (voir les références pour plus de détails).⁴⁶ Il n'existe pas beaucoup d'inhibiteurs de la DXS. C'est un axe de recherche peu développé car il nécessite d'être très sélectif vis à vis d'autres protéines dépendantes du cofacteur TPP comme la pyruvate déshydrogénase ou la transcétolase. Nous pouvons citer la clomazone. Utilisée comme herbicide, elle est transformée en oxoclomazone **23** par les plantes.^{47,48} Cette molécule **23** présente une activité inhibitrice contre la souche *Haemophilus influenzae* (*Hi*) DXS, connue sous le nom de bacille de Pfeiffer, avec une IC_{50} de 0,1 mM. Son analogue de type hydroxamate **24** possède un IC_{50} de $1,0 \pm 0,07 \mu\text{M}$ également à l'encontre de la *Hi*DXS.^{49,50} (Schéma 6). Le butylacétylphosphonate **25**, mime du pyruvate, a montré une inhibition sélective de la DXS d'*E. coli* par rapport à la transcétolase, présente chez les mammifères (i.e. K_i de $5,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$ chez *Ec*DXS et supérieur à 1mM chez la transcétolase de *Saccharomyces cerevisias*). Elle possède également des activités modestes contre les DXS issues des souches de *Yersinia pestis*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Salmonella enterica* avec les valeurs de K_i respectives de $7,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$, $4 \pm 2 \mu\text{M}$ et $8,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$.⁵¹

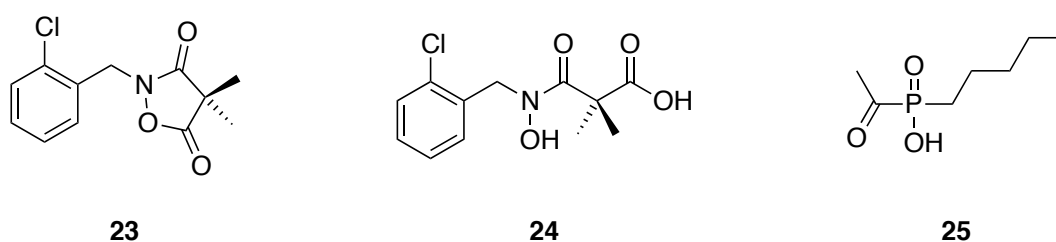


Schéma 6: Inhibiteurs connus de la DXS.

C.4 1.-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate Réductoisomérase (DXR/IspC)

C.4.1. Découverte et description de la DXR

La seconde enzyme de la voie du MEP est la DXR. Elle est la protéine la plus étudiée de cette voie. Son gène codant est connu sous différents noms : *dxr*, *IspC* (d'où son deuxième nom) ou encore, plus ancien, *yaeM*. C'est l'équipe de Seto, qui a identifié pour la première fois ce gène en 1998.⁵² Cette protéine nécessite la présence du cofacteur NADPH et d'un cation divalent métallique. La nature de ce dication peut varier et influe sur la cinétique de la protéine.

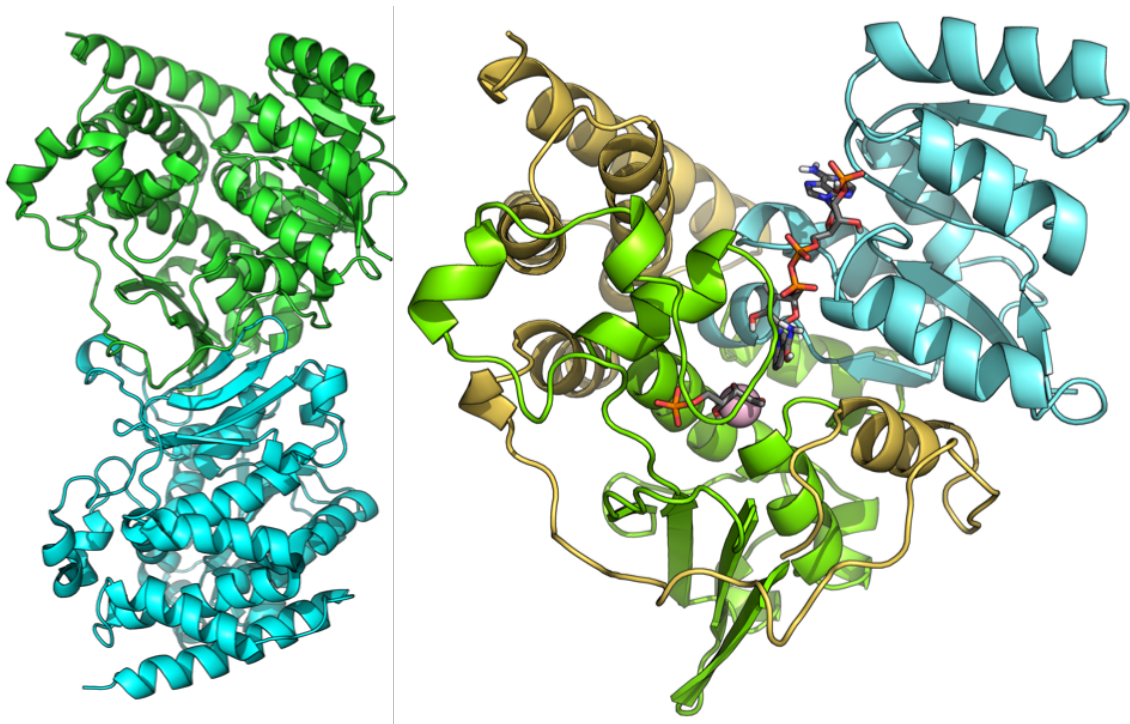


Figure 3: Le dimère de la DXR est représenté dans l'image de gauche, où chacun des monomères est coloré différemment. Un monomère de la DXR est représenté à droite, en présence du substrat naturel, le DXP, du dication métallique Mg^{2+} et du cofacteur, le NADPH. Ces deux structures proviennent de la structure cristalline PDBid 1Q0Q de *E. coli*, sur laquelle le Mg^{2+} a été ajouté.⁵³

Enzyme d'approximativement 45 kDa, elle cristallise sous la forme d'homodimère, dont chaque monomère possède une structure en «V» avec trois domaines distincts. Il existe de nombreuses structures cristallines de la DXR issues de différentes souches, en présence de nombreux ligands et de combinaisons de ligands différentes (cf. chapitre Structures protéiques). La numérotation des résidus qui va suivre est fondée sur la séquence de la DXR issue d'*E. coli*. Le premier domaine, des résidus 1 à 130, est le domaine N-terminal. Il englobe le repliement de Rossmann, site de fixation du NADPH. Le deuxième domaine, des résidus 131 à 270, est désigné comme connecteur et contient le site actif de la protéine ainsi que le site de fixation du métal (Figure 3). Le dernier domaine, des résidus 271 à 398, est le domaine C-terminal, qui participerait au maintien du site actif.⁵³

Le repliement de Rossmann est un motif structural particulier, qui peut se retrouver chez les protéines impliquant l'utilisation de cofacteurs tels que le flavine adénine dinucléotide (FAD), le NADH ou le NADPH. Il est composé d'une alternance de feuillets β parallèles liés par des hélices α (Figure 4).⁵⁴

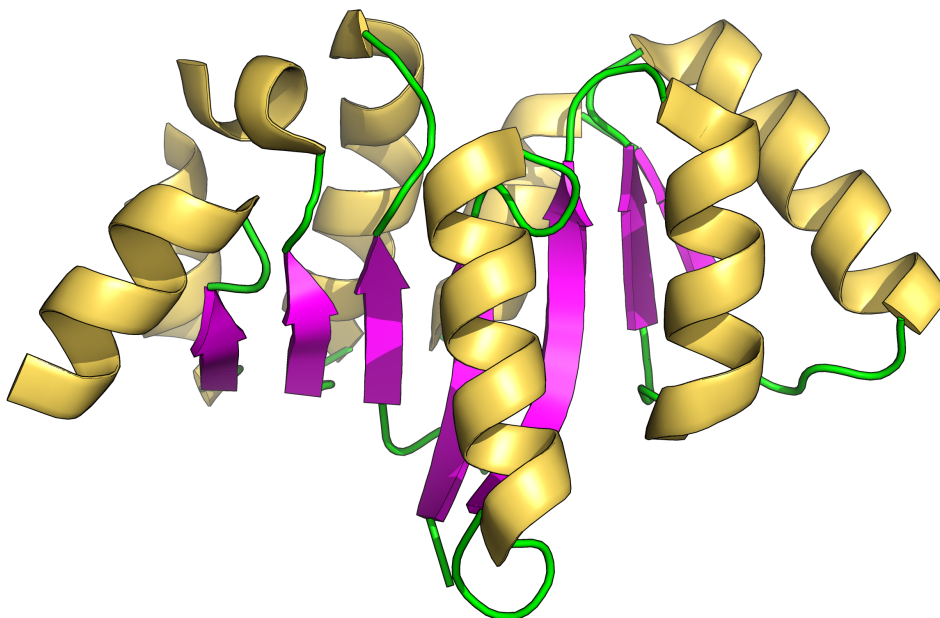


Figure 4: Repliement de Rossmann, point de fixation du cofacteur NADPH, chez la DXR d'*E. coli* (PDBid 1Q0Q). Les feuillets β sont représentés en jaune et les hélices α en violet.

Son site actif, regroupant le DXP et le dication métallique, est connu et détaillé. Il présente une boucle flexible, comprenant les résidus 206 à 216. D'après les structures cristallographiques connues, celle-ci peut adopter deux conformations : ouverte ou fermée, en fonction de la présence ou non d'un ligand. En conformation fermée, elle protège le substrat du milieu extérieur et permet à la réaction de s'opérer dans des conditions optimales. Ce réarrangement structural est donc très important. L'étude des structures suggère que les Trp212 et Met214, assistés de la Met276, jouent le rôle de barrière, confinant ainsi le substrat dans la poche du site actif (Figure 5). Le cycle nicotinique du cofacteur se trouve à l'extérieur, orienté à proximité de cette barrière, presque perpendiculairement au plan formé par les trois résidus (Figure 5).

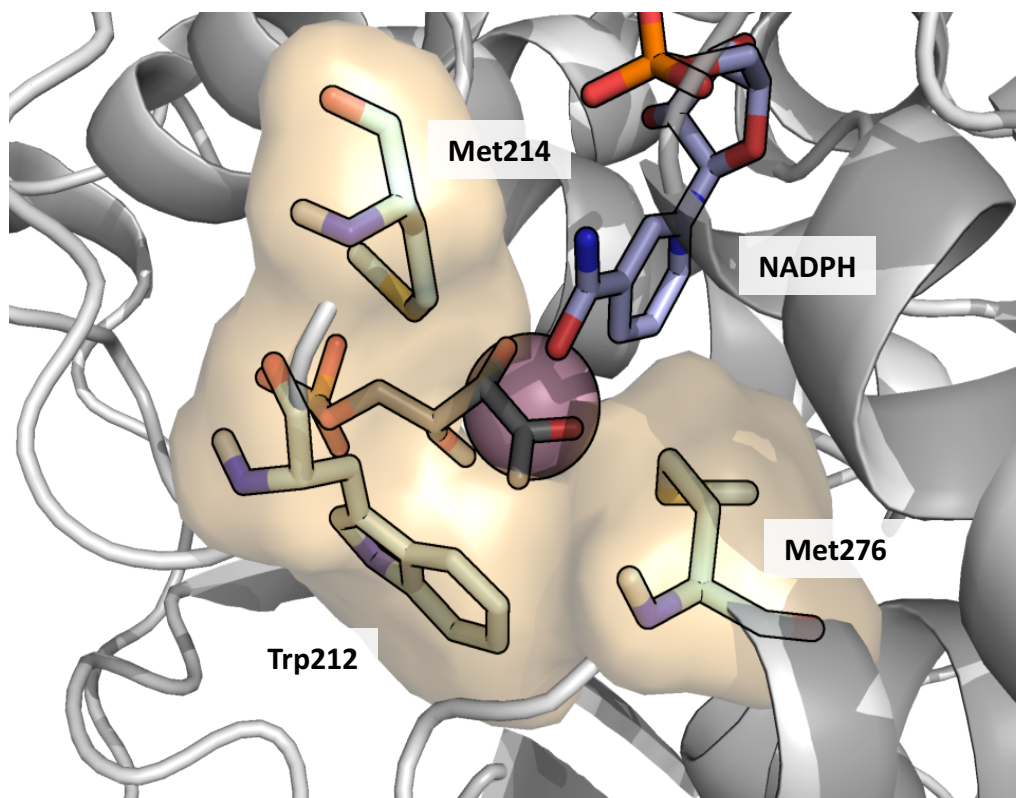


Figure 5: Barrière suggérée par les résidus Trp212, Met214 et Met276, représentés en bâtonnés, tout comme le DXP et le cofacteur. Le métal est représenté en sphère et la structure est issue de la PDBid 1QOQ.⁵³

La zone de fixation du substrat peut être décrite en plusieurs parties : i) un point d'ancrage pour la fonction phosphate ; ii) des interactions hydrophobes le long du squelette carboné du ligand ; iii) une zone de fixation au niveau du métal. Ce dernier est maintenu à l'intérieur du site actif de la protéine par les oxygènes de trois résidus : Asp150, Glu152 et Glu231. Le point d'ancrage permet de fixer le phosphate ou le phosphonate. D'après la littérature fondée sur des structures cristallines, les résidus hautement conservés et impliqués sont la Ser186, l'His209, la Ser222, l'Asn227 et la Lys228. Le squelette carboné des ligands est maintenu à l'aide du Trp212 et de la Met214 par des interactions hydrophobes (Figure 6). La fixation au dication métallique se fait par chélation avec les oxygènes en position C-2 et C-3 du DXP. Ce groupement α -hydrocétone est en général remplacé par un type d'acide hydroxamique chez les inhibiteurs efficaces de la DXR que nous verrons plus tard.

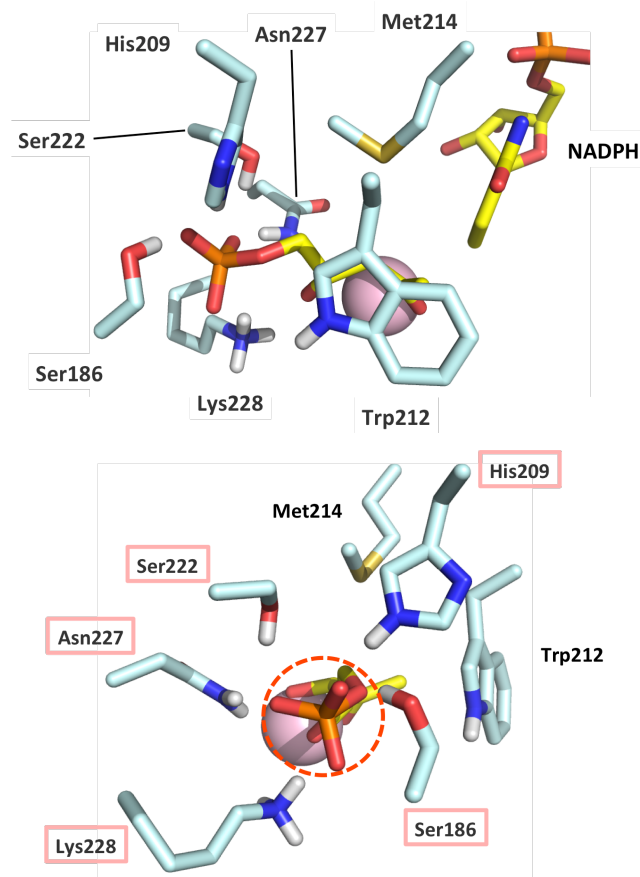


Figure 6: Résidus hautement conservés impliqués dans la fixation du DXP chez *EcDXR*. Les résidus d'intérêts, le NADPH et le DXP sont représentés en bâtonnets. Le métal Mg^{2+} est représenté en sphère rose. Les encadrés rouges correspondent aux résidus impliqués dans une interaction avec le phosphate du DXP, au niveau du point d'ancrage. La structure est issue de la PDBid 1QOQ.⁵³

C.4.2. Mécanisme de la réaction catalysée par la DXR

La DXR permet de catalyser la conversion du DXP en MEP. Cette réaction implique un réarrangement intramoléculaire du DXP **14** qui va conduire à un intermédiaire aldéhyde non isolable **26**, immédiatement réduit en MEP **15** par le cofacteur NADPH.

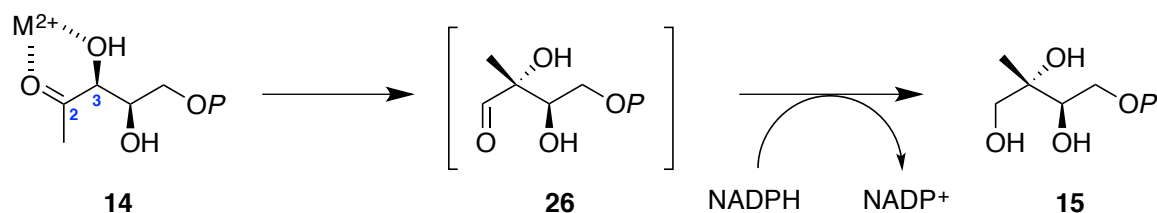


Schéma 7: Mécanisme de la réaction catalysée par la DXR.

La question est de savoir quel type de réarrangement s'opère au sein de ce mécanisme enzymatique. Pour y répondre, deux types de réarrangements furent proposés : un réarrangement de type α -cétolique et un réarrangement de type rétroaldol/aldolisation.⁵⁵ Les travaux de plusieurs équipes ont contribué à élucider ce mystère.

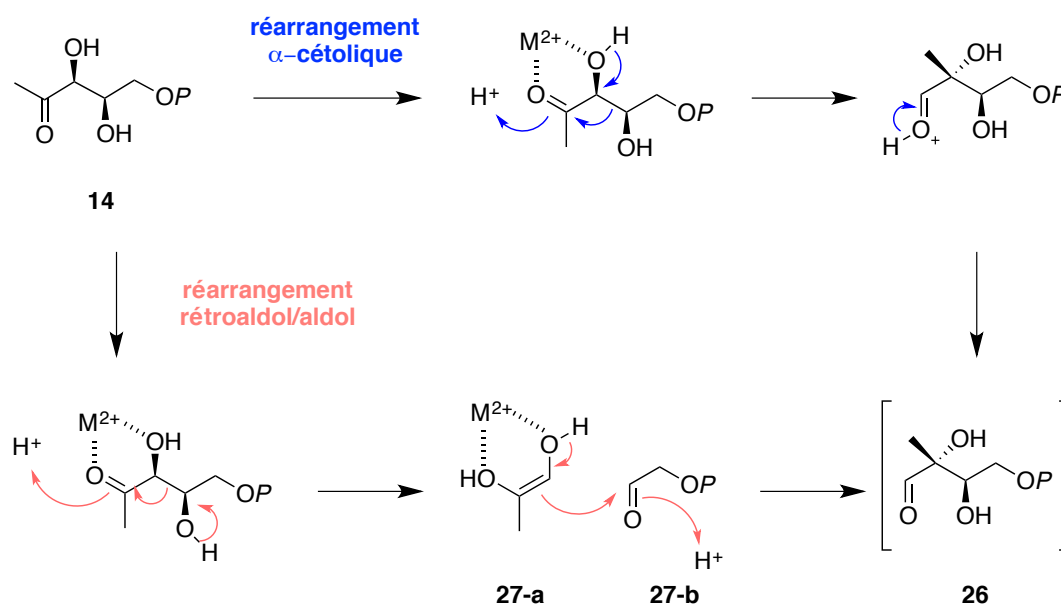


Schéma 8: Réarrangements proposés conduisant à l'aldéhyde 26 pour la réaction catalysée par la DXR.

Pour déterminer quel mécanisme est mis en jeu au cours de la réaction catalysée par la DXR, Fox et Poulter ont synthétisé différents analogues fluorés du DXP en position C-1 (**28**, **29**, **30**) (Schéma 9).^{56,57} Etant très électroattracteur, l'atome de fluor déstabiliserait fortement la formation d'un carboxonium et le réarrangement alpha-cétolique s'en verrait ralenti. En revanche, il permettrait de favoriser l'énolate, formé lors de la rétroaldolisation. Seul le composé **28**, mono fluoré, fut un substrat efficace, et pu être utilisé lors d'études cinétiques comparatives avec le DXP. Le réarrangement impliquant l'analogue monofluoré **28** est plus rapide que celui en présence du substrat naturel, le DXP. Ces résultats sont en faveur qu'un réarrangement rétroaldol/aldol.

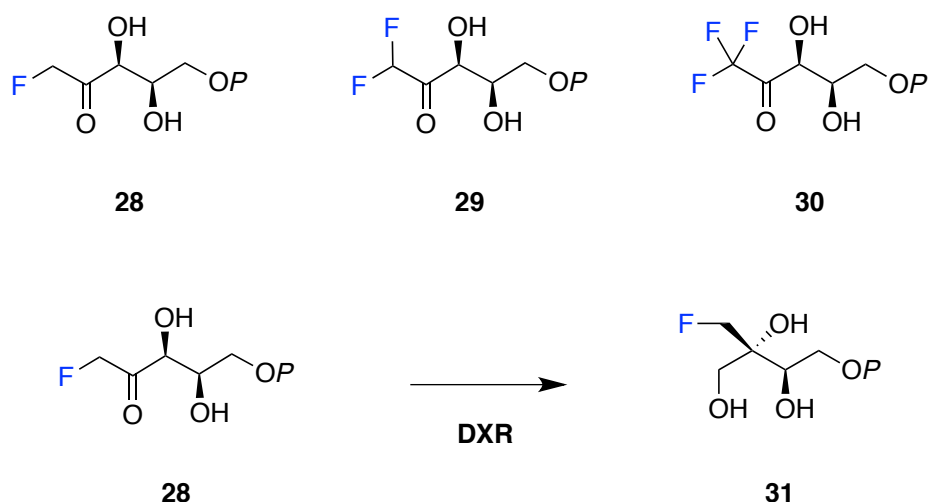


Schéma 9: Analogues fluorés **28**, **29** et **30** du DXP et conversion du **28** en l'analogue du MEP **31**.

Wong et Cox ont eu l'idée de mettre en incubation le DXP avec l'apoenzyme, c'est à dire l'enzyme sans aucun cofacteur ou cation divalent.⁵⁸ Bien qu'en faible concentration, ils ont réussi à observer la formation d'un composé diastéréoisomère **32** du substrat naturel, **14** (Schéma 10). L'obtention de cette molécule ne peut qu'être issue d'un réarrangement de type rétro aldol/aldolisation, allant dans le sens des précédents travaux réalisés. L'explication de la formation de ce diastéréoisomère vient de l'absence du cation divalent.

Lorsque ce dernier est présent, l'aldéhyde intermédiaire ne peut librement tourner, car il est chélaté au métal et ne peut que présenter sa face *Si* lors de l'attaque de l'énol. En absence du métal, l'aldéhyde est libre de rotation et peut présenter sa face *Re* lors de l'étape d'aldolisation, conduisant au composé **32**.

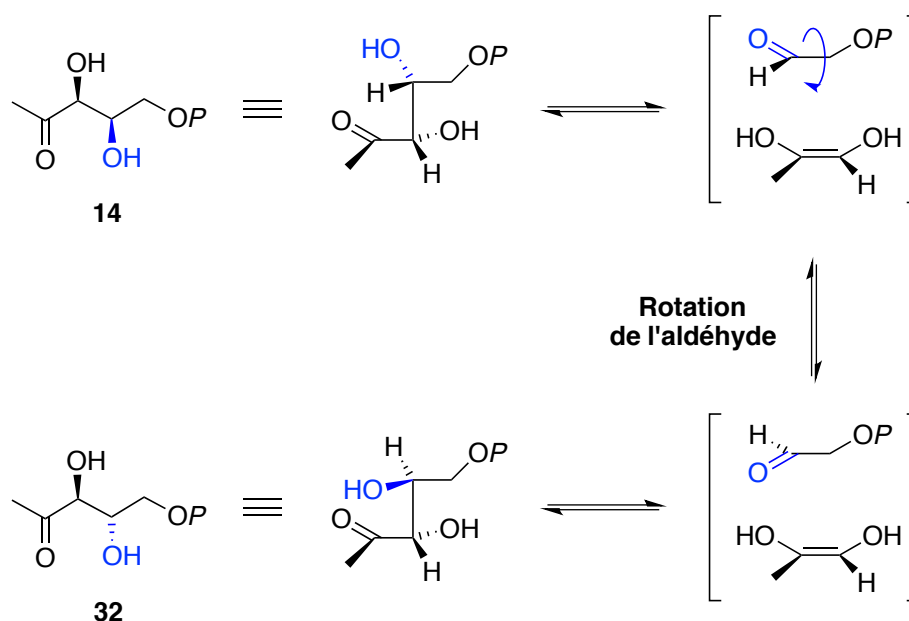


Schéma 10: Rotation de l'aldéhyde dans le site actif de l'apoenzyme DXR, conduisant à la formation du diastéréoisomère 33.

Pour confirmer l'existence d'un tel mécanisme, l'équipe de Liu a cherché à observer le changement d'hybridation des atomes de carbones en analysant par RMN les effets cinétiques secondaires des différents isotopomères du DXP marqués au deutérium en position C-3 ou C-4.⁵⁹ Les deux réarrangements font intervenir des ruptures et formations de liaisons différentes. L'hybridation des carbones du MEP produit de la réaction sera donc différente en fonction du mécanisme mis en jeu. Comme les équipes de Poulter et Cox, leurs résultats vont dans la direction d'un réarrangement de type rétro aldo/aldolisation.

Plus récemment, l'équipe de Mo a réalisé une étude de mécanique quantique de théorie fonctionnelle de la densité combinées à de la modélisation moléculaire (QM-DFT/MM), afin d'essayer d'identifier certains intermédiaires de cette réaction.⁶⁰

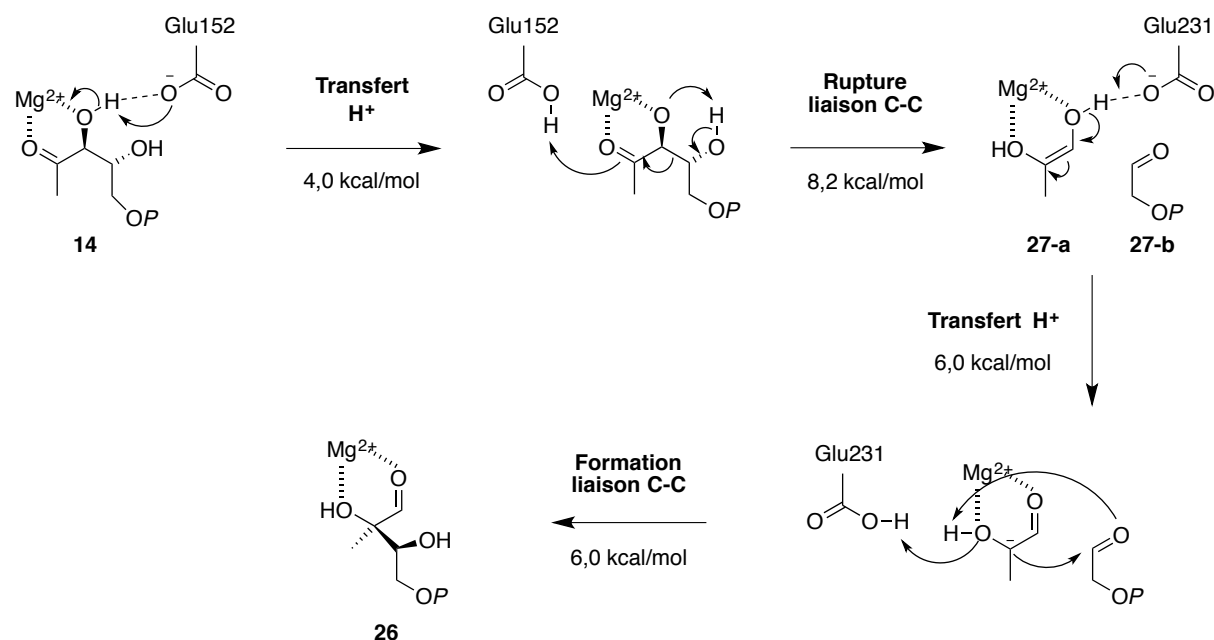


Schéma 11: Mécanisme de formation de l'aldéhyde 26 en partant du DXP 14, via une réaction de rétroaldolisation/aldolisation avec les barrières énergétiques, en kcal/mol, basées sur des calculs QM-DFT/MM réalisés par l'équipe de Mo.⁶⁰

Leurs calculs montrent que la rupture hétérolytique de la liaison C2-C3 du DXP conduisant aux deux composés **27-a** et **27-b** est favorable d'un point de vue énergétique (Schéma 11). Les résidus autour de ces fragments, notamment ceux du métal pour les interactions avec la partie **27-b**, permettent de stabiliser leur formation.

Ces différentes études permettent de conclure que le réarrangement impliqué dans la réaction catalysée par la DXR est de type rétroaldol/aldolisation. Elle se déroule donc de la manière décrite ci-dessous (Schéma 12):

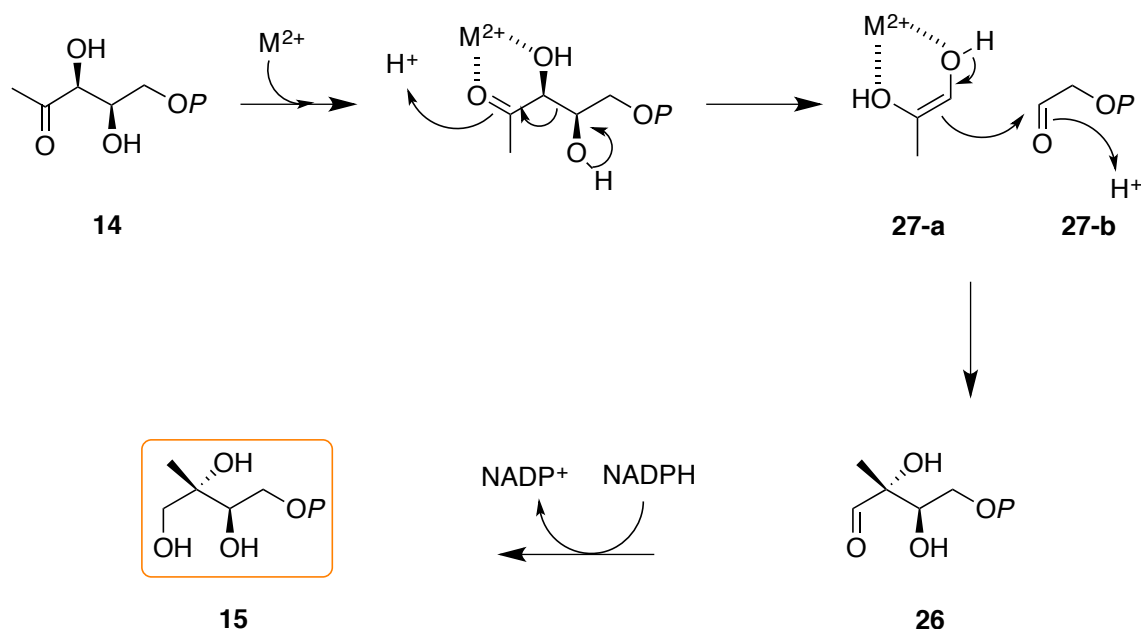


Schéma 12: Réaction enzymatique catalysée par la DXR, deuxième enzyme de la voie du MEP.

La réaction enzymatique débute avec la fixation du DXP **14** qui se chélate dans la poche de site actif de la DXR avec le cation métallique (Mg^{2+} , Mn^{2+} , ou Co^{2+}) à l'aide des oxygènes présents en C-3 et C-4. Une réaction de rétro-aldolisation a lieu, conduisant aux intermédiaires **27-a** et **27-b**, qui réagissent immédiatement ensemble via une réaction d'aldolisation pour conduire à la formation de l'aldéhyde **26**.

Le cofacteur, réagit suivant le mécanisme propre à la classe B des déshydrogénases, transférant immédiatement et exclusivement son hydrure 4-H_S du cycle nicotinique en H_R sur la face *Re* en position C-1 de l'aldéhyde non isolable **26**, conduisant ainsi à la molécule de MEP (Schéma 13).⁶¹

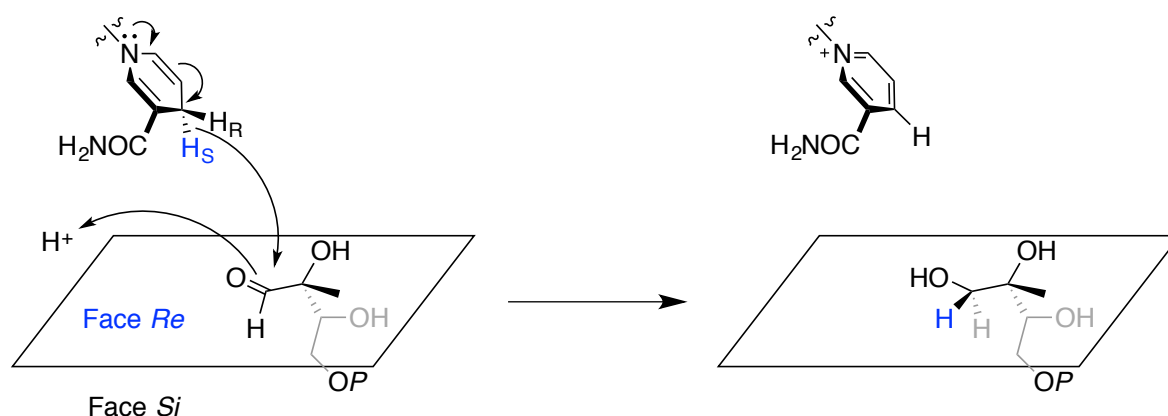


Schéma 13: Attaque du 4-H_S [NADPH] sur la face *Re* de l'aldéhyde non isolable **27**, conduisant au MEP **15**.

C.4.3. Inhibition de la DXR – résistance et biodisponibilité de la fosmidomycine

Les inhibiteurs les plus connus de la DXR sont la fosmidomycine **33** (Fom) et son dérivé *N*-méthylé, Fr-900098 **34** (Fr), isolés de *Streptomyces lavendulae* et *Streptomyces rubellomurinus*, respectivement (Schéma 14).^{62,63,64} La fosmidomycine possède une activité antimicrobienne contre de nombreuses bactéries, principalement des bactéries Gram-négatives et quelques Gram-positives, contre les *Plasmodium spp.*, parasites responsables de la malaria, et une faible toxicité pour les mammifères.⁶⁵ Une fois absorbée chez l'homme, la fosmidomycine s'élimine très rapidement et ne peut être utilisée en thérapie seule.⁶⁶ Elle est donc utilisée dans le traitement du paludisme, contre le parasite *Plasmodium falciparum*, en combinaison avec la clindamycine **35**.⁶⁷ Cette combinaison présente de bons résultats chez les adultes et les enfants âgés.⁶⁸ A ce jour, il reste difficile de soigner les jeunes enfants de moins de trois ans contre ce même parasite.

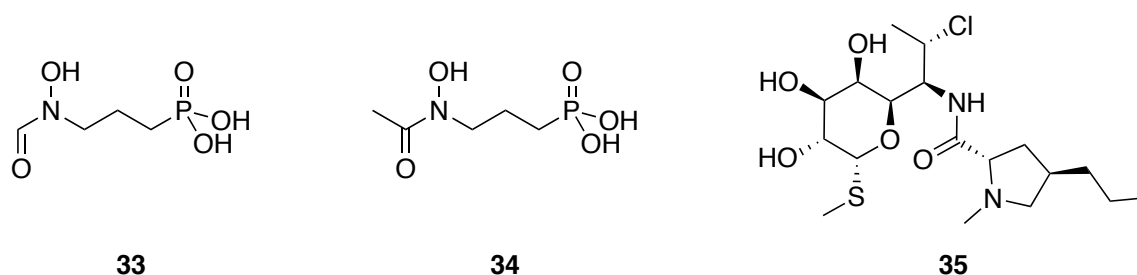


Schéma 14: Fosmidomycine (33), Fr-900098 (34) et clindamycine (35).

Pour être actifs, les inhibiteurs doivent pouvoir passer la membrane cellulaire des bactéries, soit par diffusion passive, soit à l'aide d'un transporteur, soit par un canal. Les molécules chargées ne peuvent traverser la membrane phospholipidique hydrophobe par simple diffusion. Le plus souvent, ils ont recours à un transporteur. La fosmidomycine **33** et le Fr-900098 **34** utilisent le transporteur du glycérol 3-phosphate pour pénétrer dans les cellules. Les bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* et *Pseudomonas aeruginosa* ne possèdent pas naturellement ce transporteur et sont résistantes à ces molécules.⁶⁹ D'autres développent la résistance au cours du temps.⁷⁰ D'autres organismes vont mettre en œuvre une pompe à efflux, en sur-exprimant un gène et rejettent à l'extérieur de la cellule les inhibiteurs, ne leur donnant pas le temps d'agir.⁷¹ Ces phénomènes de résistances sont en large progression et sont devenus un problème de santé publique majeur.

C.4.4. Inhibition de la DXR – Mode d’inhibition de la DXR par fosmidomycine

L’étude cinétique de la fixation de la fosmidomycine sur la DXR a révélé que le cofacteur se fixe en premier à la protéine et que le ligand ou l’inhibiteur vient par la suite, dans la poche du site actif. Le mode de fixation de la fosmidomycine est de type « *slow-tight-binding* ». ⁷²

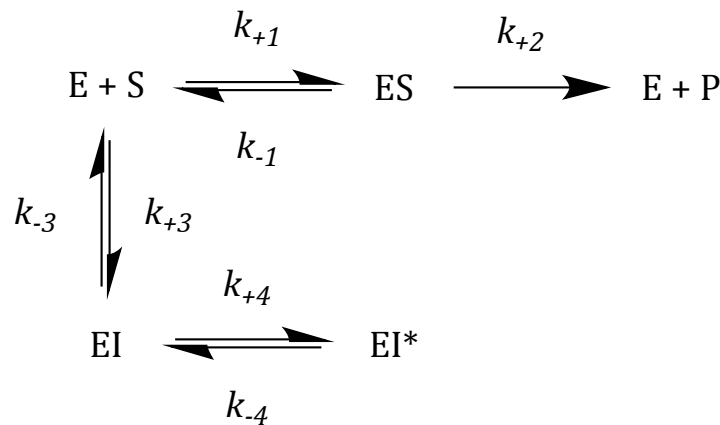


Schéma 15: Mécanisme du mode d’inhibition « *slow tight binding* ». *E* correspond à l’enzyme, *S* au substrat naturel de l’enzyme, *P* au produit issu de la réaction enzymatique, *I* représente un inhibiteur. Les constantes de formation des complexes sont représentées au niveau des flèches.

Pour expliquer ce mode d’inhibition, nous allons nous référer au Schéma 15. En présence de l’inhibiteur, il y a tout d’abord formation rapide d’un complexe [EI], suivie de la formation, beaucoup plus lente, d’un complexe activé [EI*], plus stable. ⁷³ Toutes les étapes de formation de complexe, en particulier k_{+3} et k_{-3} , sont considérées comme très rapides par rapport aux étapes de constantes de vitesse k_{+4} et k_{-4} . Dans le cas de la DXR, l’étape lente coïnciderait au passage de la boucle, qui confine le site actif, de la conformation ouverte à la conformation fermée, et inversement. Le complexe activé [EI*] se rapporterait ainsi au complexe le plus stable de la protéine, la boucle fermée avec le ligand présent dans le site actif.

C.4.5. Inhibition de la DXR – quelques exemples

La conception de la plupart des inhibiteurs est fondée sur l'architecture de base de la fosmidomycine **33**, elle-même similaire à celle du DXP. Les plus efficaces d'entre eux possèdent tous un mime du point d'ancrage phosphate ainsi qu'une pince permettant de se fixer au dication métallique du site actif de la protéine DXR (Figure 7).



Figure 7: Architecture générale des différents inhibiteurs.

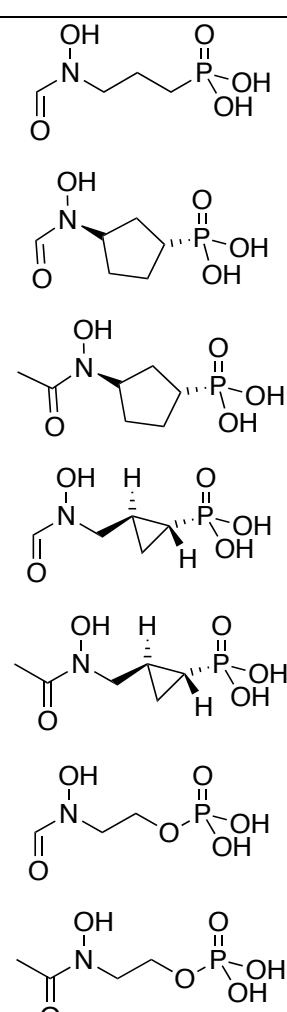
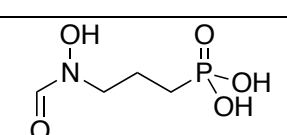
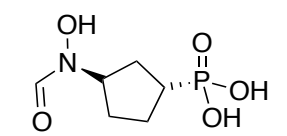
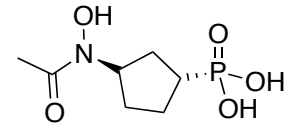
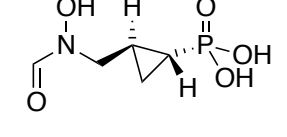
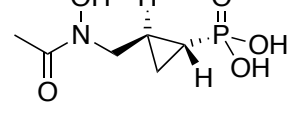
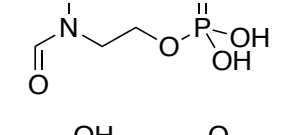
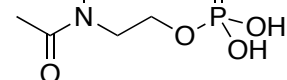
Le nombre d'inhibiteurs développés étant considérable, nous allons les regrouper en catégorie afin d'avoir un aperçu général plus clair du catalogue disponible et ne traiter que certains exemples. Les constantes d'inhibitions disponibles seront indiquées en fonction des organismes.

Nous allons commencer par traiter les modifications affectant l'espaceur. Par la suite, cette section sera divisée en fonction du type d'acide hydroxamique, capable de mimer la fonction chélatant le dication métallique, utilisé. La forme classique rétro-hydroxamique que nous retrouvons chez la fosmidomycine et chez le Fr-900098 est appelée la forme « pince naturelle ». La seconde, que nous allons découvrir chez certains inhibiteurs et de forme hydroxamique, est appelée la « pince inverse », car les positions du carbonyle et de l'hydroxylamine sont inversées.

C.4.5.1. Modifications de l'espaceur

La chaîne carbonée, également appelée squelette carboné, relie les deux fonctions clés du ligand : la pince et le mime du point d'ancrage. En diminuer ou en augmenter la longueur, voire y ajouter une insaturation, conduit à une perte d'activité d'inhibition significative.⁷⁴ Une approche de modification peut être de chercher à rigidifier le squelette carboné pour imposer une géométrie dans le but d'optimiser les interactions dans le site actif de la protéine (Tableau 1).

Tableau 1: Exemples d'inhibiteurs possédant un squelette carboné modifié par rapport à la fosmidomycine.

| Molécule |  | IC ₅₀ (nM) | | | Réf. |
|-------------------------|---|-----------------------|--------------|---------------------------|------|
| | | <i>EcDXR</i> | <i>MtDXR</i> | <i>PfDXR</i> ^a | |
| Fom 33 |  | 30 | 80 | 1200 | |
| 36 |  | 200 | - | - | 75 |
| 37 |  | 1200 | - | - | 75 |
| 38 |  | 313 | - | - | 76 |
| 39 |  | 50 | - | - | 76 |
| 40 |  | 342 | 2100 | - | 77 |
| 41 |  | 77 | 350 | - | 77 |

| Molécule | | IC ₅₀ (nM) | | | Réf. |
|----------|--|-----------------------|--------------|---------------------------|------|
| | | <i>EcDXR</i> | <i>MtDXR</i> | <i>PfDXR</i> ^a | |
| 42 | | 87 | - | 360 | 78 |
| 43 | | 87 | | | 78 |
| 44 | | 3000 | | | 78 |
| 45 | | 46 | | | 77 |

Les composés **36** à **39**, proposé par l'équipe de Van Calenbergh, présentent une restriction géométrique au niveau de la chaîne carbonée, imposée par un motif cyclopentyle (**36** et **37**) ou cyclopropyl (**38** et **39**).^{75,76} Les isomères *trans* sont ceux qui présentent les meilleures inhibitions et sont représentés dans le tableau 1. Les isomères *cis* des composés **36** et **39** possèdent, chez *EcDXR*, des IC₅₀ de 2300 nM et 12000 nM, respectivement sur *EcDXR*. Pour le dérivé cyclopropyl **39**, le mélange racémique présente une IC₅₀ plus importante de 160 nM chez *E. coli*, indiquant que son isomère *cis* est un moins bon inhibiteur. Le dérivé méthylé *trans* **39** présente la meilleure capacité inhibitrice des quatre molécules cycliques avec une IC₅₀ de 50nM, proche de la valeur de l'IC₅₀ de la fosmidomycine. Les composés de type oxo-isostères **40** à **45** ont un espaceur beaucoup moins rigide que les molécules précédentes.⁷⁸ Néanmoins, le remplacement d'un groupement méthylène par un atome d'oxygène n'est pas sans conséquence. La répulsion résultante des deux doublets électroniques non liants impose une géométrie d'angle particulière, qui se répercute sur les angles de liaison voisins proches. Les propriétés électroniques particulières de cet oxygène supplémentaire (*i.e.* atome électroattracteur, possibilité de formation de liaison hydrogène) vont également influencer sur l'environnement qui l'entoure.

La fosfoxacine **40** est une molécule naturelle extraite de *Pseudomonas fluorescens*.⁷⁹ Bien qu'elle présente une meilleure inhibition de la DXR chez *Synechocystis* par rapport à la fosmidomycine, chez *EcDXR* et *MtDXR* la tendance s'inverse.⁸⁰ Son dérivé méthylé **41** présente de meilleures capacités inhibitrices chez ces deux souches, mais reste moins efficace que la molécule de référence, la fosmidomycine. Par contre, l'analogue méthylé à pince inversée **45** présente un résultat d'inhibition comparable à celle induite par la fosmidomycine pour *EcDXR*, avec une IC₅₀ de 46 nM. Le dérivé oxo-β-phosphonate **42** possède une bonne activité contre la souche *E. coli* de 87 nM et une plus intéressante, obtenue *in vitro*, l'encontre de la souche *P. falciparum* comparé à la fosmidomycine. Par comparaison, son analogue à pince hydroxamique est beaucoup moins efficace contre *EcDXR* en présentant une IC₅₀ de 3000 nM. Dans ce cas précis, la substitution oxa-β-phosphonate est plus propice en pince naturelle qu'inversée.

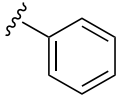
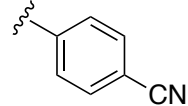
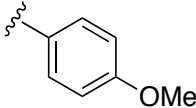
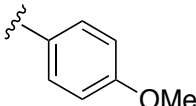
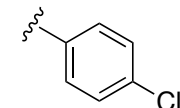
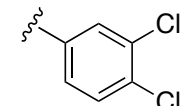
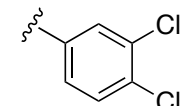
C.4.5.2. Modification de pince : pince naturelle

Nous allons commencer par aborder les analogues de la fosmidomycine ayant conservé la même orientation de la fonction acide hydroxamique que celle de cet antibiotique.

C.4.5.2-a. Analogues à pince naturelle α -substitués par rapport au phosphonate

Les substitutions α -phosphonate ont été réalisées dans le but d'optimiser les interactions au niveau du point d'ancrage du site actif de la DXR (Tableau 2).

Tableau 2: Exemples d'inhibiteurs à pince naturelle α -substitués ; Inhibitions sur *Pf*DXR effectuées sur cellules entières.

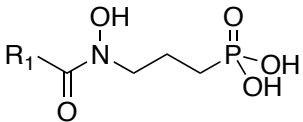
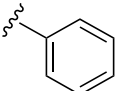
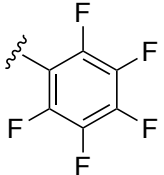
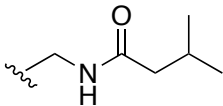
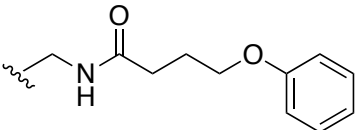
| | Molécule | | IC ₅₀ (nM) | | | Réf. |
|---------------|----------|---|-----------------------|---------------|-------------------------------|-------|
| | R | R ₁ | <i>Ec</i> DXR | <i>Mt</i> DXR | <i>Pf</i> DXR-K1 ^a | |
| Fom 33 | H | H | 30 | 80 | 1730 | |
| 46 | Me | Cl | - | - | 300 | 81 |
| 47 | Me | F | - | - | 290 | 81 |
| 48 | Me |  | 311 | 7400 | - | 78,82 |
| 49 | Me |  | 119 | - | - | 83 |
| 50 | H |  | 156 | - | - | 78 |
| 51 | Me |  | 459 | - | - | 78 |
| 52 | Me |  | 99 | - | - | 78 |
| 53 | H |  | 59 | 150 | - | 83 |
| 54 | Me |  | 119 | 700 | - | 83 |

L'insertion d'un atome fortement électroattracteur en α du phosphonate pour les composés **46** et **47** a pour objectif d'augmenter l'acidité du groupement phosphonate.⁸¹ Cela permet ainsi de diminuer le pKa du phosphonate et de mieux mimer l'effet électronique du phosphate du DXP. Les résultats des tests d'inhibitions réalisés sur cellules entières issues de *PfDXR-K1* montrent de meilleures activités inhibitrices comparées à celle de la fosmidomycine. L'analogue en hydroxamique, pince inversée, du composé **47** montre une activité de similaire au composé possédant la pince naturelle rétro-hydroxamique, avec une IC₅₀ de 310 nM face à *PfDXR-K1 in vitro*. Verbrugghen *et al.* ont démontré l'impact de la diminution de l'acidité du groupement phosphonate. Les prochains composés retenus sont des dérivés α -aryle (**48-54**). Il est intéressant de constater qu'en ajoutant deux atomes de chlore en position C-3 et C-4 du groupement benzyle (**48** et **54**), l'IC₅₀ diminue, passant de 311 nM à 119 nM et de 7400 nM à 700 nM pour *EcDXR* et *MtDXR* respectivement. Les versions formylées **50** et **53** des composés **51** et **54** possèdent des capacités d'inhibition plus efficaces que leurs analogues méthylés. Andaloussi *et al.* ont effectué des études structurales de la protéine *MtDXR* cocrystallisée en présence de Mn²⁺ et de chacun des composés α -dichloro-benzyl phosphonate **53** et **54**.⁸² Dans les deux cas, ils ont observé presque exclusivement la fixation de l'énantiomère *S*. La présence de l'aryle entraîne des interactions avec le Trp203 (cf. 212 chez *EcDXR*) ne permettant pas d'obtenir une conformation fermée de la boucle, ainsi que la perte de la liaison hydrogène entre l'His200 (cf. His209 chez *EcDXR*) et le phosphonate. Les travaux de Kunferman *et al.*, concernant la synthèse et de séparation des énantiomères β -thia- α -phényle-phosphonate, analogue du FR-900098 en pince inverse, ont démontré que c'est l'énantiomère *S* qui possède la meilleure affinité avec le site actif de l'enzyme.⁹⁰

C.4.5.2-b. Analogues à pince naturelle : modification de la pince- Approche biligand

Pour ce type d'analogue, la pince reste en orientation naturelle, sous forme rétro-hydroxamique. L'approche biligand consiste à rechercher un deuxième domaine de fixation, dans le cas présent, en dehors du site actif propre du substrat, en direction de celui du cofacteur. D'après les analyses cristallographiques, il est connu que le carbonyle de la pince est le plus proche de l'entrée du site actif. C'est pourquoi des recherches se sont orientées vers l'extension de ce fragment. Nous allons voir quatre exemples d'inhibiteurs qui suivent l'approche dite biligand (Tableau 3).

Tableau 3: Exemples d'inhibiteurs correspondant à l'approche biligand.

| | Molécule | | IC ₅₀ (nM) | | Réf. |
|---------------|---|---|-----------------------|-------|------|
| | R ₁ | | EcDXR | PfDXR | |
| | |  | | | |
| Fom 33 | H | | 30 | 230 | |
| 55 |  | | 130 | - | 84 |
| 56 |  | | 1300 | - | 85 |
| 57 |  | | 12000 | 9600 | 84 |
| 58 |  | | 1000 | 400 | 84 |

Le composé **55** portant le groupement phényle est le composé le plus efficace sur la *EcDXR* avec une IC_{50} de 130 nM contre *EcDXR*. La fluoration de l'aryle conduit à une diminution drastique de l'activité de la molécule **56** (IC_{50} de 1300 nM chez *EcDXR*). Le plus mauvais candidat est la molécule **57**, cela peut être dû à son groupement terminal encombrant. Le composé **58**, possédant une chaîne plus longue mais moins volumineuse et plus riche en électrons grâce à son phényle présente une efficacité plus importante que l'analogue alkyle précédent. Il existe encore bien d'autres modèles d'inhibiteurs de type biligand dans la littérature.⁸⁶ Pour le moment, aucun n'a réussi à montrer une inhibition efficace.

C.4.5.3. Modification de la pince rétro-hydroxamique en pince hydroxamique : pince inversée

Nous allons maintenant aborder une deuxième série d'inhibiteurs : les analogues de la fosmidomycine ayant la pince inverse. Ils possèdent une orientation inversée de la fonction acide hydroxamique. A nouveau, nous n'allons voir que quelques exemples.

C.4.5.3-a. Analogues à inversée développés au laboratoire CBMB

Au laboratoire de Chimie et Biochimie de Molécules Bioactives (CBMB), anciennement Chimie et Biochimie des Microorganismes, de nombreux travaux ont été réalisés sur les analogues à l'orientation de la fonction hydroxamate inversée par rapport celle de la fosmidomycine. Dans le tableau suivant sont présentés quelques exemples (Tableau 4).

Tableau 4: Exemples d'inhibiteurs à la pince inversée développés au laboratoire.

| | Molécule | | | IC ₅₀ (nM) | Réf. |
|---------------|----------------|---------------------|---|-----------------------|------|
| | R ₁ | R ₂ | n | <i>EcDXR</i> | |
| Fom 33 | - | - | - | 30 | |
| 59 | H | PO(OH) ₂ | 2 | 170 | 87 |
| 60 | Me | PO(OH) ₂ | 2 | 48 | 87 |
| 61 | Me | PO(OH) ₂ | 1 | 19000 | 88 |
| 62 | Me | PO(OH) ₂ | 3 | 110 | 88 |
| 63 | Me | CO ₂ H | 2 | 2500 | 88 |
| 64 | Me | SO ₃ H | 2 | 48000 | 88 |

Le composé **60** est le plus efficace avec une IC₅₀ de 48 nM contre *EcDXR*, très proche de celle de la fosmidomycine qui est la référence. De plus, il est également efficace contre des souches *E. coli* résistantes à la fosmidomycine, ce qui lui donne un intérêt supplémentaire. Nous pouvons noter que son analogue formyle perd en efficacité. Le groupement méthyle doit apporter des interactions hydrophobes stabilisantes au niveau des résidus servant au confinement du site actif (*i.e.* Trp202, Met214 ou Met276). L'impact de la longueur de l'espaceur a été par la suite étudié, que ce soit sous forme formyle ou acétyle (seuls les composés avec un acétyle sont cités comme exemples).

L'ajout d'un carbone sous forme d'un méthyle conduit au composé **62** qui possède une activité modérée (IC₅₀ de 110 nM chez *EcDXR*), mais bien moins bonne que celle de **60**. La longueur de chaîne du squelette carboné idéale est donc de trois atomes de carbone dans le cas du phosphonate. La géométrie du groupement phosphonate semble être celle de prédilection pour interagir au niveau du point d'ancrage. Des essais ont été effectués avec des acides carboxyliques et sulfoniques. Ils ont résulté par une diminution drastique de l'activité inhibitrice (composé **63** et **64**). Des tentatives de remplacement de la fonction phosphonate par des conformères de tétrazoles ont également été réalisées mais n'ont pas montré d'inhibitions significatives.⁸⁹

C.4.5.3-b. Analogues à pince hydroxamique α -substitués et modification de la position β par rapport au phosphonate

Dans cette partie nous allons principalement aborder les travaux Kunfermann *et al.* qui ont développé d'importants inhibiteurs de la DXR pince inversée, forme hydroxamique, β - α -substitués par rapport au phosphonate.^{90,91} Ils ont étudié l'impact que pouvait avoir insertion d'un atome soufre en position β -phosphonate, sur des composés α -substitués, déjà connus comme étant de bons inhibiteurs de la DXR (Tableau 5).

Tableau 5: Exemples d'inhibiteurs α,β -substitués par rapport au phosphonate de la DXR, développés par l'équipe de Kurz.⁹⁰

| Molécule | R ₁ | IC ₅₀ (nM) | | | | | | | | |
|---------------|----------------|-----------------------|-----|-----|------------------|-------|-----|------------------|----|-----|
| | | EcDXR | | | MtDXR | | | PfDXR | | |
| | | CH ₂ | O | S | CH ₂ | O | S | CH ₂ | O | S |
| FOM 33 | - | 221 ^a | | | 230 ^a | | | 160 ^a | | |
| 65 | | 243 | 940 | 8,2 | 2000 | 16000 | 280 | 3,1 | 37 | 24 |
| 66 | | 286 | 320 | 33 | 1800 | 4000 | 110 | 14 | 25 | 18 |
| 67 | | 117 | 240 | 8,5 | 770 | 4600 | 42 | 3,4 | 12 | 14 |
| 68 | | 208 | 200 | 5,9 | 280 | 1600 | 9,2 | 2,8 | 14 | 4,5 |

^a Les valeurs d'inhibitions des tests réalisés *in vivo* sont issues de la références 72.

Sans β -modification, les résultats d'inhibitions des dérivés aryles α -substitués (**65** à **68**) sur *EcDXR* et *PfDXR* sont meilleurs dans la plupart des cas. Le 3,4-difluorobenzyle **67** est le plus efficace chez *EcDXR* (IC₅₀ de 117 nM). Son dérivé chloré **68** l'emporte chez *PfDXR* avec une IC₅₀ de 2,8 nM contre 160 nM pour la fosmidomycine. Envers *M. tuberculosis*, ces deux derniers ont une efficacité proche avec des IC₅₀ de 280 nM et 230 nM pour **65** et la fosmidomycine, respectivement. L'ajout du méthyle en position para du groupement phényle de **65** conduisant ainsi à la molécule **66** ne modifie pas significativement les constantes d'inhibitions à l'encontre des trois souches.

Pour les dérivés oxa-β-α-substitués, deux paysages se forment. D'un côté nous avons les DXR issues d'*E. coli* et de *P. falciparum* où, bien que les constantes d'inhibition aient augmenté, elles restent relativement proches de celles des dérivés α-substitués (excepté pour le composé **65** chez *EcDXR*). De l'autre côté, nous avons *M. tuberculosis* où la substitution d'un carbone en β du phosphonate par un atome d'oxygène déstabilise considérablement la fixation de tous les ligands. Dans le cas du **65**, la constante d'inhibition passe de 2000 nM lorsque la molécule est simplement α-substituée à 16000 nM en sa version β-oxa-α-substituée, soit une augmentation d'un facteur huit. Les tests d'inhibitions avec les composés β-thia-α-substitués présentent des résultats beaucoup plus intéressants. Pour *E. coli* et *M. tuberculosis*, une diminution drastique des constantes d'inhibitions est observée. Pour *P. falciparum*, elles sont similaires à celles issues des dérivés α-substitués correspondant. Le composé émergent par son efficacité est le β-thia-α-dichlorophényl-substitué **68** avec les IC₅₀ de 5,9 nM, 9,2 nM et 4,5 nM pour les DXR issues de *E. coli*, *M. tuberculosis* et *P. falciparum*, respectivement. Néanmoins, des essais *in vitro*, réalisés sur les deux souches 3D7 et Dd2 de *P. falciparum* place le composé **65** en tête contre *PfDXR*-3D7 avec une IC₅₀ de 30 nM, où la molécule **68** obtient une IC₅₀ de 91 nM. L'efficacité *in vitro* des composés **65** à **68** est similaire face à *PfDXR*-Dd2 avec des IC₅₀ comprise entre 75 et 95 nM (pour information, la fosmidomycine montre une IC₅₀ de 880 nM sur *PfDXR*-3D7 et de 810 nM sur *PfDXR*-Dd2). Le β-thia-α-phényl-substitué **66** a été cocrystallisé en présence de la *PfDXR*, du dication métallique Mn²⁺ et du cofacteur NADPH. Comme l'équipe de Karl en 2011, l'équipe de Kurz observe que seul l'énantiomère S est presque exclusivement fixé dans le site actif de la protéine.⁸² Après séparation des énantiomères, ils découvrent que l'énantiomère S possède des activités inhibitrices beaucoup plus importantes que son énantiomère R (Tableau 6).⁹⁰

Tableau 6: Résultats des tests d'inhibitions réalisés *in vivo* par l'équipe de Kurz.⁹⁰

| 65 | IC₅₀ (nM) | | |
|-----------|-----------------------------|--------------|--------------|
| | EcDXR | MtDXR | PfDXR |
| R(-) | 4000 | 83000 | 12000 |
| S(-) | 5,1 | 120 | 9,4 |
| racémique | 8,2 | 280 | 24 |

C.5. Observation générale sur les inhibiteurs

Il existe beaucoup d'inhibiteurs de la DXR décrits dans la littérature, dont certains ont fourni des résultats très intéressants, comme par exemple la molécule **65**, analogue méthylé de la fosmidomycine à pince inversée et α -phényle substitué, la plus efficace contre *P. falciparum*. Inspiré de la revue de Jackson et Down, nous allons faire un bilan sur ce qu'il est bon de retenir.⁹²

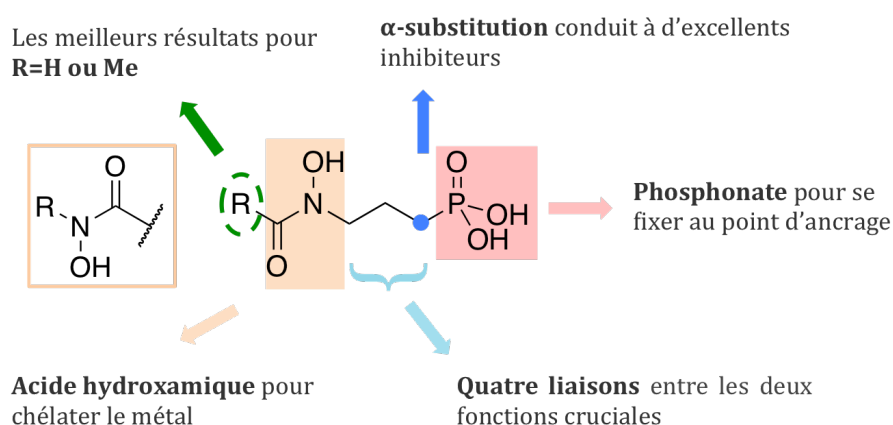


Figure 8: Relation structure activité des analogues de la fosmidomycine.

Les deux orientations de pince, rétro-hydroxamate et hydroxamate, sont les fonctions chélatantes les plus efficaces. Les remplacer par d'autre fonction entraîne une perte d'activité du composé. Les formes formyle et acétyle conduisent à des inhibiteurs de meilleure efficacité. A ce jour, il n'existe pas de substituant au niveau de la pince qui permette de fournir de résultats d'inhibition aussi bon que ceux de la fosmidomycine ou du Fr-900098. La fonction phosphonate est également cruciale pour permettre à la molécule de se fixer dans le site actif. Ces deux fonctions, la pince et le mime du point d'ancrage, sont les deux fonctions clés que possèdent tous les bons inhibiteurs de la DXR. Omettre l'un d'eux entraîne une perte d'inhibition drastique de la molécule candidate. L'espacement idéal entre ces fonctions est de trois atomes. Dans certain cas, rigidifier le squelette carboné peut contribuer à augmenter l'efficacité d'inhibition (**39**, Tableau 1). Enfin, les inhibiteurs α -aryle phosphonates, comme la molécule **65**, montrent d'excellentes capacités inhibitrices (Tableau 4).

-
- ¹ Broun, P., Somerville, « Progresse in plant metabolic engineering », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98, 8925-8927.
- ² Partridge, W.S., SCHIERZ, E.R., « OTTO WALACH: The First Organizer of the Terpenes », *Journal of Chemical Education*, 1947, 24, 106-108.
- ³ Wallach, O., « Alicyclic compounds », *Nobel Lecture*, 1910, 178-194.
- ⁴ Ruzicka, L., « The life and work of Otto Wallach », *Third Pedler Lecture*, 1932, 1532-1597.
- ⁵ Barkovich, R., Liao, J.C., « Metabolic Engineering of Isoprenoids », *Metabolic Engineering*, 2001, 3, 27-39.
- ⁶ Ruzicka, L., « The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds », *Experientia*, 1953, 9, 357-367.
- ⁷ Ramos-Valdivia, A.C., van der Heijden, R., Verpoorte, R., « Isopentenyl diphosphate isomerase : a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function », *Natural Product Report*, 1997, 14, 591-603.
- ⁸ a) Croteau, R. « Metabolism of monoterpenes in mint (mentha) species », *Planta Medica*, 1991, 57, S10-14; b) Carter, O. A., Peters, R. J., Croteau, R. « Monoterpene biosynthesis pathway construction in Escherichia coli », *Phytochemistry*, 2003, 64, 425-433.
- ⁹ Palaniappan, K., Holley, R. A, « Use of Natural Antimicrobials to Increase Antibiotic Suceptibility of Drug Resistant Bacteria », *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 140, 164-168.
- ¹⁰ Deilm, T., Haseneder, R., Zieglgänsberger, W., Rammes, G., Eisensamer, B., Rupprecht, R., Hapfelmeier, « α -Thujone reduces 5-HT₃ receptor activity by an effect on the agonist-induced desensitization », *Neuropharmacology*, 2004, 46, 192-201.
- ¹¹ Lachenmeier, D. W., Uebelacker, M., « Risk assessment of thujone in foods and medicines containing sage and wormwood - Evidence for a need of regulatory changes? », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2010, 58, 437-443.

¹² Kromidas, L., Perrier, E., Flanagan, J., Rivero, R., & Bonnet, I. « Release of antimicrobial actives from microcapsules by the action of axillary bacteria », *International Journal of Cosmetic Science*, 2006, 103–108.

¹³ Willig, K.W., « A Chemotaxonomic Analysis of Terpenoid Variation in *Cannabis* », *Biochemical Systematics and Ecology*, 2004, 32, 875-891.

¹⁴ Shen, Y.C., Tzeng, G.L., Kuo, Y.H., Khalil, A.T., « Cytotoxic Activity of Capnellene-8 β , 10 α -diol Derivatives from a Taiwanese Soft Coral *Capnella* sp. », *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2008, 55, 828-833.

¹⁵ Jean, Y.H, Chen, W.F., Sung, C.S, Duh, C.Y, Huang, S.Y., Lin, C.S., Tai, M.H, Tzeng, S.F., Wen , Z.H., « Capnellene, a natural marine compound derived from soft coral, attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats », *British Journal of Pharmacology*, 2009, 158, 713-725.

¹⁶ Trinh, K., Andrews, L., Krause, J., Hanak, T., Lee, D., Gelb, M., Pallanck, L., « Decaffeinated Coffee and Nicotine-Free Tobacco Provide Neuroprotection in *Drosophila* Models of Parkinson's Disease through an NRF2-Dependent Mechanism », *The Journal of Neuroscience*, 2010, 20, 5525-5532.

¹⁷ Ajikumar, P.K, Xiao, W.H., Tyo, K.E.J., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., Mucha, O., Phon, T.H., Pfeifer, B., Stephanopoulos, G., « Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in *Escherichia coli* », *Science*, 2010, 330, 70-75.

¹⁸ De Silva, E.D., Scheuer, P.J., « Three new sesterterpenoid antibiotics from the marine sponge *Luffariella variabilis* », *Tetrahedron Letters*, 1981, 22, 3147–3150.

¹⁹ Ebada, S.S., Lin, W.H., Proksch, P., « Bioactive Sesterterpenes and Triterpenes from Marine Sponges: Occurrence and Pharmacological Significance », *Marine Drugs*, 2010, 8, 313-346.

²⁰ Taylor, D. W., Hongqi Li, Dahl, J., Fago, F. J., Zinniker, D., Moldowan, J. M., « Biogeochemical evidence for the presence of the angiosperm molecular fossil oleanane in Paleozoic and Mesozoic non-angiospermous fossils », *Paleobiology*, 2006, 32, 179–190.

²¹ Bishop, G. J., Koncz, C. « Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling », *The Plant Cell*, 2002, 14, S97–S110.

²² Maharshak, N., Shapiro, J., Trau, H., « Carotenoderma-a review of the current literature », *International Journal of Dermatology*, 2003, 42, 178-181.

²³ Lombard, J., Moreira, D., « Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life », *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28, 87-99.

²⁴ Bloch, K., « The biological synthesis of cholesterol », *Nobel Lecture*, 1964, 78-100 ; Chaykin, S., Law, J., Phillips, A.H., Tchen, T.T., Bloch, K., « Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1958, 44, 998-1004

²⁵ Chaykin, S., Law, J., Phillips, A.H., Tchen, T.T., Bloch, K., « Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1958, 44, 998-1004.

²⁶ Lynen, F., « Biosynthetic pathways from acetate to natural products », *Pure and Applied Chemistry*, 1967, 14, 137-167.

²⁷ Back, P., Hamprecht, B., Lynen, F., « Regulation of Cholesterol Biosynthesis in Rat Liver: Diurnal Changes of Activity and Influence of Bile Acids », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1969, 133, 11-21.

²⁸ Hamprecht, Nüssler, C., B., Lynen, F., « Rhythmic changes of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase activity in livers of fed and fasted rats », *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1969, 4, 117-121.

²⁹ Miziorko, H.M., « Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 505, 131-143.

³⁰ Miziorko, H.M., Lane, D., « 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase », *The Journal of Biological Chemistry*, 1977, 252, 1414-1420.

³¹ Chen T.T., « Mevalonic Kinase: Purification and Properties », *Journal of Biochemistry*, 1958, 233, 1100-1103.

³² Dorsey, J.K., Porter, J.W., « The Inhibition of the Mevalonic Kinase by Geranyl and Farnesyl Pyrophosphates », *The Journal of Biological Chemistry*, 1968, 243, 4667-4670.

³³ Alvear, M., Jabalquinto, A. M., Eyzaguirre, J., Cardemil, E. « *Purification and characterization of avian liver mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase* » *Biochemistry*, 1982, 21, 4646-4650.

³⁴ a) Goodwin TW, « Incorporation of $^{14}\text{CO}_2$, $[2-^{14}\text{C}]$ acetate and $[2-^{14}\text{C}]$ mevalonic acid into β -carotene in etiolated maize seedlings », *Biochemical Journal*, 1958, 68, 26-27 ; b) Goodwin TW, « Studies in caroteno-genesis 25. The incorporation of $^{14}\text{CO}_2$, $[2-^{14}\text{C}]$ acetate and $[2-^{14}\text{C}]$ mevalonic acid into β -carotene by illuminated etiolated maize seedlings », *Biochemical Journal*, 1958, 70, 612-617.

³⁵ Bach T.J., Lichtenthaler H.K., « In- hibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation », *Physiologia Plantarum*, 1983, 59, 50-60.

³⁶ Flesch, G., Rohmer, M., « Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton », *European Journal of Biochemistry*, 1988, 175, 405-411.

³⁷ Rohmer, M., Knami, M., Simonin, P., Sutter, B., Sahm, H., « Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate », *Biochemical Journal*, 1993, 295, 517-524.

³⁸ Rohmer, M., Seeman, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H., « Glyceraldehyde 3-phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-Mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis », *Journal of American Chemical Society*, 1996, 118, 2564-2566.

³⁹ Eisenreich, W., Schwarz, M., Zenk, M. H., Bacherl, A., Cartayrade, A., Arigoni, D., « Terpenoid biosynthesis in Plants and Microorganisms », *Chemistry & Biology*, 1998, 5, 221-233.

⁴⁰ Rohmer, M., « Diversity in isoprene unit biosynthesis: The metherythritol phosphate pathway in bacteria and platids », *Pure and Applied Chemistry*, 2007, 79, 739-751.

⁴¹ Sprenger, G.A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graff, A.A., Taylor, S.V., Begley, T.P., Bringer-Meyer, S., Sahm, H., « Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate precursor to isoprenoids, thiamin and pyridoxol », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94, 12857-12862.

⁴² Xiang S., Usuanow G., Lange G., Busch, M., Tong, Liang, « Crystal Structure of 1-Deoxy-D-xylulose 5-Phosphate Synthase, a Crucial Enzyme for Isoprenoids Biosynthesis », *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 2676-2682.

⁴³ Julliard, J.H., Douce, R., « Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88, 2042-2045.

⁴⁴ Hills, R.E., Himmeldirk, Kennedy, I.A., Pauloski, R.M., Sayer, B.G., Wolf, E., Spenser, I.D., « The Biogenetic Anatomy of Vitamin B6 », *Journal of Biological Chemistry*, 271, 30426-30435.

⁴⁵ Banerjee, A., Wu, Y., Banerjee, Rahul, Li, Y., Yan, H., Sharkey, T.D., « Feedback Inhibition of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase Regulates the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway », *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288, 16926-16936.

⁴⁶ a) Girardo, A., Wright, L.P., Bi, Z., Rosenkranz, M., Pulido, P., Rodriguez-Concepcion, M., Niinemets, Ü., Brüggemann, N., Gershenzon, J., Schnitzer, J.P., « Metabolic Flux Analysis of Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Poplar Leaves Emitting and Nonemitting Isoprene », *Plant Physiology*, 2014, 165, 37-51 ; b) Wright, L.P., Rohwer, J.,M., Ghirardo, A., Hammerbacher, A., Ortiz-Alcaide, M., Raguschke, B., Schnitzer, J.P., Gershenzon, J., Phillips, M.A., « 1-Deoxy-D-xylulose 5-Phosphate Synthase Controls Flux through the Methylerythritol 4-phosphate Pathway in Arabidopsis », *Plant Physiology*, 2014, 165, 1488-1504.

⁴⁷ Mueller, C., Scwenger, J., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K., « Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis », *Biochemical Society Transactions*, 2000, 28, 792-793.

⁴⁸ Yasuor, H., Zou, W., Tolstikov, V. V, Tjeerdema, R. S., Fischer, A. J. « Differential oxidative metabolism and 5-ketoclozoxazole accumulation are involved in Echinochloa phyllopogon resistance to clomazone », *Plant Physiology*, 2010, 153(1), 319-326.

⁴⁹ Matsue, Y., Mizuno, H., Tomita, T., Asami, T., Nishiyama, M., Kuzuyama, T., « The herbicide ketoclozoxazole inhibits 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway and shows antibacterial activity against Haemophilus influenzae », *Journal of Antibiotics*, 2010, 63, 583-588.

⁵⁰ Hayashi, D., Kato, N., Kuzuyama, T., Sato, Y., Ohkanda, J., « Antimicrobial N-(2-chlorobenzyl)-substituted hydroxamate is an inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase », *Chemical Communications*, 2013, 49, 5535-5537.

⁵¹ Smith, J.M., Warrington, N.V., Vierling, R.J., Kuhn, M.L., Anderson, W.F., Koppisch, A.T., Meyers, C.L.F., « Targeting DXP synthase in human pathogens: enzyme inhibition and antimicrobial activity of butylacetylphosphonate », *Journal of Antibiotics*, 2014, 67, 77-83.

⁵² Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., Seto, Haruo, « A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalysing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevanonate pathway for terpenoid biosynthesis », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95, 9879-9884.

⁵³ Mac Sweeney, A., Lange, R., Fernandes, R. P. M., Schulz, H., Dale, G. E., Douangamath, A., Oefner, C., « The crystal structure of E. coli 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation », *Journal of Molecular Biology*, 2005, 345, 115–127.

⁵⁴ Rao, S.T., Rossmann, M.G., « Comparaison of Super-Secondary Structures in Proteins », *Journal of Molecular Biology*, 1973, 76, 241-256.

⁵⁵ Kuzuyama, T., Takahashi, S., & Watanabe, H. « Direct Formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate from 5-Phosphate Reductoisomerase, a New Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway to Isopentenyl Diphosphate », 1998, 39, 4509–4512.

⁵⁶ Fox, D. T., Poulter, C. D. « Mechanistic Studies with 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Synthase from Escherichia Coli », *Biochemistry*, 2005, 44, 8360–8368.

⁵⁷ Fox, D. T., Poulter, C. D., « Synthesis and Evaluation of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphoric Acid Analogues as Alternate Substrates for Methylerythritol Phosphate Synthase », *Journal of Organic Chemistry*, 2005, 70, 1978–1985.

⁵⁸ Wong, U., Cox, R. J., « The Chemical Mechanism of D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphate Reductoisomerase from Escherichia Coli », *Angewandte Chemistry International Edition English*, 2007, 46, 4926–4929.

⁵⁹ Munos, J. W., Pu, X., Mansoorabadi, S. O., Kim, H. J., Liu, H., « A Secondary Kinetic Isotope Effect Study of the 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase-Catalyzed Reaction : Evidence for a Retroaldol-Aldol Rearrangement », *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131, 2048–2049.

⁶⁰ Zhou, J., Wu, R., Wang, Binju, Cao, Z., Yan, H., Mo, Y., « Protton-Shuttle-Assisted Heterolytic Carbon-Carbon Bond Cleavage and Formation », *Catalysis*, 2015, 5, 2805-2813.

⁶¹ Radykewicz, T., Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M.H., Arigoni, D., « Biosynthesis of terpenoids : 1-deioxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase », *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2000, 446, 157-160.

⁶² Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., Seto, H., « Fosmidomycin, a Specific Inhibitor of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95, 9879–9884.

⁶³ a) Hendlin, D., Stapley, E.O., Jackson, M., Wallick, H., Miller, A.K., Wolf, F.J., Miller, T.W., Chaiet, L., Kahan, F.M., Foltz, E.L., Woodruff, H.B., Mata, J.M., Hernandez, S., Mochales, S., «Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces* », *Science*, 1969, 66, 122-123; b) Christensen, B.G., Leanza, W.J., Beattie, T.R., Patchett, A.A., Arison, B.H., Ormond, R.E., Kuehl, F.A. Jr, Albers-Schonberg, G., Jarderzky, O., « Phosphonomycin : Structure and Synthesis », *Science*, 1969, 166, 123-125.

⁶⁴ a) Okuhara, M, Kuroda, Y., Goto, T., Okamoto, M., Terano, H., Kohsaka, M. Aoki, H., Imanaka, H., « « Studies on new phosphonic acid antibiotics II. FR-900098 Isolation and Characterization », *Journal of Antibiotics*, 1980, 33, 13-17; b) Iguchi, E., Okuhara, M., Kohsaka, M. Aoki, H., « Studies on new phosphonic acid antibiotics II. Taxonomic studies on producing organisms of the phosphonic acid and related compounds », *Journal of Antibiotics*, 1980, 33, 18-23; c) Okuhara, M, Kuroda, Y., Goto, T., Okamoto, M., Terano, H., Kohsaka, M. Aoki, H., Imanaka, H., « Studies on new phosphonic acid antibiotics III. Isolation and Characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289 », *Journal of Antibiotics*, 1980, 33, 24-33; d) Kuroda, Y., Okuhara, M, Goto, T., Okamoto, M., Terano, H., Kohsaka, M. Aoki, H., Imanaka, H., « Studies on new phosphonic acid antibiotics IV. Structure determination of FR-33289, FR-31564 and FR-32863 », *Journal of Antibiotics*, 1980, 33, 29-35; e) Mine, Y., Kamimura, T., Nonoyama, S., Nishida, M., « In vitro and in vivo antibacterial activities of FR-31564, a new phosphonic acid antibiotic », *Journal of Antibiotics*, 1980, 33, 36-43; f) Kojo, H., Shigi, Y., Nishida, M., « FR-31564, a new phosphonic acid antibiotic: bacterial resistance and membrane permeability », *Journal of Antibiotics*, 1980, 33, 44-48.

⁶⁵ Wiesner J, Borrmann S, Jomaa H. « Fosmidomycin for the treatment of malaria », *Parasitology Research*, 2003, 90, 71-76.

⁶⁶ Kuemmerle, H.P., Murakawa, T., De Santis, F., « Pharmacokinetic evaluation of fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic », *Chemioterapia*, 1987, 6, 113-9.

⁶⁷ Borrmann, S., Issifou, S., Esser, G., Adegnika, A., Ramharter, M., Matsiegui, P.-B., Oyakhirome, S., Mawili-Mboumba, D.P., Missinou, M.A., Kun, J.F.J., Jomaa, H., Kremsner, P. G., « Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of Plasmodium falciparum malaria », *The Journal of Infectious Diseases*, 2004, 190, 1534–1540.

⁶⁸ Oyakhirome, S., Issifou, S., Pongratz, P., Barondi, F., Ramharter, M., Kun, J.F., Missinou, M.A., Lell, B., Kremsner, P.G., « Randomized Controlled Trial of Fosmidomycin-Clindamycin versus Sulfadoxine-Pyrimethamine in the Treatment of Plasmodium falciparum Malaria », 2007, 51, 1869-1871.

⁶⁹ Kojo, H., Shigi, H., Nishida, M., « Fr-31564, a new phosphonic acid antibiotic— bacterial resistance and membrane permeability », *Journal of Antibiotic (Tokyo)*, 1980, 33, 44-48.

⁷⁰ Brown, A.C., Parish, T., « Dxr is essential in Mycobacterium tuberculosis and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake », *Bio MedCentral Microbiology*, 2008, 8, 78.

⁷¹ Messiaen, A.S., Verbrugghen, T., Declerck, C, Ortmann, R., Schlitzer, M., Nelis, H., Van Calenbergh, S., Coenye, T., « Resistance of the *Burkholderia cepacia* complex to fosmidomycin and fosmidomycin derivatives », *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 38, 261-264.

⁷² Koppisch, A. T., Fox, D. T., Blagg, B. S. J., Poulter, C. D. « *E. coli* MEP synthase: steady-state kinetic analysis and substrate binding », *Biochemistry*, 2002, 41, 236-243.

⁷³ Golicnik, M., Stojan, J., « Slow-binding Inhibition », *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2004, 32, 228-235.

⁷⁴ Jackson, E. R., San Jose, G., Brothers, R. C., Edelstein, E. K., Sheldon, Z., Haymond, A., Johnny, C., Boshoff, H.I., Couch, R.D., Dowd, C. S., « The effect of chain length and unsaturation on Mtb Dxr inhibition and antitubercular killing activity of FR900098 analogs », *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 24, 649-653.

⁷⁵ Haemers, T., Wiesner, J., Busson, R., Jomaa, H., Van Calenbergh, S., « Synthesis of alpha-aryl-substituted and conformationally restricted fosmidomycin analogues as promising antimalarials », *European Journal of Organic Chemistry*, 2006, 17, 3856-3863.

⁷⁶ Devreux, V., Wiesner, J., Goeman, J., Van der Eycken, J., Jomaa, H., Van Calenbergh, S., « Synthesis and Biological Evaluation of Cyclopropyl Analogues of Fosmidomycin as Potent Plasmodium falciparum growth inhibitors », *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16, 1888-91.

⁷⁷ Munier, M., Thèse à l'Université de Strasbourg, 2016.

⁷⁸ Haemers, T., Wiesner, J., Van Poecke, S., Goeman, J., Henschker, D., Beck, E., Van Calenbergh, S., « Synthesis of alpha-substituted fosmidomycin analogues as highly potent Plasmodium falciparum growth inhibitors », *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16, 1888-1891.

⁷⁹ Katayama, N., Tsubotani, S., Nozaki, Y., Harada, S., Ono, H., « Fosfadecin and fosfocytocin, new nucleotide antibiotics produced by bacteria », *The Journal of Antibiotics*, 1990, 43, 238-246.

⁸⁰ Woo, Y. H., Fernandes, R. P. M., Proteau, P. J., « Evaluation of fosmidomycin analogs as inhibitors of the *Synechocystis* sp. PCC6803 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase », *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006, 14, 2375-2385.

⁸¹ Verbrugghen, T., Cos, P, Maes, L., Van Calenbergh, S., Calenbergh, S. Van, « Synthesis and evaluation of alpha-halogenated analogues of 3-(acetylhydroxyamino) propylphosphonic acid (FR900098) as antimalarials », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53, 5342–5346.

⁸² Andaloussi, D., Henriksson, M., Wie, L. M., Lindh, A., Karl, A., « Design, Synthesis, and X-ray Crystallographic Studies of alpha-Aryl Substituted Fosmidomycin Analogues as Inhibitors of Mycobacterium 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 2, 4964–4976.

⁸³ Nordqvist, A., Björkelid, C., Andaloussi, M., Jansson, A. M., Mowbray, S. L., Karlén, A., & Larhed, M., « Synthesis of functionalized cinnamaldehyde derivatives by an oxidative heck reaction and their use as starting materials for preparation of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase inhibitors », *Journal of Organic Chemistry*, 2011, 76, 8986–8998.

⁸⁴ Jansson, A. M., Wieckowska, A., Bjorkelid, C., Yahiaoui, S., Sooriyaarachchi, S., Lindh, M., Bergfors, T., Dharavath, S., Desroses, M., Suresh, S., Andaloussi, M., Nikhil, R., Sreevalli, S., Srinivana, B.R., Larhed, M., Jones, T.A., Karlen, A., Mowbray, S.L., « DXR inhibition by potent mono- and disubstituted fosmidomycin analogues », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56, 6190-6199.

⁸⁵ Ortmann, R., Wiesner, J., Silber, K., Klebe, G., Jomaa, H., Schlitzer, M., « Novel deoxy-D-xylulose 5-phosphate-reductoisomerase inhibitors : Fosmidomycin derivatives with spacious acyl residues », *Archiv Der Pharmazie*, 2007, 340, 483–490.

⁸⁶ Chofor, R., Risseuw, M. D. P., Pouyez, J., Johny, C., Wouters, J., Dowd, C. S., Couch, R.D., Van Calenbergh, S., « Synthetic fosmidomycin analogues with altered chelating moieties do not inhibit 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase or Plasmodium falciparum growth in vitro », *Molecules*, 2014, 19, 2571–2587.

⁸⁷ Kuntz, L., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C., Hemmerlin, A., Willem, A., Bach, T. J., Rohmer, M., « Isoprenoid biosynthesis as a target for antibacterial and antiparasitic drugs: phosphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase », *The Biochemical Journal*, 2005, 386, 127–135.

⁸⁸ Zinglé, C., Kuntz, L., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., « Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway : structural variations around phosphonate anchor and spacer of fosmidomycin, a potent inhibitor of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase », *The Journal of Organic Chemistry*, 2010, 75, 3203–3207.

⁸⁹ Nguyen-Trung, A. T., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C., & Rohmer, M., « Synthesis of tetrazole analogues of phosphonohydroxamic acids : an attempt to improve the inhibitory activity against the DXR », *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23, 1643–1647.

⁹⁰ Kunfermann, A., Lienau, C., Illarionov, B., Held, J., Gräwert, T., Behrendt, C.T., Werner, P., Hähn, S., Eisenreich, W., Riederer, U., Mordmüller, B., Bacher, A., Fisher, M., Groll, M., Kurz, T., « IspC as Target for Antiinfective Drug Discovery : Synthesis, Enantiomeric Separation, and Structural Biology of Fosmydomycin Thia Isosters », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56, 8151-8162.

⁹¹ Behrendt, C. T., Kunfermann, A., Illarionova, V., Matheussen, A., Gräwert, T., Groll, M., Rohdich, F.;Bacher,A., Eisenreich,W., Fischer, M., Maes, L., Kurz, T., « Synthesis and antiplasmodial activity of highly active reverse analogues of the antimalarial drug candidate Fosmidomycin », *ChemMedChem*, 2010, 5, 1673–1676.

⁹² Jackson, E.R., Dowd, C.S., « Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphate Reductoisomerase (Dxr) : A Review of the Synthesis and Biological Evaluation of Recent Inhibitors », *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012, 12, 706-728.

II. Présentation des objectifs de thèse

Le travail réalisé au cours de cette thèse s'articule autour de deux axes sur un même sujet de recherche : la modélisation moléculaire et la chimie organique. La pluridisciplinarité de ce projet ainsi que la mutualisation des connaissances issues de chacun, a mis en avant la complémentarité des deux domaines, théorique et expérimentale. Les principaux objectifs de nos travaux sont la conception de molécules ciblant la voie du MEP, ainsi qu'une meilleure caractérisation des interactions impliquées. Nous nous sommes principalement concentrés sur la deuxième enzyme de la voie du MEP, la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR). Comme décrit dans le chapitre « Introduction », cette enzyme catalyse la conversion du DXP en MEP. Etant absente chez les mammifères, elle est une cible de choix pour le développement de nouveaux composés antimicrobiens.

Nous avons tout d'abord voulu comprendre quelles étaient les interactions impliquées dans la reconnaissance des ligands dans le site actif de la DXR. Pour cela, une étude comparative entre des structures de la DXR d'*Escherichia coli* complexées avec différents ligands, incluant le substrat naturel et un inhibiteur. Cela nous a permis d'identifier les interactions sollicitées en présence de structures protéiques natives. A partir de ces informations, nous nous sommes intéressés à la DXR possédant la mutation S222T, résidu localisé dans le site actif, au niveau du point d'ancrage. Cette enzyme mutée a pour particularité d'être résistante face à la fosmidomycine, tout en conservant une activité enzymatique efficace. Ces résultats sont présentés dans le chapitre « V. Etude structurale et énergétique de la DXR » p. 120. Cette forme résistante de la DXR souligne l'influence que peut avoir la séquence du gène correspondant dans la souche étudiée et les conséquences qui peuvent en découler. Cette notion se retrouve lors d'inhibitions par des molécules sur des DXRs de différents organismes. Par exemple, une molécule possédant une activité satisfaisante à l'encontre d'une certaine souche, peut ne pas l'être autant, voire perdre son activité d'inhibition, face à une DXR d'une autre souche.

Ce phénomène a été étudié pour six inhibiteurs de la DXR et les résultats sont présentés dans le chapitre « VI. Etude comparative des interactions de plusieurs inhibiteurs de la DXR chez trois organismes » p148. Leurs inhibitions et énergies libres de fixation sur différentes DXR ont été mesurées expérimentalement chez trois organismes par Cai *et al.*: *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Plasmodium falciparum*.¹ D'importantes différences ont été relevées et nous avons voulu de comprendre quelles en étaient les raisons. Pour répondre à cette question, nous avons mis en place un protocole faisant appel à des méthodes de modélisation moléculaire couplées à de calculs d'énergie libre avec la méthode MM/PBSA.

En parallèle à ces questions théoriques concernant la fixation de ligand à la DXR, nous avons effectué une collaboration avec des organiciens et biologistes du laboratoire de Chimie et Biochimie de Molécules Bioactives (CBMB, Institut de Chimie, UMR7177), qui ont synthétisé et testé des molécules analogues phosphates d'inhibiteurs connus de la DXR. Certaines présentent des activités inhibitrices intéressantes mais n'ont, pour le moment, pas été cocrystallisées complexées à la protéine. En employant le protocole utilisé précédemment, nous avons étudié la nature et la qualité des interactions potentielles entre ces molécules et les résidus du site actif de l'enzyme. Ces calculs nous ont aidés à mieux comprendre, au niveau structural, les interactions contribuant à la fixation des ligands. Ces résultats sont présentés dans le chapitre « VII. Etude computationnelle d'analogues phosphates d'inhibiteurs de la DXR » p. 178.

¹ Cai, G., Deng, L., Fryszczyn, B. G., Brown, N. G., Liu, Z., Jiang, H., Palzkill, T., Song, Y., « Thermodynamic Investigation of Inhibitor Binding to 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase », *Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 3, 496–500.

Pour aller plus loin, nous avons également travaillé à la conception de nouveaux types d'inhibiteurs en collaboration avec les chimistes du laboratoire de CBMC. Nous avons imaginé voir plus loin que le site actif de la protéine, en nous intéressant aux résidus situés à proximité du site actif et impliqués dans la fixation du cofacteur NADPH. Ainsi, deux modèles de molécules ont été envisagés : le type biligand et le type bisubstrat.

A l'aide des méthodes computationnelles disponibles, plusieurs séries de molécules ont été modélisées, placées dans le site actif de la DXR par des méthodes de docking et analysées. Celles estimées prometteuses ont été proposées à nos collègues chimistes, et sont présentées dans le chapitre « VIII. Conception d'inhibiteurs potentiels de la DXR de type bisubstrat et biligand » p. 202.

Toujours dans l'optique de concevoir de nouveaux inhibiteurs de la DXR, nous avons travaillé à améliorer les capacités inhibitrices d'un inhibiteur synthétisé au sein du laboratoire CBMB. Cette molécule possède une fonction phosphonate et nous savons qu'elle est essentielle pour obtenir une fixation efficace dans le site actif de l'enzyme. Les groupements de type α,α -difluoro phosphonate possèdent une géométrie très proche de celle d'un phosphate. L'ajout de ce type de fonction permettrait de se rapprocher de la conformation du phosphate du DXP dans le site actif. A l'aide de notre protocole d'étude d'interactions, nous avons analysé les effets induits par ce groupement sur des inhibiteurs connus. Les résultats obtenus nous ont motivés à synthétiser deux molécules. Après plusieurs tentatives, nous avons mis en place une voie de synthèse permettant d'accéder à deux acides hydroxamiques de type α,α -difluoro phosphonate. Ces molécules, présentées dans le chapitre « IX. Etudes d'affinités et synthèses de potentiels inhibiteurs de la DXR de type α,α -difluoro phosphonate » p. 252, n'ont pas encore été testées mais les résultats initiaux obtenus se sont montrés prometteurs.

Pour finir, les deux derniers chapitres concernent des questions plus fondamentales concernant des mécanismes enzymatiques. Les études du mécanisme enzymatique catalysé par la DXR sont en faveur d'un réarrangement de type aldolisation/rétroaldolisation. Pour confirmer ce point à l'aide de méthode expérimentale, nous avons entrepris de synthétiser un analogue époxyde du substrat naturel. En se fixant dans le site actif, cette molécule pourrait être confondue par la protéine avec le DXP. La réaction enzymatique conduirait à la formation de nouveaux produits, dont l'analyse permettrait de confirmer le mécanisme proposé. Cependant, cette molécule pourrait se fixer via une liaison covalente dans le site actif de la protéine, la rendant inactive. Nous serions alors en présence d'un inhibiteur irréversible.

Nous nous sommes également intéressés à la première enzyme de la voie du MEP, la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS), qui est décrite dans le chapitre « Introduction ». Cette enzyme catalyse la synthèse du DXP à partir du D-GAP et du pyruvate, en présence de TPP. De précédentes études ont permis de découvrir que la DXS n'est pas énantiosélective par rapport à son substrat. Dans le but d'approfondir ces résultats et d'entreprendre des études cinétiques comparatives de bioconversion du D-GAP en DXP et du L-GAP en la version diastéréoisomérique du DXP, nous devons nous procurer les GAP correspondant énantiomériquement purs. Pour répondre à nos besoins, une méthode de synthèse organique permettant d'accéder aux D- et L-GAP a été développée.

Avant de présenter ces différents projets, nous allons tout d'abord revoir les bases de la structure des protéines, où nous discuterons également de la structure globale de la DXR. Par la suite, nous verrons les différentes méthodes computationnelles utilisées lors de ces travaux de thèse.

III. Structures protéiques et structures de la DXR

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| A. Macromolécules : Les protéines | 63 |
| A.1. Les acides aminés et la liaison peptidique | 63 |
| A.2. La structure primaire | 65 |
| A.3. La structure secondaire | 66 |
| A.3.1. Les hélices α | 66 |
| A.3.2. Les feuillets β | 66 |
| A.4. La structure tertiaire | 68 |
| A.5. La structure quaternaire | 68 |
| B. La diffraction aux rayons X | 69 |
| C. Structures cristallographiques de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate Réductoisomérase (DXR) | 70 |

A. Macromolécules : Les protéines

Les protéines sont des macromolécules essentielles pour les systèmes vivants, dans lesquels elles remplissent des rôles cruciaux. Nous allons brièvement voir de quoi elles sont faites et de quelle manière elles se structurent.

A.1. Les acides aminés et la liaison peptidique

Les protéines sont issues d'un assemblage linéaire d'acides aminés standard au nombre de 20 (Tableau 7). Un acide aminé est constitué d'un carbone central, appelé carbone α ($C\alpha$), lié à une amine primaire, un acide carboxylique, un hydrogène et un groupement R , variant d'un acide aminé à l'autre.

A l'exception de la glycine, qui possède le plus petit résidu, *R* est différent d'un atome d'hydrogène, ce qui fait du carbone α un carbone asymétrique. Ils sont donc chiraux et pour la totalité de ceux constitutifs des protéines, de configuration absolue L. Les groupements *R* déterminent les caractéristiques chimiques de chacun des différents acides aminés.

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

Tableau 7: Représentation des chaînes latérales des 20 acides aminés aussi que de leurs codes à trois et une lettre.

Dans une protéine, deux acides aminés sont liés par une liaison amide, aussi appelée liaison peptidique. Elle se forme entre le carboxylate, porté par le carbone α d'un acide aminé, et le groupement amine, porté par l'acide aminé voisin. Du fait de l'existence d'une forme mésomère, cette liaison peptidique est plane (Schéma 16). Une liaison peptidique peut adopter une conformation *cis* ou *trans*. Pour des raisons stériques par rapport aux chaînes latérales, la conformation *trans* est généralement la plus favorable et la plus répandue (Schéma 16). Néanmoins, nous trouvons également des liaisons peptidiques de conformation *cis* dans les structures de protéines, le plus souvent lorsqu'une proline est adjacente à la liaison ou dans certaines situations particulières.¹

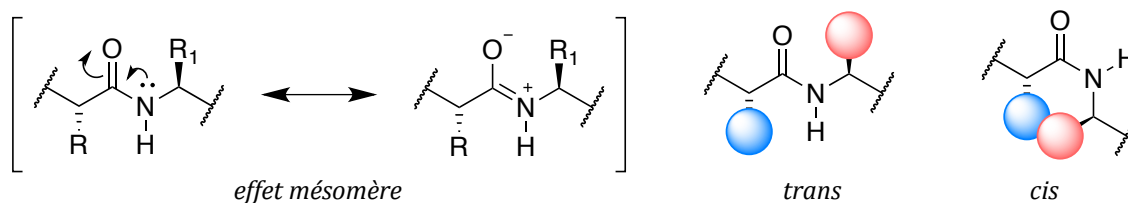


Schéma 16: Mésoamérie de la liaison peptidique et ses conformations *cis* et *trans*.

A.2. La structure primaire

La structure primaire correspond à la séquence des différents acides aminés. Elle se lit à partir de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Le squelette, comprenant une répétition d'unités N-C α -C, est appelé : chaîne principale. Les groupements *R* sont uniformément définis comme des chaînes latérales. La séquence ou certaines sections de cet assemblage peuvent déjà renseigner sur la fonction de la protéine, sa famille, ou sur la structure des niveaux plus élevés (*i.e.* secondaire, tertiaire).²

A.3. La structure secondaire

En 1951, Pauling et Corey sont les premiers à avoir proposés la présence de deux structures locales périodiques, les hélices α et les feuillets β , qui définissent la structure secondaire d'une protéine.^{3,4} Nous y trouvons également d'autres structures comme les coudes β ou les boucles Ω , que nous ne discuterons pas ici. Ces structures sont principalement stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les groupements $N-H$ et $C=O$ de fonctions amides distinctes et de résidus non voisins. Seule la chaîne principale est impliquée dans ces organisations, permettant ainsi de minimiser les gênes stériques potentiellement causées par les chaînes latérales.

A.3.1. Les hélices α

Les hélices α sont des structures très stables, où chaque groupe $N-H$ effectue une liaison hydrogène avec le $C=O$ de la troisième liaison peptidique.³ Tout $C=O_i$ appartenant à une hélice α participe à une liaison hydrogène avec le $N-H_{i+4}$, appartenant à la même hélice (Figure 9). Le pas d'une hélice α est d'environ 3,6 résidus et sa longueur moyenne est de 4 à 12 résidus.⁵

A.3.2. Les feuillets β

Un feuillet β est composé au minimum de deux brins β , où un brin correspond à une structure étendue qui, représentée seule, est non stabilisée par des liaisons hydrogènes.⁴ Le nombre de résidus séparant les deux brins est propre à la protéine. Généralement, la longueur de brin la plus fréquente est comprise entre 2 et 6 résidus. Les brins appareillés peuvent soit aller dans la même direction, ils sont appelés parallèles, soit en directions opposés, ils sont alors appelés antiparallèles (Figure 9).⁶ Pour ce dernier cas, les $N-H$ et $C=O$ effectuent des liaisons hydrogènes avec les $C=O$ et $N-H$ qui se trouvent face à eux, respectivement.

Dans le cas d'une organisation parallèle, le N-H participe à une liaison hydrogène avec le C=O face à lui, alors que le C=O est impliqué dans une liaison hydrogène avec le N-H situé deux résidus plus loin. Cela a pour conséquence de distordre les interactions, les rendant moins stables que les arrangements antiparallèles. Généralement les feuillets β sont arrangés de brins au nombre de 4 ou 5 mais il en existe de 10 et plus, comme par exemple chez les protéines transmembranaire (*i.e.* porine Ompf, PDBid 4GCP).⁷ Ils peuvent être parallèles, antiparallèles ou bien mixte, selon la protéine.

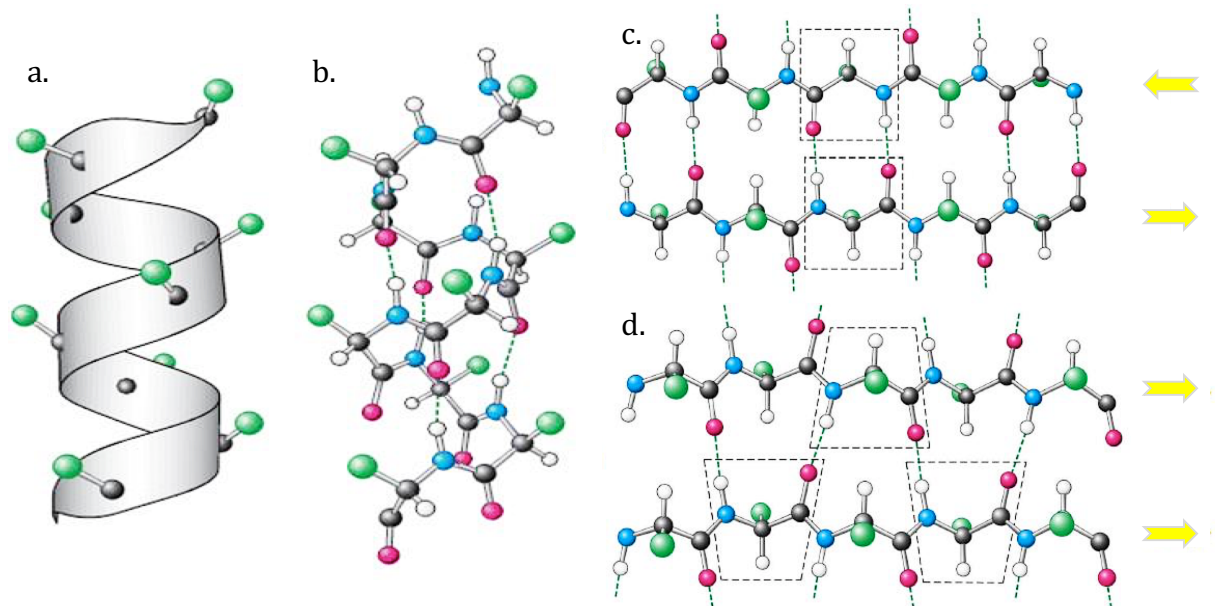


Figure 9: Les carbones sont représentés en noir, les azotes en bleu, les oxygènes en rouge, les hydrogènes en blanc et les chaînes latérales en vert. Les liaisons hydrogènes sont indiquées par des pointillés ; a. Représentation en ruban d'une hélice α avec les chaînes latérales pointant vers l'extérieur ; b. La même hélice α en représentation bâtonnets ; c. Un feuillet β antiparallèle ; d. Un feuillet β parallèle. Figure issue du livre de Biochemistry.⁸

A.4. La structure tertiaire

La structure tertiaire correspond à l'agencement spatial des différentes structures secondaires et présente en général la structure tridimensionnelle la plus stable de la protéine. Ce repliement peut impliquer la participation d'interactions ou de liaisons chimiques spécifiques pouvant être intramoléculaires ou intermoléculaires : ^{5,9,10}

- Des liaisons covalentes (*i.e.* ponts disulfures entre deux cystéines) ;
- Des liaisons hydrogènes ;
- Des interactions électrostatiques (*i.e.* ponts salins) ;
- Des interactions de van der Waals ;

Les structures tertiaires sont décomposées en différents domaines, dépendant de leur fonction, structure ou localisation, l'objectif étant de pouvoir les référencer et de faciliter les recherches d'homologies structurales.¹¹ Il en est de même pour les études de séquences.

A.5. La structure quaternaire

La structure quaternaire consiste en une structure impliquant deux ou plusieurs chaînes d'acides aminés.

B. La diffraction aux rayons X

La diffraction aux rayons X est la technique permettant la résolution de structures cristallographiques issues de cristaux.¹² Les rayons X possèdent une longueur d'onde de l'ordre de l'angström. Les distances interatomiques étant du même ordre de grandeur, ces radiations sont diffractées par les électrons des liaisons. Elles permettent alors de les localiser et d'en mesurer la densité.

A partir de la précision de ces informations, il est possible de reconstituer le réseau cristallin et d'attribuer des coordonnées cartésiennes à chacun des atomes observés. Cette méthode perd en précision et les analyses ne peuvent être exploitées dans plusieurs situations :

- Obtenir la position des atomes d'hydrogènes de macromolécules lorsque la résolution est supérieure à 1 Å. Etant très petits, ils interagissent très peu avec les rayons X ;
- Lorsqu'une partie est trop flexible, la zone diffractée est trop importante et nous ne pouvons attribuer une localisation précise (*i.e.* boucle de protéine non stabilisée) ;
- Protéines difficilement cristallisables, désordonnées. A ce moment, la technique ne peut être appliquée ;
- Résolution trop faible, lorsqu'elle est supérieure à trois angströms, ce qui peut venir d'un problème de cristallisation.

L'étape clé de la diffraction aux rayons X est l'obtention des cristaux à analyser. Les conditions de cristallisation peuvent modifier la structure et donc le résultat final (*i.e.* solvant piégé, pH, contre-ions, etc.).

C. Structures cristallographiques de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate Réductoisomérase (DXR)

Comme décrit dans le chapitre d'introduction, la DXR est une enzyme qui catalyse la conversion du DXP 14 en MEP 15, en présence d'un cation métallique divalent (Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) et d'un cofacteur NADPH. Sa structure a été publiée pour la première fois en 2002.¹³ A l'exception de la forme apo, elle cristallise sous forme d'homodimère et chaque sous-unité est composée de trois domaines organisés avec une architecture en « V » : i) le domaine N-terminal, impliquant le site de fixation du cofacteur (motif du repliement de Rosseman) ; ii) le domaine connecteur, siège de la réaction catalysée par la protéine ; iii) le domaine C-terminal (Figure 10).

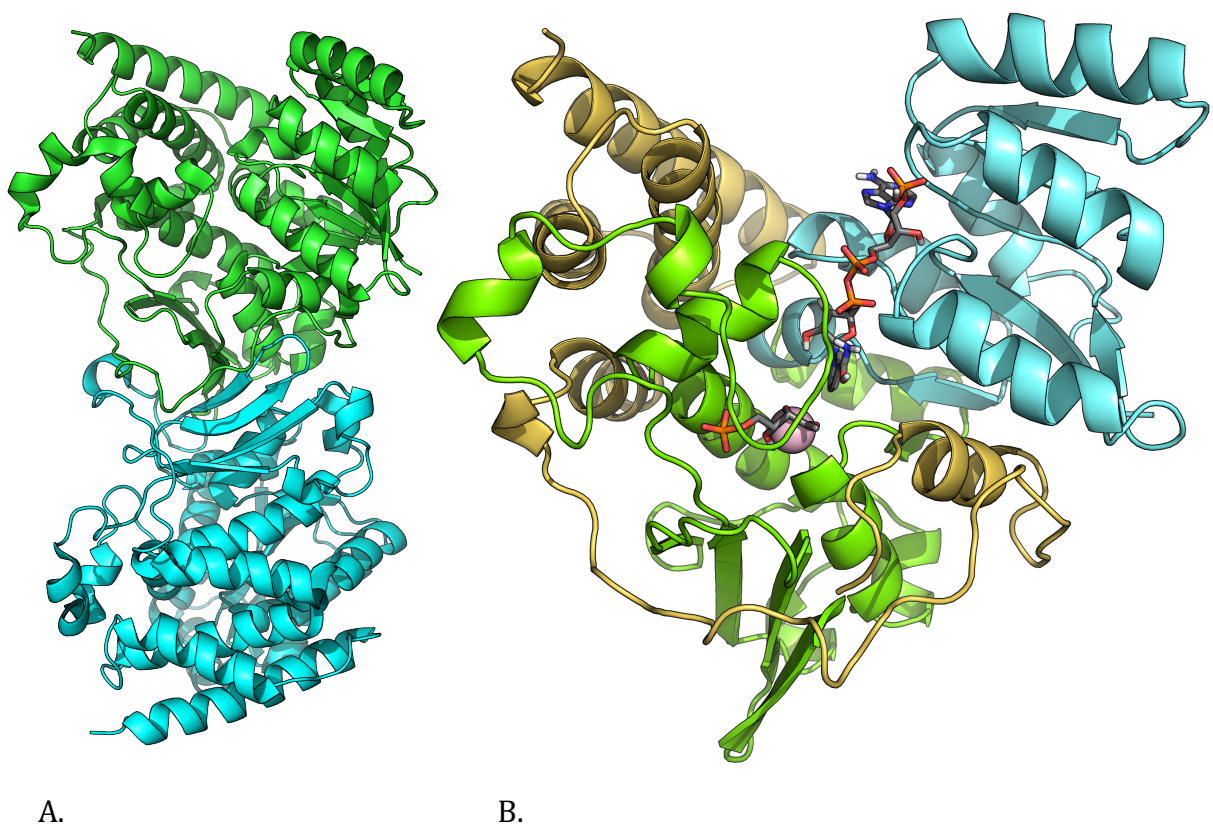


Figure 10: Homodimère (A) et monomère (B) de *EcDXR* (PDBid 1Q0Q).^{16c} Le monomère est en présence du DXP, du Mg^{2+} et du cofacteur NADPH.

La DXR a été cocrystallisée à de nombreuses reprises, à partir de différentes souches, en présence ou non de ligands. Les différentes structures sont disponibles à partir de la banque de données de structures protéiques cristallographiques (*Protein Data Bank*) et sont à ce jour au nombre de 60, dont 54 sont publiées dans 23 articles.¹⁴ 22 d'entre elles sont issues de *Mycobacterium tuberculosis*¹⁵, 15 d'*Escherichia coli*^{13,16}, 12 de *Plasmodium falciparum*¹⁷, 4 de *Moraxella catarrhalis*¹⁸, 2 de *Thermotoga maritima*¹⁹, 2 de *Zymomonas mobilis*²⁰, 2 de *Yersinia spp*²¹ et 1 d'*Acinetobacter baumannii*²².

La première structure signalée dans la littérature fut une *EcDXR* sous forme apo décrite par Reuter *et al.* en 2002.¹³ Ces auteurs décrivent une maille composée de trois sous-unités monomériques, chacune possédant une architecture en « V ». L'emplacement des sites de fixation du substrat, du dication métallique et du cofacteur, ont été supposés et en partie déduits par la similarité de réactivité avec l'acide acétohydroxy isoméro-réductase.²³ En effet, la réaction catalysée par cette dernière enzyme est très proche de celle catalysée par la DXR. Ils ont également noté la présence d'une boucle très flexible au niveau site actif (résidus 206-216, séquence *E. coli*), pour laquelle ils n'ont pu obtenir de densité électronique. Ils ont émis l'hypothèse qu'elle devait avoir un rôle protecteur pour le substrat vis à vis du solvant.

Dans la même année, Yajima *et al.* publièrent une structure de la DXR de *E. coli* (*EcDXR*) cocrystallisée en présence de NADPH, cette fois-ci, sous forme d'homodimère.^{16b} Par la suite, seule cette maille sera observée. La présence du cofacteur rend les domaines moins flexibles et l'interaction du 2'-phosphate du NADPH avec la Thr10 expliquerait que le NADH ne soit pas un bon candidat réducteur pour catalyser la réaction de la DXR. En effet, il a été observé qu'en remplaçant le NADPH par le NADH, l'activité enzymatique chute drastiquement à 1%.²⁴ L'orientation du cycle nicotinamide du cofacteur dirige le proton pro-S en C-4 vers la poche du site actif, indiquant que l'enzyme fait partie de la classe B des déshydrogénases.²⁵

En 2003, Steinbacher *et al.* réussirent à cocrystalliser l'*EcDXR* en présence de la fosmidomycine et du dication métallique Mn^{2+} .^{16a} Ils ont pu caractériser les interactions entre ces ligands et le site actif, et déterminer certains résidus servant de point d'ancrage à la fonction phosphonate (*i.e.* Ser186, Ser222, Asn227, Lys228). Cependant, la boucle reste encore assez flexible, ils en conclurent alors que la présence du cofacteur contribue à la fermeture de la boucle sur le site actif, y permettant le maintien du substrat et le protégeant du solvant. Le métal est chélaté par les résidus Asp150, Glu152 et Glu231 ainsi que par les oxygènes de la fonction rétro-hydroxamique de la fosmidomycine. Sa sphère octaédrique est complétée par la présence de trois molécules d'eau.

Les travaux de Mac Sweeney *et al.* furent les premiers à décrire une structure impliquant le DXP en présence du cofacteur.^{16c} Leurs résultats permirent d'avoir une vue précise du substrat dans son environnement et de déterminer les interactions impliquées avec la protéine. Les acides aminés participant à la fixation du phosphate ont tous été identifiés : Ser186, His209, Ser222, Asn227, Lys228. Le Trp212, la Met214, la Met276 et le cycle nicotinamide du cofacteur contribuent à la formation d'une zone hydrophobe à l'entrée du site actif. Ce dernier voit son accès obstrué par la présence du cofacteur. Les comparaisons des structures de l'enzyme cocrystallisées en présence de la fosmidomycine, avec et sans cofacteur, montrent un changement conformationnel non négligeable de la boucle surplombant le site actif (résidus 206-216 séquence *E. coli*). Elle passe d'une conformation ouverte ou partiellement ouverte en absence du cofacteur ou d'un ligand à une conformation fermée lorsque le système est complet. Cette boucle de confinement flexible semble jouer un rôle important dans la fixation des ligands dans le site actif et lors de la réaction catalysée par l'enzyme (*i.e.* les interactions impliquant l'His209, le Trp212 et la Met214 qui sont localisés sur la boucle, séquence *E. coli*). Ce type de phénomène a déjà été observé chez des isomérase, pour lesquelles le mouvement d'un domaine ou d'une boucle est requis pour protéger le substrat du solvant et permettre à la réaction enzymatique de s'opérer dans des conditions optimales.²⁶

De nombreuses équipes travaillèrent à l'élaboration de cristaux de la DXR de différents organismes afin de les comparer. Elles constatèrent que les structures obtenues étaient toutes très similaires et que l'architecture de la DXR est hautement conservée.^{15a,17,18,19,20,21,22} A ce jour, les travaux sur les structures de la DXR se concentrent principalement sur la recherche de nouveaux inhibiteurs. Elles permettent d'observer l'adaptation conformationnelle de la protéine à différents ligands, ainsi que les interactions impliquées à leurs fixations. Ces études de structures sont des outils puissants pour la conception de nouveaux inhibiteurs potentiels, notamment lorsqu'elles sont couplées à d'autres méthodes (*i.e.* docking, modélisation moléculaire et autres méthodes biophysiques).^{27,28} Nous aborderons plus en détails quelques-unes de ces techniques dans les prochains chapitres pour lesquels les sujets s'y prêteront.

¹ a) Levitt, M., « Effect of Proline Residues on Protein Folding », *Journal of molecular Biology*, 1981, 145, 251-263; b) Tchaicheyan, O., « Is peptide bond cis/trans Isomerization a key stage in the chemo-mechanical cycle of motor proteins? », *Federation of the American Societies for Experimental Biology* », 2004, 18, 783-789.

² Daily, J., Kalyanaraman, A., Krishnamoorthy, S., Vishnu, A., «A work stealing based approach for enabling scalable optimal sequence homology detection», *Journal of Parallel and Distributed Computing*, 2015, 79-80, 132-142.

³ Pauling, L., Corey, R. B., Branson, H. R., «The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1951, 37, 205-211.

⁴ Pauling, L., Corey, R. B., «The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1951, 37, 521-526.

⁵ Fersht, A. « Structure and Mechanism in Protein Science³ », First edition, W.H. Freeman, United States of America, 1999.

⁶ Kobayashi, K., Granja, J. R., Ghadiri, M. R., « β -Sheet Peptide Architecture: Measuring the Relative Stability of Parallel vs. Antiparallel β -Sheets», *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1995, 34, 95-98.

⁷ Ziervogel, B.K., Roux, B., « The binding of Antibiotics in Ompf Porin », *Structure*, 2013, 21, 1-12.

⁸ Berg, J., M., Tymoczko, J., L., Stryer, L., *Biochemistry*, 5^{ème} édition, USA, New York, 2002.

⁹ Fogolari, F., Brigo, A., Molinari, H., «Protocol for MM/PBSA molecular dynamics simulations of proteins». *Biophysical Journal*, 2003, 85, 159-166.

¹⁰ C.J. Tsai, R., Nussinov, « Hydrophobic folding units derived from dissimilar monomer structures and their interactions», *Protein Science*, 1997, 6, 24-42.

¹¹ Moroy, G., Martin, E., Dejaegere, A., Stote, R. H., «Molecular basis for Bcl-2 homology 3 domain recognition in the Bcl-2 protein family: Identification of conserved hot spot interactions», *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284, 17499-17511.

¹² Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., Jaskolski, M., «Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination», *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 2013, 280, 5705–5736.

¹³ Reuter, K., Sanderbrand, S., Jomaa, H., Wiesner, J., Steinbrecher, I., Beck, E., Stubbs, M. T., « Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis », *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277, 5378–5384.

¹⁴ www.rcsb.org; Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., « The protein Data Bank », *Nucleic Acids Research*, 2000, 28, 235-242.

¹⁵ a) Henriksson, L. M., Unge, T., Carlsson, J., Åqvist, J., Mowbray, S. L., Jones, T. A., « Structures of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis », *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 19905–19916 ; b) Andaloussi, M., Henriksson, L.M., Wie, A., Lindh, M., Bj, C., Larsson, A.M., Suresh, S., Iyer, H., Srinivasa, B.R., Bergfors, T., Unge, T., Mowbray, S.L., Larhed, M., Jones, T.A., Karl, A., « Design , Synthesis , and X-ray Crystallographic Studies of r-Aryl Substituted Fosmidomycin Analogues as Inhibitors of Mycobacterium », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 2, 4964–4976 ; c) Björkelid, C., Bergfors, T., Unge, T., Mowbray, S. L., Jones, T. A., « Structural studies on Mycobacterium tuberculosis DXR in complex with the antibiotic FR-900098 », *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2012, 68, 134–143 ; d) Jansson, A. M., Wieckowska, A., Björkelid, C., Yahiaoui, S., Sooriyaarachchi, S., Lindh, M., Mowbray, S. L., « DXR inhibition by potent mono- and disubstituted fosmidomycin analogues. » *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56, 6190-6199 ; e) Kholodar, S. A., Tomblin, G., Liu, J., Tan, Z., Allen, C. L., Gulick, A. M., Murkin, A. S., « Alteration of the Flexible Loop 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase », *Biochemistry*, 2014, 203, 3423-3431 ; f) Kholodar, S. A., Allen, C. L., Gulick, A. M., Murkin, A. S. « The role of phosphate in a multistep enzymatic reaction: Reactions of the substrate and intermediate in pieces », *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137, 2748–2756.

¹⁶ a) Steinbacher, S., Kaiser, J., Eisenreich, W., Huber, R., Bacher, A., Rohdich, F., « Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development », *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278, 18401–18407 ; b) Yajima, S., Hara, K., Sanders, J. M., Yin, F., Ohsawa, K., Wiesner, J.,

Oldfield, E., « Crystallographic structures of two bisphosphonate:1-deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase complexes », *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 10824–10835 ; c) Mac Sweeney, A., Lange, R., Fernandes, R. P. M., Schulz, H., Dale, G. E., Douangamath, A., Oefner, C., « The crystal structure of E. coli 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation », *Journal of Molecular Biology*, 2005, 345, 115–127 ; d) Yajima, S., Hara, K., Iino, D., Sasaki, Y., Kuzuyama, T., Ohsawa, K., Seto, H., « Structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in a quaternary complex with a magnesium ion, NADPH and the antimalarial drug fosmidomycin. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 2007, 63, 466–470 ; e) Deng, L., Diao, J., Chen, P., Pujari, V., Yao, Y., Cheng, G., Song, Y., « Inhibition of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase by lipophilic phosphonates: SAR, QSAR, and crystallographic studies », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 54, 4721–4734 ; f) Deng, L., Endo, K., Kato, M., Cheng, G., Yajima, S., Song, Y., « Structures of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase/Lipophilic Phosphonate Complexes », *Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 2, 165–170 ; g) Behrendt, C. T., Kunfermann, A., Illarionova, V., Matheussen, A., Pein, M. K., Gräwert, T., Kurz, T., « Reverse fosmidomycin derivatives against the antimalarial drug target IspC (Dxr) », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 54, 6796–6802.

¹⁷ a) Umeda, T., Tanaka, N., Kusakabe, Y., Nakanishi, M., Kitade, Y., Nakamura, K. T., « Molecular basis of fosmidomycin's action on the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* », *Scientific Reports*, 2011, 1, 1-9 ; b) Xue, J., Diao, J., Cai, G., Deng, L., Zheng, B., Yao, Y., & Song, Y., « Antimalarial and structural studies of pyridine-containing inhibitors of 1-deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase », *Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 4, 278–282 ; c) Kunfermann, A., Lienau, C., Illarionov, B., Held, J., Gräwert, T., Behrendt, C. T., Kurz, T., « IspC as target for anti-infective drug discovery: Synthesis, enantiomeric separation, and structural biology of fosmidomycin thia isosters » *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56, 8151-8162 ; d) Konzuch, S., Umeda, T., Held, J., Hähn, S., Brücher, K., Lienau, C., Kurz, T., « Binding modes of reverse fosmidomycin analogs toward the antimalarial target IspC », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 57, 8827–8838.

¹⁸ Structures déposées mais non publiées (PDBid : 4ZQE, 4ZQF, 4ZQG, 4ZQH)

¹⁹ Takenoya, M., Ohtaki, A., Noguchi, K., Endo, K., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Yohda, M., « Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from the

hyperthermophile *Thermotoga maritima* for insights into the coordination of conformational changes and an inhibitor binding, », *Journal of Structural Biology*, 2010, 170, 532–539.

²⁰ Ricagno, S., Grolle, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H., Lindqvist, Y., Schneider, G., « Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Zymomonas mobilis* at 1.9-Å resolution », *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2004, 1698, 37–44.

²¹ Structures déposées mais non publiées (PDBid : 3ILE, 5DUL)

²² Structures déposée mais non publiée (PDBid : 4ZQE)

²³ Biou, V., Dumas, R., Cohen-Addad, C., Douce, R., Job, D., Pebay-Peyroula, E., « The crystal structure of plant acetohydroxy acid isomeroeductase complexed with NADPH, two magnesium ions and a herbicidal transition state analog determined at 1.65 Å resolution », *The European Molecular Biology Organization Journal*, 1997, 16, 3405–3415.

²⁴ Kuzuyama, T., Takahashi, S., Watanabe, H. Seto, H., « Direct formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-D-xylulose in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate », *Tetrahedron Letters*, 1998, 39, 4509-4512 .

²⁵ Radykewicz, T., Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bachner, A., Zenk, M.H., Arigoni, D., « Biosynthesis of terpenoids : 1-deoxy- D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase », *The Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2000, 465, 157-160

²⁶ Marks, G.T., Harris, T.K., Massiah, M.A., Mildvan, A.S., Harrison, D.H., « Mechanistic implications of methylglyoxal synthase complexed with phosphoglycolohydroxamic acid as observed by X-ray crystallography and NMR spectroscopy », *Biochemistry*, 2001, 40, 6805–6818.

²⁷ Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., Cui, M., « Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery », *Current Computer-Aided Drug Design*, 2011, 7, 146–157.

²⁸ Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., Lowe, E. W, « Computational methods in drug discovery », *Pharmacological Reviews*, 2014, 66, 334–395.

IV. Méthodes computationnelles standard

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| A. Mécanique Moléculaire..... | 80 |
| A.1. Fonction d'énergie potentielle | 81 |
| A.2 Termes liés..... | 82 |
| A.2.1. Termes de liaisons..... | 82 |
| A.2.2. Terme des angles de liaisons..... | 83 |
| A.2.3. Terme d'Urey-Bradley..... | 84 |
| A.2.4. Terme des angles dièdres..... | 85 |
| A.2.5. Terme des angles impropres | 86 |
| A.2. Termes non liés..... | 87 |
| A.2.1. Interactions de van der Waals..... | 87 |
| A.2.2. Interactions électrostatiques | 88 |
| A.3. Traitement des liaisons hydrogène..... | 89 |
| A.4. Traitement des interactions longues distances des voisins non liés..... | 89 |
| A.4.1. La fonction de troncature..... | 90 |
| A.4.2. La fonction de SHifted cutoff..... | 90 |
| A.4.3. Fonction de SWitched cutoff..... | 91 |
| A.4.4. Méthode de sommation d'Ewald..... | 92 |
| A.5. Traitement du solvant en dynamique moléculaire | 93 |
| A.5.1 Simulations avec un solvant explicite..... | 94 |
| A.5.2 Simulations avec un solvant implicite..... | 94 |
| A.6. Minimisation de l'énergie d'un système | 95 |
| A.6.1. Méthode de minimisation de premier ordre..... | 96 |
| A.6.2. Méthode de minimisation de deuxième ordre..... | 97 |
| B. Simulation de Dynamique Moléculaire | 99 |
| B.1. Les algorithmes d'intégrations | 99 |
| B.1.1. Seconde loi de Newton | 99 |
| B.1.2. Algorithme de propagation de Verlet..... | 101 |
| B.1.3. Algorithme de Leap-Frog, « bond de grenouille »..... | 102 |

| | |
|---|------------|
| B.1.4. Loi de Maxwell-Boltzmann | 103 |
| B.1.5. Pas de temps (Time Step) | 105 |
| B.1.6. Algorithme de contraintes SHAKE..... | 105 |
| B.1. Simulation de dynamique moléculaire à constantes..... | 106 |
| B.1.1. Dynamique à température constante | 107 |
| B.1.2. Dynamique à pression constante | 107 |
| B.1.3. Conditions Périodiques : Periodic Boundary Conditions..... | 108 |
| C. Amarrage moléculaire ou Docking moléculaire | 110 |
| C.1. Fonction de score | 110 |
| C.2. Définition de la grille de recherche | 111 |
| C.3. Algorithme génétique de Lamarckien..... | 111 |
| D. Génération de paramètres pour de nouveaux ligands | 111 |
| E. Application de l'équation de Poisson-Boltzmann | 112 |
| E.1. Principe | 112 |
| E.2. Méthode..... | 113 |
| F. Analyses des simulations de dynamique moléculaire | 115 |
| F.1. Déviation des positions atomique : RMSD..... | 115 |
| F.2. Fluctuation des positions atomique : RMSF | 116 |

A. Mécanique Moléculaire

La mécanique moléculaire est une approche computationnelle qui est fondée sur un champ de force empirique permettant de décrire le lien unissant la structure à l'énergie. Elle s'affranchit des mouvements électroniques et ne traite que les positions des noyaux des atomes. Cette méthode exploite le cadre de la mécanique classique, la même qui décrit le mouvement macroscopique des objets. La mécanique moléculaire rend accessible l'analyse et la réalisation de calculs sur des systèmes possédant un nombre d'atomes conséquent sur des échelles de temps raisonnables pour l'étude de bons nombres de systèmes biologiques.

La mécanique moléculaire est un domaine très large dont le développement est continuellement en expansion, du fait de la diversité de ses applications, qui font nous poser de nouvelles questions. Dans ce chapitre, nous allons voir les méthodes que nous avons utilisé et qui nous ont aidé à élaborer notre travail.

A.1. Fonction d'énergie potentielle

Une molécule est définie par l'agencement de ses atomes. Ils lui confèrent une géométrie et une liberté de mouvements ainsi que des propriétés caractéristiques, dépendantes des atomes eux-mêmes (*i.e.* la charge portée par l'atome). Le champ de force regroupe différents termes d'énergies qui décrivent les bases physico-chimiques de structures moléculaires. Nous décrirons ces termes plus tard. Les paramètres de ces termes d'énergies, qui représentent différentes caractéristiques chimiques, sont déterminés par des résultats expérimentaux et des calculs de mécanique quantique. L'ensemble de ces paramètres, correspondant à des fonctions d'énergies, est appelé champ de force. A l'aide d'un champ de force, il est possible de calculer l'énergie E d'un système en fonction de ses coordonnées atomiques \vec{R} . Nous avons utilisé pour nos calculs les champs de force ALLATOM22 et ALLATOM36, adaptés au logiciel CHARMM.^{1,2} Ils ont permis d'obtenir l'énergie potentielle de nos systèmes via l'équation suivante :

$$\begin{aligned}
 E(\vec{R}) = & \sum_{\text{liaisons}} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{Urey-Bradley}} K_{UB} (S - S_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{dièdres}} K_\varphi (1 + \cos(n\varphi - \delta)) + \sum_{\text{impropres}} K_\omega (\omega - \omega_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{pairs non liés}} \left\{ \epsilon_{ij}^{\min} \left[\left(\frac{R_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}} \right\} \\
 & + \sum_{\text{résidus}} E_{CMAP}(\varphi, \psi)
 \end{aligned} \tag{1}$$

L'énergie potentielle est la somme de plusieurs termes pouvant être regroupés en deux catégories : les termes liés et les termes non liés, dans l'équation (1), se référant à nos systèmes.

A.2 Termes liés

Les termes liés concernent les termes de liaisons, des angles de liaisons, des angles dièdres, des angles impropres et des interactions de type 1,3 d'Urey-Bradley. Ils impliquent des atomes liés par liaisons covalentes.

A.2.1. Termes de liaisons

$$V_{liaisons} = \sum K_r (r - r_0)^2 \quad (2)$$

Ce terme, oscillateur harmonique, représente la somme des énergies produites par l'élongation des liaisons covalentes du système. Imaginons une liaison, représentée par un ressort, entre deux atomes, représentés chacun par une sphère (Figure 11). La distance entre les atomes, notée r , va osciller autour de la valeur r_0 , qui est la valeur de r à l'équilibre, et ce en fonction de la résistance du ressort, définie par la constante K_r . Plus la valeur de r va s'éloigner de sa valeur à l'équilibre r_0 , plus l'énergie augmentera.

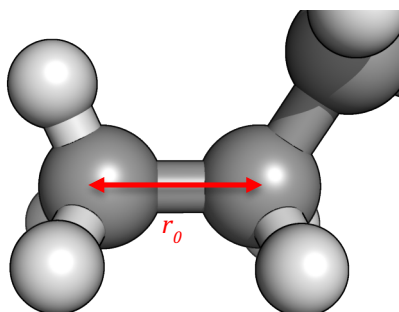


Figure 11: Représentation d'une liaison entre deux atomes de carbone. La distance va osciller à la manière d'un ressort, en fonction de la constante de force de la liaison, autour de sa valeur à l'équilibre, défini par r_0 .

A.2.2. Terme des angles de liaisons

$$V_{angles} = \sum K_{\theta}(\theta - \theta_0)^2 \quad (3)$$

Le terme des angles de liaisons, considéré comme un oscillateur harmonique, prend en compte la déformation d'angle entre trois atomes. Pour se représenter ce phénomène, nous prenons trois atomes, A, B et C, formant l'angle \widehat{ABC} , qui peut être représenté par un ressort (Figure 12). La valeur de l'angle \widehat{ABC} θ va osciller autour de la valeur θ_0 , valeur de θ à l'équilibre, et cela en fonction de la résistance du ressort définie par la constante K_{θ} . Plus la valeur de θ va s'éloigner de sa valeur à l'équilibre θ_0 , plus l'énergie augmentera.

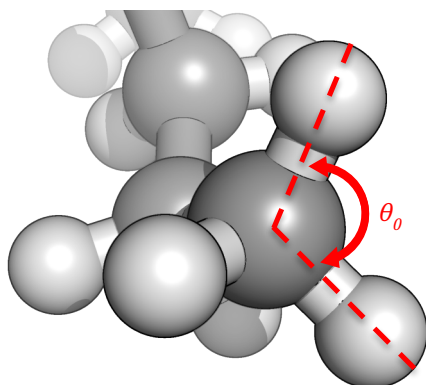


Figure 12: Représentation d'un angle de liaison. La valeur de l'angle va varier en fonction de sa constante de force, autour de sa valeur à l'équilibre, défini par θ_0 .

A.2.3. Terme d'Urey-Bradley

$$V_{UB} = \sum K_{UB}(S - S_0)^2 \quad (4)$$

Le terme d'Urey-Bradley, considéré comme un oscillateur harmonique, permet de traiter les interactions de type 1,3, c'est à dire lorsque deux atomes sont séparés par deux liaisons covalentes (Figure 13).³ La distance entre ces deux atomes est représentée par S , qui oscillera autour de sa valeur à l'équilibre S_0 . Le tout, en fonction de la constante de force K_{UB} . A nouveau, plus la valeur de S s'éloignera de sa valeur à l'équilibre, plus l'énergie de la fonction augmentera.

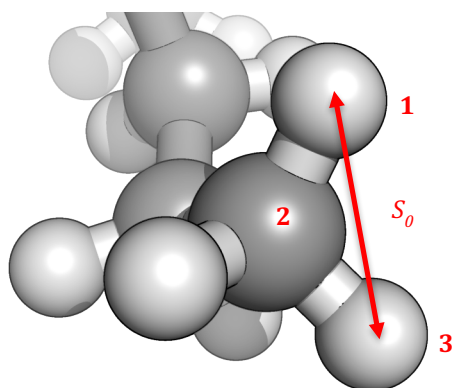


Figure 13: Représentation de l'interaction 1,3. La distance va varier autour de la valeur S_0 , en fonction de sa constante de force.

A.2.4. Terme des angles dièdres

$$V_{dièdres} = \sum K_{\varphi} (1 + \cos(n\varphi - \delta)) \quad (5)$$

La particularité de l'angle de torsion est sa périodicité par la rotation autour de la liaison qui le définit. Pour cette raison, le terme des angles dièdres est une fonction trigonométrique faisant intervenir un cosinus dans le cas du champ de force de CHARMM. La constante K_{φ} représente la force de la barrière de rotation, propre au système à quatre atomes considérés, et l'angle de torsion du dièdre correspond à φ (Figure 14). Il est défini par l'angle entre les plans définis par les atomes (ABC) et (BCD), respectivement. La valeur de la multiplicité est donnée par le terme n . Il définit le nombre de fois que la fonction passera par un minimum énergétique lors de la rotation du dièdre sur 360° . Le facteur de phase δ détermine les valeurs de torsions des angles pour lesquels la fonction passe par un minimum.

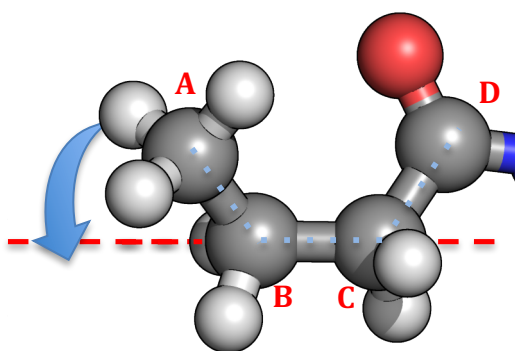


Figure 14: Représentation d'un angle dièdre, impliquant quatre atomes de carbone, A, B, C et D. Par soucis de clarté, seule la rotation de l'atome A, autour de la liaison (BC). Il en sera de même pour l'atome D. Sur les 360° de rotation, la multiplicité n , correspond au nombre de fois que des valeurs des angles dièdres φ conduisent à des minimums d'énergies.

A.2.5. Terme des angles impropres

$$V_{impropres} = \sum K_{\omega}(\omega - \omega_0)^2 \quad (6)$$

Le terme des angles impropres, prend la forme d'un oscillateur harmonique et permet d'imposer une planéité pour certaines fonctions. Imaginons quatre atomes, A, B, C et D. L'atome D doit rester dans le plan défini par les atomes A, B, C. L'atome D est relié à ce plan par l'atome C. La valeur de l'angle formé par l'intersection du plan (ABC) avec la droite (CD) ω va osciller autour de sa valeur d'équilibre ω_0 et cela en fonction de la constante de force de l'angle impropre K_{ω} . Plus la valeur de ω va s'éloigner de sa valeur à l'équilibre ω_0 , plus l'énergie augmentera. Par convention, le premier des quatre atomes listés est au centre des trois autres. Ci-dessous, l'exemple du cas de l'acétone (Figure 15).

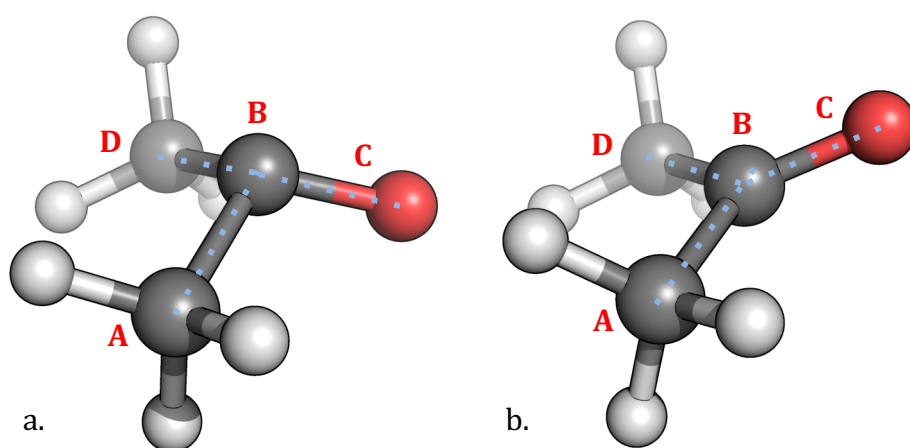


Figure 15: Ci-dessus deux conformations de la molécule d'acétone. La conformation a. présente une géométrie erronée flagrante au niveau de la fonction carbonyle cétone. Les paramètres pour l'angle impropre \widehat{BACD} correspondant à une cétone ont été appliqués pour la conformation b., conduisant à une meilleure géométrie de la fonction cétone.

A.2. Termes non liés

Comme termes appelés non liés, nous retrouvons les interactions de van der Waals et les interactions électrostatiques, impliquant des paires d'atomes. Ces termes sont appliqués aux atomes séparés de trois liaisons et plus.

A.2.1. Interactions de van der Waals

L'énergie potentielle de van der Waals est une énergie résiduelle attractive ou répulsive qui s'opère entre des atomes non liés différente de l'électrostatique. Elle découle de la corrélation des fluctuations de densités électroniques. Lors d'applications pratiques, le plus souvent, l'énergie de van der Waals est représentée par la fonction d'énergie potentielle de Lennard-Jones 6-12 suivante :⁴

$$V_{vdw} = \sum \epsilon_{ij}^{min} \left[\left(\frac{R_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (7)$$

$$\epsilon_{ij}^{min} = \sqrt{\epsilon_{ii}^{min} * \epsilon_{jj}^{min}} \quad (8)$$

$$R_{ij}^{min} = \frac{R_i^{min} + R_j^{min}}{2} \quad (9)$$

Où la distance R_{ij}^{min} est la distance à laquelle le potentiel atteint son minimum. La profondeur du puits d'énergie est définie par ϵ_{ij}^{min} où les indices i et j correspondent aux atomes considérés et r_{ij} représente la distance entre les deux atomes. Le premier terme $\left(\frac{R_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^{12}$ représente le terme dit répulsif, dominant à courte distance, dû au recouvrement des densités électroniques des deux atomes (répulsion de Pauli). Le deuxième terme $\left(\frac{R_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^6$ est dit attractif et dominant à plus grande distance (force de dispersion de London).

Dans le champ de force CHARMM, chaque type d'atome possède une valeur ϵ et R_{ij}^{min} prédéfinie. Pour les interactions entre les différents types d'atomes, le champ de force CHARMM va calculer la valeur ϵ_{ij}^{min} via une moyenne géométrique (équation 8) et R_{ij}^{min} via une moyenne arithmétique (équation 9) en prenant en compte pour chaque atome, son type atomique.

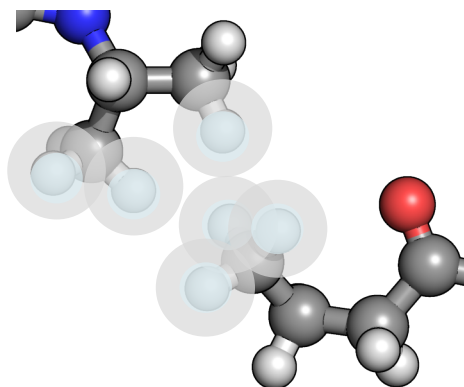


Figure 16: Représentation imagée d'interactions de van der Waals non liantes entre certains atomes de deux molécules.

A.2.2. Interactions électrostatiques

L'énergie potentielle électrostatique est une interaction de longue distance entre des atomes ou groupes d'atomes chargés, qui est représentée par le potentiel de Coulomb :

$$V_{elec} = \sum \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}} \quad (10)$$

où q_i et q_j correspondent aux charges des atomes considérés. La constante relative diélectrique du milieu ϵ est égale à un en solvant explicite, correspondant à la valeur de la permittivité du vide ϵ_0 . La distance entre les deux atomes est définie par r_{ij} . Généralement, dans tous les champs de force empiriques, tous les atomes portent une charge partielle.

A.3. Traitement des liaisons hydrogène

La petite taille de l'atome d'hydrogène et sa tendance à être polarisé positivement le rendent propice à interagir avec des voisins électronégatifs, conduisant potentiellement à la formation d'une liaison hydrogène. L'estimation de l'énergie d'une liaison hydrogène est de 2,4 et 9,6 kcal.mol⁻¹.⁵ Pour se faire, la liaison hydrogène doit posséder une géométrie particulière. L'atome d'hydrogène de l'atome donneur de liaison hydrogène doit se trouver à une certaine distance de l'atome accepteur de liaison hydrogène (de 2,2 Å jusqu'à 4 Å). L'angle formé entre l'atome d'hydrogène, l'atome accepteur de liaison hydrogène et l'atome porteur de ce dernier, doit être compris entre 130 et 180°. ⁶ La force de liaison dépendra de la capacité des participants à s'orienter et s'approcher de manière optimale. Dans certains anciens champs de force, les liaisons hydrogène étaient traitées de manière explicite dans le calcul de l'énergie potentielle. Cependant, dans le champ de force CHARMM, elles sont prises en comptes de manière implicite au travers des interactions électrostatiques et de van der Waals.

A.4. Traitement des interactions longues distances des voisins non liés

Les calculs des potentiels des termes liés (élongations de liaisons, déformations des angles et les torsions) par un champ de force sont tous proportionnels au nombre d'atomes composant le système étudié. En revanche, ceux des termes non liés (interactions de van der Waals et interactions électrostatiques) sont proportionnels au carré du nombre d'atomes composant ce système. Ces types d'interactions impliquent toutes les combinaisons de paires d'atomes possibles du système, engendrant des coûts de calculs considérables. Pour pallier ce problème posé par les termes non liés, des techniques, fondées sur des valeurs de distances de séparation, ont été développées pour traiter les interactions entre voisins non liés sur les longues distances.

L'idée est de pouvoir négliger les interactions entre les atomes séparés par une distance supérieure à celle définie comme distance limite (*cutoff*). Il existe plusieurs approches pour appliquer cette fonction. Nous allons ici vous en présenter trois : i) la fonction de troncature ; ii) la fonction SHifted ; iii) la fonction SWitched (Figure 17).

A.4.1. La fonction de troncature

La méthode la plus simple est la fonction dite de troncature. Lorsque la distance entre deux voisins non liés dépasse la valeur définie comme limite, la valeur résultante de leurs interactions sera nulle. Cependant, cette approche engendre des discontinuités à la surface de l'énergie potentielle qui génèrent d'importante perturbation du système. Cette méthode n'est donc pas à recommander et n'est pas souvent utilisée.

A.4.2. La fonction de SHifted cutoff

Une autre approche générale est la fonction de *SHifted cutoff* qui revient à soustraire une constante tout le long de la fonction d'énergie potentielle, modifiant ainsi toutes les valeurs de cette dernière. Cette fonction peut être appliquée aussi bien au terme des interactions de van der Waals, qu'au terme des interactions électrostatiques.

$$SH(r) = \left(1 - \left(\frac{r}{r_c}\right)^2\right)^2 \quad r \leq r_c \quad (11)$$

$$SH(r) = 0 \quad r > r_c \quad (12)$$

Lorsque la distance r entre les deux voisins non liés est inférieure ou égale à la valeur r_c de la valeur limite du *cutoff* définie, l'équation 11 est appliquée. Elle sera multipliée par le ou les termes non liés considérés. Quand la valeur de r_c est strictement dépassée, les forces et les énergies seront égales à zéros (équation 12).

A.4.3. Fonction de *SWitched cutoff*

L'application de la méthode de *SWitched cutoff* est une alternative à la précédente fonction de *SHifted cutoff*. Elle définit une gamme de distance dans laquelle doit se retrouver la distance des deux voisins non liés considérés.

$$SW(r, r_{on}, r_{off}) = 1 \quad r \leq r_{on} \quad (13)$$

$$SW(r, r_{on}, r_{off}) = \frac{(r_{off} - r)^2 (r_{off} + 2r - 3r_{on})}{(r_{off} - r_{on})^3} \quad r_{on} < r \leq r_{off} \quad (14)$$

$$SW(r, r_{on}, r_{off}) = 0 \quad r > r_{off} \quad (15)$$

Lorsque la distance r , entre les deux voisins non liés, est inférieure ou égale à la valeur limite r_{on} , la fonction $SW(r, r_{on}, r_{off}) = 1$ (équation 13), et lorsqu'elle est supérieure r_{off} , $SW(r, r_{on}, r_{off}) = 0$ (équation 15). Pour les valeurs de r intermédiaires, l'équation 14 est appliquée. L'avantage de la fonction *SWitched cutoff* revient pour les courtes distances ($r \leq r_{on}$). Dans ces cas-là, elle ne perturbe pas l'énergie potentielle, ce qui particulièrement intéressant pour les interactions de type van der Waals. L'inconvénient est qu'elle peut introduire des forces électrostatiques non réalistes pour les atomes séparés par des distances comprises entre r_{on} et r_{off} , ce qui peut perturber les propriétés moyennes de la structure.⁷

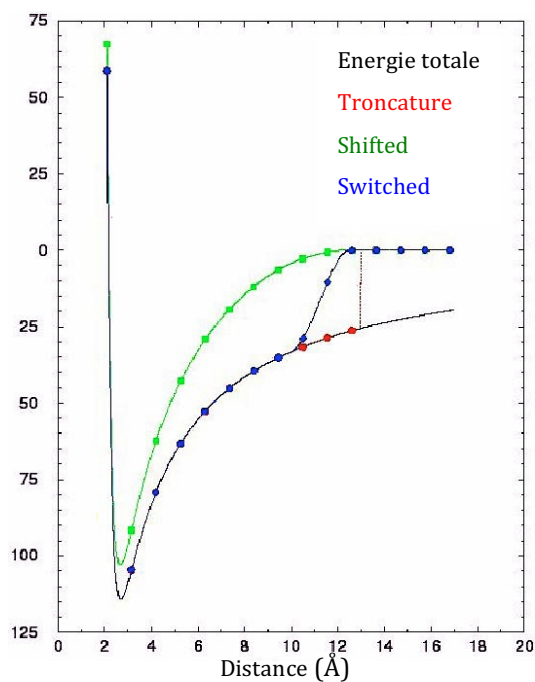


Figure 17: Graphique représentatif de l'impact des méthodes de traitement des interactions non liées en fonction des distances sur l'énergie totale en fonction de la distance.⁸

A.4.4. Méthode de sommation d'Ewald

Les méthodes décrites précédemment ne sont pas adaptées pour traiter efficacement les interactions électrostatiques. Le traitement de ces interactions de longue-distance au cours des simulations de systèmes biologiques est très important et simplement augmenter la distance limite n'est pas forcément une approche faisable. La sommation d'Ewald est une méthode développée pour le calcul d'énergies d'interactions de système périodique, par exemple pour les systèmes cristallins auxquels font référence les travaux originaux d'Ewald. La variation développée pour les biomolécules (appelée *particular mesh Ewald*) est un cas particulier de la formule de sommation de Poisson, dans laquelle, la sommation des énergies d'interactions dans l'espace réel a été remplacée par une sommation équivalente dans un espace de Fourier. Si nous considérons une boîte comportant le système à étudier. Des images identiques à cette boîte vont être créées autour d'elle à l'infini. Grâce à cette méthode, les contributions des interactions électrostatiques de toutes les paires non liées vont pouvoir être calculées.

A.5. Traitement du solvant en dynamique moléculaire

L'eau est le solvant principal des milieux biologiques. Elle possède une importance fondamentale au niveau structural, thermodynamique et fonctionnel.⁹ Il est donc important de traiter correctement les molécules d'eau afin de conserver leurs interactions lors de simulations de dynamique moléculaire. Dans nos protocoles, les molécules d'eau sont de type TIP3P pour *Transferable Intermolecular Potentials*.¹⁰ Ce type définit trois sites d'interactions centrées sur l'atome d'oxygène et sur les deux atomes d'hydrogène. Seules les interactions Lennard Jones oxygène-oxygène sont prises en compte dans le modèle général. Dans la version utilisée par le champ de force CHARMM, les paramètres de Lennard-Jones sont placés sur les atomes d'hydrogène, en plus de ceux des atomes d'oxygène (Figure 18).

```
RESI TIP3          0.000 ! tip3p water model, generate using noangle nodihedral
GROUP
ATOM OH2 OT      -0.834
ATOM H1 HT       0.417
ATOM H2 HT       0.417
BOND OH2 H1 OH2 H2 H1 H2 ! the last bond is needed for shake
ANGLE H1 OH2 H2 ! required
DONOR H1 OH2
DONOR H2 OH2
ACCEPTOR OH2
PATCHING FIRS NONE LAST NONE
```

Figure 18: Paramètres issus de CHARMM pour le modèle TIP3P de l'eau.

Les charges quant à elles restent inchangées. Les interactions électrostatiques V_{int} sont calculées pour les trois sites par la loi de Coulomb :

$$V_{int} = \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (16)$$

$$V_{self} = q_i^2 R^{-1} (\epsilon^{-1} - 1) \quad (17)$$

$$V \sim V_{int} + V_{self} \quad (18)$$

Pour chacun des voisins i et j est attribuée une charge q , la distance entre ces deux voisins est donnée par r_{ij} , et ϵ_{eff} représente la constante diélectrique effective du système. L'énergie de solvation des particules prises individuellement V_{self} fait intervenir R qui est le rayon de Born de la particule considérée. La somme de ses deux énergies (équation 18) permet d'obtenir une approximation de l'énergie de solvation du système.

A.5.1 Simulations avec un solvant explicite

Pour réaliser des simulations de dynamique moléculaire en solvant explicite, il suffit de placer le système dans un volume défini et de remplir les espaces laissés libres par des molécules d'eau. Ce type de simulation donne des résultats très précis mais le coût de calculs peut être important en fonction du nombre de molécules d'eau ajoutées. Il est judicieux de ne pas utiliser de boîte trop grande par rapport à la taille du système à étudier.

A.5.2 Simulations avec un solvant implicite

Plutôt que d'ajouter des molécules d'eau, et de devoir calculer leurs interactions, la méthode de simulation en solvant implicite permet de simuler leurs effets. Elle inclut une constante diélectrique d'écrantage des charges dans le terme du calcul des interactions électrostatiques. Le nombre d'atomes à traiter est beaucoup moins important que dans le cas d'une simulation avec un solvant explicite, ce qui permet d'écourter les temps de calculs mais engendre une perte de précision. Nous n'avons pas utilisé cette méthode dans nos travaux mais nous nous permettons de la mentionner à titre informatif.

A.6. Minimisation de l'énergie d'un système

Souvent utilisée, comme son nom l'indique, pour diminuer l'énergie d'un système ou pour la préparation de système biomoléculaire en vue d'une utilisation plus complexe, la minimisation de l'énergie est une méthode très utile pour l'étude de systèmes biologiques ou de petites molécules organiques ou inorganiques. La principale difficulté réside dans le nombre de degrés de liberté que peut prendre un système, conduisant à un nombre important de puits énergétiques potentiels. Démarrant de coordonnées géométriques (généralement issues de données cristallographiques), la minimisation va consister en un raffinement itératif local non linéaire ayant pour objectif de trouver les coordonnées atomiques pour lesquelles, l'énergie potentielle sera minimum.¹¹ C'est à dire qu'à partir de ce minimum, toutes les autres directions posséderont des énergies plus élevées (Figure 19). Cette approche est traduite, dans les coordonnées cartésiennes, par l'équation suivante :

$$r_{n+1} = r_n + \delta_n \quad (19)$$

Le terme r_n représente la conformation à l'instant n et δ_n correspond à n fois le pas de déplacement du système dans l'espace. Ce dernier terme est le plus important et va définir la méthode de minimisation employée. Il est en général sous la forme d'une dérivée de premier ordre ou de second ordre.

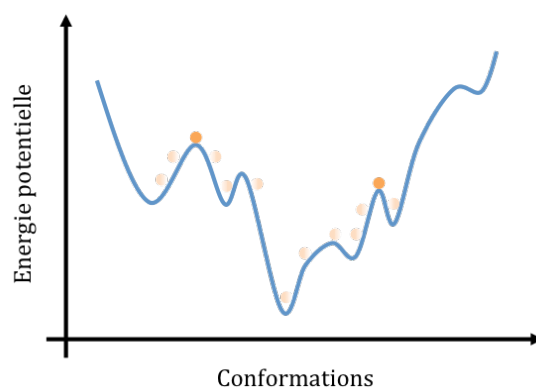


Figure 19: Représentation de la surface de l'énergie potentielle en fonction des conformations d'un système. Les points orange foncé représentent deux conformations initiales. Lors d'une minimisation, nous allons explorer la surface de la courbe de l'énergie potentielle, à l'image des points orange clair, dans le but de trouver un puits énergétique.

A.6.1. Méthode de minimisation de premier ordre

Les méthodes de minimisation les plus courantes faisant appel à des dérivés de premier ordre sont les méthodes de *Steepest descent* et de gradient conjugué. Dans les deux cas, le vecteur des charges partielles dérive de l'énergie potentielle en respectant les coordonnées atomiques.

A.6.1-a. Méthode Steepest Descent

L'utilisation de la méthode de *Steepest descent* implique l'ajout d'un déplacement parallèle à la direction de la force pour toutes les coordonnées des atomes lors de chaque itération. Le terme δ_n s'écrira :

$$\delta_n = -k_n(\nabla_n V_T) \quad (20)$$

L'énergie potentielle totale est représentée par V_T et comme paramètre d'ajustement du pas $-k_n$ (si l'énergie augmente, k_n diminuera à la prochaine étape et inversement). A partir d'un point de départ, cette méthode va permettre de descendre le long du paysage énergétique afin de se rapprocher de la zone du minimum, et va bien souvent osciller autour. Bien qu'il présente un manque de précision et de convergence, cet algorithme reste néanmoins efficace quant à sa rapidité d'exécution. Il permet d'effectuer des premiers calculs d'énergies et de géométries exploitables qui seront par la suite affinés par d'autres méthodes si besoin.

A.6.1-b. Méthode du gradient conjugué

La méthode du gradient conjugué est une approche plus sophistiquée de la minimisation de premier ordre. Sa particularité, qui la différencie de celle du *Steepest descent*, est qu'elle va tenir compte du pas d'itération précédent pour déterminer le prochain pas de minimisation. Il y a également un paramètre supplémentaire, α , qui va permettre d'obtenir le pas idéal. L'algorithme du gradient conjugué est écrit de la manière suivante :

$$r_{n+1} = r_n + \alpha \delta_n \quad (21)$$

$$\delta_n = -g_n + \delta_{n-1} \frac{|g_n|^2}{|g_{n-1}|^2} \quad (22)$$

$$g_n = \nabla_n V_T \quad (23)$$

L'algorithme de gradient conjugué possède une meilleure capacité de convergence que le *Steepest descent*, par contre l'incrémentatation successive des pas peut, occasionnellement, engendrer des problèmes d'accumulations d'erreurs numériques.

A.6.2. Méthode de minimisation de deuxième ordre

Les méthodes de minimisations les plus courantes faisant appelent à des dérivées de second ordre sont les méthodes de Newton-Raphson et, propre au programme CHARMM, l'*Adopted-Basis* Newton-Raphson. Ces méthodes possèdent des vitesses de convergences plus efficaces grâce à l'introduction de dérivées secondaires dans leurs algorithmes respectifs.

A.6.2-a. Newton-Raphson

Avec la méthode de Newton-Raphson, il est possible de débiter la minimisation d'une fonction quadratique à partir de n'importe quel point de départ et d'arriver, en une étape, au point minimum de la surface de l'énergie potentielle. Cet algorithme est fondé sur une expansion de la série de Taylor. Pour essayer de comprendre en faisant simple, nous allons prendre pour exemple x_k , point d'un système unidimensionnel. ¹²

$$V(x) = V(x_k) + (x - x_k)V'(x_k) + (x - x_k)^2 \frac{V''(x_k)}{2} + \dots \quad (24)$$

La première dérivée de $V(x)$ est :

$$V'(x) = V'(x_k) + (x - x_k)V''(x_k) \quad (25)$$

Au minimum ($x = x^*$) et $V'(x^*) = 0$, et donc :

$$x^* = x_k - \frac{V'(x_k)}{V''(x_k)} = x_k - V'(x_k)V''^{-1}(x_k) \quad (26)$$

Dans le cas d'un espace multidimensionnel, $V''^{-1}(x_k)$ sera la dérivée seconde de l'inverse de la matrice de Hessian. Le terme pas de déplacement δ_n s'écrira alors :

$$\delta_n = -H_n^{-1}g_n \quad (27)$$

La méthode de Newton-Raphson permet une convergence rapide en très peu d'itérations. Néanmoins, des problèmes peuvent survenir si le point de départ est trop éloigné du minimum, ou quand la surface de l'énergie potentielle n'est pas quadratique, ce qui est le cas lors d'une fonction d'énergie potentielle empirique. De plus, cet algorithme est très coûteux en ressources.

Les calculs de dynamique moléculaire sont principalement fondés sur la seconde loi de Newton, la loi du mouvement, dont l'énoncé, traduit du latin, et les équations sont¹³ :

« *Les changements qui arrivent dans le mouvement sont proportionnels à la force motrice ; et se font dans la ligne droite dans laquelle cette force a été imprimée.* »
(Équation 29)

$$F_i = m_i * a_i = m_i * \frac{d^2 x_i}{dt^2} \quad (29)$$

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (30)$$

où a_i est l'accélération au cours du temps de la particule i , d'une masse m_i , le long de l'axe x_i , sur laquelle s'applique une force F_{x_i} .

De plus :

$$F_i = -\nabla_{x_i} V_T \quad (31)$$

où V est l'énergie potentielle issue du champ de force empirique. Pour calculer la position et la vitesse d'une particule i à différents instants t , l'équation suivante peut être utilisée :

$$x_i(t_1) = x_i(t_0) + v_i(t_0)\Delta t \quad \text{avec} \quad \Delta t = t_1 - t_0 \quad (32)$$

De la même manière, la nouvelle vitesse peut être calculée à partir de celle antérieure :

$$v_i(t_1) = v_i(t_0) + a_i(t_0) \quad \text{avec} \quad a_i(t_0) = \frac{dx_{v_i}}{dt} \quad (33)$$

Comme la seconde loi de Newton influe sur la propagation de la vitesse (équation 33), nous obtenons l'équation faisant intervenir la force appliquée sur la particule i (équation 34).

$$\Delta v_i(t_0) = \frac{F_i(t_0)}{m_i} \Delta t \quad (34)$$

$$v_i(t_1) = v_i(t_0) + \frac{F_i(t_0)}{m_i} \Delta t \quad (35)$$

Lors d'une simulation de dynamique moléculaire, tous les atomes vont devoir obéir à cette loi. Ce type de calculs est assez lourd à supporter. C'est pourquoi plusieurs algorithmes ont été développés pour pouvoir résoudre numériquement, avec la meilleure approximation possible, l'équation de la loi du mouvement.

B.1.2. Algorithme de propagation de Verlet

Développé en 1967 au travers de l'étude des dynamiques des fluides, l'algorithme de Verlet, dérivé de deux expansions de la série de Taylor, est sans doute l'algorithme d'intégration le plus utilisé pour calculer le déplacement de particules en simulation de dynamique moléculaire.¹⁴

$$r_i(t \pm \delta t) = r_i(t) \pm v_i(t)\delta t + \frac{F_i(t)}{m_i} \frac{(\delta t)^2}{2!} \pm \frac{\dot{F}_i(t)}{m_i} \frac{(\delta t)^3}{3!} + O[(\delta t)^4] \quad (36)$$

La somme moyenne de cet algorithme (équation 36) donne la propagation des positions (équation 37).

La différence moyenne donne la propagation des vitesses (équation 38) de la particule i au cours du temps t , en fonction de sa masse m_i et de la force F_i appliquée sur elle.

$$r_i(t + \delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \delta t) + \frac{F_i(t)}{m_i}(\delta t)^2 + O[(\delta t)^4] \quad (37)$$

$$v_i(t) = \frac{r_i(t + \delta t) - r_i(t - \delta t)}{2\delta t} + O[(\delta t)^3] \quad (38)$$

Le symbole $O[(x)^4]$ est appelé *Big O notation*, aussi appelé symbole de Landau, et est un symbole utilisé en théorie complexe, science computationnelle et en mathématique. C'est une limite asymptotique permettant d'effectuer des corrections (*i.e.* troncature de la série de Taylor).

L'algorithme de propagation de Verlet est une méthode simple pour effectuer des calculs de simulations de dynamique moléculaire. Il nécessite les positions au temps $(t - \delta t)$ ainsi que celles au temps (t) et seulement les vitesses initiales pour débiter les simulations. Bien que peu coûteux, il ne permet pas disposer d'une grande précision.

B.1.3. Algorithme de Leap-Frog, « bond de grenouille »

L'algorithme de *Leap-Frog* est une des variantes de l'algorithme de Verlet. Il est réputé pour être plus robuste que ce dernier et la notion de vitesse apparaît dans la formule de la propagation des positions. Il est développé de la manière suivante :

$$v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) + \delta t a(t) \quad (39)$$

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) \quad (40)$$

Avec la méthode de *Leap-frog*, la vitesse à $(t + \frac{1}{2}\delta t)$ est calculée à partir de la vitesse $(t - \frac{1}{2}\delta t)$ et de l'accélération au temps t . Par la suite, le calcul de la position à $(t + \delta t)$ est effectué depuis la vitesse préalablement calculée et grâce à la position r à l'instant t . La vélocité peut également être obtenue au temps t par la formule :

$$v(t) = \frac{1}{2} \left[v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) + v\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) \right] \quad (41)$$

La vitesse effectue des bonds, d'où le nom *leap-frog* qui veut dire bond de grenouille, d'une valeur définie par $(t + \frac{1}{2}\delta t)$. La position suit le même parcours en démarrant au temps $(t + \delta t)$, puis continue avec un bond au temps $(t + \frac{3}{2}\delta t)$, ainsi de suite.

B.1.4. Loi de Maxwell-Boltzmann

Dans les protocoles standard, les étapes de préparations d'un système avant de débiter une simulation de dynamique moléculaire, se font généralement à des températures proches de zéro, voir zéro degré Kelvin. Après la ou les étapes de minimisations (dans nos protocoles, nous effectuerons toujours une première étape de minimisation de type *steepest descent*, suivie d'une étape de type *adapted-basis* Newton-Raphson), suivent des étapes successives de chauffage et de dynamique d'équilibration. L'étape de chauffage consiste à une montée progressive de la température appliquée à l'ensemble du système jusqu'à la valeur désirée. L'étape de dynamique d'équilibration va permettre de stabiliser le système dans les conditions choisies pour la simulation de dynamique moléculaire.

Plus connue en physique statistique, la loi de distribution de Maxwell-Boltzmann détermine la vitesse probable d'une particule dont la distribution dépend de sa masse et de la température. La fonction de la distribution est décrite de la manière suivante:

$$f(v_i) = \sqrt{\left(\frac{m_i}{2\pi k_B T}\right)^3} 4\pi v^2 e^{-\frac{m_i v_i^2}{2k_B T}} \quad (42)$$

Avec la masse de la particule m_i , k_B comme constante de Boltzmann et T qui représente la température du système, nous obtenons la probabilité qu'une particule i possède la vitesse $f(v_i)$.

L'augmentation de la température participe à l'augmentation de la vitesse. Elle peut être calculée, au cours du temps t , par rapport à l'énergie cinétique du système à l'aide de l'équation suivante :

$$T(t) = \frac{1}{(3N - n)k_B} \sum_{i=1}^N m_i |v_i|^2 \quad (43)$$

Le facteur $(3N - n)$ correspond au degré de liberté pour N atomes présents dans le système et k_B représente la constante de Boltzmann.

Dans nos protocoles standard d'études, nous incluons plusieurs étapes successives de « chauffage-dynamique d'équilibration » avant de démarrer une simulation de dynamique moléculaire. Cette méthode permet d'effectuer un échantillonnage de la distribution de Maxwell à une température donnée, donnant accès à un set de vitesses pour démarrer les simulations de dynamique moléculaire.

B.1.5. Pas de temps (Time Step)

Pour l'intégration numérique de l'équation de mouvement de Newton, un pas de temps (δt), qui sera incrémenté à chaque itération, doit être défini. Un pas de temps trop court revient à couvrir une faible proportion de l'espace. A l'inverse, un pas de temps trop grand peut conduire à des recouvrements d'atomes, engendrant d'importantes instabilités. En règle générale, la valeur du pas de temps dépend de ce que l'on cherche à observer. Il doit correspondre à environ un dixième du temps du mouvement à analyser. Lors de nos simulations de dynamique moléculaire, nous étudions le déplacement des atomes les uns par rapport aux autres de biomolécules flexibles. Nous avons alors pris un pas de temps de 1 fs, soit 10^{-15} s. Certains algorithmes ont été développés pour pouvoir exploiter des pas de temps plus importants en générant des simulations de dynamique moléculaire avec contraintes. Le premier à avoir été décrit est l'algorithme SHAKE que nous allons voir de suite.

B.1.6. Algorithme de contraintes SHAKE

L'algorithme SHAKE a été développé par Ryckaert *et al.* à partir de l'algorithme de Verlet, en se fondant sur des équations de mouvements de Lagrange-Hamilton.¹⁵ Cette méthode, toujours fondée sur les coordonnées cartésiennes, produit une simulation de dynamique moléculaire dans laquelle des contraintes, comme le maintien de longueurs de liaisons, sont satisfaites durant toute la trajectoire. Prenons l'exemple d'une contrainte sur une longueur de liaison entre deux particules i et j . Cet algorithme va appliquer une force de magnitude équivalente et d'orientation opposée sur chacune des deux particules au temps t_0 . Nous obtenons les pas de déplacement suivants, pour chacune des positions des particules i et j , en fonction de leur masse respective :

$$\delta r_i = \frac{g_{ij} r_{ij}(t_0)}{m_i} \quad (44)$$

$$\delta r_j = -\frac{g_{ij} r_{ij}(t_0)}{m_j} \quad (45)$$

Le terme g_{ij} correspond à la contribution de la contrainte appliquée au pas de déplacement. Ainsi, pour chaque contrainte, une équation quadratique peut être formulée. Pour $r = r_i(t_0) - r_j(t_0)$, $g = g_{ij}$ et $d = d_{ij}$, nous avons les relations :

$$(r' + \delta r)^2 - d^2 = 0 \quad (46)$$

$$\delta r = \left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right) g r \quad (47)$$

Ces équations, 46 et 47, conduisent à la formule générale suivante :

$$2 \left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right) * g * (r * r') + \left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)^2 g^2 r^2 = d^2 - r'^2 \quad (48)$$

La satisfaction de la n^e contrainte écrase partiellement les contraintes précédentes. Le principe d'itération de la fonction fait en sorte que chaque équation quadratique soit résolue avec une tolérance propre qui lui est spécifique. Il est également important que lors de l'utilisation de l'algorithme SHAKE, les contraintes ne modifient pas le degré de liberté du système.

B.1. Simulation de dynamique moléculaire à constantes

L'application stricte de la seconde équation de Newton implique une conservation de l'énergie. Cela conduit à un ensemble microcanonique, aussi appelé NVE, faisant référence à N pour moles, V pour volume et E pour énergie comme termes constants, où l'énergie totale est conservée pendant toute la durée de la trajectoire. Cet ensemble pouvant ne pas être adapté à tous les systèmes, des alternatives permettant de produire des simulations de dynamique moléculaire à température ou pression constante ont été développées.

B.1.1. Dynamique à température constante

Une dynamique réalisée à température constante est appelée ensemble canonique, aussi appelé NVT, faisant référence à N pour moles, V pour volume et T pour température comme termes constants, où la température est conservée pendant toute la durée de la trajectoire. Ce type de dynamique peut être intéressant, notamment pour l'étude de systèmes dont les conformations structurales varient avec la température (*i.e.* chez certaines protéines ou pour des systèmes chimiques). Pour suivre la température, la vélocité peut être utilisée :

$$\Delta T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2 m_i (\lambda v_i)^2}{3 N k_B} - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2 m_i v_i^2}{3 N k_B} \quad (49)$$

$$\Delta T = (\lambda^2 - 1) T(t) \quad (50)$$

$$\lambda = \sqrt{\frac{T_{des}}{T(t)}} \quad (51)$$

Pour contrôler la température, le paramètre λ peut être utilisé comme multiple de la vitesse v_i . Il est issu de la racine de la division de T_{des} , température désirée, par $T(t)$, température à l'instant t .

B.1.2. Dynamique à pression constante

Une dynamique réalisée à température constante est appelée ensemble isothermal-isobarique, aussi appelé NPT, faisant référence à N pour moles, P pour pression et T pour température comme termes constants, où la température est conservée pendant toute la durée de la trajectoire. Une pression constante peut être utile pour se rapprocher de conditions expérimentales ou quand le nombre de particules présentes dans le système change.

Pour maintenir une pression constante, le volume de la boîte contenant le système va devoir fluctuer. Il dépendra du terme de compressibilité isothermale κ :

$$\kappa = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \quad (52)$$

Une substance facilement compressible, possèdera une valeur de κ importante, et donc un volume de fluctuation également important.

B.1.3. Conditions Périodiques : Periodic Boundary Conditions

Les conditions périodiques permettent de se rapprocher au plus près des conditions expérimentales. Le système étudié est solvaté au centre d'une boîte, en présence d'ions (*i.e.* Na^+ et Cl^-) pour neutraliser le système et appliquer une force ionique. La méthode de conditions périodiques va construire autour de la boîte originale ses images virtuelles, au nombre infini, à la façon d'un cristal parfait (Figure 20).

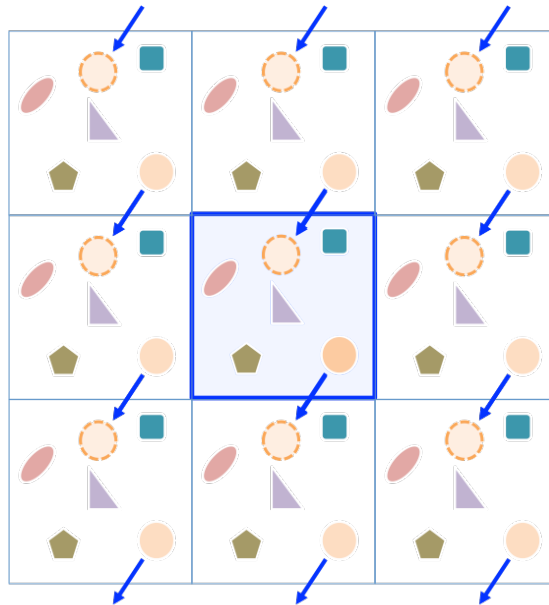


Figure 20: Exemple d'un système périodique à deux dimensions, composé de neuf cellules. Au centre est représentée la maille originale du système. Les éléments composants ce système sont libres de quitter ou de rentrer dans les différentes cellules.

Chacune des particules présentes dans les images virtuelles va se comporter comme sa particule issue de la boîte originale. Lors d'une simulation de dynamique moléculaire, seules les interactions impliquant les atomes de la boîte originale seront traitées (sauf si des atomes des images virtuelles sont impliqués dans des images minimales). Il est conseillé d'avoir une distance minimale de 5 Å entre les arrêtes de la boîte et les atomes périphérique du système d'étude. Cela afin d'éviter que le système n'interagisse avec sa propre image, avec lui-même.

Chaque particule n'interagira qu'une seule fois avec chacune des autres particules du système (en fonction de la valeur de la distance limite du *cutoff*), et ceux en incluant les images des particules les plus proches. Ce principe est appelé la convention de l'image minimale. Par exemple, la particule i interagira avec la particule j' , image de j , car plus proche. Cela engendre une image minimale où pour l'atome considéré, une image incluant tous les autres éléments les plus proches du système seront présents (Figure 21).

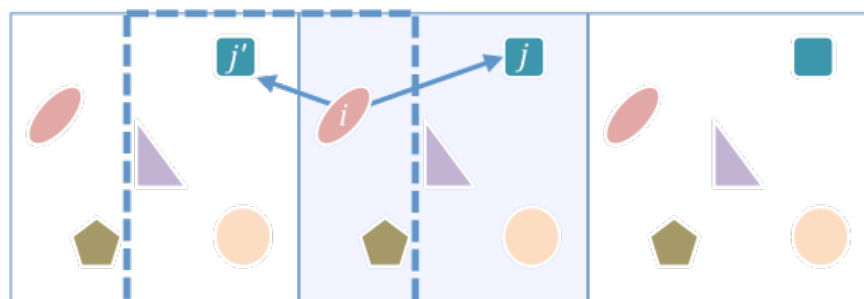


Figure 21: Exemple d'une situation d'image minimale. Au centre est représentée la maille originale du système. La cellule entourée de pointillés est l'image minimale par rapport à la particule i . Dans cette maille, nous retrouvons tous les éléments qui composent la maille de départ. Les interactions avec les éléments issus des cellules virtuelles sont privilégiées lorsque les distances sont plus courtes. Dans notre cas, $d_{ij} > d_{ij'}$, c'est pourquoi la maille image minimale par rapport à la particule i inclus j' et non j .

C. Amarrage moléculaire ou *Docking* moléculaire

La technique de l'amarrage moléculaire, plus joliment appelée *docking* moléculaire, est une méthode qui permet de prédire la conformation et le type de fixation non-covalente d'une molécule (ligand) par rapport à une macromolécule (récepteur), dans le but de former un complexe plus stable. Nous avons utilisé cette technique dans le cadre de la recherche de nouveaux inhibiteurs protéiques, à l'aide du programme AutoDock4.2 et AutoDock Vina (Raccoon).^{16,17} Au vu de la complexité de notre système, la méthode de *docking* en présence d'un récepteur flexible n'a pas été exploitée.

C.1. Fonction de score

Les résultats de *docking* d'AutoDock4.2 sont fondés sur une fonction de score, dépendante de l'enthalpie de fixation non covalente $\Delta G_{Fixation}$:

$$\Delta G_{Fixation} = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{liaison\ H} + \Delta G_{desolv} + \Delta G_{torsion} \quad (53)$$

Les énergies de dispersion et répulsion vont être représentées par ΔG_{vdW} , l'énergie électrostatique et les liaisons hydrogène correspondent aux termes ΔG_{elec} et $\Delta G_{liaison\ H}$ respectivement. L'énergie libre de désolvatation ΔG_{desolv} se réfère à la capacité du ligand à s'entourer d'eau et à l'énergie nécessaire pour s'en défaire. Enfin, l'énergie de flexibilité du ligand se rapporte à $\Delta G_{torsion}$. Les énergies sont en kcal.mol⁻¹.

C.2. Définition de la grille de recherche

Pour effectuer la recherche de conformations optimales d'un ligand par rapport à un récepteur défini, il faut définir une grille de recherche. Cette grille peut être centrée sur un atome du ligand, du récepteur ou bien manuellement, selon les axes orthonormés $[x,y,z]$. Par défaut, le pas d'espacement des points de la grille de recherche est défini à 0.375 Å avec Autodock4.2 et de 1 Å avec Autodock Vina.

C.3. Algorithme génétique de Lamarckien

Pour effectuer la recherche de conformations d'un ligand, nous avons utilisé l'algorithme génétique de Lamarckien implémenté dans Autodock4.2 et Autodock Vina. Pour commencer, une première collection de conformations va être créée dans la zone de recherche, sur lesquelles des mutations individuelles vont être effectuées, générant ainsi de nouvelles conformations. Chaque conformation est classée en fonction de son énergie, donnée en kcal/mol, et seules les meilleures conformations seront gardées. Cela va permettre d'engendrer plusieurs générations successives, dont les conformations de plus basses énergies seront sélectionnées. Cette méthode permet d'optimiser rapidement les conformations et de transmettre les informations aux générations suivantes. A la fin de ses calculs, nous obtenons un maximum de dix conformations (par défaut), classées en fonction de la meilleure estimation d'énergie de liaison au récepteur.

D. Génération de paramètres pour de nouveaux ligands

Le champ de force empirique, utilisé pour les simulations de dynamique moléculaire, est basé sur des paramètres prédéterminés. Dans le cadre de cette thèse, nous avons eu recours au champ de force tout-atome C27 et C36. Ils ont été tous deux développés pour l'utilisation d'acides aminés standards, ainsi que pour celle de certains types de ligands.

Pour notre projet de développement de nouveaux inhibiteurs potentiels, les paramètres de certaines molécules furent nécessaires d'être assemblés, voir créés et raffinés. Les paramètres initiaux présents dans le champ de force de CHARMM (CGenFF) ne sont généralement pas suffisants pour satisfaire toute la diversité des groupements chimiques qu'exploitent les ligands étudiés. Nous avons alors conçu, à l'aide de différents outils, tous les paramètres nécessaires pour nos travaux.

Dans un premier temps, nous avons utilisé l'interface web Paramchem qui donne accès à un programme gratuit (CGenFF) capable d'assigner les paramètres et charges pour la plupart des molécules.^{18,19} Il opère par substitution du type d'atome par similarité en y associant une pénalité pour chacun des paramètres et charges. Ces pénalités sont additionnées, conduisant à un score de pénalité. Plus le score de pénalité est faible, plus les paramètres engendrés par le programme pourront être considérés comme fiables.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé le module complémentaire du logiciel de visualisation *Visual Molecular Dynamics* (VMD) nommé Force Field Toolkit (ffTK).^{20,21} Ce module regroupe un ensemble d'outils permettant de construire ou d'optimiser des paramètres existants compatibles avec le champ de force CHARMM. Il nécessite un l'utilisation du programme Gaussian pour certains calculs de QM lors d'optimisation.

E. Application de l'équation de Poisson-Boltzmann

E.1. Principe

Lorsqu'un ligand paraît être un bon candidat, un complexe l'incluant avec la protéine, le métal et le cofacteur dans une boîte d'eau est construit afin de réaliser une simulation de dynamique moléculaire. La trajectoire résultante est analysée afin d'en estimer la stabilité (*i.e.* ligand dans le site actif, pas de déformation de la protéine).

En fonction de l'étude, la durée de la simulation sera plus ou moins longue. Pour ces analyses, nous avons utilisé un protocole correspondant à l'approche de Mécanisme Moléculaire de Poisson Boltzmann de Surface Accessible au Solvant (MM/PBSA). Au laboratoire de Modélisation Moléculaire (IGBMC), Lafont *et al.* ont développé une variante de cette méthode, utilisant le champ de force CHARMM, permettant de déterminer les résidus contribuant significativement à la fixation des ligands.²² Cette méthode est basée sur l'équation de Poisson-Boltzmann. Nous avons appliqué ce protocole à nos systèmes afin de comparer les molécules d'intérêts entre elles et d'analyser les résidus en fonction de leurs contributions énergétiques respectives.

E.2. Méthode

Après avoir réalisé les simulations de dynamique moléculaire des complexes d'intérêts, les structures composant les trajectoires effectuées sont regroupées selon leurs énergies électrostatiques dans des clusters. L'énergie de la structure la plus représentative d'un cluster sera analysée suivant le raisonnement proposé par Kollmann *et al.*²³ Les résultats seront pondérés en fonction de la population des clusters. L'approche consiste en un cycle thermodynamique (Figure 22), résumé en une équation, permettant de calculer l'énergie libre d'une molécule $G_{liés}^{solution}$ issue d'un système suivant l'équation :

$$G_{liés}^{solution} = E_{MM}^{gaz} + G_{PBSA} - TS_{MM} \quad (54)$$

Où E_{MM}^{gaz} correspond à l'énergie mécanique moléculaire moyenne définie par la somme des énergies des termes de liaison, d'angle, de torsion, de van der Waals et d'électrostatique définis dans le champ de force employé (équation 1.55).

$$E_{MM} = E_{liaison} + E_{angle} + E_{tors} + E_{vdW} + E_{elec} \quad (55)$$

Le terme G_{PBSA} est le terme d'énergie libre qui englobe la contribution électrostatique ainsi que la contribution non-polaire ou hydrophobe.²⁴ Le terme d'entropie TS_{MM} est très faible par rapport aux deux autres et peut être calculé par analyses quasi-harmonique ou de modes normaux.²⁵ Les ligands étant liés dans leurs sites actifs respectifs, ce terme d'entropie sera négligé. De précédents travaux ont montré que ne pas l'inclure ne perturbait pas l'identification des résidus clés (*hot spot*), interagissant de manière significative avec la molécule d'intérêt.^{23,26}

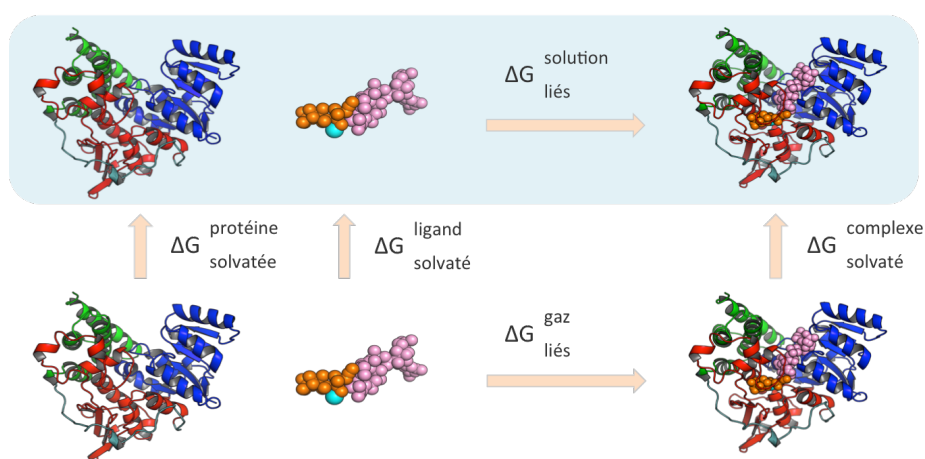


Figure 22: Cycle thermodynamique du calcul d'énergie libre via l'approche MM/PBSA.

Au final, l'équation d'énergie libre générale revient à :

$$\Delta G_{liés}^{solution} = \Delta G_{MM}^{elec} + \Delta G_{solv}^{elec} + \Delta G_{MM}^{VDW} + \Delta G_{solv}^{VDW} \quad (56)$$

Les termes ΔG_{MM}^{elec} et ΔG_{MM}^{VDW} sont les énergies calculées à partir des équations de coulombique et de Lennard-Jones respectivement, à partir du champ de force CHARMM. Les termes ΔG_{solv}^{elec} et ΔG_{solv}^{VDW} correspondent aux contributions d'hydratation. ΔG_{solv}^{elec} est calculé en résolvant l'équation de Poisson-Boltzmann grâce au programme *University of Houston Brownian Dynamics* (UHBD).²⁷ ΔG_{solv}^{VDW} est obtenu de la contribution non polaire du système solvaté par calcul de la surface accessible au solvant.

F. Analyses des simulations de dynamique moléculaire

F.1. Déviation des positions atomique : RMSD

La déviation des positions atomiques est appelée *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Cette méthode d'analyse permet de mesurer la différence de position par paires d'atomes communs, de deux structures dans l'espace.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N d_i^2}{N}} \quad (57)$$

Le terme N correspond au nombre d'atomes présents dans la structure et d_i représente la distance entre la paire d'atomes i prise en compte pour le calcul RMSD dans les deux structures. Ce type d'analyse est généralement effectué sur la séquence protéique en fonction de la position des atomes le long de la trajectoire, avec pour structure de comparaison, une structure minimisée. Les résultats sont analysés afin d'observer la présence ou non de saut important, impliquant un changement conformationnel majeur. Cela permet également de vérifier la stabilité des différentes composantes de nos systèmes. Pour que les valeurs soient correctes, il est important que les structures issues de la dynamique aient été préalablement recentrées (pour pallier le risque de diffusion lors de la simulation).

F.2. Fluctuation des positions atomique : RMSF

La fluctuation des positions atomique est appelée *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF). A la différence de la méthode précédente, du RMSD, celle du RMSF permet d'évaluer la fluctuation des atomes d'une structure au cours d'une trajectoire, par rapport à la structure moyenne de l'ensemble.

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (r_i(t_j) - r_i^{ref})^2} \quad (58)$$

Le terme T correspond au nombre de pas de temps sur lequel l'analyse va être réalisée, la position de référence de l'atome i sera r_i^{ref} , qui est sa position dans la structure moyenne de l'ensemble sur la trajectoire, et sa variation au cours du temps sera représenté par $r_i(t_j)$. Ce type d'analyse nécessite des calculs importants qui, combinés à des simulations de dynamique moléculaire conséquentes et des systèmes imposants, peuvent vite devenir pesants. Dans ces cas-là (s'ils le permettent), il peut être plus intéressant de ne sélectionner que les atomes constituant la chaîne principale des systèmes.

¹ a) MacKerell, A. D. Jr.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack Jr., R.L.; Evanseck, J.D.; Field, M.J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F.T.K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D.T.; Prodhom, B.; Reiher, III, W.E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J.C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M., « All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics Studies of proteins », *Journal of Physical Chemistry B*, 1998, *102*, 3586-3616 ; b) MacKerell, A.D. Jr., Feig, M., Brooks, III, C.L., « Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations », *Journal of Computational Chemistry*, 2004, *25*, 1400-1415 ; c) MacKerell, A.D. Jr., Feig, M. and Brooks, III, C.L., « Improved treatment of the protein backbone in empirical force fields », *Journal of the American Chemical Society*, 2004, *126*, 698-699 ; d) Best, R.B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P.E.M., Mittal, J., Feig, M., MacKerell, A.D., Jr., « Optimization of the additive CHARMM All-Atom Protein Force Fields Targeting Improved Sampling of the Backbone Φ , Ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles », *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2012, *8*, 3257-3273.

² a) Brooks B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., Karplus M., « CHARMM : A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations », *Journal of Computational Chemistry*, 1983, *4*, 187-217 ; b) Brooks, B.R., Brooks, C.L., III, Mackerell, A.D., Jr., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., Wong, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., IM, K., IM, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R.W., Post, C.B., Pu, J. Z., Schaeffer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., Karplus, M., « CHARMM: The Biomolecular Simulation Program », *Journal of Computational Chemistry*, 2009, *30*, 1545-1614.

³ Urey H.C., Bradley C.A., Jr., « The Vibrations of Pentatonic Tetrahedral Molecules », *Physical Review*, 1931, *38*, 1969-1978.

⁴ Lennard-Jones, J.E., « Cohesion », *The Proceedings of the Physical Society*, 1931, *43*, 461-482.

⁵ Gerschel A, « Liaisons intermoléculaires - Les forces en jeu dans la matière condensée », Savoirs Actuels, InterEditions/CNRS Editions, 1995, Paris.

⁶ Martin T.W., Derewenda, Z.S., « The name is bond -H bond », *Nature Structural Biology*, 1999, *6*, 403-406.

⁷ Brooks, C.L., III, Pettitt, B.M., Karplus, M., « Structural and energetic effects of truncating long ranged interactions in ionic and polar fluids », *Journal of Chemical Physics*, 1985, *85*, 5897-5908.

⁸ http://www.ch.embnet.org/MD_tutorial/pages/MD.Part3.html

⁹ Stegmann, C.M., Seeliger, D., Sheldrick, G.M., de Groot, B.L., Wahl, M.C., « The Thermodynamic Influence of Trapped Water Molecules on a Protein-Ligand Interaction », *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, *48*, 5207-5210.

¹⁰ Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., Klein, M. L., « Comparison of simple potential functions for simulating liquid water », *Journal of Chemical Physics*, 1983, *79*, 926-935.

¹¹ Brooks, C.L., III, Karplus, M., Pettitt, B.M., « Proteins : A theoretical Perspective of Dynamics, Structure, and Thermodynamics », 1988, Wiley Interscience, USA.

¹² Leach, A.L., « Molecular Modeling : Principles and Applications », Prentice Hall, Second Edition, 2001, Great Britain.

¹³ Isaac Newton, Voltaire (préface), Roger Cotes (préface), « Principes mathématiques de la Philosophie naturelle », 1759, 2^{ème} édition, traduction d'Emilie du Châtelet, Dunod, (reprod 2006) Paris.

¹⁴ Verlet L., « Computer « Experiments » on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules », *Physical Review*, 1967, *159*, 98-103.

¹⁵ Ryckaert J.P., Ciccotti G., Berendsen H.J.C., « Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints : Molecular Dynamics of *n*-Alkanes », *Journal of Computational Physics*, 1977, *23*, 327-341.

¹⁶ Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson A.J., « AutoDock4 and AutoDockTools4 : Automated Docking with Selective Receptor Flexibility », *Journal of Computational Chemistry*, 2010, *30*, 2785-2791.

¹⁷ <http://mgltools.scripps.edu/>

¹⁸ a) Vanommeslaeghe, K., MacKerell, A.D., Jr, « Automation of the CHARMM General Force Fields (CGenFF) I : Bond Perception and Atom Typing », *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, *52*, 3144-3154 ; b) Vanommeslaeghe, Raman, E.P., K., MacKerell, A.D., Jr, « Automation of the CHARMM General Force Fields (CGenFF) II :

Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges », *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 52, 3155-3168.

¹⁹ <https://cgenff.paramchem.org/>

²⁰ Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., « VMD – Visual Molecular Dynamics », *Journal of Molecular Graphics*, 1996, 14, 33-338.

²¹ Mayne, C.G., Saam, J., Schulte, K., Tajkhorshid, E., Gumbart, J.C, « Rapid Parameterization of Small Molecules Using the Force Field Toolkit », *Journal of Computational Chemistry*, 2013, 34, 2757-2770.

²² Lafont, V., Schaefer, M., Stote, R. H., Atschuh, D., Dejaegere, A., « Protein-Protein Recognition and Interaction Hot Spots in an Antigen-Antibody Complex: Free Energy Decomposition Identifies “Efficient Amino Acids.” », *Proteins*, 2008, 70, 311–319.

²³ Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Cheatham, T. E., « Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models », *Accounts of Chemical Research*, 2000, 33, 889–897.

²⁴ Sitkoff, D., Sharp, K. A., Honig, B., « Accurate Calculation of Hydration Free Energies Using Macroscopic Solvent Models », *The Journal of Physical Chemistry*, 1994, 98, 1978–1988.

²⁵ Srinivasan, J., Cheatham, T. E., Cieplak, P., Kollman, P. A., Case, D. A., « Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate-DNA helices », *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120, 9401–9409.

²⁶ Moroy, G., Martin, E., Dejaegere, A., Stote, R. H., « Molecular basis for Bcl-2 homology 3 domain recognition in the Bcl-2 protein family: Identification of conserved hot spot interactions », *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284, 17499–17511.

²⁷ Davis, M. E., Madura, J., Luty, B. A., Mac Cammon, J., « Electrostatics and Diffusion of Molecules in Solution - Simulations With the University-of-Houston Brownian Dynamics Program », *Computer Physics Communications*, 1991, 91, 187-197

V. Etude structurale et énergétique de la DXR

Table des matières

| | |
|--|------------|
| A. Introduction | 121 |
| B. Objectifs | 125 |
| C. Préparation des systèmes | 126 |
| C.1. Modélisation des complexes..... | 126 |
| C.2. Préparation des simulations de dynamique moléculaire | 127 |
| D. Résultats et discussion | 128 |
| D.1. Identification des acides aminés importants pour la fixation de ligand..... | 128 |
| D.2. Analyses des énergies totales des sites actifs..... | 131 |
| D.2.1. Les complexes en présence de DXP..... | 132 |
| D.2.1. Les complexes en présence de fosmidomycine | 134 |
| D.3. Analyses d'efficacité des acides aminés | 137 |
| D.4. Décomposition énergétique par résidu | 139 |
| E. Conclusion | 141 |

A. Introduction

La 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR) est la seconde enzyme de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes du MEP, présente chez les algues vertes unicellulaires, les parasites responsables de la malaria (*Plasmodium* spp.), dans le chloroplaste des plantes et chez la plupart des bactéries incluant des pathogènes. La DXR est responsable de la conversion du DXP en MEP en présence d'un dication métallique et du cofacteur NADPH (voir chapitre « Introduction » pour plus de détails). Etant absentes chez les humains, les enzymes de la voie du MEP, et notamment la DXR, sont des cibles importantes pour le développement de nouveaux antibactériens et antiparasitaires.

A ce jour, l'inhibiteur de la DXR le plus efficace sur le marché est la fosmidomycine **33**. Cependant, sa nature chargée conduit à une rapide clairance plasmique et la nécessité de la présence du transporteur du glycérol 3-phosphate pour pénétrer dans les cellules poussent au développement de nouvelles molécules thérapeutiques actives.^{1,2} Le point de départ pour toute étude de conception de nouveaux composés actifs est de comprendre les bases physicochimiques impliquées dans la reconnaissance moléculaire d'un ligand à un récepteur cible. L'un des outils majeurs, parmi les méthodes appliquées à ce type d'étude, est la simulation de dynamique moléculaire. Complémentaires aux analyses de structures cristallographiques, les simulations de dynamique moléculaire permettent d'étudier des changements conformationnels de protéines, ainsi que les mécanismes et les énergies de fixation de ligands. Dans ce chapitre, ces simulations ont été utilisées pour étudier la fixation du DXP **14**, substrat naturel, et de l'inhibiteur fosmidomycine **33** chez deux DXRs d'*Escherichia coli* (*EcDXR*). Pour comprendre le mécanisme de reconnaissance qui s'opère dans la formation d'un complexe DXR/ligand, il est important d'identifier les acides aminés qui y participent et le stabilisent. Des méthodes computationnelles ont été développées pour calculer les énergies libres individuelles de contribution des résidus impliqués dans la formation de complexe ligand/protéine.^{3,4,5,6,7,8,9,10} Les approches MM/PBSA (*Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area*) et MM/GBSA (*Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area*) lient les fonctions d'énergie libre empirique, en solvant implicite afin de diminuer le coût des ressources computationnelles.^{5,6,11} Ces méthodes peuvent également être utilisées pour évaluer l'impact structural et énergétique résultant de mutations au sein d'une protéine. Dans nos travaux, nous avons appliqué l'approche de type MM/PBSA pour analyser les interactions contribuant à la fixation de ligand dans le site actif de la DXR et le protocole développé par Lafont *et al.* a été employé.⁵ Il concerne l'étude de la décomposition d'énergie libre par résidu, engendrant ainsi une carte des interactions significatives impliquées dans la formation de complexes ligand/protéine. L'identification des interactions récursives chez plusieurs ligands de la DXR nous permettra de mieux concevoir de futurs inhibiteurs potentiels de la DXR. Nous étudierons également les effets induits par la présence d'une mutation d'un acide aminé localisé dans le site actif de la protéine.

La mutation, à laquelle nous allons nous intéresser, a été identifiée lors des travaux d'Armstrong *et al.*¹² Ils ont récemment publié une étude sur la modification de la séquence de la DXR chez *Escherichia coli*, dont l'objectif est de pouvoir anticiper de potentielles mutations rendant inactif les inhibiteurs connus tel que la fosmidomycine. Pour cela, ils ont utilisé la méthode *error-prone polymerase chain replication* (EP-PCR). Cette méthode consiste en une amplification en chaîne par polymérase de séquences introduisant des erreurs aléatoires dans la séquence copiée.¹³ Elle a fourni une librairie de séquences mutantes, sur laquelle des tests d'inhibitions ont été effectués (*i.e.* fosmidomycine et analogues). Durant ces tests, deux séquences de la DXR ont présenté une augmentation d'un facteur dix des valeurs d'efficacité maximum à 50 % de la concentration (EC₅₀) à l'encontre de l'inhibiteur fosmidomycine.¹² Bien qu'elles présentent une diminution d'affinité pour le substrat naturel DXP, ces protéines mutantes sont toujours capables de réaliser la transformation enzymatique du DXP en MEP. Elles possèdent toutes deux les mêmes mutations : N28Y, M68L, T202A, S222T et I256F (Figure 23).

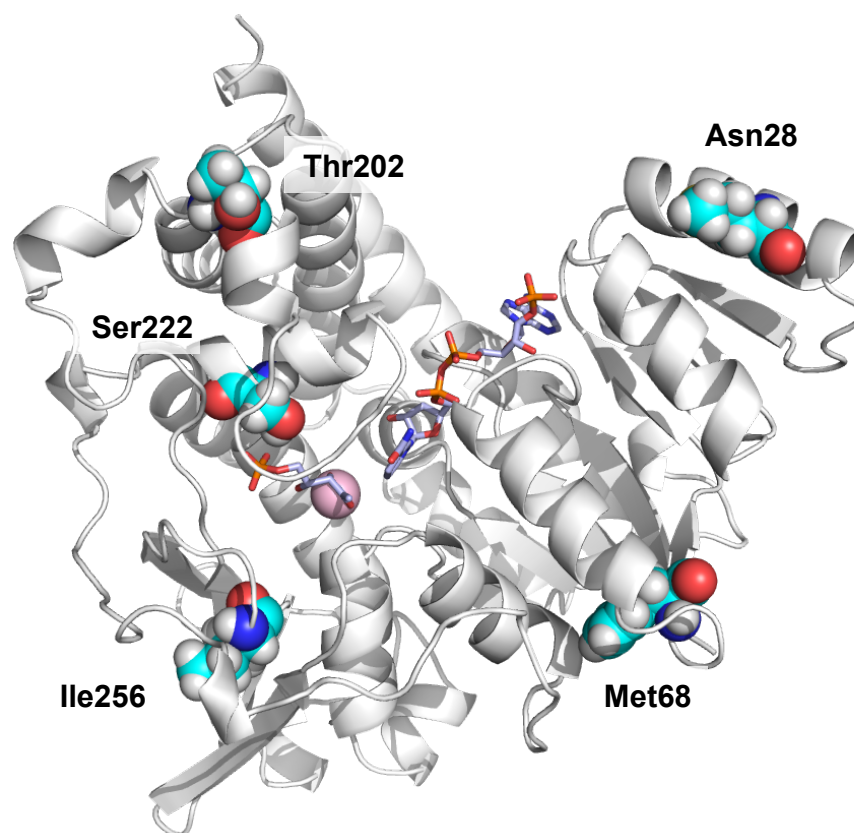


Figure 23: Représentation au sein des deux protéines résistantes à la fosmidomycine des résidus mutés (sphère cyan). La protéine (PDBid 1Q0Q) est représentée en ruban blanc, le métal en sphère rose et le DXP et NADPH en bâtonnets bleu clair.¹⁴

Dans ces mutations, une affecte la Ser222, localisée dans le site actif de la protéine, mutée en une Thr222. La Ser222 est décrite dans la littérature comme faisant partie des résidus hautement conservés interagissant avec le phosphate ou le phosphonate des ligands se fixant dans le site actif de la DXR (Figure 24, Tableau 8).^{14,15}

Tableau 8: Fragments de séquence de différents organismes (source Uniprot)¹⁶. En bleu sont représentés les résidus conservés et en surbrillance la sérine, cible de la mutation.

| Souche | Code | Fragment de séquence |
|-----------------------------------|--------|--|
| <i>Escherichia coli</i> | P45568 | 209 HPNWSMGRKISVD S ATMMNKGLE 231 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | P9WNS1 | 200 HPNWSMGPMNTLN S ASLVNKGLE 222 |
| <i>Plasmodium falciparum</i> | Q8IKG4 | 293 HPKWKMGKKITID S ATMMNKGLE 235 |

De par la localisation de ces cinq mutations, Armstrong *et al.* en ont déduit que la S222T serait responsable de la résistance induite envers la fosmidomycine et ses analogues. Ils ont alors exprimé dans une souche mutante d'*E. coli* contenant la mutation S222T, et ont observé que cette souche à DXR mutée en S222T se développe de manière similaire à la souche sauvage, à la différence qu'elle est maintenant devenue résistante à la fosmidomycine. Cette mutation représente une évolution potentielle du site active conduisant à la résistance d'inhibiteurs de la DXR.

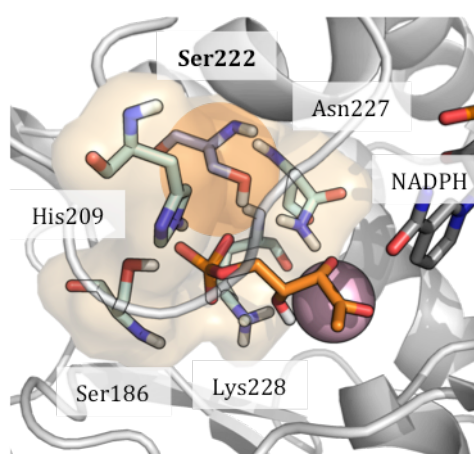


Figure 24: Site actif de la *EcDXR*-WT (PDBid 1Q0Q) en présence du Mg^{2+} (sphère). Sont représentés en bâtonnets le DXP (orange), le cofacteur et des résidus importants localisés au niveau du point d'ancrage, dont la Ser222.¹⁴

B. Objectifs

Dans ce chapitre, nous présentons une étude de la DXR complexée avec le ligand naturel, le DXP, avec l'inhibiteur, la fosmidomycine **33**. L'analyse des interactions protéine-ligand de chacun révèle des similarités ainsi que des différences entre ces deux ligands. La structure cristallographique de la DXR complexée avec le DXP, disponible dans la banque de donnée (Protein Data Bank), a été utilisée. Des simulations de dynamique moléculaire, utilisant un protocole de base, ont permis d'obtenir des informations pour les études des interactions protéine-ligand. Les contributions des acides aminés appartenant au site actif ont été analysées. Nous avons également développé un modèle homologique du mutant S222T, sur lequel les mêmes opérations décrites précédemment ont été appliquées, l'objectif étant de déterminer les facteurs permettant à la DXR du mutant de catalyser la conversion du DXP en MEP tout en devenant résistante à la fosmidomycine.

Pour ce projet, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire couplées à des calculs de contributions énergétiques par résidus (méthode MM/PBSA). La confrontation de nos résultats obtenus pour le complexe natif, issu de la structure cristallographique, en présence du DXP, du cofacteur et du métal, avec ceux décrits dans la littérature est également réalisée.¹⁴ Les analyses effectuées ont permis de mettre en évidence l'implication de résidus clés.

C. Préparation des systèmes

C.1. Modélisation des complexes

Nous avons choisi de travailler à partir de la structure cristallographique de la DXR issue d'*E. coli*, cocrystallisée en présence du DXP et du NADPH (PDBid 1Q0Q).¹⁴ Cette structure possède une résolution de 1,9 Å. La boucle de confinement, protégeant le site actif (*i.e.* résidus 206-216), est en conformation fermée. C'est à dire qu'elle recouvre et bloque le substrat dans le site actif. Dans cette structure, le métal est absent. Afin de réaliser une étude proche du modèle réel du site actif, le métal y est ajouté par superposition de la structure de la DXR de *Mycobacterium tuberculosis*, cocrystallisée en présence de la fosmidomycine, du NADPH et de Mn^{2+} (PDBid 4AIC).¹⁷ Ce dernier est ajouté à notre structure protéique et remplacé par Mg^{2+} afin de conserver des conditions expérimentales identiques à celles de la publication de référence.¹²

Les états de protonation et la régularisation des géométries impliquant les résidus d'asparagines, glutamines et histidines sont corrigés à l'aide du serveur web MolProbity4.2.¹⁸ La protéine mutante S222T est préparée avec l'outil Modeller, dont un script en libre accès engendre la mutation d'un résidu ainsi que l'optimisation de son orientation.¹⁹ La qualité de la structure résultante est contrôlée visuellement avant d'être exploitée.

Pour réaliser cette étude, l'inhibiteur fosmidomycine a été docké sur la structure décrite précédemment. Le ligand a été construit avec le logiciel Avogadro 1.1.0 pour être docké dans le site actif de la DXR de la structure 1Q0Q native, en présence du cofacteur et du Mg^{2+} auquel une charge formelle de +0,8 est assignée, en utilisant le programme Autodock4.^{20,21} Le choix de la valeur de la charge du métal sera discutée plus en détails dans le chapitre « Conception d'inhibiteurs potentiels de la DXR de type bisubstrat et biligand ». Centré sur le site actif du DXP, la taille de la boîte correspondant à l'espace de recherche conformationnel est de 50 x-, 50 y- et 50 z-points, dont chaque point est espacé de 0,375 Å.

Les coordonnées du centre de cette boîte sont [x : 19,842, y : 1,408, z : 36,675]. Lors des calculs de docking, 250000 évaluations sont réalisées par molécule et 2700 générations sont engendrées par l'algorithme génétique Lamarckien. La conformation de plus basse énergie est validée par comparaison structurale avec celle de la structure native du DXP afin de valider les critères conformationnels clés. La conformation du DXP issue de la structure cristalline est conservée pour les études de dynamique. Ces deux conformations servent à construire deux paires de complexes : i) protéine native, ligand (DXP/FOM-*WT*), Mg^{2+} , NADPH ; ii) protéine mutante, ligand (DXP/FOM-*MUT*), Mg^{2+} , NADPH.

C.2. Préparation des simulations de dynamique moléculaire

Les paramètres des ligands ont été engendrés via ParamChem (CHARMM General Force Field 36, CGENFF36) puis optimisés à l'aide de l'outil Force Field Toolkit, implémenté dans le programme de visualisation VMD.^{22,23} Les minimisations des énergies des complexes (protéine, ligand, métal, cofacteur) sont réalisées dans le vide avec une valeur limite des interactions entre atomes non liés de 15 Å avec le logiciel CHARMM.²⁴ La première étape de minimisation implique la méthode de premier ordre *Steepest Descent* sur 1000 pas, suivie de l'*Adopted-Basis* Newton-Raphson sur 3000 pas.²⁵ Ensuite les complexes sont insérés dans une boîte d'eau cubique de 75 Å de côté et leurs charges sont neutralisées par l'ajout d'ions sodium et chlorure. Tous les calculs ont été réalisés avec le champ de force CHARMM *all-atom* (version CHARMM36) et le modèle TIP3P est utilisé pour la description des molécules d'eau.²⁶ Des conditions périodiques (*periodic boundary conditions*) sont appliquées. Les interactions de courtes distances des atomes non liés sont limitées à une distance de 12 Å et les interactions longues distances sont traitées par l'algorithme *Particle Mesh Ewald* (PME). Le programme NAMD2.9 est utilisé pour effectuer une série de minimisation et de chauffage pour atteindre progressivement la température de 300 K.^{27,28} Une équilibration de 85 ps dans l'ensemble micro-canonique NVE est réalisée puis une trajectoire de 4,5 ns est produite.

Ce protocole est répété deux fois pour obtenir trois simulations indépendantes pour chacun des complexes protéine-ligand. Après vérification de la stabilité du système simulé pour chaque simulation (*i.e.* la température et l'énergie totale du système sont stables et le ligand reste dans le site actif), les trois dernières nanosecondes des trois simulations de chaque système sont concaténées et utilisées pour la suite des analyses d'énergie libre de type MM/PBSA. L'estimation de l'énergie libre et la décomposition par résidu ont été effectuées en suivant le protocole décrit dans la publication de Lafont *et al.*⁵ Les méthodes employées à la réalisation des calculs nécessaires à cette étude sont décrites plus en détails dans le chapitre « IV. Méthodes computationnelles standard » p. 78. Pour ces calculs, le complexe est divisé en deux groupes : i) la protéine ; ii) la molécule d'intérêt, le cofacteur et le métal.

D. Résultats et discussion

D.1. Identification des acides aminés importants pour la fixation de ligand

Dans cette partie sont présentés les résultats de la méthode MM/PBSA obtenus pour le complexe formé par la DXR native et son ligand naturel, le DXP (DXP/DXR-*WT*). Ces résultats ont permis d'identifier les acides aminés contribuant significativement à la fixation du DXP dans le site actif.

Pour analyser les résultats des calculs MM/PBSA du complexe DXP/DXR-*WT*, un filtre de sélection des énergies libres totales inférieures à -1 kcal/mol par résidu a été appliqué. Seuls les acides aminés interagissant favorablement avec le DXP sont présentés. Nous ne considérerons pas ceux interagissant avec le cofacteur ou le métal. Dix-huit résidus sont identifiés, dont certains possèdent d'importantes interactions stabilisantes. Les résultats sont représentés dans la Figure 25, dans laquelle sont indiquées les énergies moyenne de contribution de chaque résidu retenu lors de l'analyse.

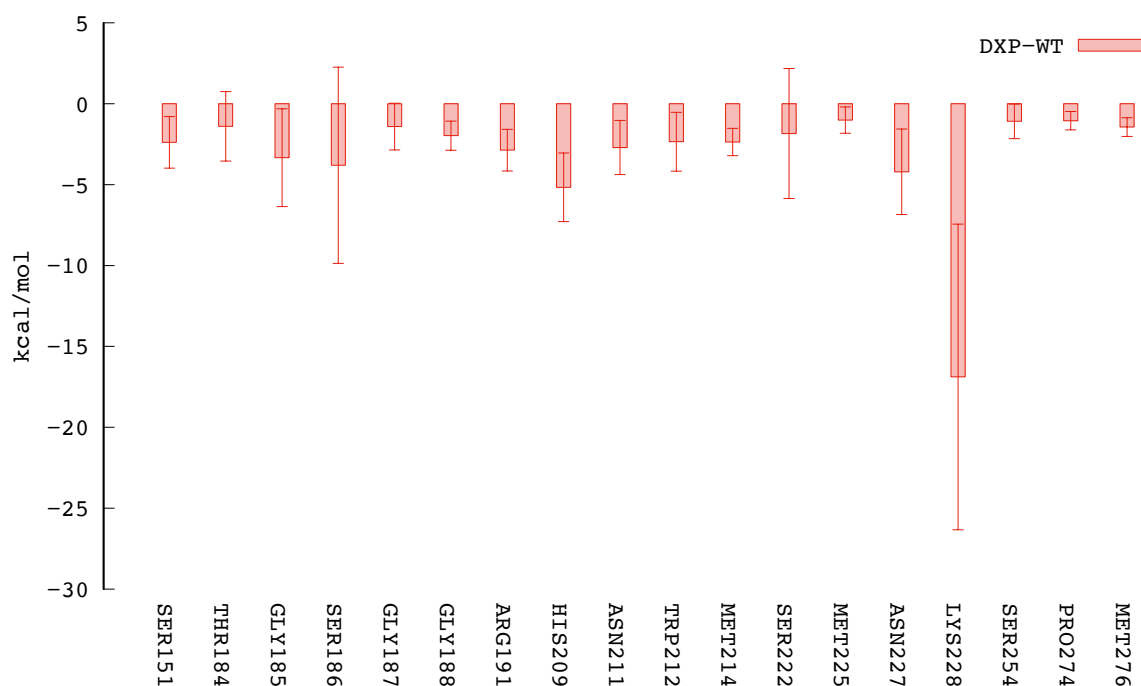
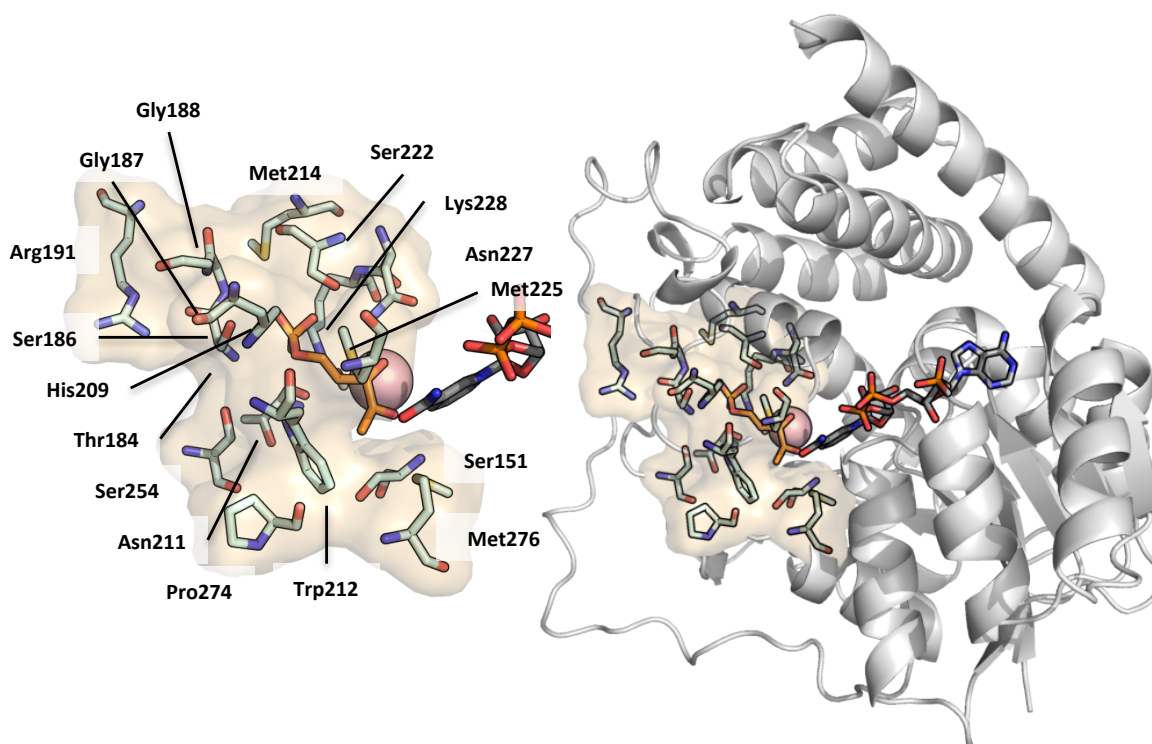


Figure 25 : Energies totales moyennes des interactions stabilisantes inférieures à -1 kcal/mol impliquant les acides aminés interagissant avec le DXP.

Les résultats de ces calculs ont permis d'identifier les résidus Gly185, Ser186, Ser222, Asn227 et Lys228, situés au niveau du point d'ancrage phosphate, ainsi que les résidus appartenant à la boucle de confinement : l'His209, l'Asn211, le Trp212 et la Met214. Ces derniers interagissent seulement lorsque la boucle est fermée sur le site actif. Parmi ces acides aminés, figurent les résidus décrits dans la littérature comme étant importants à la fixation du DXP : Ser186, His209, Trp212, Met214, Ser222, Asn227, Lys228.¹⁴ Les calculs effectués confirment l'observation faite à partir des analyses structurales, suggérant que les acides aminés cités sont sans doute importants à la fixation d'un ligand.



A.

B.

Figure 26: Représentation des résidus ayant une énergie totale d'interaction avec le DXP inférieure à -1 kcal/mol pour le DXP-WT (bâtonnets couleur cyan). Le DXP et le NADPH sont représentés en bâtonnets orange et gris, respectivement. A) Visualisation centrée sur les résidus d'intérêts ; B) Visualisation globale de la protéine et des éléments d'intérêts.

Ces premiers résultats mettent en évidence des acides aminés à proximité du ligand possédant des énergies stabilisantes non négligeables (*i.e.* Ser151, Thr184, Gly187, Gly188, Arg191, Asn211, Ser254, Pro274, Met276) (Figure 26). Cette procédure fournit des résultats en adéquation et complémentaires à ceux de la littérature, nous permettant de valider notre protocole. Elle peut donc être appliquée aux complexes impliquant la DXR mutée de notre étude, ainsi qu'aux complexes impliquant l'inhibiteur fosmidomycine **33**.

Nous allons présenter maintenant les résultats obtenus pour les complexes formés par les DXRs native et mutante avec le DXP et l'inhibiteur fosmidomycine **33**. En plus de déterminer une carte des interactions protéine-ligand, nous espérons pouvoir comprendre et déterminer de quelle manière la protéine mutante peut fixer le DXP pour le transformer en MEP et être résistante à l'inhibiteur fosmidomycine.

D.2. Analyses des énergies totales des sites actifs

Pour chacun des complexes, les contributions énergétiques moyennes par résidu du site actif ont été quantifiées à l'aide de la méthode MM/PBSA décrite dans la partie « Méthode standard ». Pour comparer les structures mutées et natives, nous nous sommes concentrés sur cinquante-neuf résidus localisés à la surface du site actif de la DXR. Certains d'entre eux peuvent ne pas ou peu interagir avec le ligand, mais la mutation S222T a pu affecter leur environnement et modifier leur comportement.

Le fait d'avoir regroupé le ligand, le cofacteur et le métal dans un même ensemble engendre des interactions trop importantes de la part de certains résidus ne se trouvant pas à proximité du ligand d'intérêt. Ils sont alors négligés et ne seront pas traités. Nos calculs ont montré que l'Asp221 de chaque complexe possède une énergie positive défavorable. Il est situé dans une hélice- α du domaine C-terminal, orientée vers le cofacteur et n'interagit pas avec les molécules d'intérêts. De même, les résidus Asp150, Glu152 et Glu231, chélatant le métal, possèdent des énergies hautement négatives, résultant de leurs interactions et de leur proximité avec ce dernier.

A partir de maintenant, nous appellerons *DXP-WT*, le complexe issu de la DXR native en présence du DXP et *DXP-MUT* le complexe issu de la DXR mutée en présence du DXP. De la même manière, seront appelés les complexes en présence de la fosmidomycine *FOM-WT* et *FOM-MUT*, respectivement.

D.2.1. Les complexes en présence de DXP

En suivant notre procédure, nous avons examiné les interactions énergétiques entre le ligand naturel DXP et les deux formes de la DXR, native et mutée, résultants des calculs de la méthode MM/PBSA. Les énergies totales moyennes issues des cinquante-neuf résidus sélectionnés pour l'analyse des complexes DXP-WT et DXP-MUT possèdent approximativement le même profil énergétique (Figure 27).

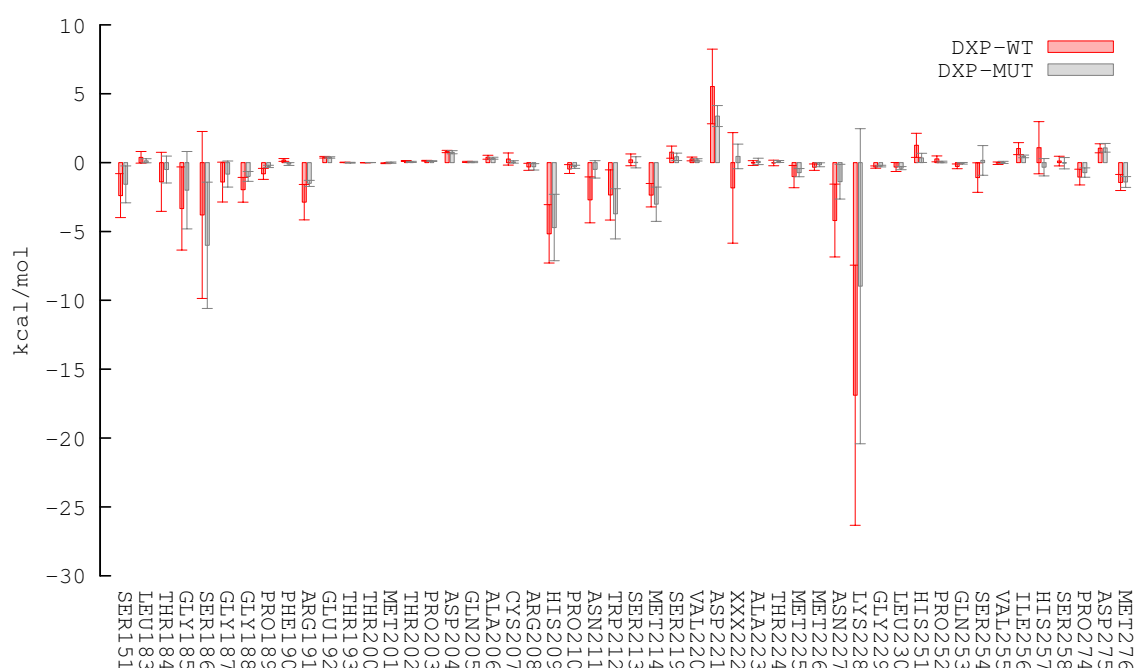


Figure 27: Energies totales moyennes et leurs écarts types, en kcal/mol, des 59 résidus sélectionnés, calculées à partir des conformations extraites des trajectoires issues de DXP-WT et DXP-MUT ; XXX222=SER222 pour le DXP-WT et XXX=THR222 pour le DXP-MUT.

Pour un certain nombre de résidus, le complexe DXP-MUT présente des énergies totales moyennes moins favorables que le complexe DXP-WT: Thr184, Gly185, Gly187, Gly188, Pro189, Phe190, Arg191, His209, Asp211, Thr224, Met225, Asp227, Lys228, Ser254. Les écarts types du complexe muté S222T correspondant à ces résidus indiquent que le profil énergétique est similaire à celui de la protéine native. En revanche, nous observons des énergies totales moyennes plus favorables que le complexe DXP-WT, pour les résidus : Ser186, Trp212 and Met214, qui sont des résidus hautement conservés du site actif.

Concernant le Trp212, la visualisation des deux trajectoires des complexes DXP-*MUT* et DXP-*WT* ont permis d'observer que ce résidu interagit d'avantage avec le cofacteur dans le cas du complexe DXP-*MUT*, alors qu'il est orienté le long squelette du DXP pour le complexe DXP-*WT* (Figure 28).

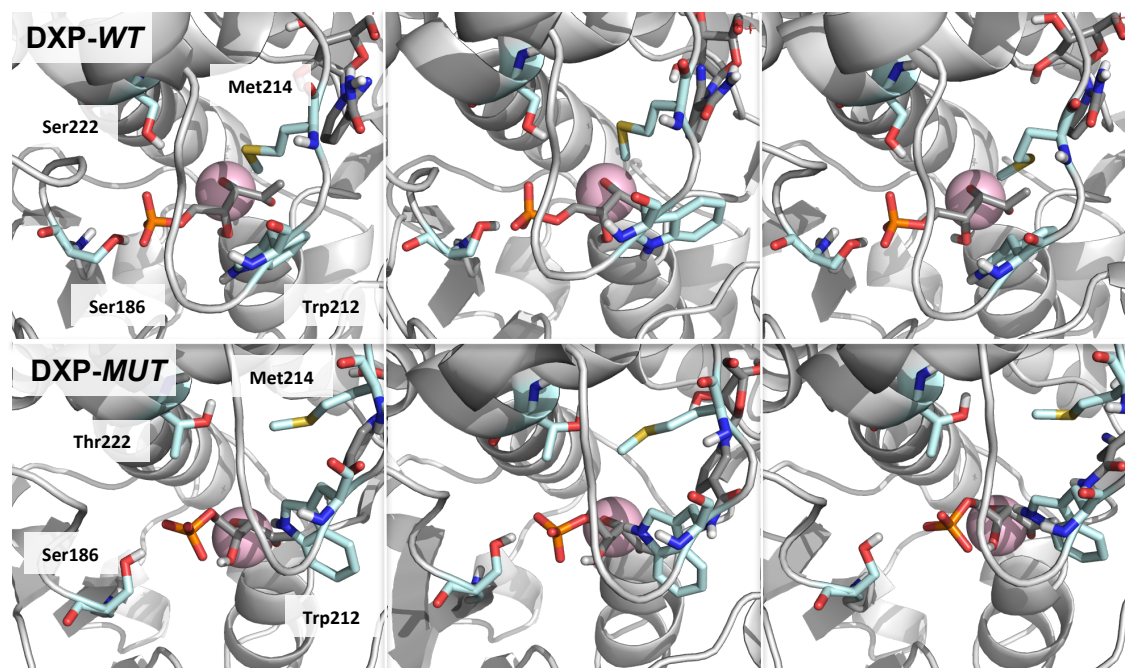


Figure 28: Visualisation des résidus d'intérêts, en bâtonnets de couleur cyan, au cours des trajectoires. L'orientation est vers le positionnement du Trp212. Le DXP et le NADPH sont en gris et le Mg²⁺ est représenté par la sphère. Les structures sont extraites au même pas.

La Ser186 reste plus proche du phosphate pour le complexe DXP-*MUT*, comparé à la structure DXP-*WT*, favorisant une forte interaction électrostatique, ce qui se retrouve dans nos résultats (Figure 29). La Thr222 possède une énergie totale libre légèrement positive chez DXP-*MUT*, déstabilisant d'autant la fixation du DXP. L'hydroxyle de la Thr222 est engagé dans une liaison hydrogène avec l'oxygène du carbonyle de l'Ile218, participant à une hélice- α du domaine C-Terminal, le long de la paroi du site actif. Cela a pour conséquence d'orienter le méthyle de la Thr222 vers le phosphate du DXP, provoquant des interactions stériques défavorables (Figure 29).

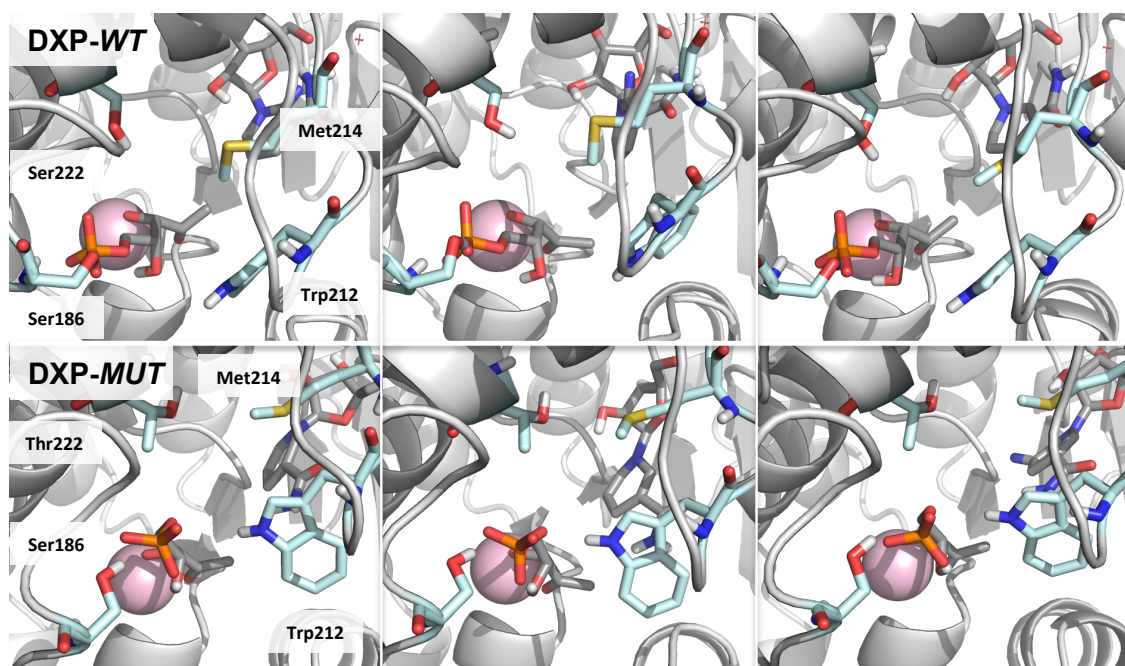


Figure 29: Visualisation de résidus d'intérêts, en bâtonnets cyan, au cours des trajectoires. Orientation de la caméra en direction du point d'ancrage. Le DXP et le NADPH sont en gris et le Mg^{2+} est représenté par la sphère. Les structures sont extraites au même pas.

D.2.1. Les complexes en présence de fosmidomycine

Nous allons maintenant examiner les énergies d'interaction entre les deux complexes de la DXR native et mutée en présence de l'inhibiteur fosmidomycine, représentées dans la Figure 30. Les énergies totales moyennes issues des cinquante-neuf résidus sélectionnés pour le complexe FOM-*WT* suivent la même tendance globale que ceux des complexes DXP-*MUT* et DXP-*WT*, résultant de la grande similarité structurale entre le DXP et la fosmidomycine.

Nous retrouvons des interactions stabilisantes fortes, impliquant des acides aminés proches ou inclus dans le point d'ancrage, la pince ou la boucle de confinement : Ser151, Gly185, Ser186, His209, Pro210, Trp212, Met214, Met225, Asn227, Lys228, Ser254 et Met276.

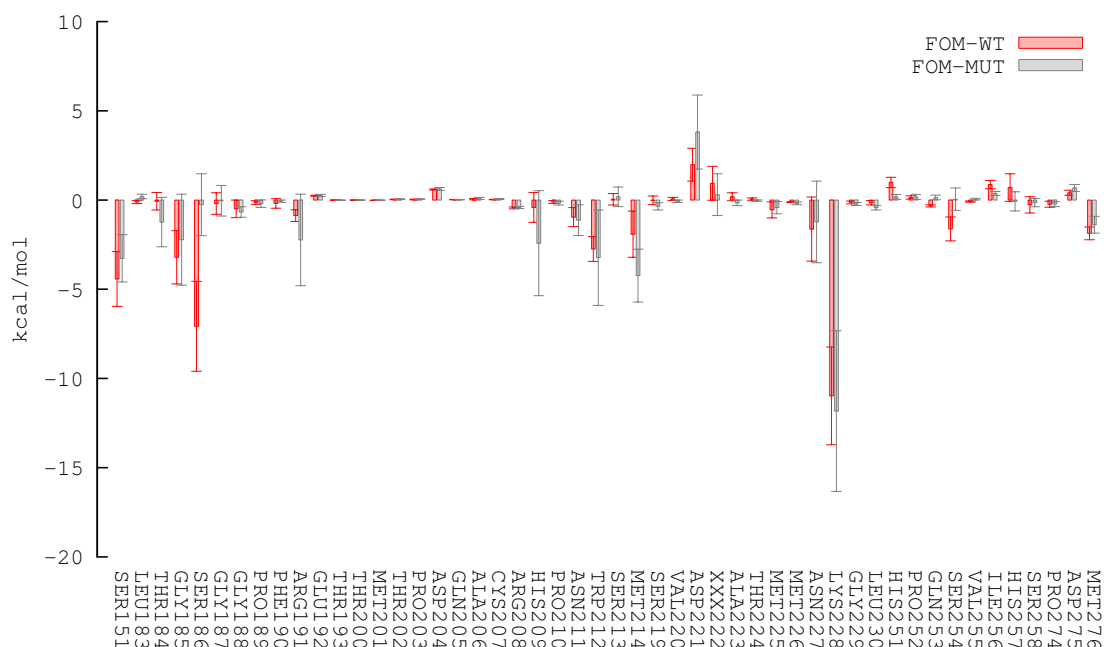


Figure 30: Energies totales moyennes en kcal/mol et leurs écarts types, des 59 résidus sélectionnés, calculées à partir des conformations extraites des FOM-WT et FOM-MUT; XXX222=SER222 pour FOM-WT et XXX=THR222 pour FOM-MUT pour le complexe muté.

Les différences d'énergie d'interaction globale sont plus importantes entre les complexes FOM-WT et FOM-MUT que pour ceux impliquant le DXP, laissant suggérer que la mutation S222T affecte plus la fixation de la fosmidomycine que celle du DXP. Pour le complexe DXP-WT, l'hydroxyle de la Ser222 peut interagir via des liaisons hydrogènes et de différentes manières avec le phosphate du DXP : i) avec les oxygènes liés uniquement au phosphore ; ii) avec l'oxygène liant le phosphore et le carbone. Cette dernière possibilité est la plus favorable car elle permet un accès plus important à la zone du point d'ancrage au phosphonate, notamment aux résidus Thr184 à Gly188. Pour la fosmidomycine, ce type d'interaction n'est pas possible car nous sommes non plus en présence d'un phosphate mais d'un phosphonate.

Lorsque le phosphonate interagit avec le point d'ancrage, la Ser222 est trop éloignée pour pouvoir participer à une liaison hydrogène avec l'un des oxygènes du phosphonate. Son hydroxyle cherche alors la chaîne principale de l'Ile218 pour effectuer une liaison hydrogène, comme pour la Thr222 dans le cas des complexes DXP-*MUT* et FOM-*MUT*. En effet, la Thr222 du complexe FOM-*MUT* effectue une liaison hydrogène avec la chaîne principale de l'Ile218. Ce mouvement entraîne l'orientation du méthyle de la Thr222 vers le phosphonate de la fosmidomycine, engendrant les conséquences suivantes : i) la perte d'interactions avec certains résidus du point d'ancrage ; ii) le soulèvement de la boucle de confinement ; iii) le déplacement du ligand (Figure 31).

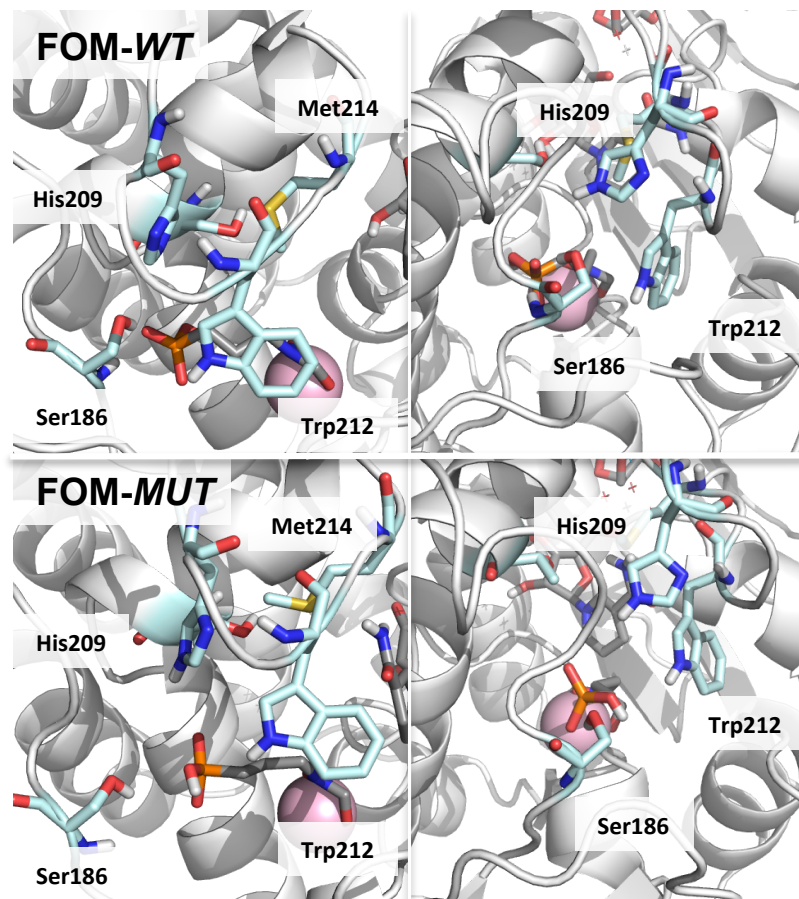


Figure 31: Visualisation de structures extraites des trajectoires FOM-*WT* et FOM-*MUT* de résidus d'intérêts, en bâtonnets cyan. Orientation de la caméra face à la boucle de confinement et en direction du point d'ancrage. La fosmidomycine et le NADPH sont en gris et le Mg²⁺ est représenté par une sphère rose.

Le complexe FOM-*MUT* obtient de meilleures énergies totales moyennes pour les acides aminés de la boucle de confinement (*i.e.* Pro210, Trp212, Met214) ainsi que pour la Ser151, la Thr184, l'Arg191 et la Lys218, sans tenir compte des écart-types. La trajectoire FOM-*MUT* indique que le Trp212 et la Met214 interagissent par moment plus avec le cofacteur qu'avec le ligand. Il est intéressant de noter que plusieurs acides aminés montrent des différences d'interactions significatives entre la forme native et mutée de la DXR, en particulier la Ser186, l'His251 et la Ser254. De telles différences, sans tenir compte des barres d'erreurs, ne sont pas observées dans le cas du DXP.

D.3. Analyses d'efficacité des acides aminés

Pour savoir si les interactions observées proviennent d'un simple contact ou d'une position optimale avec le ligand, nous avons utilisé la méthode d'analyse d'efficacité par ligand ou résidu (analogue de la méthode *ligand efficiency*).^{29,30} L'efficacité d'un acide aminé ou d'un ligand est définie par son énergie libre totale divisée par le nombre d'atome non-hydrogène qui le compose (*i.e.* 4 pour la glycine, 5 pour l'alanine, 8 pour la leucine, etc.). Cette méthode a été appliquée aux cinquante-neuf résidus sélectionnés des quatre complexes, DXP-*WT*, -*MUT* et FOM-*WT*, -*MUT* (Figure 32).

Les analyses d'efficacité appliquées aux acides aminés indiquent que les interactions les plus efficaces se trouvent à proximité du point d'ancrage (Figure 32, rectangle orange). Nous notons la perte importante d'interactions efficaces de la Ser186 pour FOM-*MUT*. Nous retrouvons également les interactions impliquant les résidus de la boucle protectrice du site actif (Figure 32, rectangle bleu), principalement représentée par les His209, Asn211, Trp212 et Met214. La contribution énergétique des acides aminés chez les complexes mutés et natifs est globalement similaire.

Seules diffèrent les énergies où les complexes natifs semblent plus stables comparés à ceux mutés, suggérant encore une fois que la mutation S222T affecte la fixation de ligand dans le site actif. Ce phénomène s'observe notamment au niveau du point d'ancrage, zone où l'orientation du méthyle de la Thr222 des complexes mutés déstabilise les complexes correspondants. Les résidus à proximité du métal sont indiqués par les rectangles violets figurant sur la Figure 32. Les interactions les plus efficaces impliquant les résidus chélatant le métal ne sont pas indiquées. Les acides aminés dans les zones blanches constituent également le site actif mais interagissent peu avec le ligand et sont donc moins importants pour cette étude.

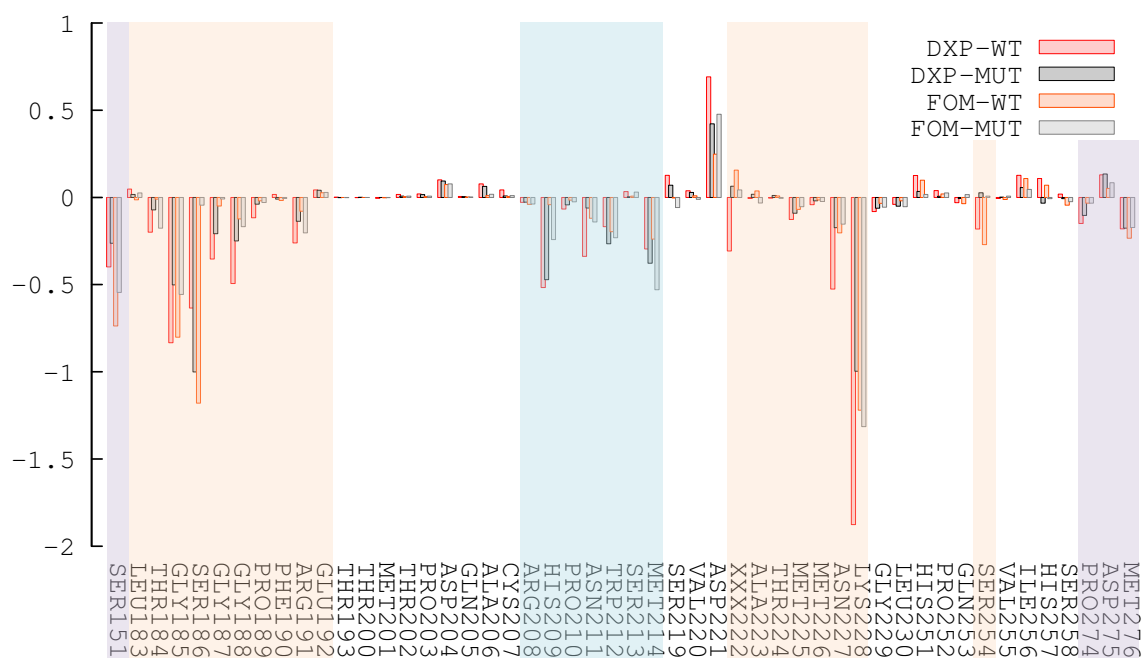


Figure 32: Efficacité respective, en kcal/mol, des 59 résidus sélectionnés pour les quatre complexes ; XXX222=SER222 pour le complexe-WT et XXX=THR222 pour le complexe-MUT ; légende des rectangles : en violet sont représentés les résidus à proximité de la fonction chélatante, en orange ceux du point d'ancrage et en bleu ceux de la boucle.

D.4. Décomposition énergétique par résidu

La décomposition des énergies par résidu permet d'avoir une meilleure compréhension des types d'interactions impliquées avec le ligand (*i.e.* de type électrostatique et van der Waals) et d'évaluer ceux qui sont les plus exposés au solvant (*i.e.* accessibilité au solvant). Les interactions électrostatiques sont largement dominantes chez les quatre complexes (Figure 33). Le point d'ancrage, où se logent les fonctions phosphate et phosphonate, indique d'importantes interactions électrostatiques favorables. Ces résultats sont cohérents, car dans cette zone vient se fixer la fonction chargée phosphate/phosphonate. Bien que le complexe FOM-*MUT* montre de bonnes interactions avec les acides aminés de la boucle en position fermée, il montre les plus faibles énergies globales, notamment pour les résidus localisés dans la zone du point d'ancrage. Le fait que le phosphonate de la fosmidomycine ne puisse pas se positionner de manière optimale chez DXR-*MUT*, pourrait expliquer la baisse d'activité d'inhibition.¹² Les interactions favorables résultantes de la boucle sont probablement renforcées par le déplacement de la molécule vers cette dernière.

Le DXP du complexe DXP-*MUT* présente de bonnes interactions, bien que légèrement plus faibles que celles issues du complexe natif. La différence électronique du phosphate par rapport au phosphonate explique ses fortes interactions électrostatiques stabilisantes localisées au niveau du point d'ancrage. Cette différence se reflète dans les charges partielles du phosphate par rapport à celles du phosphonate. La mutation S222T a un impact négatif sur les interactions avec le ligand. Les fortes interactions électrostatiques au niveau du point d'ancrage compensent la gêne stérique occasionnée par la Thr222 plus efficacement pour le DXP que pour la fosmidomycine. Le DXP reste capable de se fixer efficacement dans le site actif à en juger par les énergies obtenues. Si un tel mutant de la DXR apparaissait chez des bactéries, ces résultats indiqueraient que les nouveaux inhibiteurs devraient être capables de maintenir d'importantes interactions avec le point d'ancrage du site actif de la DXR pour être efficaces.

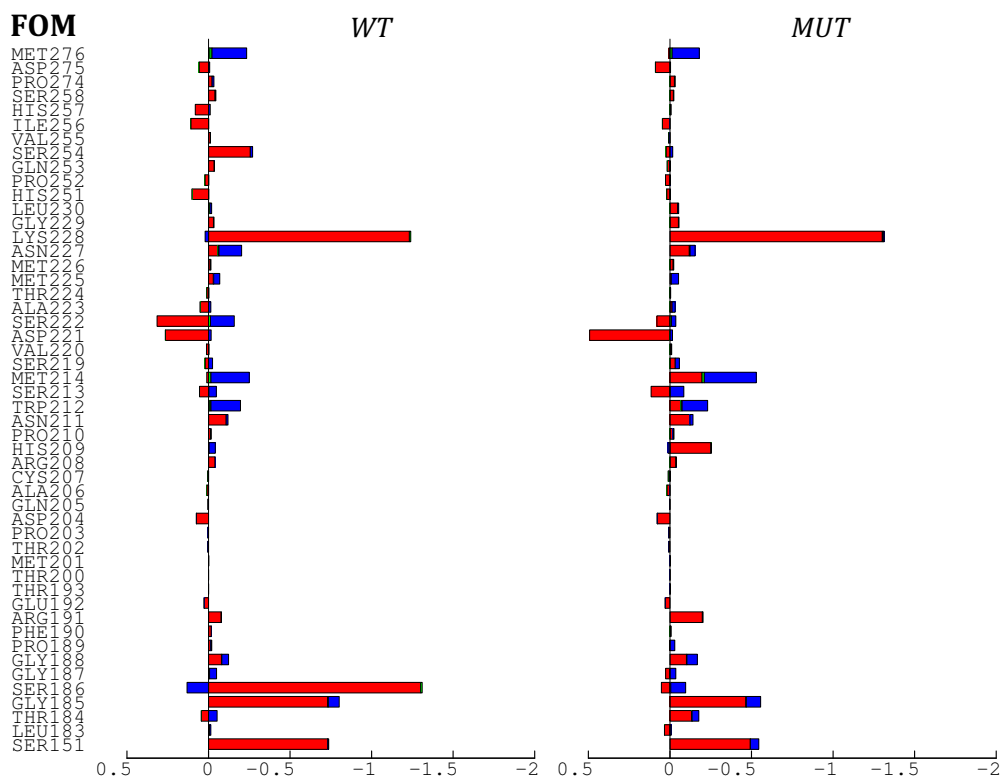
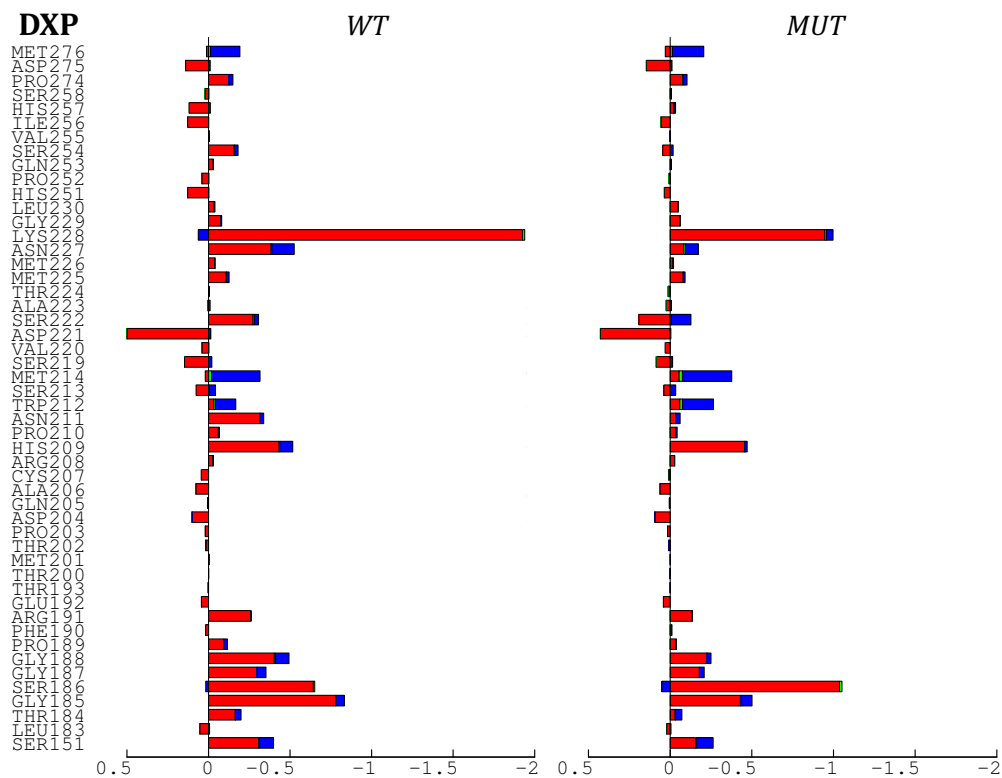


Figure 33: Décomposition énergétique par résidu en kcal/mol des 59 résidus sélectionnés des complexes-*WT* (XXX222=Ser222) et complexes-*MUT* (XXX222=Thr222). En rouge est représentée la contribution électrostatique, en bleu celle de van der Waals et en vert l'accessibilité au solvant

E. Conclusion

Des analyses du complexe de la simulation de dynamique moléculaire de la DXR en présence de son substrat naturel DXP, suivi de la procédure fondée sur notre protocole MM/PBSA, ont été réalisées. Nous avons ainsi identifié les acides aminés possédant une importante contribution à la fixation de ce ligand dans le site actif de l'enzyme. Ces interactions sont cruciales pour la fixation de molécules chez la forme native de la DXR. Ces analyses ont également montré que l'inhibiteur fosmidomycine exploite les mêmes interactions pour se fixer dans la poche du site actif.

Le mutant S222T de la DXR a été identifié par des expérimentations EP-PCR. Lorsque ce mutant est exprimé chez *E. coli*, l'enzyme reste capable de transformer le DXP en MEP et une baisse de l'inhibition par la fosmidomycine est observée.¹² En utilisant le même protocole que celui utilisé pour le complexe de la DXR native avec le DXP, nous avons examiné les complexes de la DXR mutée avec le DXP et la fosmidomycine. Le profil général d'énergie est globalement similaire mais il y a des exceptions qui différencient le complexe DXP avec celui impliquant l'inhibiteur, suggérant une différence de comportement.

La mutation S222T entraîne la formation d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle de la Thr222 et la chaîne principale de l'Ile218, orientant le méthyle de la Thr222 vers le phosphate ou phosphonate fixé au niveau du point d'ancrage. Cette position a été observée sur toutes les trajectoires mutantes et à aucun moment la liaison hydrogène avec l'Ile218 ne s'est rompue. Nos résultats suggèrent que le phosphonate de l'inhibiteur ne peut se loger dans la zone du point d'ancrage chez la forme mutante avec la même stabilité que chez la forme native. Cela a pour conséquence de l'écarter des résidus du point d'ancrage, diminuant les interactions stabilisantes avec ces derniers et expliquant pourquoi l'inhibiteur est moins actif chez le mutant S222T d'*E. coli*. Etant partis de structures possédant la boucle fermée et n'ayant pas effectué de simulations plus longues, nous ne pouvons nous prononcer si ce déplacement est suffisant pour soulever la boucle à lui seul, facilitant l'entrée du solvant et le relargage du ligand à l'extérieur du site actif.

Nous pouvons tout de même supposer que le Thr222 peut jouer le rôle de levier ou représenter une gêne quant à la fermeture de la boucle de confinement. La gêne occasionnée par la S222T est moins significative pour le complexe DXP-*MUT*. En effet, la richesse électronique du phosphate l'emporte par rapport à celle de son analogue phosphonate, lui permettant d'effectuer des interactions au niveau du point d'ancrage plus importantes et de s'y fixer efficacement. Les fortes interactions électrostatiques stabilisent la fixation du DXP dans le site actif de la DXR et contrebalancent les effets stériques dus à la mutation d'une sérine à une thréonine. Le ligand reste bien positionné comme le montre les énergies d'interactions avec la protéine.

Avec ces résultats, nous avons vu qu'une mutation au sein d'un site actif peut avoir des répercussions plus ou moins importantes en fonction du rôle et de la localisation du résidu touché. Notre étude sur les complexes DXP-*WT*, -*MUT* et FOM-*WT*, -*MUT* ont permis de mieux comprendre et de décrire quels phénomènes pourraient avoir lieu et ce, à l'aide de plusieurs analyses impliquant des calculs de type MM/PBSA. Ces résultats fournissent de nouvelles informations pouvant aider à la conception de nouveaux inhibiteurs ciblant la DXR.

¹ Kuemmerle, H.P., Murakawa, T., De Santis, F., « Pharmacokinetic evaluation of fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic », *Chemioterapia*, 1987, 6, 113-9.

² Brown, A.C., Parish, T., « Dxr is essential in Mycobacterium tuberculosis and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake », *Bio MedCentral Microbiology*, 2008, 8, 78.

³ Guerois, R., Nielsen, J. E., Serrano, L., « Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: A study of more than 1000 mutations », *Journal of Molecular Biology*, 2002, 320, 369–387.

⁴ Gohlke, H., Kiel, C., Case, D. A., « Insights into Protein–Protein Binding by Binding Free Energy Calculation and Free Energy Decomposition for the Ras–Raf and Ras–RalGDS Complexes », *Journal of Molecular Biology*, 2003, 330, 891–913.

⁵ Lafont, V., Schaefer, M., Stote, R. H., Atschuh, D., Dejaegere, A., « Protein-Protein Recognition and Interaction Hot Spots in an Antigen-Antibody Complex: Free Energy Decomposition Identifies “Efficient Amino Acids.” », *Proteins*, 2007, 70, 311–319.

⁶ Wong, C. F., McCammon, J. A. « Dynamics and Design of Enzymes and Inhibitors », *Journal of the American Chemical Society*, 1986, 108, 3830–3832.

⁷ Kollman, P., « Free-Energy Calculations - Applications to Chemical and Biochemical Phenomena », *Chemical Reviews*, 1993, 93, 2395–2417.

⁸ Simonson, T., « Free Energy Simulations Come of Age: Protein- Ligand Recognition », *Accounts of Chemical Research*, 2002, 35, 430–437.

⁹ Wan, S., Stole, R. H., Karplus, M., « Calculation of the aqueous solvation energy and entropy, as well as free energy, of simple polar solutes », *Journal of Chemical Physics*, 2004, 121, 9539–9548.

¹⁰ Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Cheatham, T. E., « Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models », *Accounts of Chemical Research*, 2000, 33(12), 889–897.

¹¹ Denisov, A. Y., Chen, G., Sprules, T., Moldoveanu, T., Beauparlant, P., Gehring, K., « Structural Model of the BCL-w - BID Peptide Complex and Its Interactions with Phospholipid Micelles », *Biochemistry*, 2006, 2250–2256.

¹² Armstrong, C. M., Meyers, D. J., Imlay, L. S., Meyers, C. F., Odom, A. R., « Resistance to the antimicrobial agent fosmidomycin and an FR900098 prodrug through mutations in the deoxyxylulose phosphate reductoisomerase gene (dxr) », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59, 5511–5519.

¹³ Cirino, P. C., Mayer, K. M., Umeno, D., « Generating mutant libraries using error-prone PCR », *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2003, 231, 3–9.

¹⁴ Mac Sweeney, A., Lange, R., Fernandes, R. P. M., Schulz, H., Dale, G. E., Douangamath, A., Oefner, C., « The crystal structure of *E. coli* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation », *Journal of Molecular Biology*, 2005, 345, 115–127.

¹⁵ Yajima, S., Hara, K., Iino, D., Sasaki, Y., Kuzuyama, T., Ohsawa, K., Seto, H., « Structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in a quaternary complex with a magnesium ion, NADPH and the antimalarial drug fosmidomycin. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 2007, 63, 466–470.

¹⁶ Lima T., Auchincloss A.H., Coudert E., Keller G., Michoud K., Rivoire C., Bulliard V., de Castro E., Lachaize C., Baratin D., Phan I., Bougueleret L., Bairoch A., « HAMAP : a database of completely sequenced microbial proteome sets and manually curated microbial protein families in UniProtKB/Swiss-Prot », *Nucleic Acids Research*, 2009, 37, 471-478.

¹⁷ Henriksson, L. M., Unge, T., Carlsson, J., Åqvist, J., Mowbray, S. L., Jones, T. A., « Structures of *Mycobacterium tuberculosis* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis », *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 19905–19916

¹⁸ Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Richardson, D. C., « MolProbity : All-atom structure validation for macromolecular crystallography », *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, 66, 12–21.

¹⁹ a) Mart, M. A., Stuart, A. C., Roberto, S., Melo, F., Andrej, S., « Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes », *Annual Review of Biophysics*, 2000, 29, 291–325; b) <http://salilab.org/modeller/wiki/Mutate%20model>

²⁰ Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G. R. «Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform», *Journal of Cheminformatics*, 2012, 4, 1-33.

²¹ Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W. L., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J., « AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility », *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30, 2785–2791.

²² a) Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., MacKerell, Jr. A. D., « CHARMM General Force Field: A Force field for Drug-Like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Field », *Journal of Computational Chemistry*, 2010, 31, 671-690 ; Vanommeslaeghe, K., MacKerell, Jr. A. D., « Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: bond perception and atom typing », *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 52, 3144-3154 ; c) Vanommeslaeghe, K., Raman, E. P., MacKerell, Jr. A. D., « Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of bonded parameters and partial atomic charges », *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 52, 3155-3168, d) <https://cgenff.paramchem.org>

²³ a) Mayne, C.G., Saam, J., Schulte, K., Tajkhorshid, E., Gumbart, J.C., « Rapid Parameterization of Small Molecules Using the Force Field Toolkit », *Journal of Computational Chemistry*, 2013, 34, 2757-2770; b) Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., « VMD – Visual Molecular Dynamics », *Journal of Molecular Graphics*, 1996, 14, 33-338.

²⁴ Brooks, B. R., Brooks, C. L., III, Mackerell, A.D., Jr., Nilsson, L., PETRELLA, R.J., Roux, B., Wong, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caffisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., IM, K., IM, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R.W., Post, C.B., Pu, J. Z., Schaeffer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., Karplus, M., « CHARMM : The Biomolecular Simulation Program », *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30, 1545-1614.

²⁵ Steinbach, P. J., Brooks, B. R., « New spherical-cutoff methods for long-range forces in macromolecular simulation », *Journal of Computational Chemistry*, 1994, 15, 667–683.

²⁶ MacKerell, A. D., Bashford, D., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Karplus, M., « All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins », *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998, *102*, 3586–3616.

²⁷ Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., Schulten, K., « Scalable molecular dynamics with NAMD », *Journal of Computational Chemistry*, 2005, *26*, 1781-1802.

²⁸ Chebaro, Y., Amal, I., Rochel, N., Rochette-Egly, C., Stote, R. H., Dejaegere, A., « Phosphorylation of the Retinoic Acid Receptor Alpha Induces a Mechanical Allosteric Regulation and Changes in Internal Dynamics», *PLoS Computational Biology*, 2013, *9*, 1–14.

²⁹ Andrew, L. Hopkins, Colin, R. Groom, Alexander, A., « Ligand efficiency : A useful metric for lead selection », *Drug Discovery Today*, 2004, *9*, 430-431.

³⁰ Charles, H. R., Scott, D. B., Brett A. T., « The role of molecular size in ligand efficiency », *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, *17*, 4258-4261.

VI. Etude comparative des interactions de plusieurs inhibiteurs de la DXR chez trois organismes

Table des matières

| | |
|---|------------|
| A. Introduction | 148 |
| B. Matériel et méthodes | 153 |
| B.1. Alignement et comparaison de séquences..... | 153 |
| B.2. Construction des complexes de l'étude..... | 153 |
| B.3. Simulations de dynamique moléculaire et d'analyses MM/PBSA | 154 |
| C. Alignement et comparaison de séquences et de structures cristallographiques | 155 |
| D. Analyses des contributions d'énergie libre totale par résidu | 160 |
| D.1. Résultats et discussion des analyses MM/PBSA | 161 |
| <i>D.1.1. Ligands se chélatant au métal Fom 33, Fom.ar 69 et Fr 34</i> | 162 |
| <i>D.1.2. Ligands phosphonates lipophiles Pyr 70 et Pyr.ar 71</i> | 162 |
| D.2. Résumé des analyses MM/PBSA | 163 |
| E. Hydratation des complexes | 164 |
| F. Conclusion | 170 |

A. Introduction

La DXR est une cible très importante pour la recherche de nouveaux antimicrobiens et parasitaires. Plusieurs équipes se sont penchées sur le sujet et ont permis la découverte de nombreux inhibiteurs de la DXR durant ces dernières années (cf. chapitre « Introduction »). Les analyses des structures cristallographiques de certains de ces inhibiteurs en présence de la protéine indiquent des interactions conservées, décrites dans le chapitre « V. Etude structurale et énergétique de la DXR » p.120. Cependant, des études *in vitro* ont montré que la capacité d'inhibition des molécules varie en fonction de l'organisme ciblé. Une molécule inhibant efficacement la DXR chez un organisme, n'est pas assurée de posséder une inhibition similaire face à celle d'un autre. L'un des problèmes concerne la capacité d'une molécule à franchir la paroi cellulaire de certains organismes, que ce soit par diffusion ou à l'aide d'un transporteur.¹ Il a notamment été montré par Brown *et al.* que la fosmidomycine nécessite la présence du transporteur du cAMP glycérol-3-phosphate dépendant.^{1a} Ce dernier est absent de la membrane de *Mycobacterium* spp., la rendant naturellement résistante à la fosmidomycine. Les molécules chargées ne peuvent traverser la membrane plasmique sans un transporteur ou canal ionique. Seules les molécules non chargées peuvent diffuser au travers de la membrane plasmique. Un autre aspect à prendre en considération est le développement d'antibiotiques à large spectre se fixant spécifiquement dans le site actif de l'enzyme. L'effet de solvatation d'un ligand est un phénomène important impliqué lors de sa fixation dans le site actif. La solvatation et la désolvatation sont d'importants facteurs à prendre en considération car cela peut influencer sur l'enthalpie et l'entropie, impactant l'énergie de fixation des ligands. En effet, la désolvatation d'un ligand et d'une protéine ont montré qu'ils avaient un impact non négligeable sur les énergies de fixation.² Dans cet objectif, Cai *et al.* ont appliqué la méthode de titration calorimétrique isotherme à six inhibiteurs connus de la DXR afin d'étudier la thermodynamique de leur fixation dans le site actif de la protéine (Schéma 17).³ Cette technique est très largement utilisée pour caractériser les interactions biomoléculaires.⁴

Lors du processus de fixation d'un ligand à un récepteur, de la chaleur peut être absorbée (endothermique) ou délivrée au milieu (exothermique). Le dispositif va alors compenser cette différence de chaleur pour maintenir une température constante. Ce transfert thermique est alors mesuré et donne accès à la constante d'affinité (K_D), l'enthalpie (ΔH), l'entropie (ΔS) et donc l'énergie libre (ΔG) du complexe formé. La quantité d'énergie est proportionnelle au nombre d'interactions ayant lieu entre les partenaires du système.

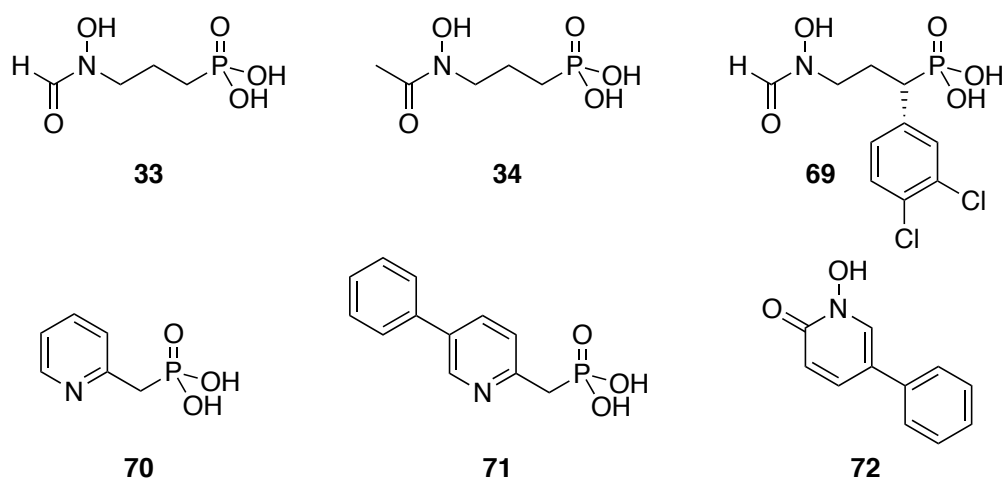


Schéma 17: Inhibiteurs connus de la DXR.

Cai *et al.* ont travaillé sur la fixation de six inhibiteurs connus de la DXR de trois organismes : *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Plasmodium falciparum* (*Ec*-, *Mt*- et *PfDXR*) (Schéma 17).³ Le choix de ces six inhibiteurs n'est pas anodin. En effet, trois sont connus comme étant de bons inhibiteurs de la DXR : la fosmidomycine **33** (Fom), son analogue α -(3,4-dichloro)phényl phosphonate **69** (Fom.ar) et son analogue méthylé Fr-900098 **34** (Fr).^{5,6,7,8,9} D'après les études de leur structure cristallographique respective, tous les trois se chélatent au métal présent dans le site actif à l'aide de leur fonction rétro-hydroxamique. Les deux molécules phosphonates lipophiles **70** (Pyr) et **71** (Pyr.ar), également cocrystallisées avec la DXR, se fixent à la protéine principalement à l'aide de l'interaction de leur phosphonate au niveau du point d'ancrage.¹⁰

Pour le modèle possédant un acide hydroxamique cyclique **72** (Lip.ar), il n’y a actuellement pas de structure cristallographique qui permette de terminer avec certitude son mode de fixation dans le site actif. Les trois inhibiteurs à pince chélatante au métal non cyclique sont de bons inhibiteurs, alors que les trois dernières molécules **70**, **71** et **72** possèdent des valeurs d’inhibitions modérées (Tableau 9). Les études d’ITC donnent accès, en plus des énergies libres de fixation, aux contributions thermodynamiques d’enthalpie et d’entropie à partir de la décomposition du ΔG . Les résultats expérimentaux de la *EcDXR*, reproduits dans le Tableau 9, montrent une différence de comportement significative pour les inhibiteurs chélatant le métal par rapport aux autres qui ne fixent pas métal.

Tableau 9: Valeurs d’inhibitions et paramètres thermodynamiques des inhibiteurs issus des travaux de Cai *et al.* chez *EcDXR*.^{3, 11, 12, 13}

| Molécule | IC ₅₀ (μM) | ΔH (kJ/mol) | K _D (M ⁻¹) | ΔG (kJ/mol) | ΔS (J.K ⁻¹ mol ⁻¹) |
|------------------|-----------------------|-------------|-----------------------------------|-------------|---|
| Fom 33 | 0,030 | 22,7 | 6,65.10 ⁶ | -36,4 | 212,1 |
| Fom.ar 69 | 0,059 | 24,3 | 3,03.10 ⁶ | -34,6 | 215,4 |
| Fr 34 | 0,030 | 23,5 | 7,14.10 ⁶ | -36,6 | 211,1 |
| Pyr 70 | 4,6 | -19,4 | 4,93.10 ⁵ | -30,4 | 39,3 |
| Pyr.ar 71 | 0,84 | -14,2 | 4,83.10 ⁵ | -30,4 | 58,0 |
| Lip.ar 72 | 1,4 | -13,8 | 1,72.10 ⁵ | -28,0 | 50,7 |

Leurs analyses ont montré que, même si les ΔG sont relativement similaires, le détail des énergies thermodynamiques est différent en fonction des organismes. Ils ont trouvé que les enthalpies de fixation des inhibiteurs de type acide rétro-hydroxamique non cyclique, **33**, **69** et **34**, sont endothermiques chez *EcDXR*. A l’inverse, ceux ne possédant pas de fonction chélatante, **70**, **71**, ainsi que le **72**, présentent des enthalpies de fixation exothermiques pour la même souche. D’après ces résultats et malgré la présence d’une fonction acide hydroxamique, Cai *et al.* ont suggéré que le **72** ne se fixerait pas au métal, car les résultats d’ITC sont proches des ligands ayant une fixation métallo indépendante.³ A l’opposé, les essais réalisés sur les *PfDXR* et *MtDXR*, tous les inhibiteurs montrent des enthalpies de fixation exothermiques.

Le phénomène de fixation endothermique de chez *EcDXR* n'est pas observé chez ces deux autres organismes. Pour justifier ces résultats, Cai *et al.* en ont conclu que, comme déplacer les molécules d'eau autour du métal est coûteux en énergie, cela se reflète dans les énergies de fixation endothermiques des molécules s'y chélatant. Ils en ont conclu que *PfDXR* et *MtDXR* doivent être moins hydratées que la *EcDXR* au niveau du site actif, principalement autour du métal.³

Dans ce chapitre, nous avons utilisé des combinaisons de simulations de dynamique moléculaire, suivie d'analyses de type MM/PBSA, afin d'étudier la fixation de ligands aux DXRs de différentes souches pour vérifier les proposition de Cai *et al.*. Dans un premier temps, une comparaison initiale des séquences des souches d'intérêts a été effectuée. Le but étant de repérer les similarités et les caractéristiques propres à chacune. Dans un deuxième temps, la contribution énergétique par résidu pour chacun des inhibiteurs, à l'exception du **72**, et pour chacune des souches, la contribution par résidu apportée pour chacune des souches, *Ec*-, *Mt*- et *PfDXR* a été étudiée afin d'identifier quantitativement les similarités et différences. Pour cela, nous avons suivi le protocole établi dans le chapitre précédent pour les analyses MM/PBSA. Pour chacune des trois souches, cinq complexes ont été construits à partir desquels des simulations de dynamique moléculaire couplées à des analyses MM/PBSA ont été réalisées. Pour finir, nous avons analysé la population et la position des molécules d'eau à proximité des inhibiteurs en fin de trajectoire pour chacun des complexes.

Nous avons choisi de ne pas traiter le composé acide hydroxamique cyclique **72** car nous ne connaissons ni son état de protonation, ni son mode de fixation dans le site actif de la DXR. En effet, un acide hydroxamique est composé d'une fonction stabilisée par mésomérie. La forme mésomère **73** conduit à l'aromaticité du cycle, qui serait alors plus stable que la forme initiale **72** (Schéma 18). De plus un échange de proton pourrait se produire menant à **74**. A proximité du métal et dans les conditions du site actif, il est également probable que l'hydroxyle de **73** ou **74** se retrouve sous forme alcoolate **75**.

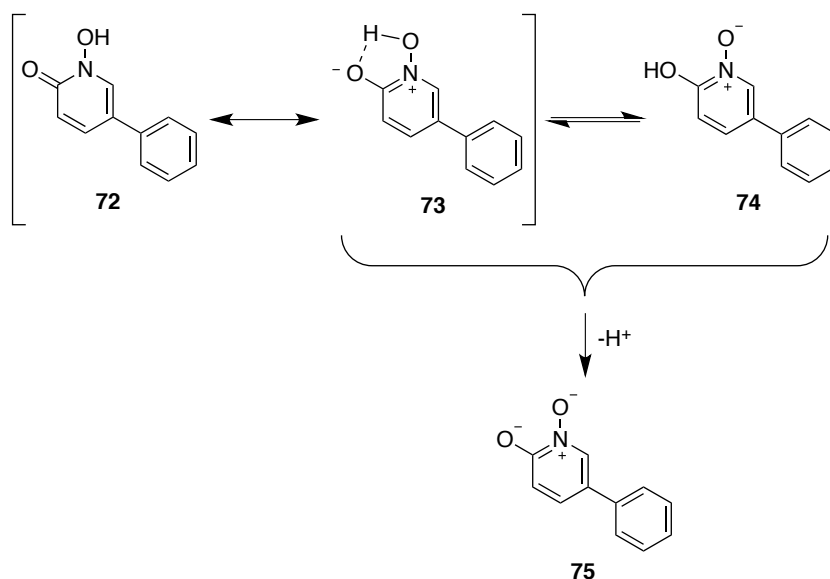


Schéma 18: Mésonérie du composé 72 et les produits potentiels qui pourraient en découler.

Deng L. *et al* suggèrent que, de la même manière que la plupart des inhibiteurs possédant une fonction acide hydroxamique, le **72** se fixerait à l'aide de cette fonction au métal.¹³ Comme étude préliminaire concernant cette molécule, les différentes formes proposées ont été dockées dans le site catalytique de la DXR d'*Escherichia coli* en présence du Mg^{2+} et du cofacteur. Les conformations de plus basses énergies résultantes montrent que l'hydroxamate se placerait privilégié au niveau du point d'ancrage plutôt qu'à proximité du métal. Ces résultats iraient dans le sens de ceux obtenus par Cai *et al.*, indiquant que la fixation chez *EcDXR* de ce ligand est exothermique et non endothermique comme pour les inhibiteurs se fixant au métal.³ En l'absence de structure expérimentale du Lip.ar **72** avec la DXR, nous avons préféré l'écartier.

B. Matériel et méthodes

B.1. Alignement et comparaison de séquences

Nous avons utilisé le programme ClustalO pour effectuer un alignement multiple de DXRs à partir des séquences des *Ec*-, *Mt*- et *Pf*DXR issues de la base de données UniProt. Cette dernière est une base de données en accès libre de séquences, d'informations fonctionnelles de protéines et, est mise à jour par un consortium international impliquant des instituts d'Europe et des Etats Unis d'Amérique.¹⁴ L'alignement multiple de séquences est un alignement de plus de deux séquences biologiques, protéiques ou nucléiques, de longueurs similaires. Les résultats sortants peuvent permettre d'identifier des relations entre les différentes séquences étudiées. Le programme ClustalO fait partie de la famille des programmes d'alignements de séquences Clustal et il obtient de bonnes performances en utilisant des multiprocesseurs afin de traiter un large nombre de séquences.¹⁵ Nous avons utilisé l'option par défaut présenté sur le site web d'EMBL-EBI.¹⁶

B.2. Construction des complexes de l'étude

Lorsqu'une structure cocrystallisée en présence de la DXR est disponible pour l'un des ligands d'intérêts, sa conformation est utilisée pour construire les complexes manquants. Ainsi les structures de *Mt*DXR cocrystallisées avec l'inhibiteur Fr-900098 **34** (PDBid 4A03) et aryle phosphonate Fom.ar **69** (PDBid 2Y1D) ont servi de base à la construction des complexes *Ec*DXR et *Pf*DXR.^{8,9} De même pour les deux inhibiteurs lipophiles, ne possédant pas de pince chélatante, Pyr **70** et Pyr.ar **71**, ont été cocrystallisés avec *Ec*DXR dont les structures respectives sont 3ANL et 3ANM.¹⁰ Leurs structures ont permis de construire les complexes *Mt*DXR et *Pf*DXR. La fosmidomycine a été cocrystallisée chez chacune des souches (1Q0L pour *Ec*DXR, 4AIC pour *Mt*DXR et 3AU9 pour *Pf*DXR).^{5,6,10} Nous avons donc conservé les conformations correspondantes pour les employer avec leurs souches respectives.

Les structures 1Q0Q, 4AIC et 3AU9 ont été utilisées comme structures initiales pour la construction de tous les complexes. Pour l'élaboration des complexes *E. coli*, la structure 1Q0Q, cocrystallisée en présence du DXP et du cofacteur, a été préférée à la 1Q0L, cocrystallisée en présence de la fosmidomycine **33** et du cofacteur.⁵ En effet, l'orientation des chaînes latérales des résidus devant chélater le métal (*i.e.* Asp150, Glu152 et Glu231) de la structure 1Q0Q possède une orientation plus adaptée à l'ajout du métal.

B.3. Simulations de dynamique moléculaire et d'analyses MM/PBSA

Nous avons travaillé à partir des structures cristallographiques de PDBid 1Q0Q issue de *E. coli*, 4AIC issue de *M. tuberculosis* et de 3AU9 issue de *P. falciparum*.^{5,6,7} Cinq complexes par souche, comprenant un ligand, le métal Mg²⁺ et le cofacteur ont été élaborés. Le métal y est ajouté par superposition de tous les complexes de la structure de 4AIC, cocrystallisée en présence de la fosmidomycine, du NADPH et de Mn²⁺. Ce dernier est ajouté aux complexes et convertit en Mg²⁺. Les états de protonation des résidus titrables et l'optimisation des géométries impliquant les asparagines, glutamines et d'histidines ont été traités à l'aide du serveur web MolProbity4.2.¹⁷ Les paramètres de chacun des ligands ont été générés à l'aide de ParamChem (CHARMM General Force Field 36, CGENFF36) puis optimisés à l'aide de l'outil Force Field ToolKit, implémenté dans VMD.^{18,19} Les minimisations des énergies des différents complexes ont été réalisées dans le vide. Les interactions entre atomes non liés ont été calculées avec une valeur seuil de 15 Å par le logiciel CHARMM.²⁰ Une première minimisation de 1000 pas a été réalisée à l'aide de la méthode de premier ordre *Steepest Descent*, suivie de l'*Adopted-Basis Newton-Raphson* sur 3000 pas.²¹ Les complexes ont été insérés dans une boîte d'eau cubique de 75 Å de côté et leurs charges ont été neutralisées par l'ajout de contre-ions sodium et chlorure. Le champ de force de CHARMM *all-atom* (*i.e.* version CHARMM36) est appliqué à la protéine, aux ions et au cofacteur, et le modèle TIP3P est assigné aux molécules d'eau.

Chaque système est répliqué à l'aide de conditions périodiques (*periodic boundary conditions*) et les interactions des atomes non liés sont calculés à courte portée avec une valeur seuil de 12 Å, et à longue portée via l'algorithme de *Particle Mesh Ewald* (PME). Le programme NAMD2.9 est utilisé pour effectuer une série de minimisation et de chauffage pour atteindre progressivement la température de 300 K.^{22,23} Une équilibration de 85 ps dans l'ensemble micro-canonique NVE est réalisée puis une trajectoire de 27,5 ns est produite. Après vérification de la stabilité (*i.e.* température et énergie totale du système stables, ligand dans le site actif, paramètres corrects), les 22,5 dernières nanosecondes ont été utilisées pour les analyses d'énergies libres de type MM/PBSA de chaque système. Une description plus détaillée des méthodes utilisées est disponible dans le chapitre « Méthodes standards ». L'estimation de l'énergie libre et la décomposition par résidu ont été effectuées en suivant le protocole décrit dans la publication de Lafont *et al.* et dans le chapitre « Méthodes standard » et « Etude structurale de la DXR ».²⁴

C. Alignement et comparaison de séquences et de structures cristallographiques

Un alignement multiple a été effectué à partir des séquences des *Ec*-, *Mt*- et *Pf*DXR, issues de la base de données UniProt et à l'aide du programme ClustalO.^{15,16} Les numéros d'accès des séquences utilisés, ainsi que l'indication de la souche et le nombre de résidus par séquences sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10: Références des souches utilisées lors de l'alignement.¹⁴

| Souche | Numéro d'accès | Nombre de résidus |
|---|----------------|-------------------|
| <i>Escherichia coli</i> K12 | P45568 | 398 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv | P9WNS1 | 413 |
| <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 | O96693 | 488 |

A partir de l'alignement de séquence réalisé avec ClustalO, nous avons trouvé un total de 100 acides aminés identiques ont été identifiés et 117 similaires positifs, ce qui représente une identité commune de 19,6% entre les trois souches (Figure 34).

```

Pf_DXR MKKYIYIYFFFITITINDLVINNTSKCVSIERRKNNAYINYGIGYNGPDNKITKSRRCR 60
Mt_DXR -----
Ec_DXR -----

Pf_DXR IKLCKKDLIDIGAIKKPINVAIFGSTGSIGTNALNIIRECNKIENVFNKALYVNKSVN- 119
Mt_DXR -----MTNSTDGRADGRLRVVVLGSTGSIGTQALQVIADNPD---RFEVVGLAAGGAHLD 52
Ec_DXR -----MKQLTILGSTGSIGCSTLDVVRHNPE---HFRVVALVAGKNVTR 41
      .:.:***** .:***: . . *.* *.
Pf_DXR ELYEQAREFLPEYLCIHDKSVYEELKELVKNIKDYKPIILCGDEGMKEICSSNSIDKIVI 179
Mt_DXR TLLRQRAQTGVFNIAVADEHAAQR-----VGDIPHGSDAATRLVEQTEADVVLN 102
Ec_DXR M-VEQCLEFSP-RYAVMDDEASAKLLKTMLQQGSRTEVLSGQQAACDMALEDVDQVMA 99
      .* : .: *. . . *.. : *.:
Pf_DXR GIDSFQGLYSTMYAIMNNKIVALLANKESIVSAGFFLKKLLNIHKNAKIIPVDSEHSAIFQ 239
Mt_DXR ALVGALGLRPTLAALKTGARLALANKESLVAGGSLVLRAR---PGQIVPVDSEHSALAQ 159
Ec_DXR AIVGAAGLLPTLAAIRAGKTILLLANKESLVTCGRLFMDAVK-QSKAQLPVDSEHNAIFQ 158
      .: . ** *: *: : *****: * :. . .:*****.*: *
Pf_DXR CLDNNKVLKTKCLQDNFSKINNINKIFLCSSGGPFQNLTMDELKNVTSENALKHPKWMG 299
Mt_DXR CLRGGT-----PDEVAKLVLTASGGPFRGWSAADLEHVTPEQAGAPTWSMG 206
Ec_DXR SLPQPIQHNLGY---ADLEQNGVVSIILTGSGGPFRETPLRDLATMTPDQACRHPNWSMG 215
      .* : : .:* .*****: :* :* ::* *.*.**
Pf_DXR KKITIDSATMMNKGLEVIETHLFLDVVDYNDIEVIVHKECIIHSCVEFIDKSVISQMYPD 359
Mt_DXR PMNTLNSASLVNKGLEVIETHLLFGIPYDRIDVVVHPQSIIHSMVTFIDGSTIAQASPPD 266
Ec_DXR RKISVDSATMMNKGLEVIETHARWLFNASASQMEVLIHPQSVIHSMVRYQDGSVLAQLGEPD 275
      :.:.:***** ***: ** .:***: * :.*** * : * *.:** **
Pf_DXR MQIPILYSLTWPDRIKTNLKPLDLAQVSTLTFHKPSLEHPCIKLAYQAGIKGNFYPTVL 419
Mt_DXR MKLPISALGWPRRVSGAAAACDFHTASSWEFELDTDVFPAVELARQAGVAGGCMTAVY 326
Ec_DXR MRTPIAHTMAWPNRVNSGVKPLDFKLSALTFAAPDYDRYPCLKLAMEAFEQQAATTAL 335
      *: ** :. : * *.. *: *: * . : :.:.:*** :* * :.
Pf_DXR NASNEIANNFLNNKIKYFDISSIISQVLESFNSQKVSENSEDLMKQILQIHSWAKDKAT 479
Mt_DXR NAANEEAAAAFLAGRIGFPAIVGIIADVLHAADQWAVEP---ATVDDVLDAQRWARERAQ 383
Ec_DXR NAANEITVAAFLAQQIRFTDIAALNLSVLEKMD--MREP---QVDDVLSVDANAREVAR 390
      **: ** : ** *: * :. :.*** : . . :.:.:*. . **: *
Pf_DXR DIYNKHSS----- 488
Mt_DXR RAVSGMASVAIASTAKPGAAGRHASTLERS 413
Ec_DXR KEVMRLAS----- 398
      *

```

Figure 34: Alignement multiple des souches *EcDXR*, *MtDXR* et *PfDXR*. Surlignés en jaune, les résidus du site actif pouvant interagir avec un ligand, fondés sur les analyses des structures cristallographique. En vert sont représentés les résidus chélatant le métal, en orange ceux composant le point d'ancrage phosphate et en bleu ceux composant la boucle de confinement du site actif. Les résidus en gras et/ou marqués d'une étoile sont des résidus identiques chez les trois organismes. Les résidus similaires sont divisés en deux classes : les substitutions conservatives (:) et non-conservatives (.)

Les résultats d'alignement indiquent que le site actif est très bien conservé chez les trois organismes : 26 résidus identiques et 8 similaires avec des substitutions conservatives sur un total de 42 résidus (Figure 34, résidus surlignés en jaune). De nombreux résidus sont en communs, incluant les résidus interagissant avec le DXP lors de sa fixation dans le site actif chez *EcDXR*.

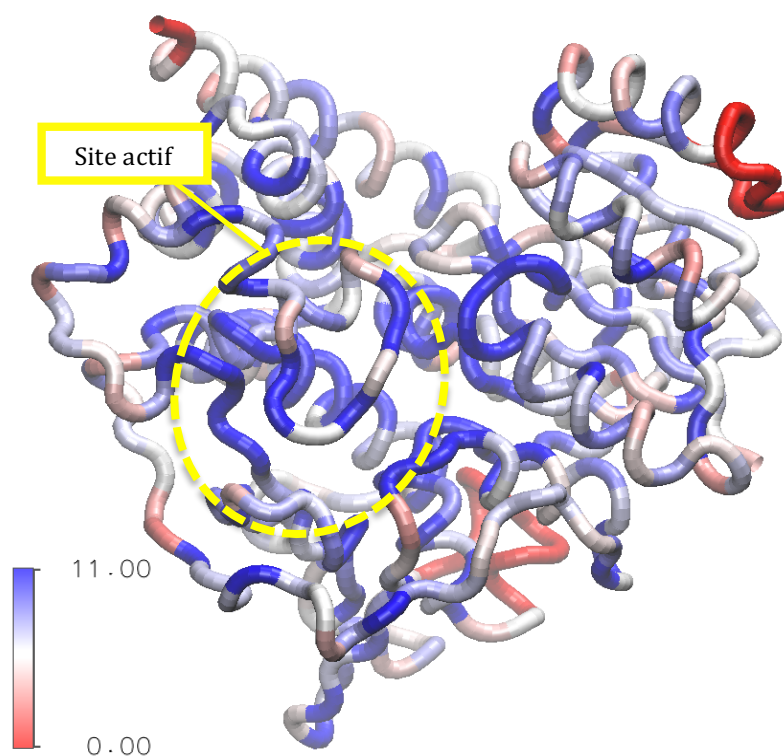


Figure 35: Score de similarité normalisé par Jalview de la DXR après alignement des trois séquences *E. coli*, *M. tuberculosis* et *P. falciparum*.²⁵ La valeur maximale de 11 est attribuée lorsque qu'un résidu est conservé chez les trois souches.

Néanmoins, certaines différences intéressantes sont observées. La boucle, comprenant les résidus 206 à 216 présente des variations de séquence qui sont voisines d'acides aminés cruciaux, comme les His209, Pro210, Trp212 et Met214 (*i.e.* séquence *E. coli*) (Figure 35). En effet, entre l'Ala206 et l'His209 conservées (*i.e.* séquence *E. coli*), nous avons une cystéine et une arginine chez *EcDXR*, une glycine et une alanine chez *MtDXR* et une Leucine et Lysine chez *PfDXR*, respectivement. De plus, entre la Pro210 et le Trp212 et entre le Trp212 et la Met214 (*i.e.* séquence *E. coli*), nous avons respectivement une asparagine et une sérine chez *EcDXR*, une thréonine et une sérine chez *MtDXR* et enfin deux lysines chez *PfDXR*.

Les deux dernières positions que nous venons de voir sont considérées comme mutations non conservatrices et encadrent un résidu important de la boucle, le Trp212 (*i.e.* séquence *E. coli*). En effet, il est décrit dans la littérature comme ayant un rôle crucial dans la fermeture de la boucle sur le site actif.^{5,6,7} Le rôle de cette boucle est de confiner le substrat naturel dans le site actif, le protégeant du milieu extérieur et permettant à la réaction enzymatique de se dérouler de manière optimale. Les différences de séquences de la boucle de confinement, chez les trois organismes, laissent supposer un comportement propre à chaque souche quant à sa fermeture et ouverture. De plus, quand cette boucle de confinement est fermée, son extrémité interagit avec une seconde boucle lui faisant face, comprenant les résidus 250 à 256 (*i.e.* séquence *E. coli*). Ce repliement est observé pour chacune des trois structures cristallographiques, 1Q0Q pour *E. coli* (cocristallisée en présence du DXP et du NADPH), 4AIC pour *M. tuberculosis* (cocristallisée en présence de la fosmidomycine, du Mn²⁺ et du NADPH) et 3AU9 pour *P. falciparum* (cocristallisée en présence de la fosmidomycine, du Mg²⁺ et du NADPH) (Figure 36).^{5,6,7}

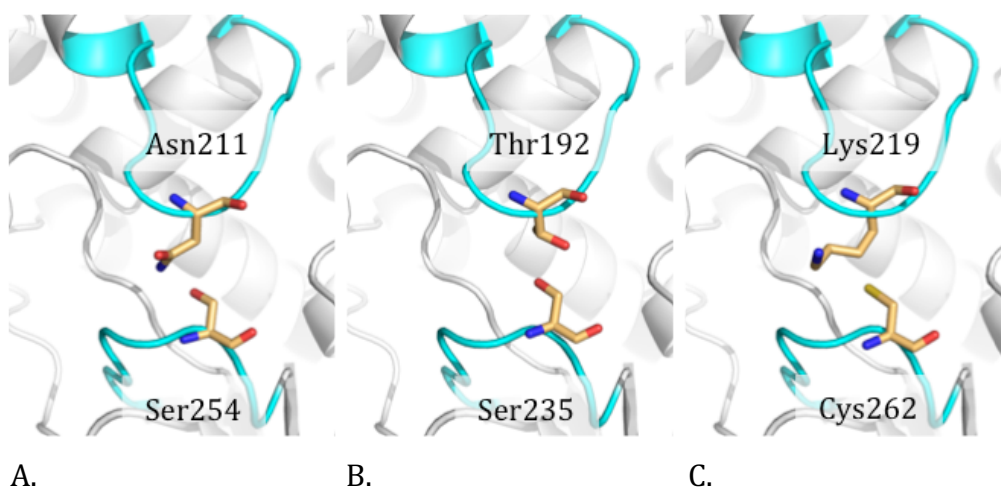


Figure 36: 1Q0Q pour *EcDXR*; B. 4AIC pour *MtDXR*; C. 3AU9 pour *PfDXR*. Les deux boucles d'intérêts sont représentées en cyan, les résidus impliqués sont en bâtonnets orange et les molécules d'eau sont représentées en sphère rouge.

Malgré un repliement similaire, une première analyse des structures cristallographiques montre que la boucle recouvrant le site actif (résidus 206 à 216, chez *E. coli*) semble plus hydratée, en comparaison aux deux autres structures 4AIC et 3AU9 (Figure 36).

Une étude des contacts de la boucle du site actif montre trois régions d'interface avec le reste de la protéine. La première est située sous la zone du point d'ancrage du ligand et implique deux prolines conservées (Pro189 et Pro210 chez *EcDXR*, Pro273 et Pro294 chez *PfDXR*, Pro180 et Pro201 chez *MtDXR*). La deuxième est localisée à proximité du cofacteur et implique le tryptophane Trp212 qui est en contact avec la Pro274 et la Met276 pour *E. coli*, Trp296 avec Pro358 et Met360 chez *P. falciparum*, Trp203 avec Pro265 et Met267 chez *M. tuberculosis*. Ces deux premières régions d'interface sont conservées dans les trois souches. La troisième est variable selon les trois souches étudiées. Chez *E. coli*, l'Asn211 de la boucle de confinement est bien orientée pour interagir avec la Ser254 de la seconde boucle (Figure 36). Chez *M. tuberculosis* (4AIC), à la place de l'Asn211 présente chez *E. coli*, se trouve la Thr192 (numérotation pdb de 4AIC). Cette dernière interagit avec la Ser235 (numérotation pdb de 4AIC) via son groupement hydroxyle. Une distance de 2,8 Angströms sépare les deux oxygènes des chaînes latérales correspondantes, ce qui est favorable pour une liaison hydrogène. La séquence de *P. falciparum* diverge des deux autres organismes, notamment par la substitution de l'Asn211 (*EcDXR*)/Thr192 (*MtDXR*) en Lys219 (numérotation pdb) et la substitution de la Ser254 (*EcDXR*)/Ser235 (*MtDXR*) en Cys262 (numérotation pdb). La Lys219 semble interagir avec cette de la Cys262 via des interactions de type hydrophobe au niveau de sa chaîne latérale. Cette interaction pourrait aider à maintenir les deux boucles proches, même si une position alternative était observée pour le soufre de la cystéine indiquant une certaine flexibilité. Une autre particularité de la séquence de *P. falciparum* est son occurrence riche en Lysine. En effet, trois lysines sont présentes dans la boucle de confinement, et pointent vers le solvant.

Les comparaisons de séquences et les analyses structurales montrent les plus grandes différences au niveau des domaines entourant le site actif (Figure 35). Des différences ont été observées au niveau de la zone du site actif, particulièrement autour de la boucle servant à confiner le ligand. Deux points d'ancrages sont conservés chez toutes les souches, tandis que le résidu central de la boucle du site actif (Asn211 chez *EcDXR*, Thr192, chez *MtDXR* et Lys219 chez *PfDXR*), entre la proline et le tryptophane conservés, est variable (Figure 35 et Figure 36). Ce dernier pourrait induire une différence de confinement du site actif.

La bonne interaction entre les deux boucles considérées chez *E. coli* laisse supposer que la conformation fermée peut être plus facilement maintenue. Chez *M. tuberculosis*, même si l'orientation de la chaîne latérale de la thréonine n'est pas optimale, une potentielle liaison hydrogène pourrait être envisagée avec une sérine conservée chez *E. coli*. *P. falciparum* diffère avec une interaction Lysine-Cystéine qui semble plus faible. A partir d'analyses visuelles, les deux dernières souches paraissent également moins hydratées que leur analogue *E. coli*. Une analyse plus poussée de la population des molécules d'eau pourrait être réalisée à l'aide du programme Chimera ou du module Liaison-H («*H-bond*») du programme CHARMM.²⁶

D. Analyses des contributions d'énergie libre totale par résidu

Les analyses préliminaires, réalisées au niveau des séquences et structures cristallographiques des DXRs, ont montré des différences entre les trois organismes qui pourraient être impliquées dans la différence d'inhibition observée à l'encontre d'une même molécule. Nous allons maintenant passer à l'analyse des contributions des énergies libres des acides aminés pour chacun des cinq inhibiteurs (*i.e.* Fom **33**, Fom .ar **69**, Fr **34**, Pyr **70** et Pyr.ar **71**). Pour chacun des ligands sélectionnés par Cai *et al.* un complexe a été construit pour chacune des souches, suivant le protocole présenté dans la partie « Matériel et méthodes » de ce chapitre, décrite précédemment.³ Les systèmes résultant sont tous composés d'un ligand, du métal Mg²⁺ et du cofacteur NADPH. Les simulations de dynamique moléculaire et la procédure d'analyses MM/PBSA ont été réalisées suivant le protocole décrit précédemment.

Les analyses des RMSD (*Root Mean Square Deviation*) indiquent que pour chacune des souches les différents systèmes sont stables (Figure 37). Nous n’observons pas de changement structural majeur. Les analyses de fluctuations (RMSF, *Root Mean Square Fluctuation*) ne montrent pas de fluctuation majeure au niveau du site actif, excepté au niveau de la boucle de confinement (206 à 215 chez *EcDXR*, 187 à 196 chez *MtDXR* et 214 à 219 *PfDXR* ; numérotation pdb).

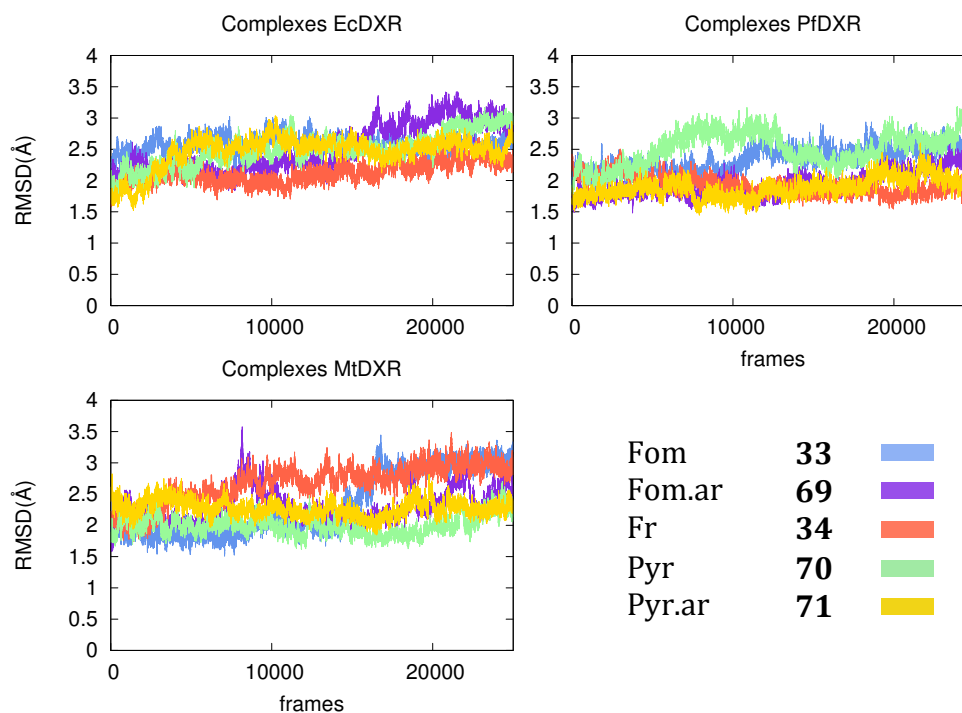


Figure 37: RMSD des trajectoires de chaque complexes protéine-ligand par souche.

D.1. Résultats et discussion des analyses MM/PBSA

Dans cette partie nous allons présenter les résultats de la procédure MM/PBSA qui quantifie les contributions d’énergie libre par résidu impliqué à la fixation d’un ligand. Pour simplifier les analyses, uniquement les résidus localisés au niveau du site actif seront discutés et la numérotation PDB des structures sera utilisée. Ainsi 52 acides aminés pour chaque structure ont été étudiés.

Dans un premier temps, les inhibiteurs rétro-hydroxamiques sont discutés (Fom **33**, Fom.ar **69**, Fr **34**), puis dans un deuxième temps les inhibiteurs phosphonates lipophiles (Pyr **70**, Pyr.ar **71**). Notons que les complexes « 1Q0Q » font références à la souche *E. coli*, les « 4AIC » à *M. tuberculosis* et les « 3AU9 » à *P. falciparum*. Les détails des énergies par complexe sont présentés dans les Annexes, p. 407 à 411.

D.1.1. Ligands se chélatant au métal Fom **33**, Fom.ar **69** et Fr **34**

Pour chacun des complexes formés à partir de la DXR et de ligands connus pour se chélater au métal Mg^{2+} , un certain nombre d'acides aminés ont été identifiés par les calculs comme apportant des contributions importantes à la fixation des ligands, excepté pour 3AU9/Fom.ar **69**. Elles incluent la Ser186, le Trp212, la Met214 et la Lys228 (*i.e.* séquence *E. coli*) comme participants favorables, excepté pour le complexe 3AU9/Fom.ar **69** où cette dernière, la Lys228, possède une contribution positive et défavorable. La Ser186 est localisée au niveau du point d'ancrage phosphonate et le Trp212 et la Met214 composent la boucle de confinement qui ferme le site actif. Derrière ces résultats, qui se retrouvent dans la plupart des complexes contenant un ligand possédant une fonction chélatant le métal, d'autres résidus, de la poche du site actif, montrent fréquemment des contributions intéressantes. Nous retrouvons notamment la Ser151 et la Gly185. La Ser151 est à proximité de la pince rétro-hydroxamique et interagit avec l'oxygène du carbonyle. La Gly185 est localisée au niveau du point d'ancrage, interagissant avec le phosphonate.

D.1.2. Ligands phosphonates lipophiles Pyr **70** et Pyr.ar **71**

Le même protocole a été utilisé pour étudier les ligands phosphonates lipophiles, Pyr **70** et Pyr.ar **71**. Pour chacun des complexes et des ligands, les interactions d'énergies totales sont faiblement favorables. Les résidus du point d'ancrage phosphonate montrent des contributions légèrement efficaces, majoritairement comprises entre 0 et -2 kcal/mol.

Chez toutes les souches, la lysine (*i.e.* Lys228 chez *E. coli*, Lys209 chez *M. tuberculosis* et Lys236 chez *P. falciparum*) est hautement défavorable. Pour tous les complexes, la boucle de confinement s'ouvre et les sites actifs sont très hydratés. Cependant les complexes issus de *P. falciparum* possèdent une boucle de confinement moins ouverte. La boucle lui faisant face reste proche du fait d'interactions hydrophobes entre la Lys219, la Cys262 et les aromatiques des inhibiteurs. Notons que l'interaction favorable de la Met214 pour le complexe *EcDXR*/Pyr **70** est dû à une interaction avec le cofacteur et non avec le ligand. Les deux boucles d'intérêts, la boucle de confinement et celle lui faisant face, se sont éloignées l'une de l'autre au cours de la simulation.

D.2. Résumé des analyses MM/PBSA

Les inhibiteurs pouvant se chélater au métal via la fonction rétro-hydroxamique, à savoir Fom **33**, Fom.ar **69** et Fr **34**, possèdent de meilleures contributions de la part des résidus du site actif. Ils sont maintenus par deux points, l'interaction avec le métal et celles du point d'ancrage. Ainsi, la boucle de protection peut plus facilement interagir avec le ligand occupant le site actif, ce qui l'aide à l'y fixer. Ces premiers résultats vont dans le sens que ces trois inhibiteurs se fixent favorablement à la DXR, et induisent une inhibition qui est confirmée par les résultats de K_i . De plus, les interactions favorables sont du même ordre de grandeur dans toutes les souches et certains résidus favorables sont conservés. Ces derniers résultats pourraient être corrélés aux constantes d'inhibition qui sont proches dans les trois souches pour un même inhibiteur. Enfin, l'ouverture du site actif induit une exposition aux molécules d'eau qui envahissent progressivement ce dernier, perturbant les interactions directes entre le ligand et les résidus. Cependant, certaines molécules d'eau sont pontantes et participent également à la fixation des inhibiteurs à la protéine. Les inhibiteurs phosphonates lipophiles, Pyr **70** et Pyr.ar **71**, interagissent moins efficacement avec le site actif en regard du nombre de résidus favorables énergétiquement. L'absence de la fonction chélatante engendre une liberté de mouvement pour le ligand, accélérant l'ouverture de la boucle de confinement. Cela provoque une accessibilité rapide et importante du site actif aux molécules d'eau.

E. Hydratation des complexes

Dans ce travail, nous avons essayé de trouver un lien entre les différentes souches de la DXR et les dessous thermodynamiques de la fixation de ligand à la DXR. Les analyses résumées précédemment, qui se concentrent pour la plupart sur les acides aminés participant à la fixation des ligands et à leurs contributions à l'énergie libre de fixation, n'ont pas été suffisantes pour comprendre les résultats expérimentaux. Ce qui nous a frappé dans les résultats issus des études d'ITC, concerne les différentes contributions entropiques des ligands en fonction des souches étudiées.³ Pour savoir si nous pouvons observer une différence d'hydratation des sites actifs des différents organismes, nous avons étudié les structures extraites des simulations et utilisées pour les analyses MM/PBSA précédentes. Afin de quantifier cette hydratation, nous nous sommes concentrés sur le cluster le plus proche de la fin de la trajectoire, qui est une structure représentative de la fin de chaque simulation. Pour visualiser l'hydratation pour chacune des structures extraites du cluster final de chaque simulation, les molécules d'eau situées à 7 Å du ligand présent dans le site actif sont sélectionnées. Les molécules d'eau en contact direct avec l'inhibiteur et la protéine ont été sélectionnées, à l'aide du programme VLDP, et visualisées.²⁷ Pour faciliter la visualisation des molécules d'eau, le diamètre des sphères des oxygènes est diminué à 1 Å et celui des hydrogènes à 0,5 Å. Les inhibiteurs, certains résidus et le cofacteur sont représentés en bâtonnets cyans pour les inhibiteurs et blancs pour le reste. La protéine est représentée sous forme ruban et le métal en sphère rose (Figure 38).

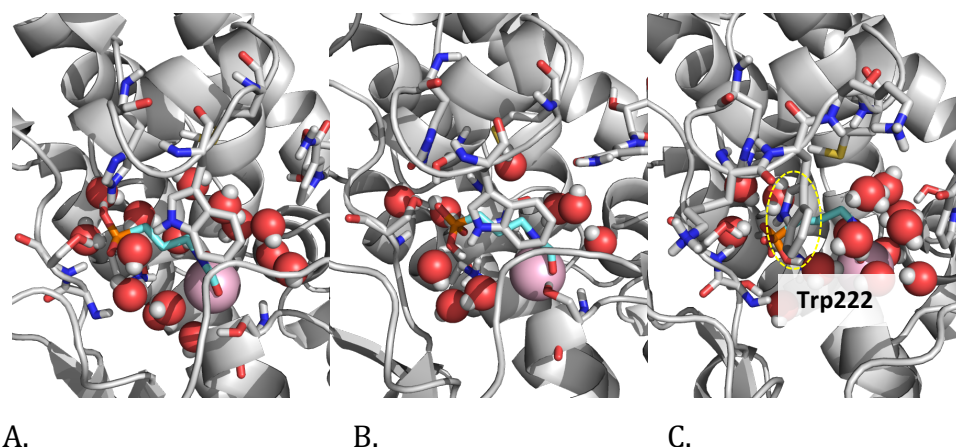


Figure 38: Complexes *Ec*- (A), *Mt*-(B) et *Pf*DXR/Fom 33 (C) en présence des molécules d'eau en contact avec l'inhibiteur représentées en sphères.

En effet, les boucles restent suffisamment proches pour limiter l'entrée des molécules d'eau dans le site actif. A partir des structures extraites de la manière définie précédemment, les complexes *Ec*- et *Pf*DXR/Fom 33 possèdent le même nombre de molécules d'eau. Cependant, leur répartition autour de l'inhibiteur est bien différente (Figure 38). Chez *E. coli*, elles se trouvent autour du ligand alors que chez *P. falciparum*, nous les retrouvons principalement à proximité du métal, vers l'entrée du site actif. Chez ce dernier, l'indole du Trp222 pointe vers le phosphonate. Cette interaction conduit à une orientation quasi perpendiculaire du résidu par rapport au squelette de la fosmidomycine 33, dévoilant en partie le métal et la fonction chélatante.

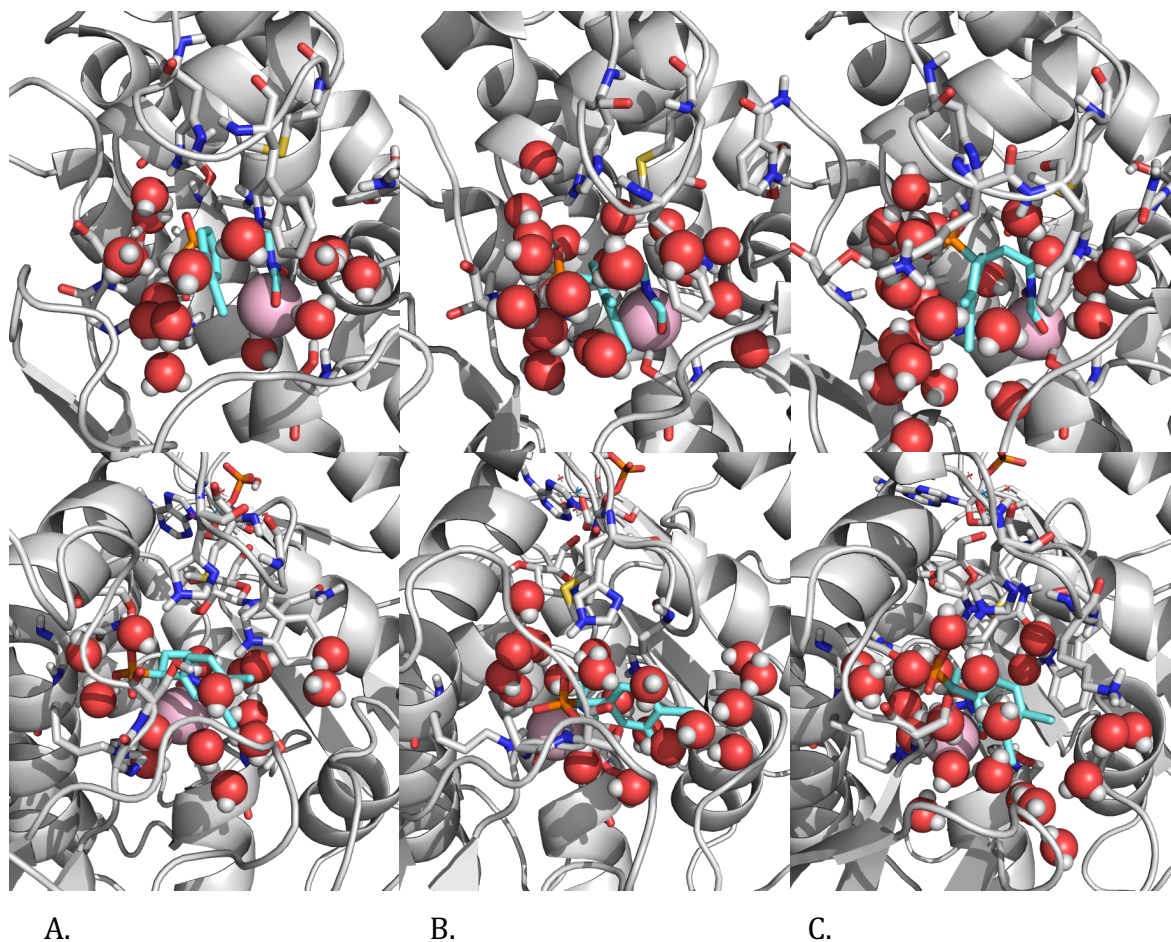


Figure 39: Complexes *Ec*- (A), *Mt*-(B) et *PfDXR*/Fom.ar 69 (C) en présence des molécules d'eau en contact avec l'inhibiteur représentées en sphères.

La population de molécules d'eau en contact avec le α -(3,4-dichloro)phényl phosphonate **69** est plus importante pour les complexes *Mt*- et *PfDXR* par rapport à celui d'*E. coli* (*i.e.* 21, 23 et 15 respectivement) (Figure 39). Les Tryptophanes (*i.e.* Trp193 chez *MtDXR* et Trp222 chez *PfDXR*), localisés sur la boucle de confinement, participent à une interaction de type van der Waals avec le groupement (3,4-dichloro)phényl du ligand, impliquant une position quasi parallèle à ce dernier. Le groupement pointe alors vers l'extérieur du site actif, soulevant la boucle et interagissant avec le solvant.

L'inhibiteur Fr-900098 **34** conduit à différentes positions d'hydratation pour les trois souches (Figure 40). Comme dans le cas de la fosmidomycine **33**, le complexe *Ec*DXR/Fr **34** est majoritairement hydraté au niveau du point d'ancrage du phosphonate. L'entrée du site actif est bloquée par le cofacteur, et le Trp212 possède une position parallèle au squelette du composé Fr-900098 **34**, empêchant les molécules d'eau d'accéder au ligand de ce côté. Pour les complexes *Mt*- et *Pf*DXR, le cofacteur s'est décalé en direction opposée à celle de Fr-900098 **34**, permettant au solvant d'accéder au ligand. Cette approche est accentuée pour *Pf*DXR car l'indole du Trp222 cherche une liaison hydrogène avec le phosphonate. Il se retrouve alors quasi perpendiculaire au squelette de Fr-900098 **34**, dévoilant la pince chélatante de ce dernier et le métal.

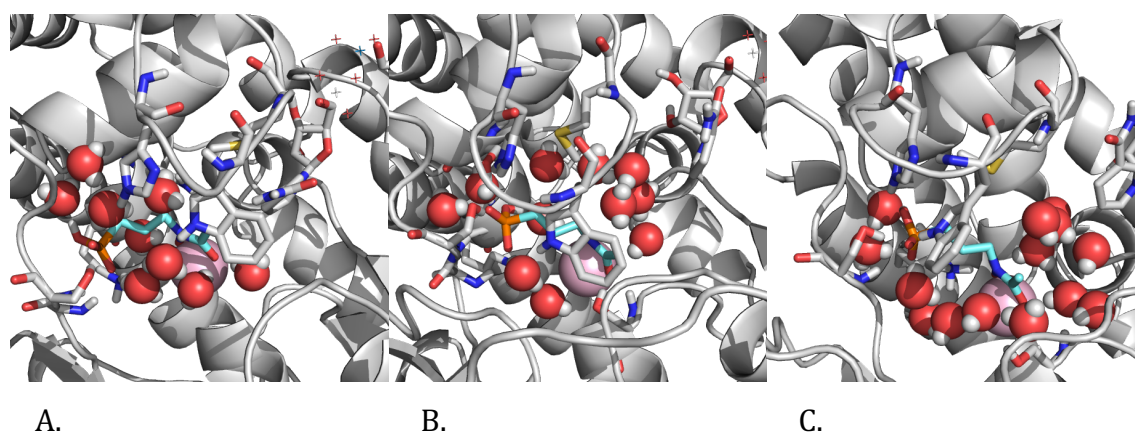


Figure 40: Complexes *Ec*- (A), *Mt*-(B) et *Pf*DXR/Fr **34** (C) en présence des molécules d'eau en contact avec l'inhibiteur représentées en sphères.

A partir des analyses structurales effectuées sur les structures représentatives des fins de trajectoires, nous avons constaté que les différentes souches présentent des placements de molécules d'eau différents dans le site actif. Cette analyse visuelle suggère que la structure du ligand ainsi que la séquence du site actif, incluant les alentours, de la protéine pourraient influencer la structure locale du solvant. La solvation et la désolvation ont des impacts non-négligeable sur la fixation d'un ligand.²

Les résultats de l'étude d'ITC de Cai *et al.* montrent qu'il a une importante contribution entropique à l'énergie libre de fixation pour les ligands chélatant le métal en présence de l'*EcDXR*.³ Ils ont suggéré que cela pourrait être dû à une hydratation plus importante du site actif chez *EcDXR*, par rapport aux autres souches *Mt-* et *PfDXR* (*i.e.* un nombre plus important de molécules d'eau sont déplacés lors de la fixation des ligands chélatant le métal). Il est conventionnellement accepté que la contribution entropique de fixation résultant du déplacement du solvant peut être attribuée à la désolvation des surfaces non-polaires.²⁸ Les analyses MM/PBSA quantifient la contribution d'énergie libre de fixation due à la désolvation non-polaire, et c'est sur cet aspect que nous nous sommes concentrés. Les acides aminés du site actif qui sont au contact du ligand et qui contribuent à sa fixation pour chacune des trois souches ont été identifiés. Comme indiqué dans l'analyse de l'alignement multiple, un certain nombre de résidus sont identiques aux trois souches, certains sont similaires et d'autres entre les deux (Figure 34). Focalisés sur ces différents résidus et des résultats MM/PBSA pour chaque combinaison souche/ligand, nous pouvons estimer la contribution d'énergie libre due à la désolvation non-polaire (ΔG^{np}) de l'équation 56 du chapitre « IV. Méthodes computationnelles standard », p. 114. A partir de cette valeur globale, nous pouvons quantifier la surface non-polaire désolvatée par la fixation d'un ligand. Pour cela, nous avons fait la moyenne de la contribution ΔG^{np} de chaque résidu issu de la décomposition d'énergie libre calculée, que nous avons sommé. Par la suite, la contribution ΔG^{np} est convertie en surface accessible au solvant (SASA) en utilisant la relation de l'équation 59, qui dit que :²⁴

$$G_{protéine}^{np} = 0,0055 * SASA \quad 59$$

Nous obtenons ainsi une surface non-polaire de désolvation liée à la présence du ligand pour chacun des organismes à partir des analyses MM/PBSA. Pour effectuer de premières analyses, ce protocole a été appliqué aux résidus non-similaires des 53 acides aminés étudiés. Les résultats correspondants sont présentés dans le Tableau 11 suivant.

Tableau 11: Contribution non-polaire ΔG^{np} en kcal/mol et les ratios de SASA relative aux valeurs calculées pour les complexes 1Q0Q.

| Molécule | $G_{protéine}^{np}$ du site actif (kcal/mol) | | | 1Q0Q-ratio | Rapport SASA | |
|------------------|--|---------|---------|------------|--------------|-----------|
| | 1Q0Q | 3AU9 | 4AIC | | 3AU9/1Q0Q | 4AIC/1Q0Q |
| Fom 33 | -0,7336 | -0,4979 | -0,3495 | 1 | 0,68 | 0,48 |
| Fom.ar 69 | -0,9519 | -0,877 | -0,7987 | 1 | 0,92 | 0,84 |
| Fr 34 | -0,7052 | -0,6576 | -0,5609 | 1 | 0,93 | 0,80 |
| Pyr 70 | -1,0711 | -0,7856 | -0,8285 | 1 | 0,73 | 0,96 |
| Pyr.ar 71 | -0,7423 | -0,9322 | -0,7704 | 1 | 1,26 | 0,77 |

Nous observons que, dans le cas des ligands chélateurs (*i.e.* fom **33**, fom.ar **69** et fr **34**), les valeurs SASA des complexes *PfDXR* (3AU9) et *MtDXR* (4AIC) sont toutes moins importantes que celle de *EcDXR* (1Q0Q), pour certain cas jusqu'à 52% de moins. Ces observations suggèrent que la fixation des ligands chélateurs à la *EcDXR* engendre une plus importante contribution de désolvation non-polaire, impliquant une contribution entropique plus importante, ce qui est cohérent avec les résultats expérimentaux. Le complexe *EcDXR*/Pyr **70** présente la contribution de désolvation non-polaire la plus importante pour *EcDXR* par rapport à tous les autres complexes. L'analyse visuelle de la trajectoire *EcDXR*/Pyr **70** indique que le phosphonate du ligand a quitté le site du point d'ancrage, provoquant un déplacement important de la molécule vers l'entrée du site actif et une ouverture de la boucle de confinement. Ces modifications importantes de positionnement du ligand et de conformation, notamment pour *EcDXR*/Pyr **70**, peuvent biaiser les résultats. Ce déplacement est moins important pour la molécule analogue Pyr.ar **71**. Il serait préférable de réitérer les calculs MM/PBSA sur une trajectoire plus courte, afin de pouvoir conserver une conformation du site actif fermée. Ces résultats présentent des cohérences avec les observations issues des études d'ITC, cependant plus de calculs et d'analyses sont encore nécessaires.

F. Conclusion

Les analyses réalisées dans ce chapitre concernent le lien entre la thermodynamique issue de la fixation d'un ligand par rapport aux séquences de DXRs de différentes souches. Les données des études d'ITC suggèrent que la principale différence entre ces souches provient des contributions d'enthalpie libre (ΔH) et d'entropie (ΔS), et ce malgré des valeurs d'énergie libre globale (ΔG) similaires.

Dans ce projet, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire de cinq composés sur trois différentes souches de la DXR. Ces simulations ont été complétées par des analyses de type MM/PBSA, permettant d'obtenir la décomposition de l'énergie libre par résidu, conduisant à la contribution énergétique individuelle par rapport à un ligand. Les analyses MM/PBSA indiquent que la présence de la pince en plus d'une fonction phosphonate permet d'obtenir de meilleures interactions avec les résidus du site actif de la protéine. En effet, elle permet de maintenir le ligand dans une conformation apte à interagir avec les résidus présents à la surface de la DXR. Ne possédant pas de fonction pour se fixer au métal, les inhibiteurs Pyr **70** et Pyr.ar **71** ne se fixent efficacement qu'au niveau de la zone du point d'ancrage. Cependant, l'analyse des énergies totales n'a pas permis d'extraire d'informations pour expliquer les observations expérimentales, notamment la grande contribution d'entropie pour les ligands chélatant le métal en complexe avec la souche *E. coli*. Nous nous sommes alors tournés vers un examen des molécules d'eau à proximité du site actif, principalement par analyse visuelle.

Des contacts impliquant les molécules d'eau avec les différents complexes nous ont permis d'évaluer la distribution de ces molécules d'eau autour du site actif. Ces informations nous ont amenés à nous intéresser à l'énergie de désolvatation de chacun des sites actifs des trois souches, et en particulier aux surfaces de désolvatation non-polaires.

Nous avons pu déterminer les résidus participants aux interactions entre les différentes souches et inhibiteurs. A partir des acides aminés non conservés, nous sommes intéressés aux $G_{protéine}^{np}$, qui détermine la désolvatation non-polaire à l'énergie de fixation. Nous avons pu calculer la surface accessible au solvant pour chaque combinaison de complexe ligand-protéine. Celles-ci sont globalement plus importantes chez *E. coli* que chez *M. tuberculosis* et *P. falciparum*, indiquant que pour *E. coli*, le site actif contient plus de surfaces non-polaires qui ont été déshydratées par la fixation de ligand. Ce qui pourrait expliquer une contribution entropique plus élevée lors de la fixation de ligand au site actif de l'*Ec*DXR. Cependant, des études complémentaires plus détaillées sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

Il reste encore beaucoup à faire pour bien comprendre les dessous de la thermodynamique liée à la fixation d'un ligand chez la DXR. Un facteur que nous avons négligé dans ces calculs concerne les larges différences conformationnelles entre la forme possédant un ligand lié au site actif avec celle non liée, principalement dues aux mouvements d'ouverture et de fermeture de la boucle de confinement du site actif. En effet, nous sommes partis de structure de protéine possédant la boucle fermée, c'est à dire d'un système d'interactions idéales. Il pourrait être intéressant de prolonger l'ensemble des trajectoires afin d'observer le comportement des systèmes ainsi que la conservation des interactions au cours du temps. A partir de ces résultats, nous ne pouvons expliquer la différence d'inhibition des ligands en fonction des souches employées. La détermination de l'état d'hydratation des *Ec*-, *Mt*- ou *Pf*DXR ne peut être faite à partir de ces analyses. Pour cela, il faudrait inclure des études sur des structures apo à partir de conformations fermées et ouvertes de la boucle de confinement.

¹ a) Brown, A.C., Parish, T., « Dxr is essential in Mycobacterium tuberculosis and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake », *BMC Microbiology*, 2008, 8, 87-98 ; b) Reichenberg, a, Wiesner, J., Weidemeyer, C., Dreiseidler, E., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Jomaa, H., « Diaryl ester prodrugs of FR900098 with improved in vivo antimalarial activity », *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2001, 11, 833-5 ; c) Ortmann, R., Wiesner, J., Reichenberg, A., Henschker, D., Beck, E., Jomaa, H., Schlitzer, M., « Alkoxy-carbonyloxyethyl ester prodrugs of FR900098 with improved in vivo antimalarial activity », *Archiv Der Pharmazie*, 2005, 338, 305-314; d) Schlüter, K., Walter, R. D., Bergmann, B., Kurz, T., « Arylmethyl substituted derivatives of Fosmidomycin: Synthesis and antimalarial activity », *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 41, 1385-1397; e) Kurz, T., Schlüter, K., Pein, M., Behrendt, C., Bergmann, B., Walter, R. D., « Conformationally restrained aromatic analogues of fosmidomycin and FR900098 », *Archiv Der Pharmazie*, 2007, 340, 339-344; f) Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H., Schlitzer, M., « Double ester prodrugs of FR900098 display enhanced in-vitro antimalarial activity », *Archiv Der Pharmazie*, 2007, 340, 667-669; g) McKenney, E. S., Sargent, M., Khan, H., Uh, E., Jackson, E. R., San Jose, G., van Hoek, M. L., « Lipophilic prodrugs of FR900098 are antimicrobial against Francisella novicida in vivo and in vitro and show GlpT independent efficacy », *PloS One*, 2012, 7, e38167; h) Ponaire, S., Zinglé, C., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., « Growth inhibition of Mycobacterium smegmatis by prodrugs of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase inhibitors, promising anti-mycobacterial agents », *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 51, 277-285; i) Brücher, K., Gräwert, T., Konzuch, S., Held, J., Lienau, C., Behrendt, C., Kurz, T., « Prodrugs of reverse fosmidomycin analogues », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 58, 2025-2035; j) Faísca Phillips, A. M., Nogueira, F., Murtinheira, F., Barros, M. T., « Synthesis and antimalarial evaluation of prodrugs of novel fosmidomycin analogues », *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 25, 2112-2116.

² a) Shimokhina, N., Bronowska, A., Homans, S. W., « Contribution of ligand desolvation to binding thermodynamics in a ligand-protein interaction », *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45, 6374-6376; b) Browning, C., Martin, E., Loch, C., Wurtz, J. M., Moras, D., Stote, R. H., Billas, I. M. L., « Critical role of desolvation in the binding of 20-hydroxyecdysone to the ecdysone receptor », *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 32924-32934; c) Biela, A., Khayat, M., Tan, H., Kong, J., Heine, A., Hangauer, D., Klebe, G., « Impact of ligand and protein desolvation on ligand binding to the S1 pocket of thrombin », *Journal of Molecular Biology*, 2012, 418, 350-366.

³ Cai, G., Deng, L., Fryszczyn, B. G., Brown, N. G., Liu, Z., Jiang, H., Palzkill, T., Song, Y., « Thermodynamic Investigation of Inhibitor Binding to 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase », *Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 3, 496–500.

⁴ Freyer, M.W., Lewis, E.A., « Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions », *Methods in Cell Biology*, 2008, 84,79-113.

⁵ Mac Sweeney, A., Lange, R., Fernandes, R. P. M., Schulz, H., Dale, G. E., Douangamath, A., Oefner, C., «The crystal structure of *E. coli* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation», *Journal of Molecular Biology*, 2005, 345, 115–127.

⁶ Henriksson, L. M., Unge, T., Carlsson, J., Åqvist, J., Mowbray, S. L., Jones, T. A., « Structures of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis », *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 19905–19916.

⁷ Umeda, T., Tanaka, N., Kusakabe, Y., Nakanishi, M., Kitade, Y., Nakamura, K.T., « Molecular basis of fosmidomycin's action on the human malaria parasite Plasmodium falciparum », *Scientific Reports*, 2011, 1-9.

⁸ Bjorkelid, C., Bergfors, T., Unge, T., Mowbray, S.L., Jones, T.A., « Structural studies on Mycobacterium tuberculosis DXR in complex with the antibiotic Fr-900098 », *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2012, 68, 134-143.

⁹ Andaloussi, M., Henriksson, L.M., Wieckowska, A., Lindh, M., Bjorkelid, C., Larsson, A.M.S., Iyer, H., Srinivasa, B.R., Bergfors, T., Unge, T., Mowbray, S.L., Larthed, M., Jones, T.A., Karlen, A., « Design, synthesis and X-Ray crystallographic studies of alpha-aryl substituted fosmidomycin analogues as inhibitors of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 56, 4964-4976.

¹⁰ Deng, L., Endo, K., Kato, M., Cheng, G., Yajima, S., Song, Y., « Structures of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase/Lipophilic Phosphonate Complexes », *Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 2, 165-170.

¹¹ Haemers, T., Wiesner, J., Van Poecke, S., Goeman, J., Henschker, D., Beck, E., Jomaa, H., Van Calenbergh, S., «Synthesis of alpha-substituted fosmidomycin analogues as highly potent *Plasmodium falciparum* growth inhibitors», *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16, 1888-1891.

¹² Yajima, S., Hara, K., Sanders, J. M., Yin, F., Ohsawa, K., Wiesner, J., Jomaa, H., Oldfield, E., «Crystallographic structures of two bisphosphonate: 1-deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase complexes», *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 10824-10825.

¹³ Deng, L., Sundriyal, S., Rubio, V., Shi, Z., Song, Y., «Coordinanation Chemistry Based Approach to Lipophilic Inhibitors of 1-Deoxyxylulose-5-phosphate Reductoisomerase», *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 52, 6539-6542.

¹⁴ Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Apweiler, R., Alpi, E., Zhang, J., «UniProt: A hub for protein information», *Nucleic Acids Research*, 2015, 43, D204-D212.

¹⁵ Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., Thompson, J.D., « Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs », *Nucleic Acids Research*, 2003, 31, 3497-3500.

¹⁶ <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

¹⁷ Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Richardson, D. C., «MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography», *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, 66, 12-21.

¹⁸ a) Vanommeslaeghe, K., MacKerell, A.D., Jr., « Automation of the CHARMM General Force Fiels (CGenFF) I : Bond Perception and Atom Typing », *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 52, 3144-3154 ; b) Vanommeslaeghe, Raman, E.P.K., MacKerell, A.D., Jr, « Automation of the CHARMM General Force Fiels (CGenFF) II : Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges », *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 52, 3155-3168 ; c) <https://cgenff.paramchem.org/>.

¹⁹ Mayne, C.G., Saam, J., Schulte, K., Tajkhorshid, E., Gumbart, J.C, « Rapid Parameterization of Small Molecules Using the Force Field Toolkit », *Journal of Computational Chemistry*, 2013, 34, 2757-2770.

²⁰ Brooks, B. R., Brooks, C. L., III, Mackerell, A.D., Jr., Nilsson, L., PETRELLA, R.J., Roux, B., Wong, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., IM, K., IM, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R.W., Post, C.B., Pu, J. Z., Schaeffer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., Karplus, M., « CHARMM: The Biomolecular Simulation Program », *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30, 1545-1614.

²¹ Steinbach, P. J., Brooks, B. R., « New spherical-cutoff methods for long-range forces in macromolecular simulation », *Journal of Computational Chemistry*, 1994, 15, 667-683.

²² Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., Schulten, K., « Scalable molecular dynamics with NAMD », *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26, 1781-1802.

²³ Chebaro, Y., Amal, I., Rochel, N., Rochette-Egly, C., Stote, R. H., Dejaegere, A., « Phosphorylation of the Retinoic Acid Receptor Alpha Induces a Mechanical Allosteric Regulation and Changes in Internal Dynamics », *PLoS Computational Biology*, 2013, 9, 1-14.

²⁴ Lafont, V., Schaefer, M., Stote, R. H., Atschuh, D., Dejaegere, A., « Protein-Protein Recognition and Interaction Hot Spots in an Antigen-Antibody Complex: Free Energy Decomposition Identifies "Efficient Amino Acids." », *Proteins*, 2007, 70, 311-319.

²⁵ Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., « Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench », *Bioinformatics*, 2009, 25, 1189-1191

²⁶ Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE, « UCSF Chimera-avisualization system for exploratory research and analysis », *Journal of computational Chemistry*, 2004, 25, 1605-1612.

²⁷ a) Esque, J., Oguey, C., de Brevern, A.G., « A novel evaluation of residue and protein volumes by means of Laguerre tessellation », *Journal of Chemical information modeling*, 2010, 51, 947-960 ; b) Esque, J., Léonard, S., de Brevern, A.G., Oguey, C., « VLDP web server : a powerful geometric tool for analysing protein structures in their environment », *Nucleic Acids Research*, 2013, 41, 373-378; c) http://www.dsimb.inserm.fr/dsimb_tools/vldp/.

²⁸ a) Klebe, G., Böhm, H.J., « Energetic and Entropic Factors Determining Binding Affinity in Protein-Ligand Complexes », *Journal of Receptor & Signal Transduction Research*, 1997, 17, 459-473 ; b) Olsson, T.S.G, Williams, M.A., Pitt, W.M., Ladbury, J.E., « The Thermodynamics of Protein-Ligand Interaction and Solvation : Insights for Ligand Design », *Journal of Molecular Biology*, 2008, 384, 1002-1017.

VII. Etude computationnelle d'analogues phosphates d'inhibiteurs de la DXR

Table des matières

| | |
|---|------------|
| A. Introduction | 177 |
| B. Méthodes | 182 |
| B.1. Préparation des complexes pour le Docking | 182 |
| B.1. Préparation des simulations de dynamique moléculaire..... | 184 |
| C. Résultats et discussion | 185 |
| C.1. Etudes de docking | 185 |
| C.2. Comparaison des inhibitions avec les résultats issus du docking | 186 |
| C.3. Etudes MM/PBSA | 188 |
| C.4. Cas particulier du HX-phos 76 - Implication potentielle de la fonction chélatante..... | 191 |
| D. Conclusion | 195 |

A. Introduction

L'augmentation de la résistance des bactéries pathogènes face aux antibiotiques est reconnue depuis plusieurs dizaines d'années.¹ Toujours d'actualité, ce phénomène est devenu un problème mondial majeur, vivement accéléré par une surconsommation d'antibiotiques accrue chez les hommes et les animaux, notamment d'élevage.^{2,3} D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la recrudescence des cas d'infections comme la pneumonie ou la tuberculose est devenue difficile à gérer du fait de la perte d'efficacité des antibiotiques. L'année

2015 a notamment été marquée par une augmentation significative de nombre de cas de tuberculose, engendrant plus d'1,4 millions de décès directement liés à l'infection et 10,4 millions de nouveaux cas, dont 580 000 se sont avérés résistants aux traitements.³

La croissance du nombre de cas de tuberculose résistante engendre également des frais de santé et de perte de productivité conséquents, estimés à 6 milliards d'euros au niveau mondial. La recherche de nouveaux antibiotiques possède une place cruciale parmi la liste des méthodes de préventions (*i.e.* utilisation réfléchie des antibiotiques, vaccinations, éviter les contacts avec les personnes infectées, bonne hygiène).

La DXR, présente chez la plupart des bactéries, dont des pathogènes incluant *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la maladie tuberculose, est une cible de choix pour la recherche de nouveaux antimicrobiens. Dans ce chapitre, nous avons travaillé sur l'étude d'analogues phosphates de l'inhibiteur de la DXR fosmidomycine, en nous aidant d'outils computationnels. Dans cet objectif, nous nous sommes intéressés aux travaux de recherche publiés en 1990 par Katayma *et al.*, qui ont découvert deux antibiotiques nucléiques, la fosfadécine et la fosfocytocine, à partir de cultures bactériennes de *Pseudomonas viridiflava* PK-5 et *Pseudomonas fluorescens* PK-2, respectivement.⁴ L'hydrolyse de ces deux analogues nucléiques conduit à l'obtention de deux phosphates possédant également des propriétés antibiotiques: la fosfomycine, issue de la fosfadécine, et la fosfoxacine **40**, issue de la fosfocytocine. Katayma *et al.* ont montré que ces quatre composés possèdent des activités antibiotiques à l'encontre de bactéries Gram-positives et Gram-négatives, et que les produits issus de l'hydrolyse des nucléotides, la fosfomycine et la fosfoxacine **40**, sont plus actifs que leurs prodrogues analogues de nucléotides. En 2006, Woo *et al.* se sont penchés sur l'architecture de ces produits, et ont publié la synthèse ainsi que les résultats d'inhibitions de la fosfoxacine **40** et de son analogue méthylé **41** à l'encontre de la DXR issue de la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC6803.⁵ Les molécules **40** et **41** présentent les constantes d'inhibitions respectives de 19 et 2 nM, respectivement. Ces résultats d'inhibitions sont meilleurs que ceux de la fosmidomycine **33**, analogue phosphonate de la fosfoxacine **40**, contre la même enzyme et avec un K_i de 58 nM. La seule différence

structurale entre la fosmidomycine **33** et la fosfoxacine **40** se situe au niveau de la fonction qui fixe l'inhibiteur au point d'ancrage du site actif (*i.e.* phosphonate et phosphate respectivement). La présence d'un groupe phosphate identique à celui présent chez le substrat naturel, le DXP **14**, améliore l'inhibition d'un facteur trois vis à vis de la DXR de *Synechocystis* sp. PCC6803.

Cette observation laisse suggérer que la présence d'une fonction phosphate puisse également améliorer l'activité inhibitrice d'inhibiteurs connus de la DXR face à d'autres organismes. Dans ce contexte, nos collaborateurs ont travaillé à améliorer la capacité inhibitrice d'inhibiteurs connus à pince hydroxamique, préalablement synthétisés par Kuntz *et al.*, correspondant à la forme hydroxamique de la fosmidomycine **33** et du FR-900098 **34**. Nos collaborateurs ont remplacé le phosphonate par un phosphate et inversé les positions des groupements fonctionnels dans la pince hydroxamate chélatante, conduisant à l'obtention des composés **76** et **45**, nommés HX-phos et *N*-méthyle HX-phos respectivement (Figure 41).⁶

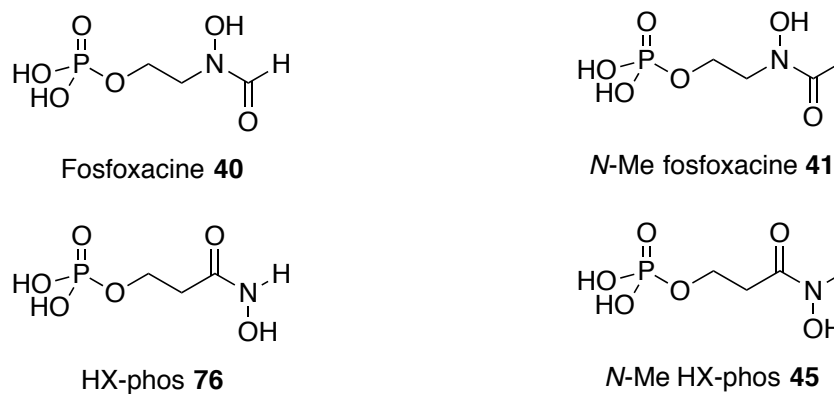


Figure 41: Inhibiteurs phosphates de la DXR, analogues d'inhibiteurs phosphonates connus.

Ces composés, ainsi que ceux à pince rétro-hydroxamique fosfoxacine **40** et son analogue méthylé **41** (*N*-méthyle fosfoxacine), ont été synthétisés et testés au laboratoire sur deux souches non pathogènes : *Escherichia coli* et *Mycobacterium smegmatis*, qui sert de modèle pour les mycobactéries.⁷

Il s'avéra que seuls les composés méthylés, *N*-méthyle fosfoxacine **41** et *N*-méthyl HX-phos **45**, montrèrent des inhibitions efficaces contre ces deux souches. Les résultats de toutes les valeurs d'inhibitions pour les deux souches figurent dans le Tableau 12. Il est intéressant de noter que les valeurs d'inhibitions mesurées pour *MsDXR* sont beaucoup plus élevées que celles mesurées pour d'*EcDXR*.

Tableau 12: IC₅₀ des analogues phosphates de la fosmidomycine contre les DXRs de chez *Escherichia coli* (*EcDXR*) et *Mycobacterium smegmatis* (*MsDXR*).⁷

| Molécule | IC ₅₀ (nM) | |
|---|-----------------------|--------------|
| | <i>EcDXR</i> | <i>MsDXR</i> |
| Fosfoxacin 40 | 342 | 2100 |
| <i>N</i> -méthyle fosfoxacine 41 | 77 | 350 |
| HX-phos 76 | 2600 | 9200 |
| <i>N</i> -méthyle HX-phos 45 | 46 | 290 |

A ce jour, aucune structure cristallographique n'a été réalisée en présence de l'une de ces molécules. Dans l'objectif de comprendre le mode de fixation de ces dernières dans le site actif de la DXR, ainsi que les interactions impliquées, nous avons envisagé des études de docking et des simulations de dynamique moléculaire, en nous fondant sur deux souches : *Escherichia coli* et *Mycobacterium tuberculosis*.

Les DXRs de *Mycobacterium tuberculosis* (*MtDXR*) et de *Mycobacterium smegmatis* (*MsDXR*) sont structurellement très proches. Un alignement multiple a été effectué à l'aide du programme ClustalO à partir des séquences P9WNS1 pour *MtDXR* et L8FDQ3 pour *MsDXR*, toutes les deux issues de la base de données UniProt (Figure 42).^{8,9} Les deux DXRs possèdent une identité commune de 71% avec 295 acides aminés identiques et 45 ayant une similarité positive. Ces données sont satisfaisantes pour envisager la comparaison d'analyses de modélisation moléculaire impliquant la *MtDXR*, avec celles issues des données expérimentales sur la *MsDXR*.

```

DXR_MYCTU MTNSTDGRADGRLRVVVLGSTGSIGTQALQVIADNPDRFEVVGLAAGGAHLDTLLRQRAQ 60
DXR_MYCSM -----MLILGSTGSIGTQALEVIAANPDRFEVVGLAAGGGHPELLAAQRTQ 46
          :::*****:*** *****.* : * **:
DXR_MYCTU TGVTNIAVADEHAAQRVGDIPYHGSDAATRLVEQTEADVVLNALVGALGLRPTLAALKTG 120
DXR_MYCSM TGVAAVAVADPAAAEAVGDVRYTGPDAVTRLVEDTEADVVLNALVGALGLQPTLAALATG 106
          ***: :**** **: ***: * * *.*****:*****:***** **
DXR_MYCTU ARLALANKESLVAGGSLVLRARPQIVPVDSEHSALAQCLRGGTPDEVAKLVLTASGGP 180
DXR_MYCSM ARLALANKESLVAGGPLVLKAAAPQIVPVDSEHSAMAQCLRGGTRAELDKIVLTASGGP 166
          ***** **:* *****:***** *: *:*****
DXR_MYCTU FRGWSAADLEHVTPEQAGAHPTWSMGPMNTLNSASLVNKGLEVIETHLLFGIPYDRIDVV 240
DXR_MYCSM FLGWSAEDLKSVTPEQAGKHPTWSMGPMNTLNSATLVNKGLELIETHLLFGVDYDDIDVV 226
          * **** **: ***** *****:*****:*****: ** ****
DXR_MYCTU VHPQSIHSMVTFIDGSTIAQASPPDMKLPISLALGWPRRVSGAAAACDFHTASSWEFEP 300
DXR_MYCSM VHPQSIHSMATFTDGSTLAQASPPDMKLPIALALGWPDRIAGAAAACDFSTASTWEFLP 286
          *****:***.* ** *:*****:***** *: :***** **:*** *
DXR_MYCTU LDTDVFPAVELARQAGVAGGCMTAVYNAANEEAAAAFLAGRIGFPAIVGIIADVLHAADQ 360
DXR_MYCSM LDNAVFPAVDLARFAGKQGGCLTAVYNSANEEAAEFLDGRIGFPDIVETVGDVLHAADR 346
          **. *****:*** ** *:*****:***** ** ***** ** :.*****:
DXR_MYCTU WAVEPATVDDVLDAQRWARERAQRAVSGMASVAIASTAKPGAAGRHASTLERS 413
DXR_MYCSM WAAEPATVDDVLDAQRWAREQARGVVEQKSVR-RGLVTK----- 384
          **.*****:***: .*. : . .:*
    
```

Figure 42: Alignement des séquences des *MtDXR* (P9WNS1, DXR_MYCTU) et *MsDXR* (L8FDQ3, DXR_MYCSM). Les résidus du site actif et pouvant interagir avec un ligand sont surlignés en jaune. De couleur orange sont représentés ceux interagissant au niveau du point d'ancrage, en vert ceux chélatant le métal et en bleu ceux composants dans la boucle de confinement.^{12,13}

B. Méthodes

B.1. Préparation des complexes pour le Docking

Comme aucune structure cristallographique de la DXR cocrystallisée des quatre molécules phosphates d'intérêts n'est disponible à ce jour, il nous faut prédire leurs conformations potentielles au sein du site actif de l'enzyme. Pour réaliser cela, nous avons utilisé le logiciel de docking Audock4.2 ainsi que nos connaissances quant à la fixation de ligand à la DXR.¹⁰ A partir des analyses de docking, nous pourrions avoir une idée de l'estimation d'énergie de fixation et de la conformation de chacune des molécules. Les molécules de la Figure 41 ont été modélisées à l'aide du logiciel Avogadro1.1.0.¹¹ Pour cette étude de docking deux structures de la DXR ont été utilisées, l'une issue d'*E. coli* (*EcDXR*, PDBid 1Q0L), cocrystallisée en présence de la fosmidomycine et du cofacteur NADPH, et l'autre de *M. tuberculosis* (*MtDXR*, PDBid 4AIC), cocrystallisée en présence de la fosmidomycine, de Mn^{2+} et du cofacteur NADPH.^{12,13} La structure 1Q0L possède une orientation des acides aminés devant chélater le métal non favorable. Cependant, nous nous concentrons principalement sur les résidus interagissant avec le ligand. Ceux chélatant le métal n'en font pas partie et ne risquent pas de perturber les analyses de docking.

Les deux structures de la DXR ont été préparées de la même manière que pour les précédentes études de docking réalisées (voir chapitre « Etude structurale de la DXR », par exemple).¹⁴ Chaque récepteur est composé de la protéine, du cofacteur et du métal possédant une charge de +0,8. Le choix de cette dernière sera discuté dans le chapitre « Conception d'inhibiteurs potentiels de la DXR de type bisubstrat et biligand ». Centré sur le site actif de la DXR, l'espace de recherche conformationnel est de 50-x, 50-y, 50-z points, tous espacés de 0,375 Å pour chacune des structures. Les coordonnées sont [x: 34,275, y: 31,883, z: 34,691] pour la structure 1Q0L et [x: 15,098, y: -3,528, z: 2,353] pour la structure 4AIC. Lors des calculs de docking, 2500000 évaluations sont réalisées par molécule et 27000 générations sont engendrées par l'algorithme génétique Lamarckien. Chaque molécule est soumise au même protocole et les conformations les plus optimales sont conservées.

Par conformations optimales, nous attendons à ce que les fonctions clés soient bien positionnées dans le site actif. Ces critères de sélection sont fondés sur les connaissances acquises par l'étude de structures cristallographiques de la DXR, en présence du ligand naturel (DXP) et d'inhibiteurs, ainsi que des analyses MM/PBSA de caractérisation des résidus du site actif impliqués dans la fixation de ligand, réalisées dans le chapitre « Etude structurale de la DXR ». ^{12,13} La fonction phosphate doit être localisée au niveau du point d'ancrage, impliquant les résidus Gly185, Ser186, Gly187, His209, Ser222, Asp227 et Lys228 (*i.e.* séquence *E. coli* et numérotation PDB) et la fonction chélatante doit être à proximité du métal. Il est important de noter que les interactions impliquant des métaux sont difficiles à prédire et à évaluer par calculs de docking. ¹⁵ Pour la suite de l'étude, nous utiliserons la numérotation PDB.

Pour chacune des molécules, une conformation par structure, répondant au mieux aux critères attendus, a été sélectionnée. Une minimisation d'énergie des huit complexes (protéine, ligand, métal, cofacteur) est effectuée. Pour cela, les paramètres des ligands ont été produits via ParamChem (CHARMM General Force Field 36, CGENFF36). ¹⁶ La minimisation des énergies de chacun des complexes est réalisée dans le vide, avec une valeur limite des interactions entre atomes non liés de 15 Å, avec le logiciel CHARMM. ¹⁷ La première étape de cette minimisation implique la méthode de premier ordre *Steepest Descent* sur 1000 pas, suivie de l'*Adopted-Basis* Newton-Raphson sur 3000 pas. ¹⁸ Cette partie du protocole sert à réorienter les chaînes latérales des résidus du site actif de la DXR en fonction du ligand qui l'occupe. Ainsi, l'environnement autour des molécules phosphates en est plus adapté. Les ligands respectifs sont retirés du site actif des complexes et sont dockés une nouvelle fois, à l'aide du même protocole précédemment décrit, sur leur structure protéique minimisée respective. L'application de cette méthode sur la fosmidomycine **33** nous a permis de valider notre protocole, dont les résultats ne sont pas pris en compte dans le classement. En effet, les structures utilisées, ayant été obtenues par cocrystallisation en présence de la fosmidomycine **33**, possèdent déjà les orientations de chaînes latérales adéquates, contrairement aux structures utilisées pour évaluer les molécules testées.

B.2. Préparation des simulations de dynamique moléculaire

Les paramètres engendrés précédemment pour les molécules phosphates, à l'aide de ParamChem, sont réutilisés et optimisés à l'aide de l'outil Force Field Toolkit, implémenté dans le programme de visualisation VMD pour la suite des calculs.^{17,19} Une première minimisation en deux étapes est réalisée sur chacun des complexes en suivant le même protocole employé plus tôt (*i.e.* méthodes *Steepest Descent* et l'*Adopted-Basis* Newton-Raphson). Par la suite, ils sont introduits dans une boîte d'eau de 75 Å de côté et leurs charges sont neutralisées par l'ajout de contre-ions sodium et chlorure. Tous les calculs ont été réalisés avec le champ de force CHARMM *all-atom* (version CHARMM36) et le modèle TIP3P est utilisé pour la description des molécules d'eau.²⁰ Des conditions périodiques (*periodic boundary conditions*) sont appliquées.

Les interactions de courtes distances des atomes non liés sont limitées à une distance de 12 Å et celles de longues distances sont traitées par l'algorithme PME. Une série de minimisation et de chauffage est effectuée à l'aide du programme NAMD2.9, pour atteindre progressivement la température de 300 K.^{21,22} Une équilibration de 85 ps dans l'ensemble NVE est réalisée puis une trajectoire 4,5 ns est produite pour chacun des complexes. La stabilité des simulations de dynamique moléculaire de tous les complexes est contrôlée (*i.e.* température et énergie totale du système stables, le ligand reste dans le site actif). Les trois dernières nanosecondes de chacune des trajectoires seront utilisées pour les calculs de décomposition d'énergie libre par résidu de type MM/PBSA en suivant le même protocole utilisé dans les chapitres précédents, élaboré par Lafont *et al.*²³ Pour ces calculs, chaque complexe est divisé en deux groupes : i) la protéine ; ii) la molécule d'intérêt, le cofacteur et le métal.

C. Résultats et discussion

C.1. Etudes de docking

Après avoir suivi le protocole décrit ci-dessus, nous avons trouvé les estimations d'énergie de fixation, issues des calculs de docking pour les composés phosphates. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13: Résultats du docking des analogues phosphates sur *EcDXR* et *MtDXR* minimisées.

| Molécules | <i>EcDXR</i> ¹ | <i>MtDXR</i> ¹ | Classement ² |
|---|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Fosfoxacine 40 | -5,92 | -5,01 | 4 |
| <i>N</i> -méthyle fosfoxacine 41 | -6,90 | -5,86 | 2 |
| HX-phos 76 | -6,49 | -5,47 | 3 |
| <i>N</i> -méthyle HX-phos 45 | -6,99 | -6,43 | 1 |

¹ L'estimation d'énergie de fixation correspond à l'énergie de la conformation respectant au mieux les critères de positions attendus dans le texte qui possédant la plus basse énergie en kcal/mol ;

²Le classement est basé sur la comparaison des estimations d'énergie de fixation de chaque conformation sélectionnée.

Pour chacune des souches, le classement des molécules est fondé sur la comparaison des estimations d'énergies de fixation de chaque conformation sélectionnée et est identique pour les deux protéines *EcDXR* et *MtDXR* (Tableau 13). Le *N*-méthyle HX-phos **45** présente les plus basses estimations d'énergies de fixation (-6,99 kcal/mol chez *EcDXR* et -6,43 kcal/mol chez *MtDXR*), suivi du *N*-méthyle fosfoxacine **41** (-6,90 kcal/mol chez *EcDXR* et -5,84 kcal/mol chez *MtDXR*), du HX-phos **76** (-6,49 kcal/mol chez *EcDXR* et -5,47 kcal/mol chez *MtDXR*) et enfin de la fosfoxacine **40** (-5,92 kcal/mol chez *EcDXR* et -5,01 kcal/mol chez *MtDXR*). Il est intéressant de noter que, pour chacune des molécules d'intérêts, l'estimation d'énergie de fixation pour *MtDXR* est moins favorable que pour *EcDXR*. Les molécules méthylées, *N*-méthyle HX-phos **45** et *N*-méthyle fosfoxacine **41**, présentent de meilleurs résultats que leurs analogues non-méthylés respectifs, HX-phos **76** et fosfoxacine **40**.

Après l'examen des structures résultantes, nous avons observé que le méthyle au niveau de la pince est situé à proximité d'un résidu conservé de la boucle de confinement (*i.e.* Trp212 et Met276 chez *EcDXR* et Trp193 et Met247 chez *MtDXR*), ainsi que le cofacteur, se trouvant à proximité du site actif. La Met276 chez *EcDXR* et la Met247 chez *MtDXR* n'interagissent pas avec les molécules non-méthylées, d'après les prédictions de conformations fournis par le logiciel de docking Autodock4.2. Tous les autres résidus, prédits comme participants à des interactions, sont communs pour les conformations sélectionnées, indiquant que la présence de ce méthyle au niveau de la pince du ligand pourrait être à l'origine des meilleurs résidus des composés méthylés *N*-méthyl HX-phos **45** et *N*-méthyle fosfoxacine **41** par rapport à leurs analogues non-méthylés HX-phos **76** et fosfoxacine **40**.

Les conformations issues du docking ont été visualisées et comparées. Le RMSD résultant des deux structures de départ (monomères A) est seulement de 1,2 Å. Les phosphates, issus des conformations des molécules dockées sur *MtDXR*, sont légèrement moins au fond de la poche du site actif mais néanmoins, interagissent avec les Ser167, His190, Ser203, Asn203 et Lys209. Pour chacune des souches, la position des fonctions chélatantes au métal, de type acide rétro-hydroxamique (fosfoxacine **40**, *N*-méthyle fosfoxacine **41**) ou hydroxamique (HX-phos **76**, *N*-méthyl HX-phos **45**), sont proches du métal et possèdent un positionnement similaires (voir Annexes, p. 412).

C.2. Comparaison des inhibitions avec les résultats issus du docking

Afin d'évaluer l'efficacité des résultats issus des calculs de docking réalisés à l'aide du logiciel AutoDock4, nous avons comparé le classement prédit avec celui fondé sur les constantes d'inhibitions des phosphates fosfoxacine **40**, *N*-méthyle fosfoxacine **41**, HX-phos **76** et *N*-méthyle HX-phos **45** (Tableau 14). Excepté HX-phos **76**, le classement obtenu par le docking suit celui correspondant aux IC₅₀ des deux souches, *EcDXR* et *MsDXR* (Tableau 14). Nous discuterons de la molécule HX-phos **76** plus loin dans ce chapitre.

Tableau 14 : Comparaison des résultats d'inhibitions des molécules d'intérêts avec le classement basé sur les estimations d'énergie de fixation des deux souches, *EcDXR* et *MsDXR* ; le classement des molécules par souche est fonction des résultats d'inhibitions.

| Molécules | <i>EcDXR</i> | | <i>MsDXR</i> | | Classement Docking |
|---|-----------------------|------------|-----------------------|------------|--------------------|
| | IC ₅₀ (nM) | Classement | IC ₅₀ (nM) | Classement | |
| Fosfoxacin 40 | 342 | 3 | 2100 | 3 | 4 |
| <i>N</i> -méthyle fosfoxacine 41 | 77 | 2 | 350 | 2 | 2 |
| HX-phos 76 | 2600 | 4 | 9200 | 4 | 3 |
| <i>N</i> -méthyle HX-phos 45 | 46 | 1 | 290 | 1 | 1 |

D'après les valeurs d'inhibitions, le *N*-méthyle HX-phos **45**, possédant une fonction chélatante hydroxamique, présente les meilleures IC₅₀ pour les deux souches (46 nM contre *EcDXR* et 290 nM contre *MsDXR*), suivi des analogues à pince rétro-hydroxamique *N*-méthyle fosfoxacine **41** (77 nM contre *EcDXR* et 350 nM contre *MsDXR*) et fosfoxacine **40** (342 nM contre *EcDXR* et 2100 nM contre *MsDXR*). Comme lors de nos analyses de docking, les molécules méthylées, *N*-méthyle HX-phos **45** et *N*-méthyle fosfoxacine **41**, possèdent les meilleures inhibitions contre les DXRs des deux organismes. Excepté le cas du composé phosphate non-méthylé HX-phos **76**, l'ordre des deux classements est identique. Tout comme les résultats d'inhibitions, les estimations d'énergies de fixation pour *MsDXR* sont plus élevées que pour *EcDXR*. Cependant, le rapport entre ces énergies est de loin inférieur à celui des valeurs d'inhibitions expérimentales. Néanmoins, les cohérences de résultats permettent de valider notre protocole de docking.

C.3. Etudes MM/PBSA

Les études de docking et les résultats d'inhibitions suggèrent que la présence d'un méthyle sur le groupe chélatant conduit à des molécules plus efficaces (Tableau 13, Tableau 14). Pour mieux comprendre les raisons de cet effet, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire couplées à des études de mécanique moléculaire de Poisson-Boltzman (MM/PBSA). Le protocole développé par Lafont *et al.*, décrit dans le chapitre « Méthodes standard », permet d'avoir accès à la contribution d'énergie libre par résidu d'un complexe défini.²³ Nous avons décidé d'appliquer cette méthode aux quatre complexes formés avec la *EcDXR* possédant la boucle en conformation fermée (*i.e.* résidus 206-215, PDBid 1Q0Q), le cofacteur NADPH, le dication métallique Mg^{2+} et les quatre analogues phosphates (fosfoxacine **40**, *N*-méthyle fosfoxacine **41**, HX-phos **76** et *N*-méthyle HX-phos **45**). La souche *Escherichia coli* a été privilégiée à *Mycobacterium tuberculosis* pour suivre au plus près le modèle expérimental. En effet, à ce jour il n'existe pas de structure cristallographique disponible de la DXR de *Mycobacterium smegmatis*. Nous avons choisi cette fois-ci de travailler avec la structure *EcDXR* 1Q0Q, cocrystallisée en présence du DXP et du cofacteur.¹² L'orientation des acides aminés devant chélater le métal est plus favorable que celle de la structure 1Q0L. Lors des calculs de docking, nous nous focalisons uniquement sur le site actif, n'impliquant pas ces résidus. En revanche, pour des calculs de dynamique moléculaire, leurs positions doivent être cohérentes avec celle du métal. Au lieu de modifier leurs coordonnées de position, nous avons préféré nous servir d'une structure correcte.

Les résultats des contributions d'énergies libres par résidu issus de l'application de l'approche MM/PBSA seront représentés selon le code couleur suivant : la contribution électrostatique sera en rouge, celle de van der Waals en bleu et celle correspondant à l'accessibilité au solvant en vert. Comme nous nous concentrons sur les interactions stabilisant la fixation des ligands, un filtre énergétique est appliqué. Seuls les acides aminés possédant une énergie libre totale inférieure ou égale à -1 kcal/mol seront représentés dans la Figure 43.

VII. Etude computationnelle d'analogues phosphates d'inhibiteurs de la DXR

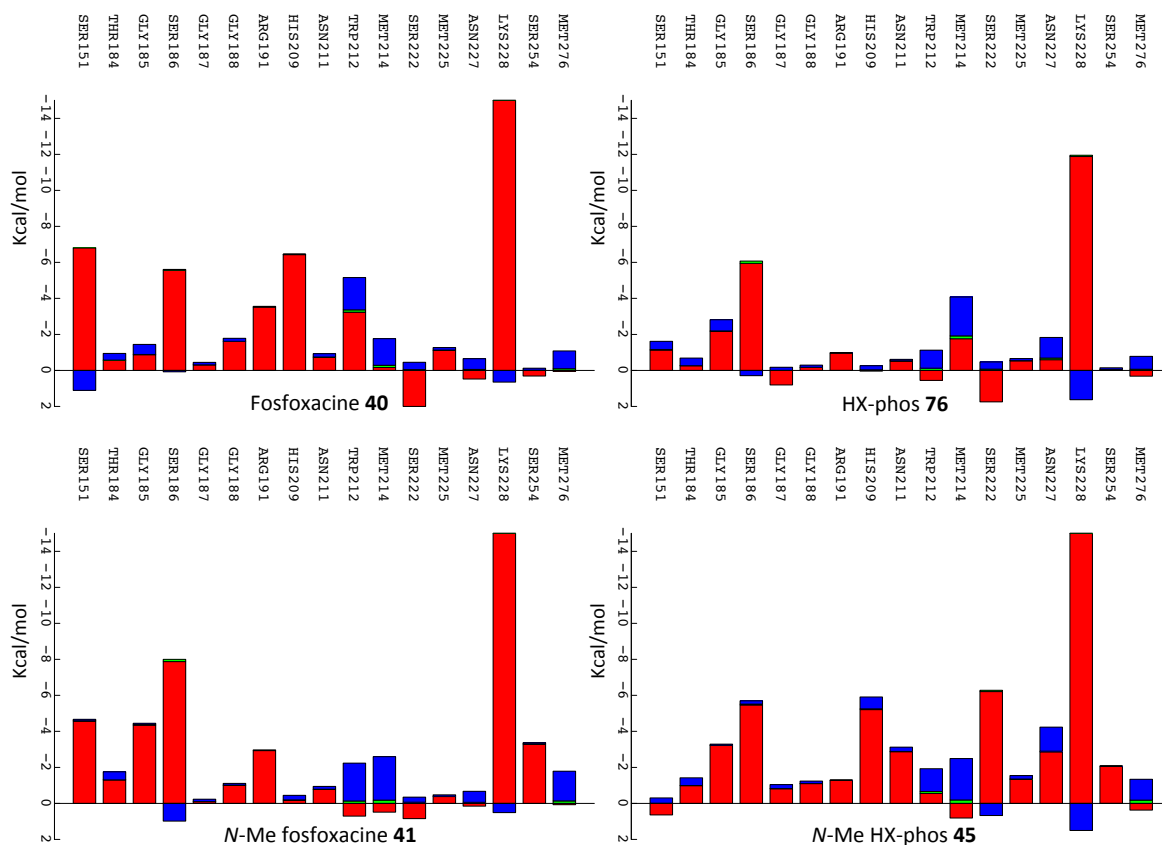


Figure 43 : Contributions MM/PBSA des quatre complexes issus des molécules phosphates. Les résidus listés sont situés dans le site actif et interagissent avec les ligands d'intérêts. Les énergies sont en kcal/mol et décomposées en contribution électrostatique (rouge), de van der Waals (bleu) et d'accessibilité au solvant (vert).

Les interactions les plus importantes sont de type électrostatique, et impliquent les fonctions phosphates et les résidus localisés au niveau du point d'ancrage (*i.e.* Thr184, Gly185, Ser186, Gly187, Gly188, Arg191, His209 et Lys228). Par soucis de visibilité, les échelles d'énergie des graphiques présentés dans la Figure 43 sont coupées à -15 kcal/mol. La Lys228 présente des énergies issues des interactions électrostatiques plus basses de -20,3 kcal/mol pour le ligand fosfoxacine **40**, -20,4 kcal/mol pour le *N*-méthyle fosfoxacine **41** et de -23,7 kcal/mol pour le *N*-méthyle HX-phos **45**. Il est important de noter que du fait des approximations de la méthode, les énergies sont indicatrices d'interactions significatives et non quantitatives.

Nous pouvons noter que cette Lys228 présente également des énergies de van der Waals plus défavorables pour les composés à pince hydroxamique HX-phos **76** et *N*-méthyle HX-phos **45** par rapport à leurs analogues à pince rétro-hydroxamique fosfoxacine **40** et *N*-méthyle fosfoxacine **41**. Les interactions stabilisantes impliquant la Ser151, localisée à proximité de la fonction chélatante, sont plus importantes pour les composés fosfoxacine **40** et *N*-méthyle fosfoxacine **41** que celles impliquant les ligands HX-phos **76** et *N*-méthyle HX-phos **45**. L'His209 n'effectue pas d'interaction électrostatique avec le composé HX-phos **76**, contrairement à tous les autres ligands.

Les acides aminés Trp212, Met214 et Met276 entourent les fonctions chélatantes et maintiennent une zone hydrophobe à l'entrée du site actif, assistés du cofacteur.^{12,13} Ce phénomène se retrouve dans les complexes étudiés des analogues phosphates. Les résultats de contributions énergétiques indiquent que ces trois résidus contribueraient à maintenir les ligands via des interactions de type van der Waals. Celles correspondant aux composés méthylés, *N*-méthyle fosfoxacine **41** et *N*-méthyle HX-phos **45**, sont plus importantes que celles des composés non-méthylés, fosfoxacine **40** et HX-phos **76** (Figure 44).

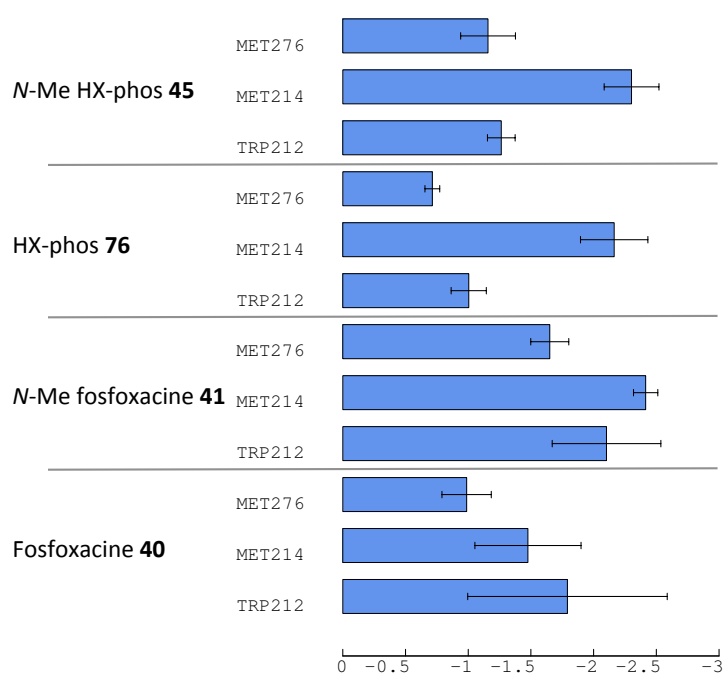


Figure 44: Contribution énergétique des interactions de type van der Waals en kcal/mol des résidus entourant la fonction chélatante des molécules d'intérêts.

Les participations de ces trois résidus (*i.e.* Trp212, Met214, Met276) couplées à celle du cycle nicotinique du cofacteur expliquent les meilleurs résultats d'inhibitions des molécules méthylées *N*-méthyle fosfoxacine **41** et *N*-méthyle HX-phos **45**, par rapport à leurs analogues non-méthylés fosfoxacine **40** et HX-phos **76**. Les résultats de contributions d'énergie libre obtenus pour la molécule HX-phos **76** ne permettent pas d'expliquer les faibles valeurs d'inhibitions observées sur *EcDXR* et *MsDXR*. A partir de ces analyses, nous nous attendrions à une différence de constante d'inhibition avec son analogue *N*-méthyle HX **45** du même ordre de grandeur que celle observée pour les *N*-méthyle fosfoxacine **41** et fosfoxacine **40**. Le temps de simulation n'était peut-être pas suffisant ou le fait d'être parti de conformations fermées de la DXR a pu biaiser ces résultats. Cependant, il est également probable qu'une transformation chimique, impliquant le groupement *N-H*, ait eu lieu dans le site actif, ce qui ne peut être prédit par nos calculs classiques de modélisation moléculaire.

C.4. Cas particulier du HX-phos 76 - Implication potentielle de la fonction chélatante

Les constantes d'inhibition de la molécule HX-phos **76** pour les deux organismes *EcDXR* et *MsDXR* sont en désaccord avec le classement obtenu par rapport aux résultats d'estimation d'énergie de fixation. A la vue des résultats des calculs issus du docking et de l'étude MM/PBSA, nous nous attendions à une inhibition plus efficace de la part de cette molécule, et non à ce qu'elle soit, et de loin, la moins bonne des inhibiteurs. La version phosphonate, le HX **77**, est connue pour également être un moins bon inhibiteur comparé à sa version méthylée, *N*-méthyle HX **60**.⁶ Pour mieux comprendre la raison d'un tel désaccord entre les résultats expérimentaux et computationnels, nous nous sommes intéressés à la fonction acide hydroxamique primaire, R-N(H)OH.

Un acide hydroxamique primaire possède deux protons acides, le premier lié à l'oxygène et le second lié à l'atome d'azote. Comme les amides, et sans prendre en compte les rotamères, cet acide existe sous deux formes, **78** et **79** (Schéma 19).²⁴ La structure de l'anion hydroxamate peut prendre trois formes, **80**, **81** et **82** (Schéma 19).²⁵ Les constantes d'équilibre de dissociation (k_1 à k_4 , Schéma 19) sont complexes à généraliser et dépendantes des conditions. Cependant, Steinberg et Swidler ont montré que les formes $R-(NH)O^-$ **80** et $R-N(OH)^-$ **81** sont présentes en solution aqueuse en proportion quasi égale car elles possèdent une basicité similaire (Schéma 19, $pK_a \approx 8,6$).²⁶ Ils ont aussi noté que pour la forme méthylée, $R-(NMe)O^-$, la densité électronique présente sur l'oxygène est plus importante que celle de l'oxygène correspondant de la forme non-méthylée **80**. La densité électronique de l'oxygène est notamment renforcée par la liaison de l'atome d'azote, possédant un doublet d'électrons non-liants. Ce type de fragment possède une nucléophilie élevée, qui a été découverte par Edwards et Pearson et nommée : effet α .²⁷ Ce motif se retrouve chez les inhibiteurs *N*-méthyle fosfoxacine **41** et *N*-méthyle HX-phos **45**, et cet effet α a pour conséquence d'augmenter le caractère nucléophile de l'oxygène porté par l'azote, permettant une meilleure interaction avec un cation à proximité, comme le métal du site actif de la DXR.

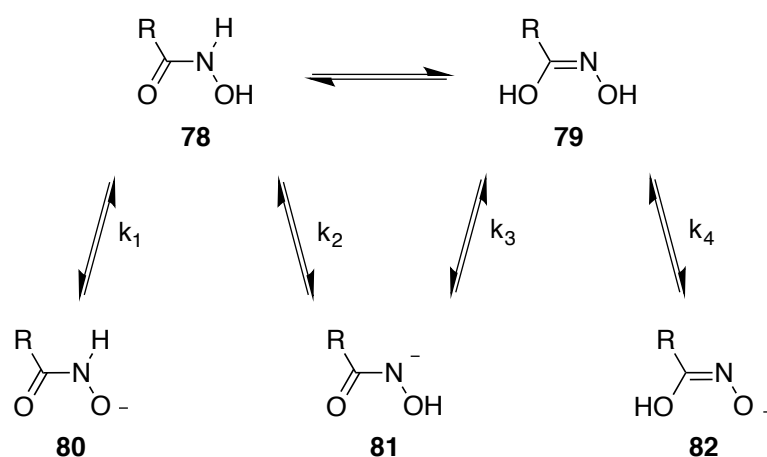


Schéma 19: Différentes formes d'hydroxamate possibles.

Des analyses expérimentales montrent qu'en absence d'un solvant non-propice à la formation de liaison hydrogène, seule la forme $R-(NH)O^-$ **80** est présente.^{28,29} Des études théoriques vont également dans ce sens.^{30,31,32} Une fois dans le site actif de la DXR, la fonction chélatante d'un ligand est entourée de résidus à caractère hydrophobe (*i.e.* Trp212 et Met214 localisés dans la boucle de confinement, la Met276, et le cycle nicotinamide du NADPH). Lors du mécanisme de bioconversion du DXP en MEP, lorsque la boucle de confinement est en conformation fermée, ces derniers sont décrits comme jouant un rôle de barrière devant confiner le substrat DXP dans le site actif de l'enzyme, le protégeant du milieu extérieur ainsi que du solvant, afin d'optimiser la réaction enzymatique de la DXR. C'est notamment à cet endroit qu'à lieu la réduction de l'aldéhyde intermédiaire, issu du réarrangement intramoléculaire du DXP, par le cofacteur, conduisant au MEP. Il est possible que les conditions particulières de cette zone entraînent un équilibre entre les deux formes $R-N(OH)$ et $R-(NH)O^-$ de la fonction hydroxamique du HX-phos **76**. Il a été établi dans la littérature qu'un acide hydroxamique peut présenter différentes formes.^{33,34} Les interactions entre un acide hydroxamique primaire et un cation métallique sont très complexes. En effet, plusieurs types de coordination de groupements acides hydroxamiques à un métal ont été observés, proposés et sont résumés dans le Schéma 20.³⁵

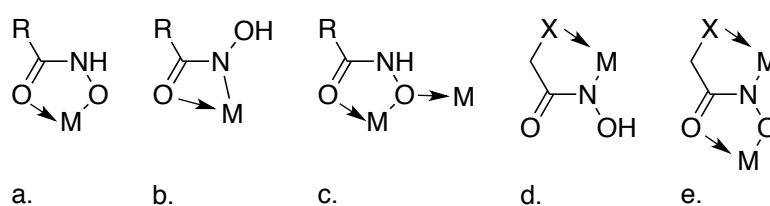


Schéma 20: Modes de coordination de groupes de type acide hydroxamique avec des métaux M. Les flèches représentent les liaisons impliquant un doublet d'électrons non-liants.

De ces cinq types de coordination à un métal présentés dans le Schéma 20, trois seraient envisageables dans notre situation, en présence de HX-phos **76**. Le premier serait le mode coordination le plus fréquent, le mode $\{O,O\}$ (a, Schéma 20), impliquant la perte de l'hydrogène de l'oxygène.

Le deuxième pourrait être le mode {O,N} (b, Schéma 20), impliquant la formation de l'anion N⁻. La troisième possibilité serait une chélation de l'anion azote au métal (d, Schéma 20). Ce type de chélation implique la présence d'un autre atome donneur à proximité pour conduire à la formation d'un cycle avec le métal, préférentiellement à 5 ou 6 atomes. Ce mode de coordination a déjà été observé dans plusieurs complexes, dont le premier fut décrit en 1982 en présence de Ni (II).³⁶ D'après ce que nous venons de voir, couplé à l'environnement de la zone de chélation au métal du site actif, nous pourrions supposer que la forme R-N⁻(OH) de la molécule HX-phos **76** soit prédominante. De plus, concernant le mode {O,N} (b, Schéma 20), la formation d'un cycle à quatre atomes avec un métal ne conduirait pas nécessairement à une conformation suffisamment stable, ne permettant ainsi sa détection par des méthodes comme la diffraction aux rayons X. Ceci expliquerait qu'aucune structure cristallographique n'a, à ce jour, été observée, bien que sa présence en solution, en l'absence de métal, soit démontrée.³⁷

Si le HX-phos **76** se coordonne au métal du site actif de la DXR suivant le mode {O,O}, comme les autres inhibiteurs acides hydroxamiques, il en résulterait une meilleure activité inhibitrice. Bien que la présence d'un méthyle augmente les capacités inhibitrices (*i.e.* fosfoxacine **40** par rapport à *N*-méthyle fosfoxacine **41**), l'écart des IC₅₀ est bien trop important pour être seulement dû à un apport d'interactions favorables hydrophobes en faveur de la molécule méthylée, ainsi que d'une densité électronique accrue de l'oxygène porté par l'azote. Il resterait les deux autres modes cités, impliquant l'atome d'azote : le mode {O,N} (b, Schéma 20) et le mode {N, X} (d, Schéma 20). Le mode {O,N}, conduisant à un cycle à quatre paraît peu favorable à former un complexe stable, au vu de la proximité entre les différents atomes impliqués, mais dû à la mise en évidence de son existence par des analyses théoriques et expérimentales, ce mode transitoire ne peut être écartée. Ces informations suggèrent que l'équilibre entre les deux anions hydroxamate pourrait expliquer en partie la non-efficacité d'inhibition des composés HX **77** et HX-phos **76** à l'encontre de la DXR.

L'exploration d'études de docking des formes alternatives du HX-phos **76** ont montré des estimations d'énergies de fixation moins favorables (données non présentées), appuyant l'idée qu'une distribution de plusieurs formes pourraient être présente pour le phosphate HX-phos **76**. Enfin, le mode {N, X} pourrait également être une possibilité envisageable, par la présence du groupement phosphate dont l'un des oxygènes pourrait participer à la chélation du métal, une possibilité que nous n'avons pas explorée pour le moment. Au niveau de cette étude et des calculs effectués, nous ne pouvons déterminer quel mode de fixation au métal est impliqué lors de la formation du complexe HX-phos **76** avec la DXR. Ce sujet reste à explorer lors de futures études.

D. Conclusion

Dans ce projet, nous avons réalisés des études de docking de quatre molécules, fosfoxacine **40**, *N*-méthyle fosfoxacine **41**, HX-phos **76** et *N*-méthyle HX-phos **45**, sur deux souches de la DXR : *E. coli* et *M. tuberculosis*. Le classement des molécules en fonction de l'estimation de leur énergie de fixation est cohérent avec les résultats expérimentaux, à l'exception de la molécule HX-phos **76**. L'analyse des résultats de l'étude de docking classe cette molécule en troisième position. Or, les résultats des tests d'inhibitions indiquent qu'elle présente la plus mauvaise inhibition, et la place en quatrième position pour les deux souches, *EcDXR* et *MsDXR*. Nous avons par la suite réalisé des études de contributions d'énergie par résidu de type MM/PBSA pour ces quatre molécules, complexées avec *EcDXR*. Les résultats obtenus expliquent la meilleure efficacité des composés possédant la pince chélatante méthylée, *N*-méthyle fosfoxacine **41** et *N*-méthyle HX-phos **45**, par rapport à leurs analogues respectifs non-méthylés fosfoxacine **40** et HX-phos **76**. En effet, la présence d'un environnement hydrophobe, dû à la présence du Trp212, la Met214, la Met276 et du cycle nicotinamide du NADPH, est propice aux interactions de type van der Waals avec une fonction hydroxamate *N*-méthylée.

Concernant l'inhibiteur HX-phos **76**, aucune interaction défavorable n'explique une telle différence d'inhibition par rapport à son analogue méthylé *N*-méthyle HX-phos **45**, laissant suggérer que ce comportement résulte d'un phénomène plus complexe, ne pouvant être prédit par la nature des calculs effectués. Fondée sur des résultats expérimentaux impliquant une hydroxylamine primaire, similaire à celle présente chez HX-phos **76**, nous avons émis l'hypothèse que la présence du proton N-H conduirait à une compétition entre les deux formes anions hydroxamates $R-N(OH)^-$ et $R-(NH)O^-$. En l'absence d'informations issues de structure cristallographique, nous pouvons seulement supposer que les résidus autour de la zone de chélation, assistés du cofacteur, génèrent un environnement hydrophobe, propice à stabiliser la forme $R-N(OH)^-$, au moins transitoirement, alors que la forme $R-(NH)O^-$ nécessite des liaisons hydrogènes pour être stabilisée et observée. Dans ces conditions, la forme $R-N(OH)^-$ serait alors prédominante par rapport à la forme $R-(NH)O^-$, empêchant une chélation efficace du ligand au métal lorsque la boucle de confinement est fermée. L'étude de ce phénomène nécessiterait différentes méthodes de simulations qui dépassent l'objectif de ce projet, impliquant l'utilisation de techniques mixant la mécanique quantique à des simulations de mécanique classique. Les détails et possibilités de ce type d'études surpassent les attentes de ce projet, dans lequel nous suggérons qu'un équilibre entre les deux anions hydroxamates serait l'une des raisons pour expliquer le manque d'efficacité face à la DXR des composés acides hydroxamiques primaires.

¹ Tenover, F.C., Hugues, J.M., World Health Organisation, « Scientific working group on monitoring and managements of bacterial resistance to antimicrobial agents », WHO/CDS/BV1/95.7, Geneva, Switzerland, 1994.

² Witte, W., « Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture », *Science*, 1998, 279, 996-997

³ « Global tuberculosis report », World Health Organisation, 2016

⁴ Katayam, N., Tsubotani, S., Nozaki Y., Harada, S., Ono, H., « Fosfadecin and fosfocytocin, new nucleotide antibiotics produced by bacteria », *The journal of antibiotics*, 1990, 238-246.

⁵ Woo, Y-H, Fernandes, R.P.M., Proteau, P.J., « Evaluation of fosmidomycin analogs as inhibitors of the *Synechocystis* sp. PCC6803 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase », *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2006, 14, 2375-2385.

⁶ Kuntz, L., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C., Hemmerlin, A., Willem, A., Bach, T. J., Rohmer, M., « Isoprenoid biosynthesis as a target for antibacterial and antiparasitic drugs: phosphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase », *The Biochemical Journal*, 2005, 386, 127-135.

⁷ Munier, M., Thèse de Chimie, Université de Strasbourg, France, 2016.

⁸ a) Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Apweiler, R., Alpi, E., Zhang, J., « UniProt: A hub for protein information », *Nucleic Acids Research*, 2015, 43, D204-D212; b) Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., Thompson, J.D., « Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs », *Nucleic Acids Research*, 2003, 31, 3497-3500.

⁹ <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

¹⁰ Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W. L., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J., « AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility », *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30, 2785-2791.

¹¹ Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G. R. « Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform », *Journal of Cheminformatics*, 2012, 4, 1-33.

¹² Mac Sweeney, A., Lange, R., Fernandes, R. P. M., Schulz, H., Dale, G. E., Douangamath, A., Oefner, C., « The crystal structure of E. coli 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation », *Journal of Molecular Biology*, 2005, 345, 115–127.

¹³ Henriksson, L. M., Unge, T., Carlsson, J., Åqvist, J., Mowbray, S. L., Jones, T. A., « Structures of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis », *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 19905–19916.

¹⁴ Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Richardson, D. C., «MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography», *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, 66, 12–21.

¹⁵ a) Hu, X., Shelver, W. H., «Docking studies of matrix metalloproteinase inhibitors: Zinc parameter optimization to improve the binding free energy prediction», *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2003, 22, 115–126; b) Chen, D., Gerd, M., Power, T. D., Sower, L., Peterson, J. W., Schein, C., «Accounting for Ligand-Bound Metal Ions in Docking Small Molecules on Adenylyl Cyclase Toxins», *Proteins*, 2007, 67, 593–605; c) Santos-martins, D., Forli, S., Joa, M., Olson, A. J., «An Improved AutoDock Force Field for Small-Molecule Docking to Zinc Metalloproteins», 2014, 54, 2371–2379.

¹⁶ a) Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., MacKerell, Jr. A. D., « CHARMM General Force Field: A Force field for Drug-Like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Field », *Journal of Computational Chemistry*, 2010, 31, 671-690 ; Vanommeslaeghe, K., MacKerell, Jr. A. D., « Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: bond perception and atom typing », *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 52, 3144-3154 ; c) Vanommeslaeghe, K., Raman, E. P., MacKerell, Jr. A. D., « Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of bonded parameters and partial atomic charges», *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 52, 3155-3168, d) <https://cgenff.paramchem.org>

¹⁷ Brooks, B. R., Brooks, C. L., III, Mackerell, A.D., Jr., Nilsson, L., PETRELLA, R.J., Roux, B., Wong, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., IM, K., IM, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R.W., Post, C.B., Pu, J. Z., Schaeffer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., Karplus, M., « CHARMM: The Biomolecular Simulation Program », *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30, 1545-1614.

¹⁸ Steinbach, P. J., Brooks, B. R., « New spherical-cutoff methods for long-range forces in macromolecular simulation », *Journal of Computational Chemistry*, 1994, 15, 667-683.

¹⁹ a) Mayne, C.G., Saam, J., Schulte, K., Tajkhorshid, E., Gumbart, J.C., « Rapid Parameterization of Small Molecules Using the Force Field Toolkit », *Journal of Computational Chemistry*, 2013, 34, 2757-2770 ; b) Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., « VMD - Visual Molecular Dynamics », *Journal of Molecular Graphics*, 1996, 14, 33-338.

²⁰ MacKerell, A. D., Bashford, D., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Karplus, M., « All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins », *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998, 102, 3586-3616.

²¹ Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., Schulten, K., « Scalable molecular dynamics with NAMD », *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26, 1781-1802.

²² Chebaro, Y., Amal, I., Rochel, N., Rochette-Egly, C., Stote, R. H., Dejaegere, A., « Phosphorylation of the Retinoic Acid Receptor Alpha Induces a Mechanical Allosteric Regulation and Changes in Internal Dynamics », *PLoS Computational Biology*, 2013, 9, 1-14.

²³ Lafont, V., Schaefer, M., Stote, R. H., Atschuh, D., Dejaegere, A., « Protein-Protein Recognition and Interaction Hot Spots in an Antigen-Antibody Complex: Free Energy Decomposition Identifies "Efficient Amino Acids." », *Proteins*, 2007, 70, 311-319.

²⁴ Exner, O., Simon, W., « Acyl derivatives of hydroxylamine. XII. Dissociation constants of hydroxamic acids and their functional derivatives », *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 1965, 30, 4078-4094.

²⁵ Bauer, L., Exner, O., « The Chemistry of Hydroxamic Acids and N-hydroxyimides », *Angewandte Chemie International Edition*, 1974, 13, 376-384.

²⁶ Steinberg, G.M., Swidler, R., « The Benzohydroxamate Anion », 1964, *Journal of Organic Chemistry*, 1965, 30, 2362-2365.

²⁷ Edwards, J.O., Pearson, R.G., « The Factors Determining Nucleophilic Reactivities », *Journal of the American Chemical Society*, 1962, 84, 16-24.

²⁸ Bordwell, F.G., Fried, H.E., Hugues, D.L., Lynch, T-Y, Satish, A.V., Whang, Y.E., « Acidities of Carboxamides, Hydroxamic Acids, Carbohydrazides, Benzenesulfonamides, and Benzenesulfonohydrozides in DMSO Solution », *Journal of Organic Chemistry*, 1990, 55, 3330-3336.

²⁹ Bagno, A., Comuzzi, C., Scorrano, G., « The Site of Ionization of Hydroxamic Acids Probed by Heteronuclear NMR Relaxation Rate and Noe Measurements. An Experimental and Theoretical Study », 1994, 116, 916-924.

³⁰ Remko, M., « The Gas-Phase Acidities of Substituted Hydroxamic and Silahydroxamic Acids : A comparative ab Initio Study », *Journal of Physical Chemistry A*, 2002, 106, 5005-5010.

³¹ Wu, D-H, Ho, J-J, « Ab Initio Study of Intramolecular Proton Transfer in Formohydroxamic Acid », *Journal of Physical Chemistry A*, 1998, 102, 3582-3586.

³² Böhm, S., Exner, O., « Acidity of hydroxamic acids and amides », *Journal of Biomolecular Chemistry*, 2003, 1, 1176-1180.

³³ Chatterjee, B., « Donor properties of hydroxamic acids », *Coordination Chemistry Reviews*, 1978, 25, 281-303.

³⁴ Kurzac, B., Kozłowski, H., Farkas, E., « Hydroxamic and aminohydroxamic acids and their complexes with metal ions », *Coordination Chemistry Reviews*, 1992, 114, 169-200.

³⁵ Dobosz, A., Dudarenko, N.M., Fritsky, I.O., Głowiak, T., Karaczyn, A., Kozłowski, H., Sliva T.Y., Wiatek-Kozłowska, J.S., « N-Bonding of the hydroxamic function in Nickel (II) and Copper (II) complexes with 2-(hydroxyimino)propanohydroxamic acid », *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1999, 743-749.

³⁶ Brown, D.A., Roche, A.L., Pakkanen, T.A., Pakkanen T.T., Smolander, K., « The X-Ray Crystal Structure of Bis(glycinohydroxamato)nickel(II). A Novel Co-ordination of

Nickel by Hydroxamic Avid via the Nitrogen Atom of the NHOH Group », *Journal of the Chemical Society*, 1982, 676-677.

³⁷ Brown, D.A., Roche, A.L., Pakkanen, T.A., Pakkanen T.T., Smolander, K., « The X-Ray Crystal Structure of Bis(glycinohydroxamato)nickel(II). A Novel Co-ordination of Nickel by Hydroxamic Avid via the Nitrogen Atom of the NHOH Group », *Journal of the Chemical Society*, 1982, 676-677.

VIII. Conception d'inhibiteurs potentiels de la DXR de type bisubstrat et biligand

Table des matières

| | |
|---|------------|
| A. Introduction | 204 |
| B. Le docking ou amarrage moléculaire | 206 |
| <i>B.1. Principe de base du Docking</i> | 207 |
| <i>B.2. Une large gamme d'outils</i> | 207 |
| C. Site actif de la DXR | 209 |
| C.1. Caractéristiques et critères | 209 |
| C.2. Détermination de la charge du métal divalent du site actif de la DXR | 210 |
| D. Approche bisubstrat | 212 |
| D.1. Méthodes | 215 |
| D.2. Résultats et discussion | 216 |
| <i>D.2.1. Choix des fragments</i> | 217 |
| <i>D.2.2. Docking sur les complexes analogues azotures</i> | 218 |
| <i>D.2.3. Docking d'azotures sur complexes DXR/Cyclooctyne</i> | 221 |
| <i>D.2.4. Docking de produits potentiellement issus de la réaction de cycloaddition</i> | 222 |
| D.3. Conclusion approche bisubstrat | 224 |
| E. Approche biligand | 225 |
| E.1. Méthodes | 226 |
| E.2. Première méthode : Etude à partir de fragments | 227 |
| <i>E.2.1. Conception : 1^{ère} partie</i> | 229 |
| <i>E.2.2. Conception : 2^{ème} partie</i> | 233 |
| <i>E.2.3. Conception : 3^{ème} partie</i> | 236 |
| <i>E.2.4. Conclusion de la première méthode : Etude à partir de fragments</i> | 237 |
| E.3. Deuxième méthode : construction à partir de fragments commerciaux | 238 |
| <i>E.3.1. Résultats et discussion</i> | 239 |
| <i>E.3.2. Conclusion : fragments commerciaux</i> | 243 |
| E.4. Conclusion approche biligand | 244 |
| F. Conclusion générale | 244 |

A. Introduction

La recherche de nouveaux inhibiteurs implique la construction de molécules pouvant se fixer à une enzyme afin d'en perturber le fonctionnement. Les sites actifs des substrats naturels sont des cibles de prédilection. Cependant, d'autres zones à proximité des sites actifs peuvent également servir de cible pour bloquer l'activité enzymatique. A partir de cette idée, deux approches d'inhibitions potentielles de la DXR ont été envisagées. Toutes deux sont fondées sur l'exploitation des acides aminés impliqués dans les interactions de fixation du substrat DXP et du cofacteur NADPH. Nous avons imaginé la conception d'inhibiteurs de type biligand et de type bisubstrat.

L'approche d'inhibiteurs de type biligand consisterait à concevoir des molécules possédant trois régions clés. Une première région devrait mimer le substrat naturel, le DXP, dans la poche du site actif, une seconde le site de fixation du cofacteur, et la troisième servirait à lier les deux sous-unités précédentes (Figure 45).

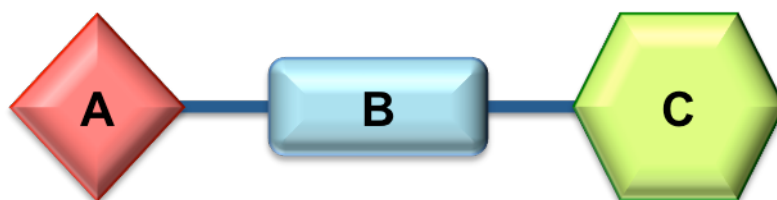


Figure 45: Description générale de l'approche biligand ; A et C représentent les régions ciblant les sites de fixations du DXP et du NADPH, respectivement, et B l'espaceur.

Cette méthode d'inhibition est connue et a déjà été appliquée à la DXR. Elle fait partie des méthodes abordées lors de la description d'inhibiteurs connus présentés dans le chapitre « I. Introduction » p. 42, Tableau 3.^{1,2} A ce jour et pour ce type de composé, la meilleure IC₅₀ est de 130 nM et revient au composé **55** sur la DXR d'*Escherichia coli*, qui est un analogue rétro-hydroxamique benzylé de la fosmidomycine **33**.³

L'approche d'inhibiteurs de type bisubstrat impliquerait la conception de deux molécules, la première qui mimerait le substrat naturel DXP et la seconde le cofacteur NADPH (Figure 46). Lorsque ces deux molécules se fixeraient à leur position respective, elles pourraient réagir entre-elles via une réaction chimique entre deux fonctions complémentaires spécifiques.

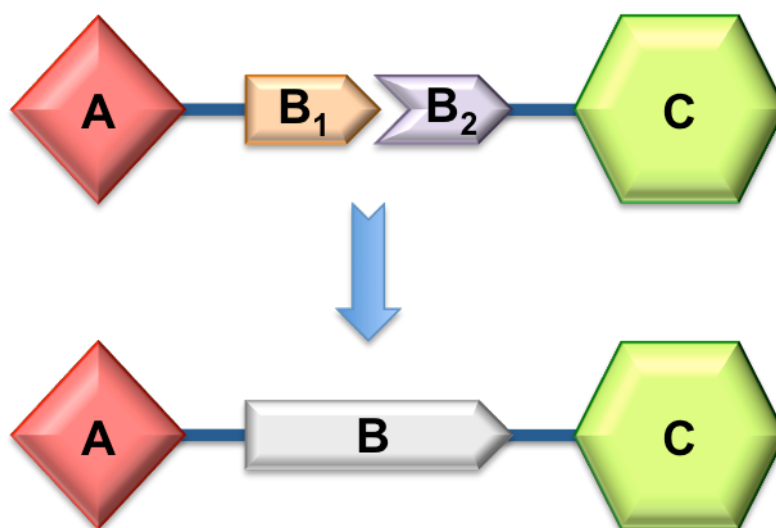


Figure 46: Description générale de l'approche bisubstrat : A et C représentent les régions ciblant les sites de fixations du DXP et du NADPH ; B₁ et B₂ sont les deux fonctions chimiques complémentaires devant réagir ensemble conduisant à B.

Les deux approches décrites précédemment, biligand et bisubstrat, nécessitent la synthèse de molécules complexes, entraînant des coûts souvent importants (*i.e.* temps de travail, matériels, produits, etc.). Dans le but de réduire le nombre de possibilité de molécules complexes à synthétiser, nous avons réalisé des études computationnelles ciblant le site actif de la DXR, et impliquant des molécules que nous avons imaginées. Nous avons entrepris des études de docking, dont l'objectif est de concevoir des inhibiteurs potentiels, explorant plusieurs architectures structurales, afin de sélectionner les candidats les plus prometteurs pour ces deux méthodes et de les proposer aux chimistes.

B. Le docking ou amarrage moléculaire

La conception de molécules à visées thérapeutiques est depuis toujours un défi pour la recherche. L'évolution des technologies a permis de mieux comprendre les interactions impliquant un substrat et son récepteur. Lorsque le site actif d'une enzyme, ainsi que son substrat naturel, sont connus, il est possible d'imaginer une multitude de molécules afin de pouvoir évaluer leurs activités potentielles vis à vis un ou plusieurs récepteurs. Bien sûr, pour être efficace la conception doit rester réfléchie. De nos jours, elle est de plus en plus assistée par ordinateur (*computer-aided drug design*, CADD), assistance qui est devenue un outil essentiel de la chimie médicinale actuelle.⁴ Elle concerne principalement la synthèse et l'étude d'affinité de petites molécules organiques sur la surface de macromolécules telles que les protéines.

Le principe du docking est de prédire la ou les conformations optimales que peut adopter une molécule pour se fixer au mieux à une macromolécule, telle qu'une protéine. L'algorithme d'exploration des conformations et la fonction de score du logiciel utilisé permettent de définir quelle molécule semble la plus adaptée au récepteur. La plupart des grandes entreprises pharmaceutiques y consacrent d'importants moyens et cette méthode a servi à concevoir beaucoup de médicaments actuellement sur le marché.^{5,6,7}

B.1. Principe de base du Docking

Les structures tridimensionnelles du récepteur et du ligand sont très importantes (*i.e.* résolution, protonation, architecture). Une étude de docking débute en définissant un espace qui englobe la zone cible dans un repère orthonormé. Par la suite, un algorithme recherche toutes les conformations de la molécule étudiée pouvant interagir avec la surface du récepteur, dans l'espace défini. Ces calculs prennent en compte les interactions de van der Waals, électrostatiques, de solvatation, ainsi que les degrés de liberté de la molécule, interactions décrites plus en détails dans le chapitre « IV. Méthodes computationnelles standard » p. 78.⁷ Plus la zone de recherche est grande, plus les calculs demandent des ressources importantes. Il est possible d'ajouter une flexibilité au récepteur, engendrant une augmentation considérable du temps des calculs. Une fois l'exploration de toutes les conformations effectuées dans la zone d'intérêt, la ou les conformations de plus basses énergies de fixation estimées sont retenues. Lorsque le mode de fixation dans le site actif est connu, il est recommandé d'en tenir compte lors de l'analyse des résultats. En effet, la conformation de plus basse énergie peut très bien être en désaccord avec les modes connus de fixations. Il est important de garder un regard critique sur les résultats, quitte à choisir une conformation possédant une énergie de fixation plus élevée.

B.2. Une large gamme d'outils

Les développements des logiciels de docking, de visualisation et des services en ligne de spécificités similaires abondent, et le nombre de publications y faisant référence augmente chaque année. D'après la revue publiée par Chen, Autodock et GOLD sont les logiciels les plus utilisés (Figure 47).^{8,9,10}

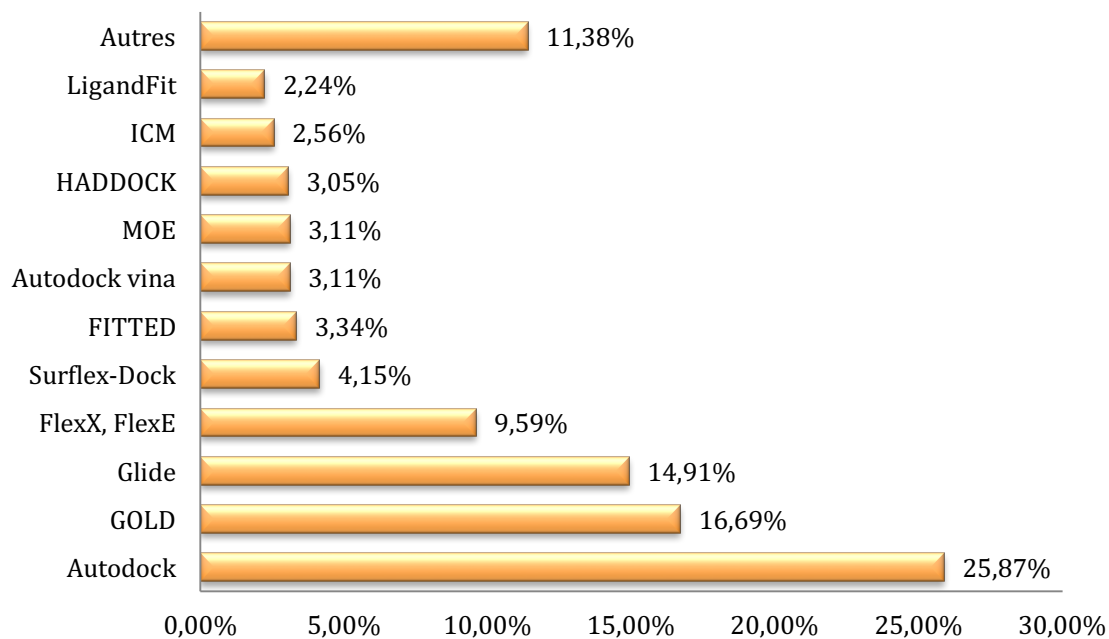


Figure 47: Fréquence des citations de logiciels de docking dans les publications impliquant des études de docking sur la période de 1990 à 2013.⁸

Le classement présenté indique les logiciels qui sont les plus populaires et ne compare en aucun cas leurs efficacités respectives. Le fait qu'ils soient en libre accès et qu'ils fassent partis des premiers logiciels développés a sans doute beaucoup contribué à la notoriété de certains. Durant nos travaux d'études de docking, nous avons utilisé les logiciels Autodock4.2 et Autodock Vina, pouvant être utilisé via l'interface graphique Raccoon2, pour leur efficacité, la facilité de prise en main et le libre accès.^{11,12,13,14} Nous avons choisi d'effectuer nos calculs de docking avec des ligands flexibles sur récepteur rigide. Il est important de noter que Raccoon2 ne permet pas de travailler sur un serveur utilisant l'ordonnancement de tâches informatique SLURM (*Simple Linux Utility for Resource Management*). Son utilisation a nécessité l'installation de PBS (*Portable Bash System*) sur un serveur. Seule la conformation de plus basse énergie peut être analysée via l'interface graphique Raccoon2.

C. Site actif de la DXR

C.1. Caractéristiques et critères

Les études des nombreuses structures cristallographiques de la DXR, ainsi que les analyses MM/PBSA effectuées au cours de précédents chapitres, nous ont permis d'acquérir de bonnes connaissances de son site actif (voir chapitres « V. Etude structurale et énergétique de la DXR » p. 120, « VI. Etude comparative des interactions de plusieurs inhibiteurs de la DXR chez trois organismes » p. 148). A partir des différentes observations, nous avons décomposé le site actif de la DXR en quatre parties :

- i) une zone jouant le rôle de point d'ancrage localisée au fond de la poche (*i.e.* Ser186, His209, Ser222, Asn227, Lys228 chez *EcDXR*),
- ii) une boucle flexible permettant de confiner le substrat dans le site actif, dont certains résidus participent à des interactions clés (*i.e.* His209, Trp212, Met214 chez *EcDXR*),
- iii) un cation métallique divalent où peut chélaté par un ligand,
- iv) une zone hydrophobe au niveau de l'entrée du site actif, impliquant la participation du cycle nicotinique du cofacteur NADPH ainsi que des résidus (*i.e.* Trp212, Met214, Met276 chez *EcDXR*).

Ces informations seront utiles dans l'analyse des résultats issus des calculs de docking et nous servirons de filtres, afin d'écartier les conformations non conformes possédant néanmoins de bonnes énergies. Par exemple, nous savons que si une molécule possède un groupement phosphate ou phosphonate, il se positionnera préférentiellement au niveau de la zone du point d'ancrage du site actif. Si pour une telle molécule, la conformation de plus basse énergie ne respecte pas cette condition, elle sera écartée. Il en est de même pour les fonctions de type hydroxamique et rétro-hydroxamique, connues pour chélater le métal via une conformation *cis*.

Les deux programmes utilisés, Autodock4.2 et Autodock Vina, les assimilent à des fonctions amides et bloquent leurs rotations *cis-trans*. Pour obtenir des résultats cohérents, avec les observations issues des structures cristallographiques de la DXR, il faut autoriser la libre rotation *cis-trans* des fonctions amides. De plus, si la conformation de plus basse énergie ne possède pas la fonction devant chélater le métal à proximité de ce dernier, elle sera écartée. Enfin, les hydroxyles portés par ces fonctions sont déprotonés lors des docking, car il est fortement supposé que la fonction chélatée au métal se trouve sous forme anionique.

C.2. Détermination de la charge du métal divalent du site actif de la DXR

Les critères ci-dessus nous ont confrontés à un problème computationnel concernant la charge du métal. Le logiciel attribue par défaut au métal, dans notre cas le magnésium, la charge +2. Bien que cela soit un cation divalent de type M^{2+} , sa charge formelle est compensée par les atomes d'oxygènes des résidus le chélatant (*i.e.* Asp150, Glu152, Glu231 chez *EcDXR*), ce qui a pour conséquence de la réduire. Nous avons cherché à paramétrer une nouvelle valeur de charge pour le magnésium adaptée à notre système.

A partir de la *EcDXR* cocrystallisée en présence du DXP et du cofacteur (PDBid 1Q0Q), nous avons inséré le métal (Mg^{2+}) après superposition de la structure 4AIC et nous avons minimisé l'ensemble du complexe.^{15,16} Nous avons retiré le DXP de la structure et nous l'avons amarré à plusieurs reprises dans le site actif, en présence du cofacteur, en modifiant à chaque fois la charge du métal. L'objectif de cette procédure est de retrouver des conformations de plus basses énergies similaires à celle issue de la structure cristallographique. L'essai, présentant une charge du magnésium fixée à +0,8, a fourni les résultats les plus significatifs, avec une valeur de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) 0,62 Å entre la conformation cristallographique et celle de plus basse énergie dockée du DXP (Tableau 15). Nous avons appliqué ce protocole à deux complexes de deux souches différentes, cocrystallisés en présence de la fosmidomycine (Fom) et du cofacteur (PDBid 1Q0L et 4AIC).^{15,16}

Les conformations issues du docking sont très proches de celles issues des structures cristallines. Dans le cas de la structure 1Q0L une valeur de RMSD de 0,42 Å a été obtenue entre la conformation de la fosmidomycine dockée et celle issue de la structure cristallographique, et une valeur de 0,66 Å dans le cas de la structure 4AIC (Tableau 15). Les estimations d'énergies de liaisons des conformations de plus basses énergies de la fosmidomycine pour les deux structures 1Q0L et 4AIC sont similaires, avec les valeurs respectives de -6,22 kcal/mol et -6,46 kcal/mol.

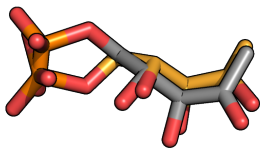
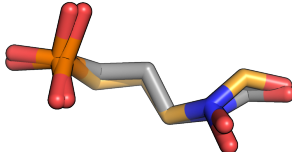
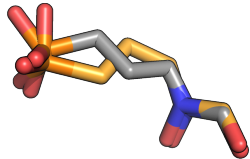
| Structures | 1Q0Q, <i>E. coli</i> (DXP, 14) | 1Q0L, <i>E. coli</i> (Fom, 33) | 4AIC, <i>M. tuberculosis</i> (Fom, 33) |
|--------------------------------|---|--|---|
| |  |  |  |
| RMSD (Å) | 0,62 | 0,42 | 0,66 |
| Affinité estimée (kcal/mol) | -4,46 | -6,22 | -6,46 |

Tableau 15: RMSD, en Å, des conformations des ligands amarrés sur la DXR avec celles issues des conformations cristallines; En gris sont représentées les conformations cristallographiques et en orange celles de plus basses énergies issues du docking. Par souci de visibilité, les hydrogènes ne sont pas représentés.

Ces résultats nous ont permis de valider notre protocole et de l'appliquer à l'ensemble de nos études, qui ont été réalisées avec comme cation Mg^{2+} , ce dernier étant majoritairement présent dans la DXR sur le plan biologique. Dans ce chapitre, tous les calculs de docking ont été réalisés sur la DXR d'*Escherichia coli* issue de la structure 1Q0Q, en présence de Mg^{2+} possédant une charge de +0,8.

D. Approche bisubstrat

L'approche d'inhibition bisubstrat implique une réaction entre deux molécules possédant deux fonctions complémentaires réagissant l'une avec l'autre. Une réaction de type bioorthogonale a paru être un choix idéal pour réaliser ce projet. C'est une réaction chimique entre deux fonctions spécifiques conduisant à la formation d'une liaison covalente. Cette réaction n'interfère ni avec les fonctions biologiques présentes aux alentours, ni avec le milieu.¹⁷ Elle fait intervenir des réactants non toxiques et est compatible avec l'eau. L'objectif est de concevoir deux molécules, l'une mime du DXP et l'autre mime du cofacteur. Une fois dans leur site de fixation respectif, elles réagiraient entre-elles via une réaction bioorthogonale. Il est important que cette réaction se réalise lorsque les deux molécules sont fixées à la protéine à leurs positions respectives. La molécule mimant le DXP serait maintenue dans le site actif par la boucle de confinement (*i.e.* résidus 206 à 216 chez la DXR d'*Escherichia coli*), impliquant un maintien plus important de tout l'ensemble. Si les fonctions sont trop réactives, cela pourrait conduire à la formation du produit final en dehors des sites de fixations. La molécule formée risquerait d'être moins apte à venir se fixer à la protéine, et par conséquent à l'inhiber. Il est donc important de bien choisir les fonctions complémentaires devant participer à la réaction. Plusieurs réactions bioorthogonales ont été décrites dans la littérature. Par exemple, nous retrouvons la variante de Staudinger, ainsi que des réactions impliquant des alcènes ou des alcynes contraints (Schéma 21).^{18,19,20}

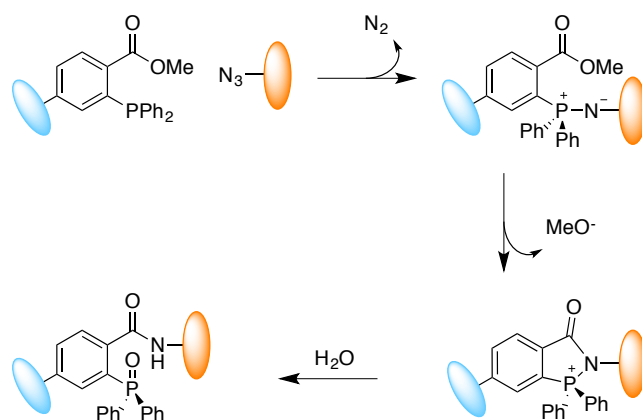


Schéma 21: Exemple de réaction bioorthogonale : la réaction modifiée de Staudinger.¹⁸

Le choix du type de réaction orthogonale implique une étude des différentes cibles. Pour se fixer dans le site actif au niveau du DXP efficacement, un ligand doit posséder au minimum un phosphonate pour interagir avec le point d'ancrage au fond de la poche et une fonction pouvant se chélater au métal. La boucle de confinement permet de protéger le site actif et d'y maintenir le ligand fixé. Cependant, elle limite le volume d'espace disponible. Le mime du DXP devra être de taille comparable à celle du DXP et posséder les deux fonctions citées précédemment. Le cofacteur bloque l'entrée du site actif avec son cycle nicotinamide, partiellement recouvert pas la boucle de confinement. L'entrée du site actif présente d'ailleurs des résidus pouvant interagir avec le cycle via des interactions hydrophobes (*i.e.* Met214, Gly215, Ile218, Met276). Il est intéressant de noter que l'amide présent sur le cycle participe à une liaison hydrogène avec l'un des oxygènes du pont diphosphate, impliquant une planéité et une surface disponible importante. A partir de ces observations, nous avons choisi de travailler avec des couples comprenant un azoture et un alcyne cyclique contraint dans le but d'effectuer une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire. Cette réaction fait partie de la chimie dite « click », appellation qui décrit les réactions très sélectives capables de donner de très hauts rendements, applicables à de nombreux systèmes et conditions, et dont les produits sont stables.²¹ C'est en 1961, que pour la première fois, Krebs et Wittig découvrirent la réactivité d'azoture de phényle sur un alcyne contraint stable, une cyclooctyne.²² A la différence de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Sharpless impliquant un alcyne terminal, la réaction ne nécessite pas la présence de cuivre, ce qui en fait une réaction totalement inerte vis-à-vis de son environnement (Schéma 22).²³

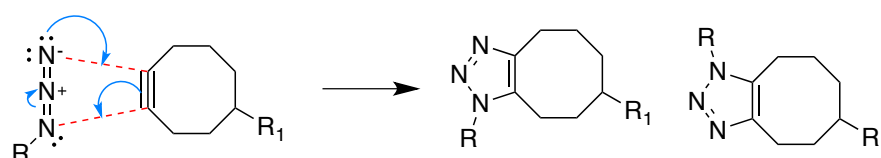


Schéma 22: Cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un cyclooctyne, conduisant à la formation de deux régioisomères si R₁ et/ou R sont différents de H.

Le fait d'être inclus dans un cycle crée une distorsion dans la géométrie de l'alcyne, le rendant plus réactif et diminuant l'énergie d'activation de la réaction.²⁴ En effet, l'ordre de grandeur de l'énergie d'activation passe de 20,9 kcal/mol dans le cas d'un alcyne allylique, à 10,4 kcal/mol en présence d'un cyclooctyne.²⁵ Cette énergie d'activation correspond à la somme de l'énergie de distorsion totale et de l'énergie d'interaction. Le mime du DXP porterait la fonction azoture et devrait être orienté vers l'extérieur du site actif pour augmenter les chances de réaction entre les deux partenaires. Le mime du cofacteur porterait le groupement cyclooctyne. La fonction alcyne devrait être proche de l'entrée du site actif de la protéine, à proximité de la position de l'azoture porté par le mime du DXP. Nous savons que la partie du cofacteur la plus proche du site actif correspond au cycle nicotinamide.^{15,16} Il est partiellement recouvert par la boucle de confinement composée des résidus 206 à 216 (base séquence *Escherichia coli*). Ces conditions pourraient être propices à l'initiation de la réaction bioorthogonale entre un azoture et un alcyne contraint, une fois que les deux molécules seraient à leur position respective. En effet, la boucle pourrait contraindre le cycle, ce qui diminuerait l'énergie d'activation du système (Figure 48).

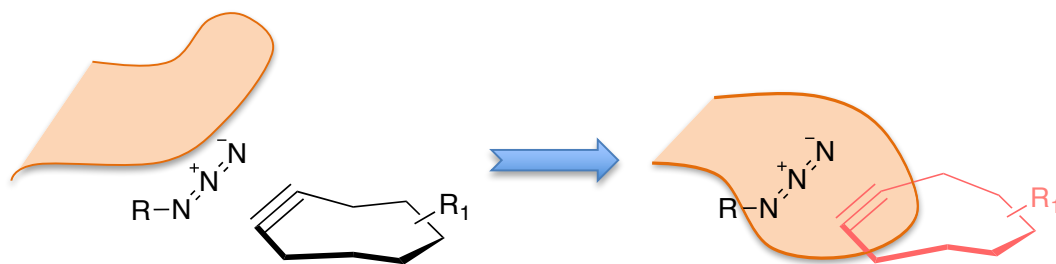


Figure 48: Schéma de l'effet potentiel de la boucle de confinement de la DXR sur la conformation de la cyclooctyne, conduisant à une réactivité plus importante de cette dernière.

D.1. Méthodes

Les molécules ont été élaborées à l'aide du logiciel Avogadro1.1.0.²⁶ Pour toutes les études de docking, la structure de la DXR issue de *E. coli* (PDBid 1Q0Q), cocrystallisée en présence du DXP et du cofacteur NADPH, a été utilisée.¹⁵ Le métal a été ajouté à partir des coordonnées du Mn^{2+} de la DXR possédant le PDBid 4AIC, cocrystallisée en présence de la fosmidomycine, du cofacteur NADPH et du métal Mn^{2+} , obtenues après superposition à la structure d'intérêt, et est converti en Mg^{2+} .²⁷ Les calculs de docking ont été effectués avec le programme AutoDock4.2, avec lequel 250000 évaluations sont réalisées par molécule et 2700 générations sont engendrées par l'algorithme génétique Lamarckien.⁹ La taille et les coordonnées des espaces conformationnels, utilisées pour les calculs de docking des molécules d'azotures sur la DXR et le métal, sont respectivement de 60-x, 40-y, 40-z points avec un espacement de 0,375 Å entre chacun, centrés sur les coordonnées [x:22,842 ; y:1,82 ; z:36,503]. Celles pour les docking des cyclooctynes réalisés sur les complexes DXR-azotures sont de 90-x, 90-y, 60-z points avec un espacement de 0,375 Å entre chacun, centrés sur les coordonnées [x: 36,29 ; y: 8,90 ; z: 32,76]. Celles des docking des cyclooctynes sur la protéine et le métal de 90-x, 90-y et 60-z points avec un espacement de 0,375 Å entre chaque point, centrés suivant les coordonnées [x: 36,296 ; y: 8,902 ; z: 32,762]. Celles des docking des azotures sur les complexes DXR-cyclooctynes de 80-x, 50-y, 40-z points avec espacement de 0,375 Å entre chacun, centrés sur les coordonnées [x:27,583 ; y:0,314 ; z:34,807]. Les docking des produits issus de la réaction bioorthogonale sur la DXR et le métal ont été effectués avec AutoDock Vina. La taille et les coordonnées de l'espace conformationnel étudié sont de 25,05-x, 21,93-y et 18,00-z points avec un espacement de 1 Å centrés selon l'axe [x: 32,48 ; y: 26 ; 63 ; z: 6,02].

D.2. Résultats et discussion

Cette partie peut être divisée en trois sections. La première d'entre elles concerne l'analyse de quatre analogues azotures dockés dans le site actif du DXP en présence du cation métallique. Pour chacun d'entre eux, la conformation possédant la position la plus adéquate a été retenue, c'est à dire celle qui respecte nos critères : i) le phosphonate dans le point d'ancrage, ii) l'acide rétro-hydroxamique proche du cation métallique, iii) l'azoture vers l'extérieur du site actif et potentiellement accessible. Les conformations retenues ont permis de construire des complexes avec la protéine et en présence du cation métallique, sur lesquelles des cyclooctynes commerciaux ont été dockés. La seconde section est similaire à la première, à l'exception que les cyclooctyne sont dockés en premier sur le récepteur DXR-cation métallique. Les conformations retenues (*i.e.* alcyne orienté et proche de l'entrée du site actif) sont ajoutées à la DXR et les complexes en résultant sont utilisés comme récepteur pour le docking des azotures. Enfin, la dernière partie concerne l'étude de docking des produits issus des réactions bioorthogonales entre certains partenaires sur la DXR en présence du cation métallique.

Du fait de la quantité de résultats provenant de ces travaux et pour faciliter la lecture de ce chapitre, nous avons décidé de placer certaines analyses des résultats du docking dans les Annexes p. 413 à 433. Nous allons, plus simplement, présenter un résumé ainsi que les remarques concernant les différents essais réalisés.

D.2.1. Choix des fragments

Elaborer des partenaires capables de se placer à proximité l'un de l'autre selon une orientation spécifique n'est pas commune. De plus, à ce jour le docking simultanés de deux fragments sur une même cible n'a pas encore été décrit. Pour pallier ce problème, différentes méthodes ont été développées.

A partir de la structure de l'inhibiteur fosmidomycine, nous avons substitué l'acide rétro-hydroxamique avec un azoture. L'espace entre ces deux fonctions varie de un à quatre carbones, conduisant à quatre molécules **83**, **84**, **86** et **87**, qui nous appellerons respectivement **Azo1**, **Azo2**, **Azo3** et **Azo4** (Schéma 23). La longueur de cette chaîne a été estimée en fonction de la distance du carbonyle du DXP, participant à la chélation au cation métallique, et du cycle nicotinique du cofacteur (données non présentées).

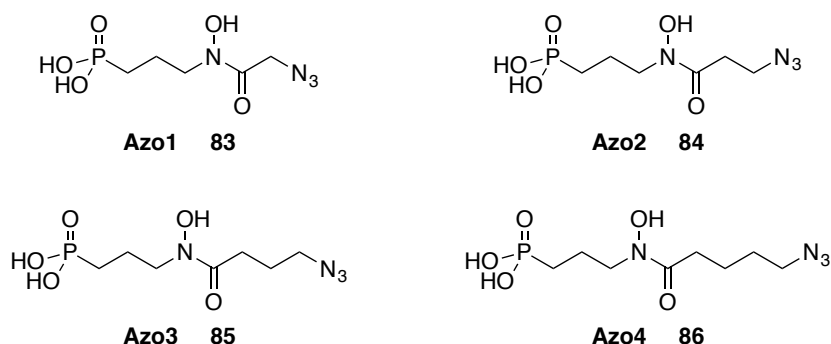


Schéma 23: Azotures devant se fixer dans le site actif de la DXR.

Le cyclooctyne est un fragment qui peut s'avérer délicat et contraignant à synthétiser. Lorsque c'est possible, il est préférable de travailler à partir de molécules commerciales. Cela permet de réaliser des économies de temps et d'argent non négligeables. Parmi les cyclooctynes commerciaux disponibles dans le catalogue du fournisseur *Sigma Aldrich*, quatre, de type bicyclononyne, ont été retenus (Schéma 24). La demande en cyclooctynes s'oriente généralement vers des molécules très réactives pour participer à des techniques de marquage rapides et efficaces.

Dans notre situation, une molécule trop réactive risquerait de déclencher la réaction entre les deux partenaires sans qu'ils soient fixés à leurs positions respectives sur la protéine. Les cyclooctynes choisis, **87**, **88**, **89** et **90** (respectivement nommés **CC1**, **CC2**, **CC3** et **CC4**), sont ceux qui possèdent une réactivité potentiellement compatible avec notre système, d'une taille raisonnable et pouvant être optimisés (**87** et **89**) (Schéma 24).^{19c}

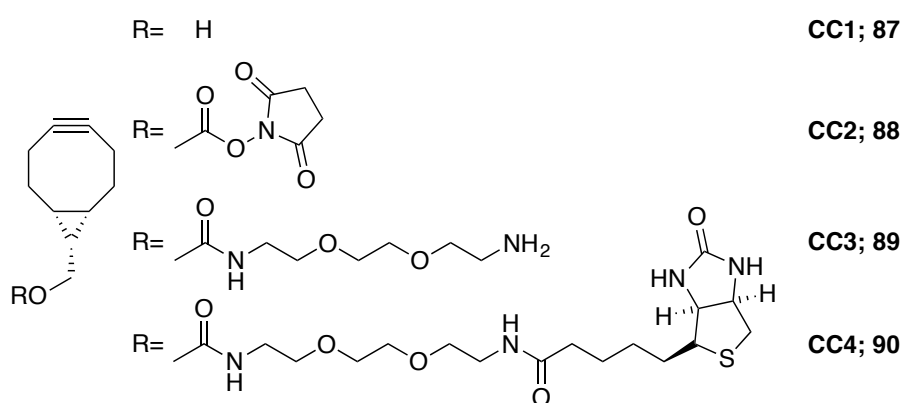


Schéma 24: Cyclooctynes commerciaux sélectionnés et disponibles chez *Sigma Aldrich*.

D.2.2. Docking sur les complexes analogues azotures

Dans cette partie, une étude de docking des composés azotures sur la DXR a été effectuée, suivi d'un docking des cyclooctynes. Les analogues azotures de la fosmidomycine ont été dockés sur la DXR de PDBid 1Q0Q en présence du Mg^{2+} sans cofacteur afin de ne pas bloquer l'orientation de l'azoture vers l'extérieur du site actif.¹⁵ Pour chacun des azotures, la conformation, possédant l'estimation d'énergie de liaison la plus basse ainsi qu'une position correcte, a été extraite et conservée (voir les Annexes p. 422-423). Toutes les structures finales doivent avoir le phosphonate au niveau du point d'ancrage, la fonction chélatante à proximité du métal et l'azoture orienté vers l'extérieur du site actif. A partir du protocole défini dans la partie « Méthodes » de ce chapitre, nous avons retenu dix conformations issues des analyses de docking des quatre composés azotures qui sont présentées dans le Tableau 35 p. 418 figurant dans les Annexes.

Les énergies libres de fixation estimées des conformations sélectionnées (*i.e.* pour lesquelles l'azoture semble le plus accessible) varient de -7,64 kcal/mol pour l'**Azo2-1_1 84** à 6,42 kcal/mol pour l'**Azo1-1_3 83** (Figure 49). Les dix conformations d'azotures retenues ont servi à construire des complexes DXR-ligands, qui sont par la suite utilisés comme récepteur pour le docking des cyclooctynes.

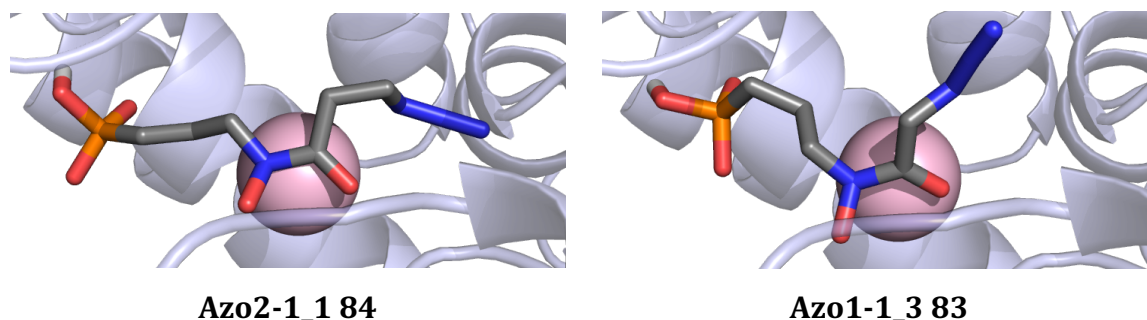


Figure 49: Représentation des conformations Azo2-1_1 84, possédant la meilleure estimation d'énergie, et Azo1-1_3 83, possédant la moins bonne estimation d'énergie.

Le même protocole, utilisé précédemment pour les azotures, a été employé pour docker les cyclooctynes commerciaux, conduisant à un total de onze conformations sélectionnées, présentant des cyclooctynes orientés favorablement vers les fonctions azotures des ligands des récepteurs proposés. Les complexes composés des conformations issues d'**Azo2 84** sont ceux ayant fourni le plus de résultats intéressants, tant d'un point vu conformationnel qu'énergétique.

CC2 88 a obtenu les meilleures énergies de fixation lors des docking en présences des composés **Azo2 84** et **Azo3 85**, avec des énergies libres de fixation respectives estimées de -8,24 kcal/mol et de -8,84 kcal/mol (Figure 50). Les résultats pour chacun des complexes sont présentés dans les Annexes (p. 415 à 418).

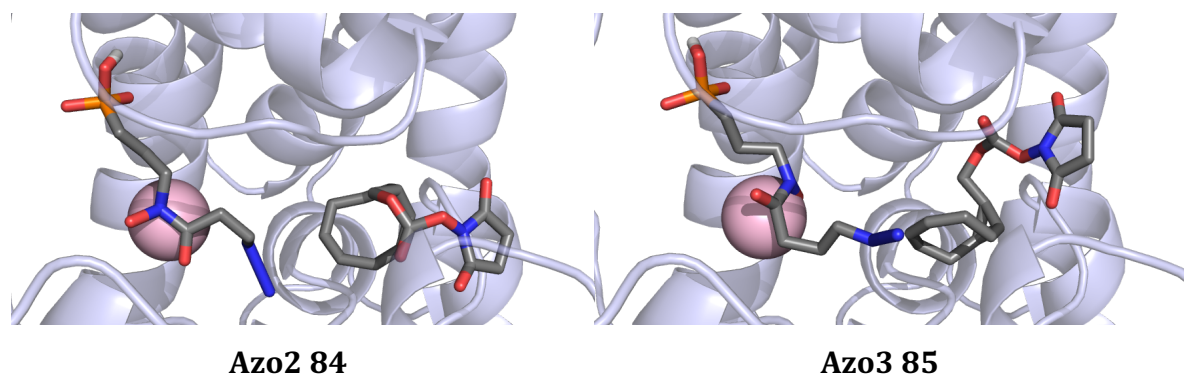


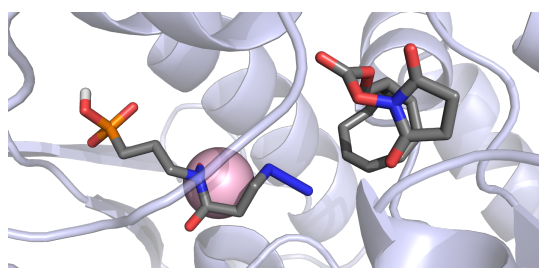
Figure 50: Représentation des deux meilleures conformations de CC2 88 après docking sur les complexes DXR-Azo2 84 et DXR-Azo3 85.

A partir de ces résultats, il n'est pas évident de pouvoir trancher sur la faisabilité de la réaction de bioorthogonalité concernant les couples sélectionnés. Nous pouvons néanmoins indiquer que l'**Azo2 84** et l'**Azo3 85** semblent posséder des longueurs d'espaceur adéquates pour interagir avec un partenaire. Le cyclooctyne **CC2 88** présente pour le moment les énergies de fixation les plus favorables. L'ajout d'un degré de liberté pour le fragment portant l'azoture lors du docking permettrait d'obtenir des résultats plus précis.

D.2.3. Docking d'azotures sur complexes DXR/Cyclooctyne

A priori, il n'y a pas de raisons qui puissent suggérer qu'un ligand avec un azoture devrait se fixer en premier dans le site actif, par rapport à un cyclooctyne. Pour examiner l'effet induit par la présence d'un cyclooctyne sur la fixation potentielle d'un azoture, une nouvelle stratégie a été mise en place. Nous avons tout d'abord docké les cyclooctynes avec comme récepteur le complexe DXR-cation métallique. Les analyses de docking ont été entreprises en présence des cyclooctynes commerciaux d'intérêts comme ligand, sur la DXR en présence du cation métallique. Les conformations pour lesquelles l'alcyne est orienté vers l'entrée du site actif de la protéine ont été retenues, et sont au nombre de neuf. Par la suite, les azotures ont été dockés à leur tour sur chacun des récepteurs correspondant aux complexes DXR-cyclooctynes, conduisant à la sélection de six structures finales, présentées dans le Tableau 40 p. 424 figurant dans les Annexes.

Les docking des différents azotures sur les complexes DXR-cyclooctynes en présence du Mg^{2+} ont montré que les conformations de plus basses énergies se logeaient majoritairement dans le site actif de la DXR. Les énergies de fixation estimées varient de -7,86 kcal/mol pour le couple **CC2-1_5 88** et **Azo2 84** à -6,98 kcal/mol pour le couple **CC2-1_5 88** et **Azo4 86**. Pour autant, plusieurs structures présentent une orientation de la fonction azoture peu exploitable. Seuls les complexes impliquant deux conformations de la **CC2 88** (*i.e.* DXR/CC2-1_4 et DXR/CC2-1_5) ont produit des résultats intéressants (Figure 51).



CC2-1_5 88 et Azo2 84

-7,86 kcal/mol

Figure 51: Représentation de la conformation de l'azoture de plus basse énergie retenue, impliquant CC2 88 et Azo2 84.

Les conformations retenues possèdent des énergies et des positions similaires (cf. Annexes, Tableau 41 p. 424). L'**Azo3 85** n'a pas été retenu et les composés **Azo1 83** et **Azo2 84** sont les plus représentés. Seul le complexe DXR avec le cyclooctyne **CC2 88** a montré des conformations de docking intéressantes pour les azotures d'intérêts, excepté pour **Azo3 85**. Les énergies estimées des trois azotures **Azo1 83**, **Azo2 84** et **Azo4 85** sont similaires, les trois couples formés avec la **CC2 88** peuvent être envisagés. Comme lors de la précédente étude, la **CC2 88** ressort dans nos résultats ainsi que l'**Azo2 84**. Ces résultats suggèrent que cette combinaison pourrait être intéressante comme point de départ pour le développement d'inhibiteurs bisubstrats potentiels de la DXR.

D.2.4. Docking de produits potentiellement issus de la réaction de cycloaddition

Dans cette troisième section, nous avons étudié certains produits des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaires afin d'accéder à une estimation de fixation des produits finaux de la réaction bioorthogonale. La cyclooctyne **CC2 88** ayant montré les résultats les plus intéressants, les produits résultants de la réaction avec les quatre azotures ont été élaborés (Schéma 25).

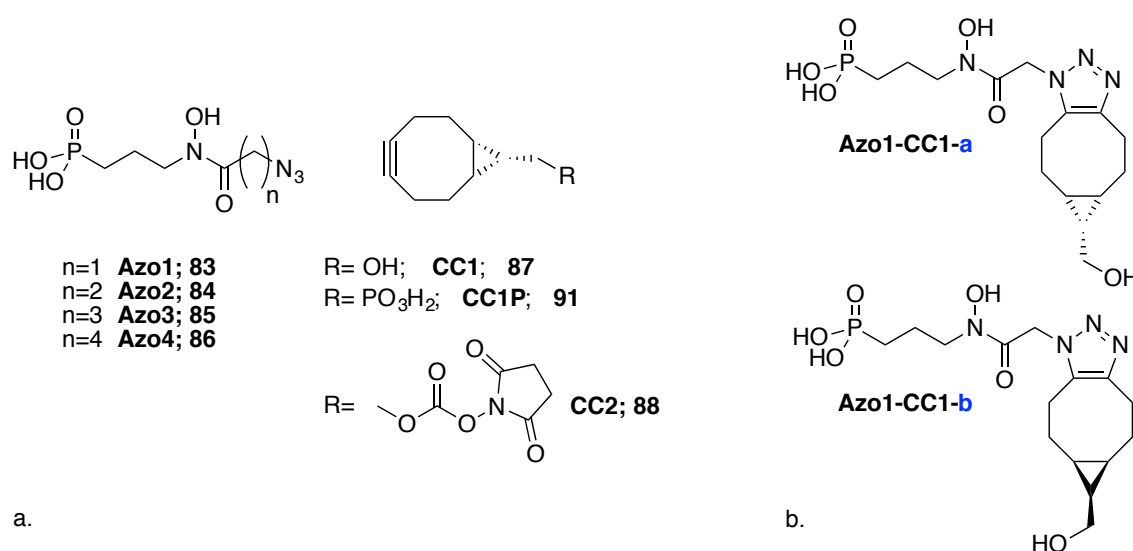


Schéma 25: a) Azotures et alcynes ayant été utilisés pour produire les molécules issues de la réaction de cycloaddition ; b) Régioisomères issus de la réaction bioorthogonale entre CC1 87 et l'Azo1 83.

Nous avons également inclus dans cette étude les produits issus de la réaction de la **CC1 87** et de sa version phosphonate (**CC1P 91**) avec les azotures, le but étant d'évaluer la possibilité de fonctionnalisation. Pour chaque couple de molécules, deux régioisomères peuvent être formés (Schéma 25). Chacun d'eux est modélisé puis docké sur la protéine, en présence du métal. Pour chacune des molécules, seule la conformation de plus basse énergie est analysée. Si une molécule interagit avec la Ser186, présente au niveau du point d'ancrage dans le site actif, de par sa fonction phosphonate, la conformation est retenue.

Sur les différentes combinaisons testées, dix ont été retenues. La **CC2 88** est représentée une seule fois, de par le produit **Azo2-CC2-b 92**, issu de la réaction de cycloaddition de l'**azo2 84** et de la **CC2 88**. Il possède une énergie de fixation estimée à -10 kcal/mol, la plus basse de celles de toutes les conformations sélectionnées (Figure 52).

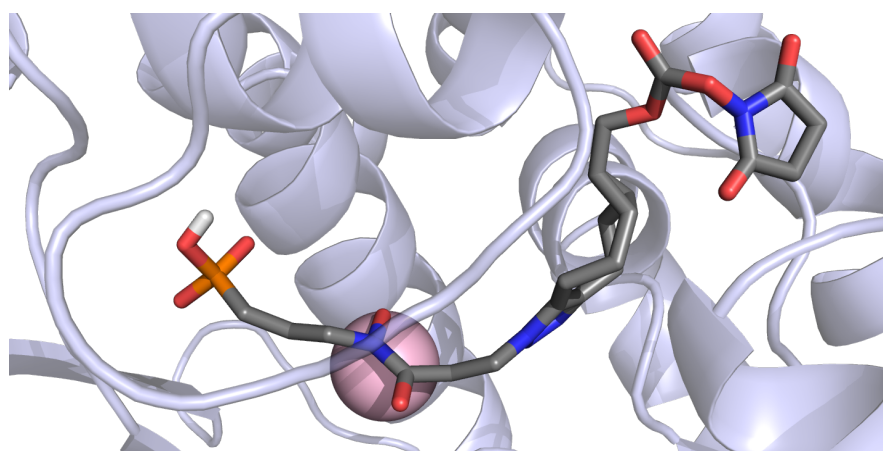


Figure 52: Conformation du produit de la cycloaddition de l'azoture 84 avec la cyclooctyne 88, conduisant au composé 92, possédant une énergie de fixation estimée de -10 kcal/mol.

Bien que les précédents résultats du docking d'azotures sur les complexes DXR/CC1 **87** n'ont pas donné de résultats très concluants, les produits issus de la cycloaddition avec les azotures montrent des énergies estimées plus efficaces.

En effet, ils présentent des estimations d'énergies de fixation et des conformations intéressantes pour chacun des azotures. Nous avons également montré que l'ajout d'un phosphonate sur le cycle **CC1 87** augmente légèrement les interactions en favorisant la fixation à la surface de la protéine. Cette position pourrait éventuellement être optimisée. Les détails de ces résultats sont présentés dans les Annexes (Tableau 42 p. 427). En résumé, le couple **Azo2-CC2 92** conduirait à une molécule se fixant efficacement à la DXR. Les couples formés à partir de la **CC1 87** ont également montré des estimations d'énergies favorables. Or, celle-ci n'a pas été retenue durant nos précédentes analyses Il serait intéressant de tester l'inhibition de cette molécule **CC1 87** en présence de l'**Azo2 84**, ces deux composés seuls, ainsi que le mélange de régioisomères préalablement formés par la réaction de cycloaddition au niveau du site actif de la DXR. Nous pourrions alors déterminer si le produit est capable d'inhiber l'activité de la protéine et si la réaction est capable de se produire *in situ*. L'ajout d'un phosphonate à **CC1 87**, conduisant à la **CC1P 91** montre une légère amélioration des énergies. Il pourrait être envisagé de travailler à l'optimisation de cette molécule.

D.3. Conclusion approche bisubstrat

Durant cette étude d'inhibiteurs de type bisubstrat, nous avons développé trois stratégies de docking afin de raffiner nos résultats. D'après nos analyses, **CC2 88** semblerait être un alcyne prometteur. En effet, pour les trois méthodes présentées, ce cyclooctyne a fourni des énergies libres de fixation estimées pertinentes, notamment en présence de l'**Azo2 84**. La dernière étude de docking réalisée sur les produits potentiellement formés, à partir de la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire, a montré des conformations favorables impliquant la **CC1 87**. Hors, cette dernière ne présentait pas de résultats intéressants dans les études précédentes. L'ajout de la fonction phosphonate à la **CC1 87** améliore les énergies de fixation estimées, indiquant qu'une optimisation de cette position pourrait améliorer les capacités de fixation.

A partir de ces résultats, il est difficile d'évaluer l'efficacité des molécules proposées. Pour que la réaction bioorthogonale se réalise entre la fonction azoture et l'alcyne contraint, il faut que les deux partenaires se trouvent à proximité l'un de l'autre et fixé à la protéine. Cette situation n'a pas obligation d'être longue dans le temps, il faut seulement qu'elle se produise pour amorcer la cyclisation. Inclure une flexibilité ou liberté de mouvement à la cyclooctyne ou à l'espaceur et l'azoture, en fonction de qui fait partie du récepteur, s'avèrerait intéressante, mais cela n'est pas réalisable avec le logiciel utilisé. De plus, d'autres analyses complémentaires aux études docking, comme des simulations de dynamique moléculaire, seraient nécessaires.

E. Approche biligand

Comme décrit dans l'introduction de ce chapitre, un biligand est une molécule interagissant avec deux sites de fixations différents plus ou moins éloignés. Dans notre situation, ces cibles sont le site de fixation du DXP et du cofacteur NADPH. L'objectif est de concevoir des molécules possédant des fonctions pouvant interagir avec ces sites. Plusieurs approches ont été développées pour ces travaux, et comme précédemment, dans ce chapitre nous allons uniquement présenter les principaux résultats. Les détails des analyses sont présentés dans les Annexes p. 418 à 427. Pour débiter ces travaux, nous avons conservé la structure de base de la fosmidomycine **33** comme mime du DXP **14**, comprenant une fonction phosphonate pour se fixer au niveau du point d'ancrage, un squelette carboné non substitué et une pince de type acide rétro-hydroxamique. Plusieurs fragments ont servi de substituant pour cette pince, dans le but d'interagir avec le site de fixation du NADPH et de concevoir des inhibiteurs potentiellement efficaces.

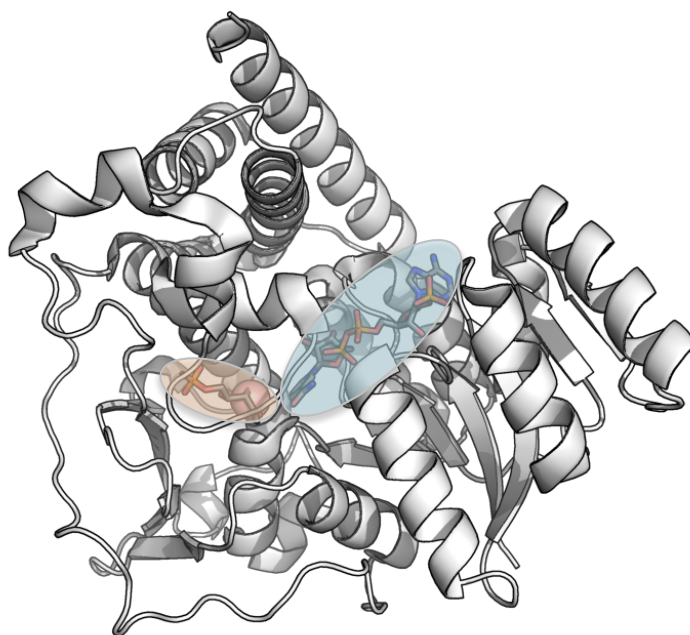


Figure 53: DXR (PDBid 1Q0Q) en représentation ruban et en présence du DXP et du NADPH en bâtonnets et du Mg^{2+} en sphère. En couleur orange et bleu sont indiqués les sites de fixation cibles de l'approche biligand.

E.1. Méthodes

Les molécules ont été modélisées à l'aide du logiciel Avogadro1.1.0.²⁶ Pour toutes les études de docking la structure de la DXR issue de *E. coli* (PDBid 1Q0Q), cocrystallisée en présence du DXP et du cofacteur NADPH, a été utilisée.¹⁵ Le métal a été ajouté à partir des coordonnées du Mn^{2+} de la DXR possédant le PDBid 4AIC, cocrystallisée en présence de la fosmidomycine, du cofacteur NADPH et du métal Mn^{2+} , obtenu après superposition à la structure d'intérêt, et est remplacé par Mg^{2+} .¹³ Les calculs de docking ont été effectués avec le programme AutoDock Vina en utilisant l'interface graphique Raccoon.⁹ La taille et les coordonnées des espaces conformationnels utilisées pour les calculs de docking des fragments de la première méthode sont de 40-x, 40-y et 30-z points avec un espacement de 1 Å entre chacun, centrés sur [x : 32,48, y : 6,02 ; z : 26,63], celles concernant les parties dédiées à la conception de ligands sont de 23-x, 18-y et 15-z points, avec un espacement de 1 Å entre chacun et des coordonnées de [x : 23,03, y : 2,53; z : 36,62].

E.2. Première méthode : Etude à partir de fragments

Pour commencer, une recherche des interactions potentiellement exploitables à la surface de la protéine a été réalisée. Dans ce but, un criblage de 350 molécules de structures très variées, issues d'une librairie d'Avogadro, est effectué sur la DXR possédant la boucle fermée (*i.e.* résidu 206 à 216 d'après la séquence d'*E. coli*).²⁶ Ces structures vont de l'acide aminé à des molécules aromatiques et sont composées de carbones, d'hydrogènes, d'azotes ou d'oxygènes. Autodock Vina est utilisé pour effectuer ce criblage. Les coordonnées de chaque atome de toutes les conformations, issues des résultats de docking, sont concaténées dans un même fichier. Les atomes trop éloignés des zones d'intérêts, ou dans des zones peu peuplées, ne sont pas retenus (Figure 54). Nous obtenons ainsi une carte de population et de type d'atomes tapissant la surface des zones d'intérêts potentielles, permettant de nous faire une idée des interactions pouvant être exploitées.

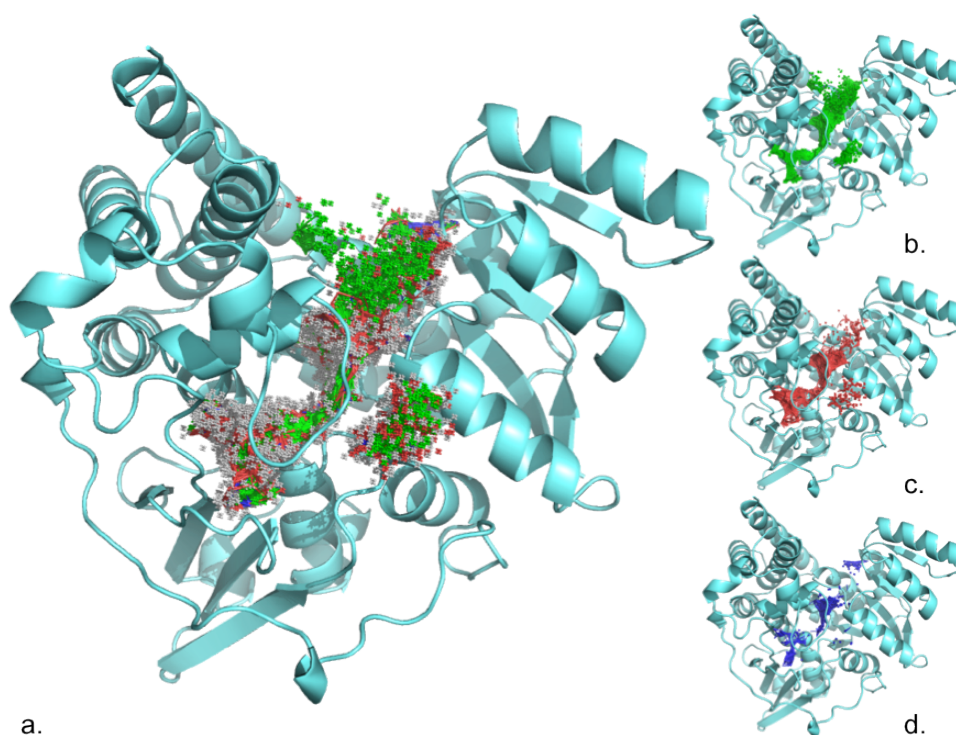


Figure 54: a) Atomes des conformations issues du docking des 350 molécules sur la EcDXR. En vert sont représentés les carbones (b), en blanc les hydrogènes, en rouge les oxygènes (c) et en bleu les azotes (d).

Le site actif enzymatique et celui du cofacteur sont bien représentés. Il est intéressant de noter que par superposition avec le DXP, la présence d'une cavité sous la fonction phosphate est décelée (Figure 55). Cet espace disponible rappelle les inhibiteurs à pince hydroxamique substitués en α par un groupement aryle et ou un groupement oxa ou thia en β (**65** à **68**), dont certains ont montré d'excellentes inhibitions (voir chapitre « I. Introduction », Tableau 5, p. 45).^{28,29}

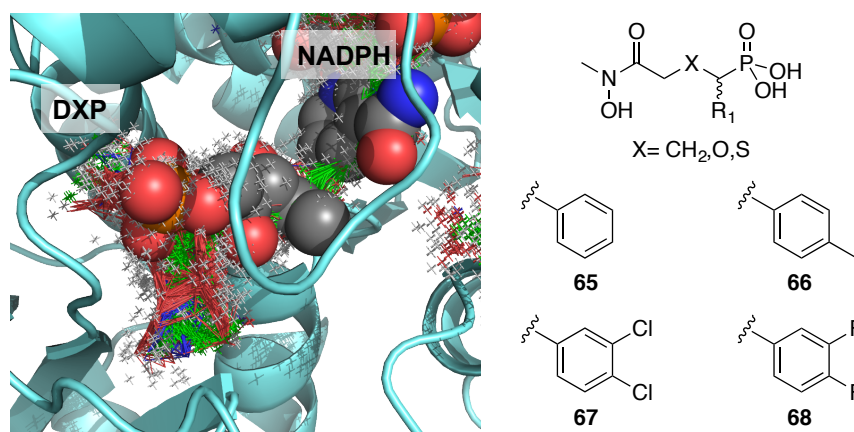


Figure 55: Site actif du DXP en présence de ce dernier ainsi que le NADPH, tous deux représentés en sphères. Les structures des inhibiteurs de la DXR hydroxamique α -substitués par un groupement aryle et avec un groupement oxa ou thia en β sont rappelées.

Publié que très récemment, durant la rédaction de cette partie, le programme AutoSite permet d'identifier les sites de fixation probables d'une protéine.³⁰ Les sites détectés par AutoSite sont représentés sous forme de clusters, pour lesquels chaque point prédit soit une interaction hydrophobe, soit une liaison hydrogène avec un résidu accepteur ou donneur. Nous avons réalisé un essai sur la DXR (PDBid 1Q0Q) en présence du métal Mg^{2+} afin de comparer les clusters prédits par AutoSite avec nos résultats précédents. Le cluster principal, englobant le site actif du DXP et le site de fixation du cofacteur, est similaire à celui que nous avons obtenu avec la méthode de criblage (Annexes, Figure 65, p. 428). Les interactions prédites sont cohérentes avec ce que nous présentons, permettant, nous confortant dans l'utilisation des résultats du criblage lors de nos travaux. Les informations fournies par ces coordonnées atomiques donnent accès à une multitude d'architectures moléculaires qui nous ont servi de base à la construction de molécules de type biligand.

Ne possédant pour le moment les connaissances informatiques nécessaires pour écrire un script permettant d'explorer ces nombreuses possibilités, cette recherche a été faite manuellement. Pour faciliter notre démarche, nous n'avons conservé que les modèles élaborés possédant la base fosmidomycine, comme mime du DXP. La conception de potentiels inhibiteurs de type biligand concerne principalement l'optimisation des interactions avec le site de fixation du cofacteur. La faisabilité chimique des molécules retenues sera discutée avec les chimistes ultérieurement. Tout au long de ce travail, de nombreuses combinaisons ont été envisagées et dockées. Pour en faciliter la compréhension, elles sont représentées schématiquement et seules celles ayant montré des résultats constructifs seront détaillées dans les Annexes p. 429 à 438.

L'exercice de conception moléculaire réalisé pour ce projet a été fait en trois étapes. La première de ces étapes est la conception d'une première série de molécules, fondée sur le squelette de la fosmidomycine, a été réalisée en substituant le rétro-hydroxamate par différents dérivés aryles et naphtyles. La seconde étape implique une étude plus orientée vers l'utilisation de fragments aromatiques substitués. Enfin, la troisième et dernière étape concerne une étude de conception à partir de composés commerciaux.

E.2.1. Conception : 1^{ère} partie

Les principales interactions polaires entre la DXR et le cofacteur NADPH sont fondées sur des structures cristallines et décrites dans la littérature, ainsi que celles déterminées par nos analyses MM/PBSA (données non présentées).³¹ Elles sont localisées au niveau du pont diphosphate et du ribose 2'-phosphate du NADPH (Figure 56).

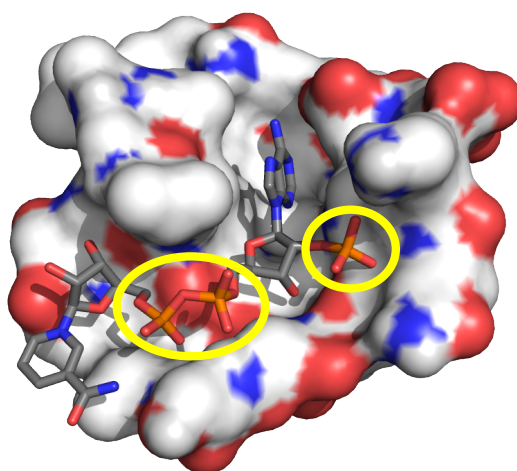


Figure 56: Site de fixation du NADPH représenté en surface, coloré en fonction du type d'atome (rouge pour les oxygènes, bleu pour les azotes, blanc pour les hydrogènes) avec le NADPH en bâtonnets. Le pont diphosphate et le 2'phosphate sont entourés d'une ellipse jaune.

Le ribose 2'-phosphate du NADPH contribuerait majoritairement à la fixation du cofacteur à la DXR, car en présence de son analogue NADH, l'activité de la DXR diminue drastiquement à 1%.³² La région interagissant avec le cycle nicotinamide est relativement hydrophobe. Il est partiellement recouvert par la boucle de confinement et obstrue l'entrée du site actif. La conception d'une première série de molécules, fondée sur le squelette de la fosmidomycine, a été réalisée en substituant l'hydroxamate par différentes combinaisons de dérivés aryles et naphthalènes, sélectionnées à partir des informations issues du criblages (Schéma 26).

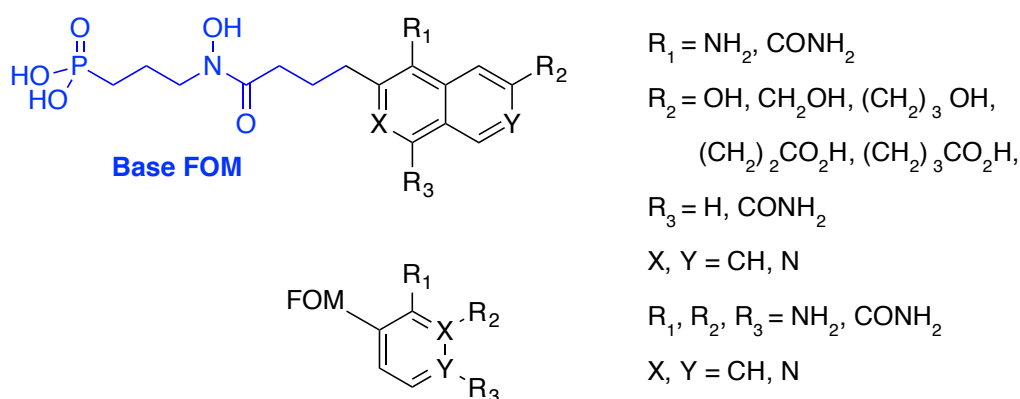
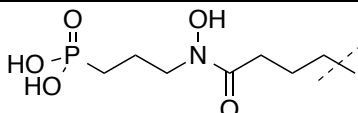
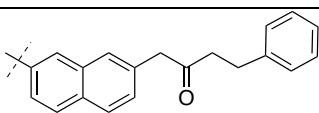
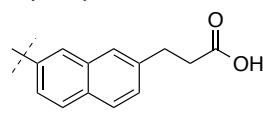
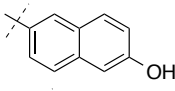
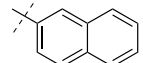


Schéma 26: Différents modèles de biligands dockés sur la DXR, dans le cadre de l'optimisation des interactions potentielles avec le site de fixation du NADPH. Lorsqu'un azote participe à un cycle aromatique, cet atome n'est pas substitué et les autres atomes y participants sont des carbones.

Les critères de sélection des molécules dockées sont les interactions du phosphonate du mime du DXP avec l'un des deux résidus clés du point d'ancrage : la Ser186 et/ou l'His209, imposant ainsi aux molécules retenues d'interagir avec le site actif de la DXR. Quinze molécules ont passé ce filtre et sont représentées dans le Tableau 43 p. 429 des Annexes. Les énergies libres de fixation estimées pour les quatre meilleures conformations sélectionnées oscillent de -10,6 à -9,7 kcal/mol (Tableau 16).

Tableau 16: Energies libres de fixation estimées en kcal/mol des quatre meilleures molécules ayant passé le filtre d'interactions avec la Ser186 et/ou l'His209.

|  | |
|---|---|
| Substituant | Energie de fixation estimée (kcal/mol) |
|  | 92 -10,6 |
|  | 93 -10,3 |
|  | 94 -9,7 |
|  | 95 -9,7 |

La molécule **92** possède la meilleure estimation d'énergie de fixation, qui est de -10,6 kcal/mol. Malgré de bonnes estimations d'énergies, certaines molécules ne possèdent pas la conformation idéalement souhaitée, comme par exemple les molécules **100**, **102**, **103** et **106** (Annexes, Tableau 43 p. 429). Leur phosphonate interagit avec l'His209, mais est positionné entre l'His209 et le métal, plaçant la pince à l'extérieur du site actif (B, Figure 57).

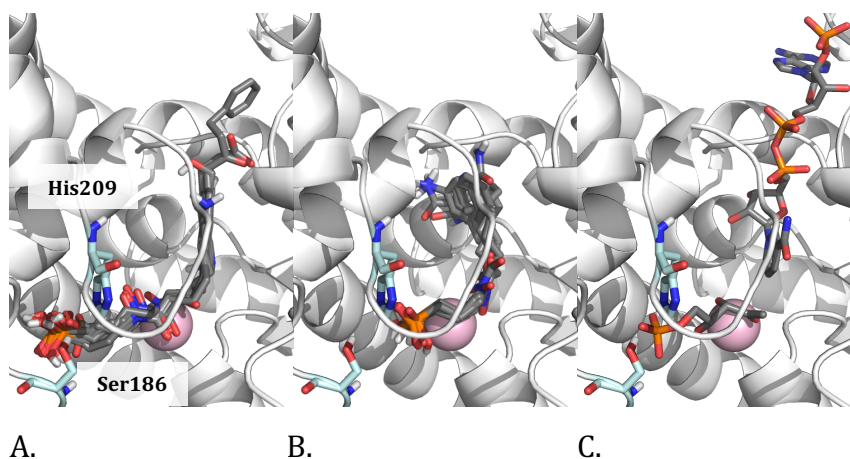


Figure 57: Superpositions des conformations dockées sélectionnées en représentations bâtonnées sur la DXR (PDBid 1Q0Q) en présence du métal ; A) Conformations sélectionnées possédant le phosphonate au niveau du point d'ancrage ; B) Conformations avec l'hydroxamate à l'extérieur du site actif ; C) DXP et NADPH issus de la structure PDBid 1Q0Q.

Lorsque le phosphonate est fixé au niveau du point d'ancrage, les aromatiques se placent à l'endroit où se loge le cycle nicotinamide du cofacteur (A et C, Figure 57). Quand le phosphonate est entre l'His209 et le cation métallique, l'hydroxamate se trouve à l'extérieur du site actif, proche de la position de l'amide du cycle nicotinamide du cofacteur. Les aryles se positionnent dans la zone de fixation du ribose. Après superpositions, nous observons que certaines fonctions des molécules analysées présentent des interactions polaires communes avec celles du NADPH (Figure 58).

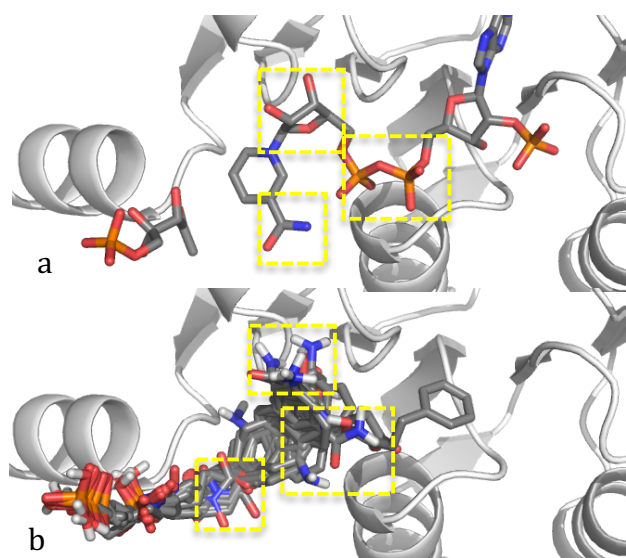


Figure 58: a. DXP et NADPH complexés à la DXR ; b. Superposition des conformations retenues par le filtre d'interactions Ser186 et/ou His209.

E.2.2. Conception : 2^{ème} partie

Les résultats des analyses précédentes ont permis d'évaluer l'impact issu de la présence d'aromatiques (Tableau 16). A la vue des estimations d'énergies de fixation, l'étude de ce type de fragments a été poursuivie (Schéma 27, Fragment-1). Pour minimiser le temps de conception, une seule position est substituée à la fois.

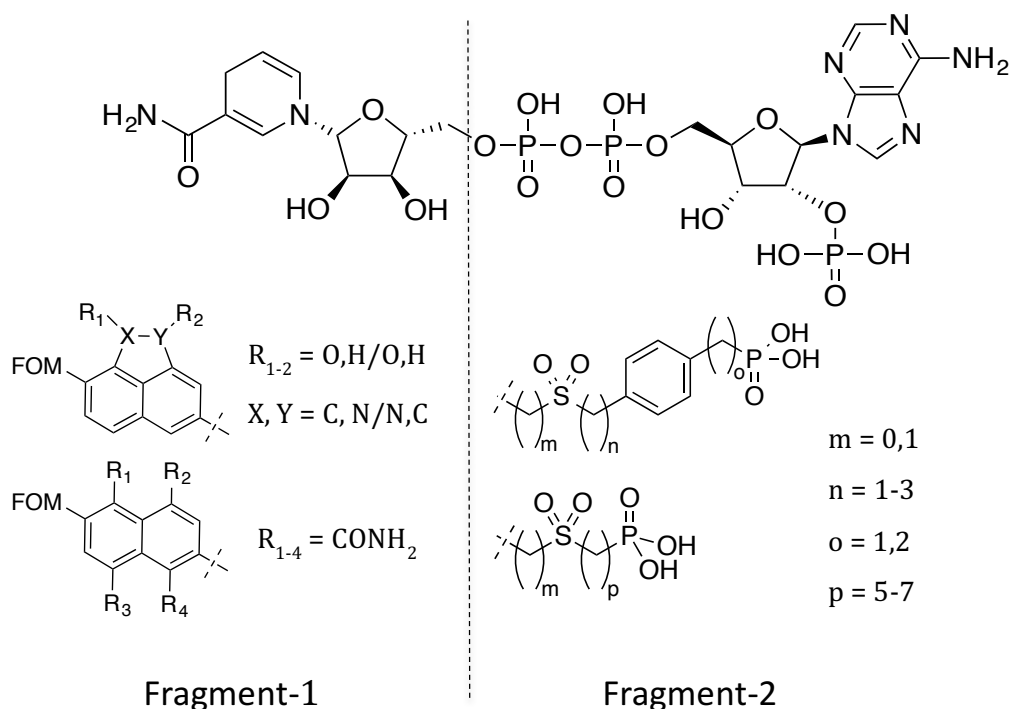
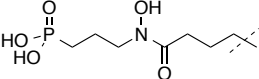
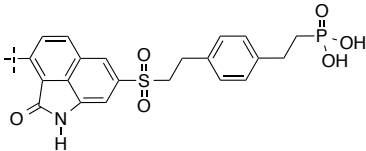
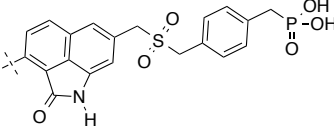
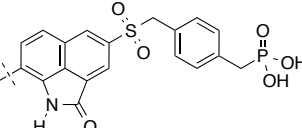
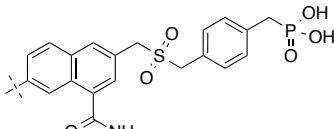


Schéma 27: Structures de biligands dockées sur la DXR, optimisation des régions mimant le cycle nicotinamide (Fragment-1), le diphosphate et le ribose 2'-phosphate (fragment-2). Le NADPH est indiqué comme modèle.

Dans la première partie de ces travaux, nous avons observé que le **92** pourrait atteindre la région d'interaction du ribose 2'-phosphate du NADPH (Figure 58). Dans le but de reproduire de tels résultats, des dérivés du sulfonyle à queue phosphonate de différentes longueurs de chaîne ont été conçus (Schéma 27, Fragment-2) et dockés suivant le protocole défini. Pour sélectionner des résultats cohérents avec les conformations de ligands connus, nous avons choisi d'appliquer deux filtres : i) interactions avec la Ser186 et/ou l'His209 avec la fonction phosphonate du squelette fosmidomycine ; ii) interactions avec la Thr10 et le Trp212.

La Thr10 est décrite comme interagissant avec le ribose 2'-phosphate du NADPH et le Trp212 est un résidu de la boucle de confinement du site actif.^{15,16} Ces deux filtres ont permis de retenir treize molécules, dont leurs énergies de fixation, ainsi que leur classement, sont présentés dans le Tableau 44 p. 431 des Annexes. Elles possèdent des estimations d'énergies libres de fixation proches, de -11,7 à -10 kcal/mol. Ces dernières sont plus favorables que celles de la série précédente (Annexes Tableau 43 p. 429). Les quatre meilleures conformations sont présentées dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Energies libres de fixation estimées en kcal/mol des quatre meilleures molécules ayant passé le filtre d'interactions avec la Ser186 et/ou l'His209, Thr10 et le Trp212.

| Molécule | Energie de fixation estimée (kcal/mol) | |
|---|---|-------|
|  | | |
|  | 107 | -11,7 |
|  | 108 | -11,5 |
|  | 109 | -11,5 |
|  | 110 | -11,4 |

Les dérivés naphlostyriles (*i.e.* **107**, **108**, **109**, **111**, **112**, **115**, **117** et **119**, Annexes, Tableau 44 p. 431) sont majoritairement représentés par rapport aux naphthalènes carboxamides (*i.e.* **110**, **113**, **114** et **116**, Annexes, Tableau 44 p. 431). Les composés possédant un naphthalène substitué par un amide, interagissent dans la zone de fixation du ribose, excepté pour le **115**, dont l'amide est situé à l'entrée du site actif, comme celui du NADPH (Figure 59). Les conformations sélectionnées ont toutes leur sulfonyle au niveau de la zone d'interaction du pont diphosphate du cofacteur. La Thr10 est atteinte en présence de 8 à 9 liaisons espaçant le naphthalène et le phosphonate. La présence d'un phényle entre ces deux fonctions améliore les énergies de fixation estimées, indiquant qu'une structure rigide semble plus favorable.

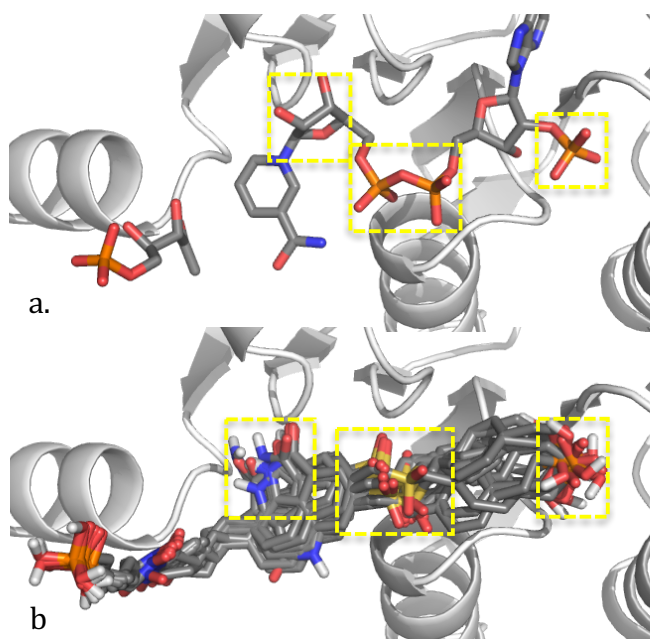


Figure 59: a. DXP et NADPH complexés à la DXR ; b. Superposition des conformations retenues par le filtre d'interaction avec la Ser186 et/ou l'His209, la Thr10 et le Trp212.

E.2.3. Conception : 3^{ème} partie

Les résultats de docking précédents indiquent qu'il serait possible d'atteindre le point de fixation du ribose 2'-phosphate, crucial pour l'activité enzymatique de la DXR.³² Pour cette nouvelle série, nous avons cherché à optimiser la fonction sulfonyle (Schéma 28). La longueur de l'espaceur entre le squelette fosmidomycine et le fragment naphthyle est également étudiée. Les filtres utilisés précédemment sont conservés pour ces analyses, conduisant à la sélection de cinq molécules (Tableau 18).

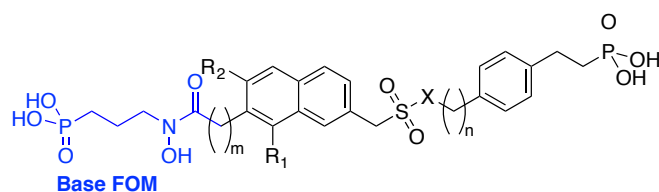


Schéma 28: Structures de biligands dockées sur la DXR, optimisation de la fonction sulfonyle.

Tableau 18 : Energies libres de fixation estimées en kcal/mol des cinq molécules ayant passé le filtre d'interactions avec la Ser186 et/ou l'His209, la Thr10 et le Trp212.

| Molécule | Energie de fixation estimée (kcal/mol) | |
|----------|--|-------|
| | 120 | -11,7 |
| | 121 | -11,5 |
| | 122 | -10,4 |
| | 123 | -10 |
| | 124 | -10 |

Les trois premières molécules, **120**, **121** et **122**, possèdent une fonction sulfonamide à la place de la fonction sulfonyle. Seule la quatrième molécule **123** présente un naphthalène substitué par un amide. Elle obtient la même estimation d'énergie que son analogue naphthalène non substitué **124**, suggérant que l'amide n'est pas nécessaire ou approprié pour interagir dans cette zone. Les conformations retenues s'alignent sur celles cristallographiques des DXP et NADPH.^{15,16} Les zones cibles d'interactions du cofacteur sont respectées : i) mime du pont diphosphate avec les sulfonamides et sulfonyles, ii) mime du 2'ribose phosphate par le phosphonate (Figure 60).

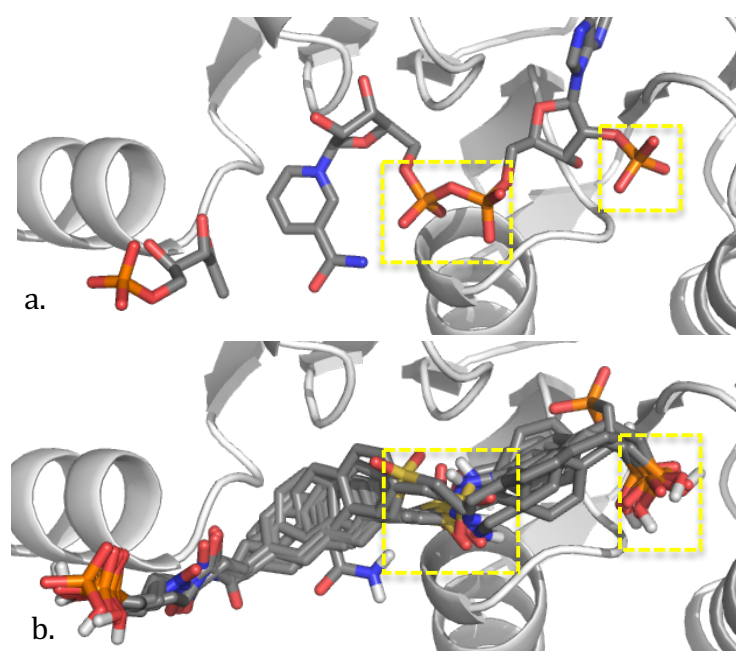


Figure 60: a. DXP et NADPH complexés à la DXR ; b. Superposition des conformations retenues par le filtre d'interactions avec la Ser186 et/ou l'His209, la Thr10 et le Trp212.

E.2.4. Conclusion de la première méthode : Etude à partir de fragments

A partir de ces résultats de docking, plusieurs molécules ont été retenues, interagissant avec des zones importantes, comme le site actif du DXP, la zone de fixation du cycle nicotinamide, celle du pont diphosphate, ainsi que le point de fixation du ribose 2'-phosphate.

Nous avons pu concevoir des molécules possédant des énergies libres de fixation estimées inférieures à -10 kcal/mol, laissant supposer des activités potentielles inhibitrices. Des études de dynamique moléculaire ainsi que des analyses de contributions par résidu pourraient être réalisées sur les composés intéressants et potentiellement synthétisables pour compléter nos analyses. Nous avons pu déterminer des critères structuraux qui pourraient conduire à des molécules intéressantes (Figure 61). Dans ces critères, nous retrouvons le mime du DXP, devant posséder une fonction chélatante et une devant se fixer dans la zone du point d'ancrage. Il pourrait être espacé de deux à trois liaisons d'un groupement naphthyle substitué en position 5, par une queue à tête polaire plus ou moins rigide. Cette dernière devrait idéalement être espacé de sept à huit liaisons du naphthyle.

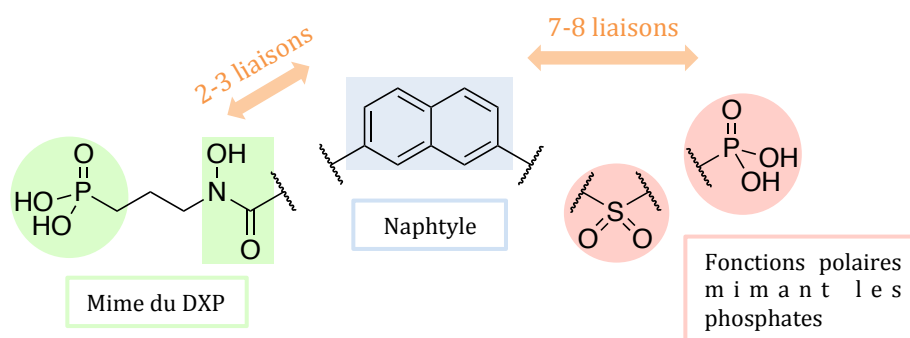


Figure 61: Modèle structural pouvant aider à la conception de nouveaux inhibiteurs biligands.

E.3. Deuxième méthode : construction à partir de fragments commerciaux

La synthèse de nouveaux inhibiteurs peut s'avérer délicate et laborieuse. L'emploi de motifs commerciaux ou décrits peut être judicieux. Les chimistes ayant pu obtenir les azotures **83** à **86** de l'approche bisubstrat (données non présentées), nous avons réutilisé ces modèles pour élaborer de nouveaux candidats biligands (Schéma 23).

Une des approches a été de considérer, qu'après une réduction chimique de l'azoture en amine primaire, une réaction de couplage avec un acide carboxylique pourrait être envisagée.

A partir de cette idée, des acides carboxyliques commerciaux du fournisseur *Sigma Aldrich* ont été sélectionnés. En nous fondant sur les précédents résultats, le choix s'est orienté vers des dérivés d'acides benzoïques. Les produits issus de différents couplages ont été imaginés, impliquant chacun des quatre azotures **83** à **86** (Schéma 23). A la demande des chimistes, les deux types de fonction chélatante au cation métallique ont été envisagés : hydroxamate (hx-) et rétro-hydroxamate (rhx-). Les motifs commerciaux nous ayant servi comme ligands dans cette étude de docking sont présentés dans les Annexes (p. 434 à 438).

E.3.1. Résultats et discussion

Pour réaliser cette étude de docking, nous avons utilisé le program Raccoon2, impliquant Autodock Vina, en modifiant le profil du protocole employé jusqu'ici afin d'affiner les résultats. Le nombre d'itérations de recherche de conformations est augmenté à cinquante contre huit, valeur par défaut, et chaque molécule est dockée cinq fois sur la protéine. A nouveau, un filtre conformationnel est appliqué pour ne retenir que les structures interagissant avec la Ser186. Si les cinq structures d'une même molécule sont retenues, elle est conservée et une moyenne des énergies de chacune des conformations lui est attribuée. L'ensemble du protocole est réalisé deux fois de suite et les molécules sélectionnées communes aux deux calculs sont analysées. Par souci de clarté, seuls les deux meilleurs résultats de chaque série hydroxamique et rétro-hydroxamique sont traités et classés en fonction de la longueur de l'espaceur (**Esp-1**, **Esp-2**, **Esp-3**, et **Esp-4**). L'ensemble des résultats pour chacune des orientations de pince sont représentés dans les Annexes (p 436 à 438).

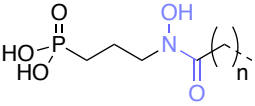
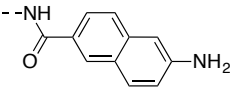
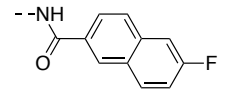
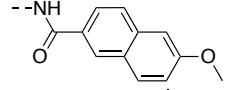
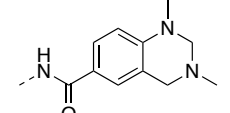
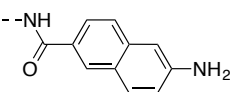
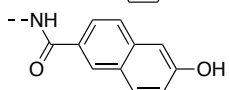
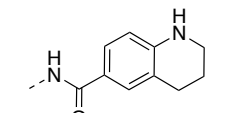
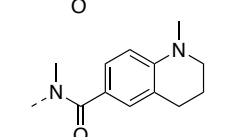
Pour la série à pince rétro-hydroxamique, préfixe **rhx-**, les molécules possédant un espaceur de 3 et 4 chaînons, **Esp-3** et **Esp-4** respectivement, sont majoritaires avec 16 molécules retenues pour chacun des deux groupes (Tableau 19). Le nombre des composés **Esp-1** et **Esp-2** est similaire, avec les valeurs respectives de 13 et 12. Les énergies moyennes des quatre groupes sont équivalentes (environ -9,08 kcal/mol). Les **Esp-4** sont représentées 20 fois dans la série à pince hydroxamique, préfixe **hx-**, suivis par les **Esp-3** au nombre de 16 (Tableau 19). Bien que plus nombreux, les énergies moyennes de ces deux groupes sont plus basses que celles des groupes **Esp-1** et **Esp-2**, aux nombres respectifs de 11 et 12.

Tableau 19: Nombre de molécules sélectionnées pour chacune des séries à pince hydroxamique (hx) et rétro-hydroxamique (rhx), en fonction de l'espaceur (Esp). Les énergies de fixation moyennes estimées sont en kcal/mol.

| | Nombre de molécules sélectionnées | | | |
|--|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| | Esp1 | Esp2 | Esp3 | Esp4 |
| Pince rétro-hydroxamique | 13 | 12 | 16 | 16 |
| Energie moyenne de fixation estimée (kcal/mol) | -9,09 | -9,02 | -9,11 | -9,10 |
| Pince hydroxamique | 11 | 12 | 15 | 20 |
| Energie moyenne de fixation estimée (kcal/mol) | -9,15 | -9,28 | -8,58 | -8,87 |

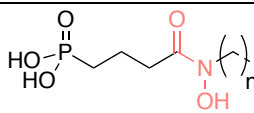
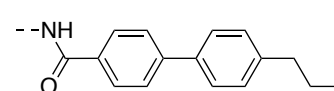
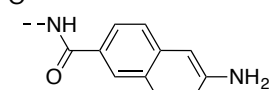
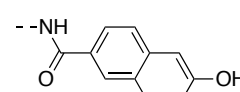
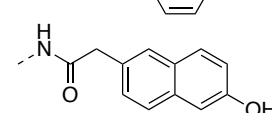
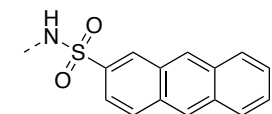
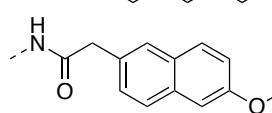
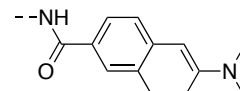
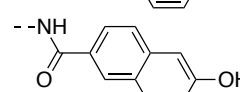
Dans la série à pince rétro-hydroxamique, préfixe **rhx-**, les estimations des énergies sont similaires pour les quatre longueurs d'espaceurs (Tableau 20). Elles oscillent de -10,3 kcal/mol pour les **rhx-151-Esp1** et **rhx-151-Esp3** à -9,7 kcal/mol pour le **rhx-131-Esp4** et le motif **151** a été sélectionné à deux reprises. A l'exception des motifs **125**, **131** et **132**, tous sont des dérivés naphtyles, rejoignant les précédentes observations (cf. Tableau 18, par exemple).

Tableau 20: Résultats de la série à pince rétro-hydroxamique. Les molécules présentant les deux meilleurs résultats de chacun des groupes espaceurs (Esp) sont indiquées et leurs énergies de fixation estimées sont en kcal/mol.

| Molécule | E. de fixation estimée (kcal/mol) | Représentation des fragments |
|---|-----------------------------------|--|
|  Esp n=1, 2, 3, 4 | | |
| Esp-1 | | |
| rhx-151-Esp1 | -10,3 |  |
| rhx-153-Esp1 | -10,2 |  |
| Esp-2 | | |
| rhx-150-Esp2 | -9,9 |  |
| rhx-132-Esp2 | -9,9 |  |
| Esp-3 | | |
| rhx-151-Esp3 | -10,3 |  |
| rhx-149-Esp3 | -10,2 |  |
| Esp-4 | | |
| rhx-125-Esp4 | -9,9 |  |
| rhx-131-Esp4a | -9,7 |  |

Les résultats retenus de la série à pince hydroxamique, préfixe **hx-**, possèdent des motifs plus variés. Toutefois, les dérivés naphtyles sont à nouveau majoritairement représentés (*i.e.* **145**, **149**, **151**, **155** et **163**). Les énergies estimées sont proches et oscillent de -10,4 kcal/mol pour le **hx-152-Esp3** à -9,7 kcal/mol pour le **hx-145-Esp3**.

Tableau 21: Résultats de la série à pince hydroxamique. Les molécules présentant les deux meilleurs résultats pour chacun des groupes espaceurs sont indiquées, ainsi que leurs énergies de fixation estimées, en kcal/mol.

| Molécule | E. de fixation estimée (kcal/mol) | Représentation des fragments |
|---|-----------------------------------|--|
|  Esp n=1, 2, 3, 4 | | |
| Esp-1 | | |
| hx-147-Esp1 | -10,2 |  |
| hx-151-Esp1 | -10 |  |
| Esp-2 | | |
| hx-149-Esp2 | -10,2 |  |
| hx-163-Esp2 | -10 |  |
| Esp-3 | | |
| hx-145-Esp3 | -9,9 |  |
| hx-155-Esp3 | -9,7 |  |
| Esp-4 | | |
| hx-152-Esp4 | -10,4 |  |
| hx-149-Esp4 | -9,9 |  |

E.3.2. Conclusion : fragments commerciaux

Les résultats obtenus indiquent une prédominance pour les dérivés naphtyles, en adéquation avec les précédents résultats (Figure 61). Les énergies étant similaires pour les deux orientations de pinces et pour chacun des espaceurs, il ne nous est pas possible de trancher quant à l'efficacité potentielle d'une molécule par rapport à une autre. Nous notons que certains motifs sont plus représentés que d'autres (voir Annexes, Tableau 46 p. 434 et Tableau 48 p. 437). A partir de ces résultats, nous avons pu déterminer des critères structuraux, qui pourraient conduire à des molécules intéressantes (Figure 62). Bien sûr, nous retrouvons le mime du DXP, pour lequel l'orientation de la pince chélatante est libre. Cette dernière pourrait être séparée par 1 à 4 liaisons d'un dérivé naphtyle possédant une fonction polaire en position 6. Il serait intéressant d'observer le comportement de certains de ces complexes lors de dynamique moléculaire et d'effectuer des analyses MM/PBSA.

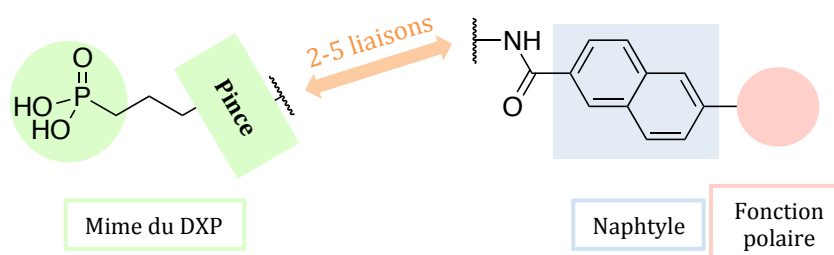


Figure 62: Modèle structural pouvant aider à la conception de nouveaux inhibiteurs de type biligand à partir de fragments commerciaux.

Cette étude a impliqué un nouveau protocole de docking plus rigoureux impliquant le logiciel Autodock Vina. L'inconvénient est qu'il est beaucoup plus coûteux en calculs que la procédure classique, résultant principalement de l'augmentation du nombre d'itérations. Actuellement, nous n'avons pu évaluer son efficacité par plus d'analyses théoriques et expérimentales.

E.4. Conclusion approche biligand

La conception d'inhibiteurs potentiels de type biligand a permis de mettre en place deux approches d'études. Dans un premier temps, nous avons construit des molécules candidates en nous basant sur les résultats du docking de fragments. Ils ont permis de déterminer des zones d'interactions exploitables, complétant celles issues de la littérature qui décrivent les sites de fixations du DXP et du cofacteur. Grâce à cette méthode, nous sommes parvenus à élaborer des composés possédant des estimations d'énergies de fixation intéressantes (Tableau 18).

Dans un deuxième temps, nous avons imaginé recycler les molécules employées lors de l'approche bisubstrat servant à mimer le DXP (Schéma 23). Pour faciliter les étapes de synthèse, des fragments commerciaux issus du catalogue du fournisseur *Sigma Aldrich* ont été utilisés comme source d'inspiration. Afin d'optimiser l'acuité de nos résultats, nous avons cherché à améliorer le protocole de docking. Les potentiels résultats expérimentaux qui découleront de ces travaux pourront permettre d'évaluer et d'améliorer les méthodes appliquées lors de ces études. En attendant, des analyses computationnelles supplémentaires, comme des simulations de dynamique moléculaire, permettraient de compléter ces études.

F. Conclusion générale

Dans ce chapitre, nous avons développé plusieurs stratégies de docking, employant les programmes AutoDock4.2 et AutoDock Vina pour la conception d'inhibiteurs de type bisubstrat et biligands. L'approche d'inhibiteurs de type bisubstrat nécessite la présence de deux molécules. Chacune d'elle devra se fixer à un site de fixation de la protéine (i.e. site de fixation du DXP ou du cofacteur).

Il est important qu'elles soient suffisamment proche l'une de l'autre pour permettre à la réaction bioorthogonale de se réaliser, liant les deux molécules. L'unique molécule ainsi formée pourrait rester fixée plus longtemps dans le site actif de la DXR et présenter des inhibitions intéressantes. A partir de notre étude nous avons pu sélectionner des couples de molécules pouvant servir lors d'essais d'inhibition sur la DXR. L'approche biligand implique la conception de molécules pouvant interagir avec deux sites de fixation à la fois : le site du DXP et du cofacteur NADPH. Après avoir déterminé une carte des potentielles interactions exploitables situées à la surface de la protéine des zones d'intérêts, nous avons conçu plusieurs modèles qui ont conduit à la sélection de plusieurs candidats. Certains d'entre eux ont été imaginés à partir de produits commerciaux et connus. En plus des molécules proposées nous avons pu établir un modèle structural pouvant aider à la conception de nouveaux inhibiteurs de type biligand, notamment à partir de fragments commerciaux.

Ces analyses de docking ont été effectuées sur récepteur rigide et ne prennent pas en compte la flexibilité de la protéine. C'est pourquoi il serait nécessaire de réaliser de analyses complémentaires de simulations de dynamique moléculaire des complexes prometteurs ainsi que des analyses MM/PBSA.

¹ Jansson, A. M., Wieckowska, A., Bjorkelid, C., Yahiaoui, S., Sooriyaarachchi, S., Lindh, M., Bergfors, T., Dharavath, S., Desroses, M., Suresh, S., Andaloussi, M., Nikhil, R., Sreevalli, S., Srinivana, B.R., Larhed, M., Jones, T.A., Karlen, A., Mowbray, S.L., « DXR inhibition by potent mono- and disubstituted fosmidomycin analogues », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56, 6190-6199.

² Ortmann, R., Wiesner, J., Silber, K., Klebe, G., Jomaa, H., Schlitzer, M., « Novel deoxy-D-xylulose 5-phosphate-reductoisomerase inhibitors: Fosmidomycin derivatives with spacious acyl residues », *Archiv Der Pharmazie*, 2007, 340, 483-490.

³ Jansson, A. M., Wieckowska, A., Bjorkelid, C., Yahiaoui, S., Sooriyaarachchi, S., Lindh, M., Bergfors, T., Dharavath, S., Desroses, M., Suresh, S., Andaloussi, M., Nikhil, R., Sreevalli, S., Srinivana, B.R., Larhed, M., Jones, T.A., Karlen, A., Mowbray, S.L., « DXR inhibition by potent mono- and disubstituted fosmidomycin analogues », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56, 6190-6199.

⁴ Coupez, B., Lewis, R. A., « Docking and scoring-theoretically easy, practically impossible? », *Current Medicinal Chemistry*, 2006, 13, 2995-3003.

⁵ Warren, G. L., Do, T. D., Kelley, B. P., Nicholls, A., Warren, S. D., « Essential considerations for using protein-ligand structures in drug discovery », *Drug Discovery Today*, 2012, 17, 1270-1281.

⁶ Schneider, A., Erden, Z., Widmer, H., Koch, G., Billy, C., Von Krogh, G., « Rethinking leadership in drug discovery projects », *Drug Discovery Today*, 2012, 17, 1258-1262.

⁷ Gohhxe, H., Klebe, G., « Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors », *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, 41, 2644-2676.

⁸ Chen, Y. C., « Beware of docking! », *Trends in Pharmacological Sciences*, 2015, 36, 78-95.

⁹ a) Goodsell, D. S., Olson, A. J., « Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing », *Proteins*, 1990, 8, 195-202; b) Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W. L., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J., « AutoDock4.2 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility », *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30, 2785-2791.

¹⁰ Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., Taylor, R. D., « Improved protein-ligand docking using GOLD », *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 2003, 52, 609–623.

¹¹ Trott, O., Olson, A. J., « AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading », *Journal of Computational Chemistry*, 2010, 31, 455–461.

¹² Chen, D., Gerd, M., Power, T. D., Sower, L., Peterson, J. W., Schein, C., « Accounting for Ligand-Bound Metal Ions in Docking Small Molecules on Adenylyl Cyclase Toxins », *Proteins*, 2007, 67, 593–605.

¹³ Wacker, S. J., Jurkowski, W., Simmons, K. J., Fishwick, C. W. G., Johnson, A. P., Madge, D. de Groot, B. L., « Identification of Selective Inhibitors of the Potassium Channel Kv1.1-1.2(3) by High-Throughput Virtual Screening and Automated Patch Clamp », *ChemMedChem*, 2012. 7, 1775–1783.

¹⁴ Cosconati, S., Forli, S., Perryman, A. L., Harris, R., David, S., Olson, A. J., Napoli, S., « Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice », *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2011, 5, 597–607.

¹⁵ Mac Sweeney, A., Lange, R., Fernandes, R. P. M., Schulz, H., Dale, G. E., Douangamath, A., Oefner, C., « The crystal structure of *E. coli* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation », *Journal of Molecular Biology*, 2005, 345, 115–127.

¹⁶ Henriksson, L. M., Unge, T., Carlsson, J., Åqvist, J., Mowbray, S. L., Jones, T. A., « Structures of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis », *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 19905–19916

¹⁷ Baskin, J.M., Bertozzi, C.R., « Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science », édité par Lahann, J., Wiley & Sons, 2009.

¹⁸ Saxon, E., Bertozzi, C. R., « Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction », *Science*, 2000, 287, 2007–2010; b) Kiick, K. L., Saxon, E., Tirrell, D.A., Bertozzi, C. R., « Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99, 19–24.

¹⁹ Baskin, J.M., Bertozzi, C.R., « Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems. *QSAR & Combinatorial*», *Science*, 2007, 26, 1211–1219; b) Sletten, E.M., Bertozzi, C.R., « Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality », *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2009, 48, 6974–6998; c) Debets, M. F., van Berkel, S.S., Dommerholt, J., Dirks, A.T.J., Rutjes, F.P.J.T., van Delft, F.L., « Bioconjugation with strained alkenes and alkynes», *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44, 805–815.

²⁰ Shih, H.W., Kamber, D.N., Prescher, J.A., « Building better bioorthogonal reactions », *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 21, 103–111.

²¹ Kolb, H.C., Finn, M.G., Sharpless, K.B., « Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions », *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, 40, 2004–2021.

²² Wittig, G., Krebs, A., « Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkine », *Chemische Berichte*, 1961, 94, 3260–3275.

²³ Himo, F., Lovell, T., Hilgraf, R., Rostovtsev, V.V., Noodleman, L., Sharpless, L.K.B., Fokin, V.V., « Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates », *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 210–216.

²⁴ a) Schoenebeck, F., Ess, D. H., Jones, G. O., Houk, K. N., « Reactivity and regioselectivity in 1,3-dipolar cycloadditions of azides to strained alkynes and alkenes: a computational study», *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131, 8121–33; b) Gold, B., Shevchenko, N. E., Bonus, N., Dudley, G. B., Alabugin, I. V., « Selective transition state stabilization via hyperconjugative and conjugative assistance: stereoelectronic concept for copper-free click chemistry », *The Journal of Organic Chemistry*, 2012, 77, 75–89.

²⁵ Gordon, C.G., Mackey, J.L., Jewett, J.C., Sletten, E.M., Houk, K.N., Bertozzi, C.R., « Reactivity of Biarylazacyclooctynones in Copper-Free Click Chemistry », *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134, 9199–9208.

²⁶ Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G. R. « Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform », *Journal of Cheminformatics*, 2012, 4, 1–33.

²⁷ Henriksson, L. M., Unge, T., Carlsson, J., Åqvist, J., Mowbray, S. L., Jones, T. A, « Structures of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis », *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 19905–19916.

²⁸ Kunfermann, A., Lienau, C., Illarionov, B., Held, J., Gräwert, T., Behrendt, C.T., Werner, P., Hähn, S., Eisenreich, W., Riederer, U., Mordmüller, B., Bacher, A., Fisher, M., Groll, M., Kurz, T., « IspC as Target for Antiinfective Drug Discovery : Synthesis, Enantiomeric Separation, and Structural Biology of Fosmydomycin Thia Isosters », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56, 8151-8162.

²⁹ Behrendt, C. T., Kunfermann, A., Illarionova, V., Matheeussen, A., Gräwert, T., Groll, M., Rohdich, F., Bacher, A., Eisenreich, W., Fischer, M., Maes, L., Kurz, T., « Synthesis and antiplasmodial activity of highly active reverse analogues of the antimalarial drug candidate Fosmidomycin », *ChemMedChem*, 2010, 5, 1673–1676.

³⁰ Ravindranath, P.A., Sanner, M.F., « AutoSite: an automated approach for pseudoligands prediction – From ligand binding sites identification to predicting key ligand atoms », *Structural Bioinformatics*, 2016, 32, 3142-3149.

³¹ a) Takenoya, M., Ohtaki, A., Noguchi, K., Endo, K., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Yohda, M., « Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* for insights into the coordination of conformational changes and an inhibitor binding », *Journal of Structural Biology*, 2010, 170, 532–539 ; b) Yajima, S., Hara, K., Iino, D., Sasaki, Y., Kuzuyama, T., Ohsawa, K., Seto, H., « Structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in a quaternary complex with a magnesium ion, NADPH and the antimalarial drug fosmidomycin », *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 2007, 63, 466–470 ; (liste non exhaustive).

³² Argyrou, A., Blanchard, J.S., « Kinetic and Chemical Mechanism of Mycobacterium tuberculosis 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Isomerase », 2004, *Biochemistry*, 43, 4375-4384.

IX. Etudes d'affinités et synthèses de potentiels inhibiteurs de la DXR de type α,α -difluoro phosphonate

Table des matières

| | |
|--|------------|
| A. Introduction | 252 |
| B. Etudes d'affinités par analyses de Docking | 256 |
| B.1. Méthode - Préparation du docking..... | 256 |
| B.2. Résultats | 257 |
| B.3. Conclusion de l'analyse | 260 |
| C. Etudes d'affinité par analyses MM/PBSA | 261 |
| C.1. Méthodes - Préparation des systèmes | 261 |
| C.2. Résultats et discussion..... | 261 |
| C.2.1. Complexes DXR/Fom 33 et DXR/Fom-difluorée 166..... | 263 |
| C.2.2. Complexe DXR/Fr 34 et DXR/Fr-difluoro167..... | 264 |
| C.2.3. Complexes DXR/HX 77 et DXR/HX-difluoro164..... | 265 |
| C.2.4. Complexes DXR/N-méthyle HX 60 et DXR/N-méthyle HX-difluoro166..... | 266 |
| C.3. Conclusion des analyses MM/PBSA | 267 |
| D. Synthèses des analogues de type acide α,α-difluoro phosphonate hydroxamique | 268 |
| D.1 Introduction successive des atomes de fluor | 269 |
| D.1.1. Retrosynthèse..... | 269 |
| D.1.2. Résultats et discussion..... | 270 |
| D.1.3. Conclusion..... | 274 |
| D.2 Introduction directe des deux atomes de fluor : 1 ^{ère} tentative | 274 |
| D.2.1. Retrosynthèse..... | 274 |
| D.2.2. Résultats et discussion..... | 276 |
| D.2.3. Conclusion..... | 279 |
| D.3 Introduction directe des deux atomes de fluor : 2 ^{ème} tentative..... | 279 |
| D.3.1. Retrosynthèses..... | 279 |
| D.3.2. Stratégie A. Résultats et discussion | 281 |
| D.3.3. Stratégie B. Résultats et discussion | 282 |
| D.3.4. Conclusion..... | 288 |
| D.4. Conclusion des synthèses organiques | 288 |
| E. Conclusion générale | 289 |

A. Introduction

Au sein du laboratoire de Chimie et Biochimie de Molécules Bioactives (CBMB), anciennement Chimie et Biochimie des Microorganismes, Kuntz *et al.* ont synthétisé la molécule **60** analogue du Fr-900098 **34**, possédant d'excellentes activités inhibitrices contre la DXR d'*Escherichia coli* avec une IC₅₀ de 48 nM (cf. chapitre « Introduction » pour plus de détails). La différence structurale entre cet analogue et la fosmidomycine réside au niveau de la fonction qui chélate le dication métallique présent dans le site actif de la protéine DXR. La molécule **60** (*N*-méthyle HX) possède une pince de type acide hydroxamique, alors que celle de la fosmidomycine **33** en possède une de type acide rétro-hydroxamique (Schéma 29).¹

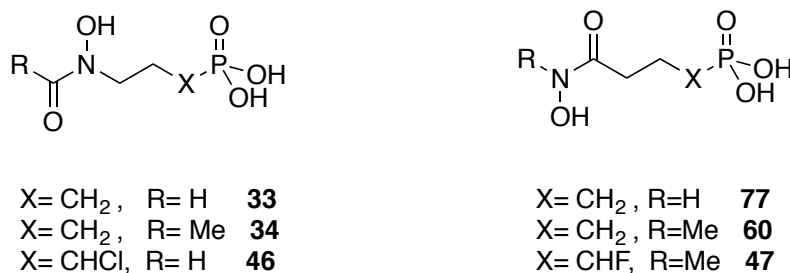


Schéma 29: Rappel de quelques inhibiteurs connus de la DXR.

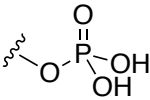
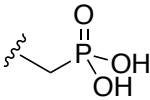
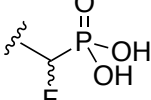
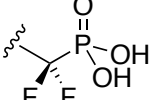
L'objectif du travail présenté est d'améliorer les capacités inhibitrices des inhibiteurs phosphonates de type acide hydroxamique non-méthylée **77** et méthylée **60**, que nous appellerons HX et *N*-méthyle HX respectivement.

Verbrugghen *et al.* ont synthétisé des inhibiteurs de la DXR, analogues de la fosmidomycine, de type α -halogénés en version acide hydroxamique et rétro-hydroxamique.² Ces molécules ont montrés d'excellentes IC₅₀ sur deux souches de *Plasmodium falciparum* (*i.e.* Pf-GHA et Pf-K1). L'ajout d'un atome halogéné en alpha du phosphonate augmente l'acidité de ce dernier, se rapprochant ainsi de celle du phosphate, présent chez le substrat naturel DXP **14**.

Etant sous forme doublement déprotonée, ces inhibiteurs α -halogénés interagissent plus favorablement avec les résidus du point d'ancrage de la DXR. Ces travaux ont montré que l'optimisation du point d'ancrage permet d'améliorer les propriétés inhibitrices de ces composés. Le phosphate est une fonction essentielle pour un grand nombre de molécules naturelles et de mécanismes biologiques (*i.e.* NADPH, ATP, ADN, kinase, communication intracellulaire, etc.). De ce fait, la chimie médicinale s'y intéresse notamment en développant différents bioisostères. Les plus courants dérivent de la fonction phosphonate (*i.e.* phosphoramidate, phosphorothioate, etc.).³ Ils en existent également sous forme de carboxylates, de sulfonates ou d'hétérocycles.⁴ Des analogues du *N*-méthyle HX **60** possédant des groupements bioisostères du phosphate autre que phosphonate ont déjà été synthétisés au laboratoire CBMB (*i.e.* tétrazole, acide carboxylique, squarique ou sulfonique).^{5,6} Aucun d'eux n'a présenté d'inhibition suffisante sur la *EcDXR*. A ce jour, les fonctions de type phosphate et phosphonate sont les plus efficaces pour se lier au point d'ancrage du substrat du site actif de la DXR.

A partir de structures cristallographiques de petites molécules d'analogues phosphonates, il a été observé que les angles dièdres de phosphonates α -substitués par un ou deux atomes de fluors étaient de très bons isostères géométriques du phosphate et du phosphonate (Tableau 22).^{7,8}

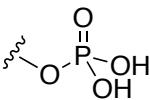
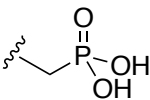
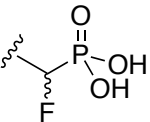
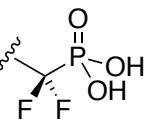
Tableau 22: Angles dièdres pour chacune des fonctions isostères du phosphate.

| | | | | |
|---------------------|---|---|--|---|
| |  |  |  |  |
| Angles C-X-P | 118,7° | 112,1° | 113,2° | 116,5° |

Ces analogues α -fluoro et α,α -difluoro phosphonate possèdent des angles respectifs de 113,2° et 116,5° contre 118,1° pour le phosphate, alors que le phosphonate en possède un de 112,1°.

L'angle de l' α,α -difluoro phosphonate est celui qui se rapproche le plus de celui du phosphate. Cette similarité de géométrie pourrait être un avantage intéressant à exploiter afin d'améliorer la fixation d'une molécule à un site actif. Les poches des sites actifs pouvant être très spécifiques, un candidat inhibiteur possédant une géométrie d'une fonction cruciale très proche de celle du substrat naturel est un atout. De plus, le pKa des fonctions d'une molécule est important à prendre en compte lors d'une étude d'activité, notamment d'inhibition. Cela l'est d'autant plus lorsque l'une de ces fonctions est impliquée dans la fixation à la cible. Les phosphonates possèdent un pKa₂, constante de dissociation du deuxième proton acide, de 7,6 contre 6,4 pour les fonctions de type phosphate.⁹ Le pH physiologique (pH_i), variant de 6,1 à 7,8 selon les organismes (*i.e. Mycobacterium spp., Plasmodium falciparum, Escherichia coli*), le phosphonate sera majoritairement sous forme mono-protonée, contrairement au phosphate qui le sera doublement.¹⁰

Tableau 23: pKa₂ de fonctions isostères du phosphate.

| | | | | |
|------------------------|---|---|--|---|
| Fonctions |  |  |  |  |
| pKa₂ | 6,4 | 7,6 | 6,5 | 5,4 |

Sous forme doublement déprotonée à pH_i, le phosphate est plus enclin à faire des liaisons hydrogènes et des interactions électrostatiques avec son environnement qu'en étant mono-protonée. Le fluor est l'élément le plus électronégatif du tableau périodique. Son effet électro-attracteur est important et influence l'acidité des protons portés par le phosphonate. Les acides α -fluoro phosphonique et α,α -difluoro phosphonique, possédant les pKa₂ respectifs de 6,5 et 5,4, sont également doublement chargés négativement à pH_i (Tableau 23).

Nous avons pris en considération ces éléments afin de travailler à l'amélioration des propriétés inhibitrices des composés HX **77** et *N*-méthyle HX **60**. Nous avons choisi de garder la fonction phosphonate, et d'en modifier l'acidité ainsi que sa géométrie en ajoutant deux atomes de fluors en alpha du phosphonate. Ces informations nous ont motivés à concevoir les molécules analogues de **60**, l'acide (1,1-difluoro-4-(hydroxylamino)-4oxobutyl)phosphonique **164** et l'acide (1,1-difluoro-4-(hydroxy(méthyl)amino)-4oxobutyl)phosphonique **165**, que nous appellerons respectivement HX-difluoro et *N*-méthyle HX-difluoro (Schéma 30).

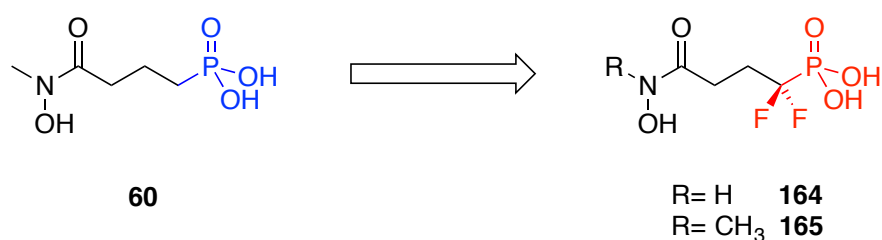


Schéma 30: Remplacement du phosphonate de **60** par un α,α -difluoro phosphonate.

Pour évaluer le potentiel des composés **164** et **165**, nous nous sommes tournés vers des analyses théoriques. Afin de réaliser ces études, nous avons utilisé des outils de docking, de modélisation moléculaire et de calculs d'énergie libre.

Ce chapitre est divisé en plusieurs sections, dont les premières traitent d'études computationnelles, et sont suivies de la présentation des synthèses chimiques des molécules d'intérêts.

B. Etudes d'affinités par analyses de Docking

Dans les études d'affinités des molécules α,α -difluoro-phosphonique non-méthylée **164** et méthylée **165**, nous avons décidé d'y inclure des références. En effet, leurs analogues non-fluorés respectifs **77** et **60** n'ont jamais été cocrystallisés dans le site actif de la DXR. Nous avons donc inclus dans cette étude la fosmidomycine (Fom) **33**, le FR-900098 (Fr) **34** et le DXP **14**. Les versions difluorées de la fosmidomycine et du FR-900098 sont également étudiées et seront respectivement appelées Fom-difluorée **166** et Fr-difluoro **167**. Contrairement aux inhibiteurs **33** et **34**, les analogues à pince hydroxamique non-fluorés respectifs, **77** et **60**, n'ont jamais été cocrystallisés dans le site actif de la DXR, et pour cette raison toutes les molécules ont été traitées selon un même protocole. Ainsi, nous disposerons d'une étude complète, réalisée sur la DXR de la souche d'*Escherichia coli*, sur l'effet potentiel d'un groupement acide α,α -difluoro phosphonique en fonction de l'orientation de la pince, rétro-hydroxamique (type Fom **33**) ou hydroxamique (type *N*-méthyle HX **60**).

B.1. Méthode - Préparation du docking

Toutes les molécules ont été construites avec Avogadro 1.1.0 et les études de docking ont été réalisées avec Autodock4.2 et son algorithme génétique Lamarckien.^{11,12} La structure de PDBid 1Q0Q a été utilisée pour *E. coli*, DXR cocrystallisée en présence du cofacteur et du DXP.¹³ Après superposition avec la structure 4AIC, le métal est converti en Mg^{2+} et ajouté à la structure 1Q0Q.¹⁴ Les états de protonation et la régularisation des géométries, impliquant les résidus d'asparagines, glutamines et histidines, sont corrigés à l'aide du serveur web MolProbity4.2.¹⁵ Chaque étude de docking est réalisée en présence du cofacteur NADPH et du métal Mg^{2+} , pour lequel une charge de +0,8 est attribué. L'espace de recherche de conformations est centré sur le site actif. Il possède les coordonnées [x : 20,653, y : 1,436 ; z : 36,619] et une taille de 50-x, 50-y et 50-z points avec un espacement de 0,345 Å entre chacun. Lors des calculs de docking, 2500000

évaluations sont réalisées par molécule et 27000 générations sont engendrées par l'algorithme génétique Lamarckien.

Pour chaque système, les dix conformations issues du docking sont groupées en fonction d'un RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 2 Å. Les groupes et les conformations de plus basses énergies possèdent le numéro 1. Pour désigner une conformation, nous indiquerons son numéro de groupe puis celui de la conformation (*i.e.* 1_1 correspond à la conformation de plus basse énergie du groupe de plus basse énergie, 2_1 à la conformation de plus basse énergie du deuxième groupe de plus basse énergie, ainsi de suite). Pour être retenue, une conformation doit posséder la fonction phosphonate au niveau du point d'ancrage et la fonction chélatante proche du dication métallique, comme nous l'avons défini dans les précédents chapitres (par exemple, « V. Etude structurale de la DXR », p. 120).

B.2. Résultats

Dans cette étude, nous avons docké neuf molécules différentes sur la DXR d'*Escherichia coli*. A partir des analyses et du regroupement des résultats, nous avons observé que, excepté pour le composé non-méthylé à pince hydroxamique HX 77, tous les groupes de plus basses énergies sont ceux possédant les structures répondant aux critères de sélection (*i.e.* les positions des fonctions clés). Pour HX 77 nous retrouvons des conformations correctes dans le deuxième groupe (Tableau 24). L'unique conformation représentant le groupe 1 de plus basse énergie, possède la pince chélatante orientée vers la paroi de la protéine (*i.e.* Ser254) et non à proximité du métal.

Tableau 24: Résultats de l'étude docking réalisées sur EcDXR.

| Molécule | Groupe | Energie (kcal/mol) | Nb. Conf. | Ecart d'énergie (kcal/mol) | Conf. Retenue |
|------------------------|--------|-----------------------|--------------|-------------------------------|------------------|
| DXP 14 | 1_1 | -5,95 | 5 | 0,80 | 1_1 |
| | 2_1 | -5,94 | 4 | 0,85 | |
| | 3_1 | -5,81 | 1 | 0,00 | |
| Fom 33 | 1_1 | -6,43 | 8 | 0,79 | 1_1 |
| | 2_1 | -5,91 | 2 | 0,11 | |
| Fr 34 | 1_1 | -7,27 | 9 | 1,12 | 1_1 |
| | 2_1 | -6,06 | 1 | 0,00 | |
| HX 77 | 1_1 | -6,81 | 1 | 0,00 | 2_1 |
| | 2_1 | -6,64 | 6 | 1,28 | |
| | 3_1 | -6,40 | 1 | 0,00 | |
| | 4_1 | -6,20 | 2 | 0,56 | |
| N-Me HX 60 | 1_1 | -7,26 | 7 | 0,75 | 1_1 |
| | 2_1 | -6,55 | 2 | 0,28 | |
| | 3_1 | -6,54 | 1 | 0,00 | |
| HX-dif 164 | 1_1 | -7,28 | 6 | 0,34 | 1_3 |
| | 2_1 | -6,87 | 4 | 0,44 | |
| N-Me HX-dif 165 | 1_1 | -7,32 | 8 | 0,87 | 1_1 |
| | 2_1 | -6,78 | 2 | 0,14 | |
| Fom-dif 166 | 1_1 | -6,39 | 9 | 0,49 | 1_1 |
| | 2_1 | -6,06 | 1 | 0,00 | |
| Fr-dif 167 | 1_1 | -7,36 | 9 | 0,60 | 1_1 |
| | 2_1 | -6,75 | 1 | 0,00 | |

Afin de valider notre protocole de docking, nous avons comparé les résultats des conformations de plus basse énergie du DXP **14**, de la fosmidomycine **33** et du FR-900098 **34** avec des structures cristallines cocrystallisées en présence de ces derniers. La conformation 1_1 du DXP **14**, possédant une énergie estimée de -5,95 kcal/mol possède un RMSD de 0,47 Å par rapport à sa structure cristallisée issue de 1Q0Q.¹³ Celle de la fosmidomycine, avec une énergies estimée à -6,43 kcal/mol, possède un RMSD de 0,61 Å par comparaison avec la structure cristallographique de 1Q0L.¹³

Pour la FR-900098 **34**, nous avons superposé la conformation numéro **1_1** issu de l'analyse de docking avec celle de la structure 4AO3, cocrystallisée en présence de **34**, du cofacteur et de Mn^{2+} .⁵ Bien que cette structure soit de la souche *Mycobacterium tuberculosis*, nous obtenons un RMSD satisfaisant de 0,33 Å. Ces faibles différences de positionnement, au niveau du site actif de la DXR, indiquent que le protocole fourni des résultats cohérents avec les structures existantes. Il peut donc être appliqué aux différentes molécules de l'étude. Les groupes sélectionnés comportent les populations de conformations les plus importantes. Les énergies de fixation estimées pour les molécules difluorées sont légèrement plus favorables que celles de leurs analogues non-fluorés respectifs. Les liaisons hydrogènes avec le point d'ancrage et les interactions hydrophobes prédites sont référencées dans le tableau ci-dessous (Tableau 25).

Tableau 25: Interactions clés prédites par le logiciel de Docking sur EcDXR. Les liaisons hydrogènes avec le point d'ancrage sont représentées en bleu et les interactions hydrophobes potentielles en orange. Les énergies sont kcal/mol.

| Molécule | Conf. retenue | Energie (kcal/mol) | Ser184 | His209 | Trp212 | Met214 | Ser222 | Asn227 | Lys228 | Met276 | NADPH |
|------------------------|---------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| DXP 14 | 1_1 | -5,95 | | | | | | | | | |
| Fom 33 | 1_1 | -6,43 | | | | | | | | | |
| Fr 34 | 1_1 | -7,27 | | | | | | | | | |
| HX 77 | 2_1 | -6,64 | | | | | | | | | |
| N-Me HX 60 | 1_1 | -7,26 | | | | | | | | | |
| HX-dif 164 | 1_3 | -7,28 | | | | | | | | | |
| N-Me HX-dif 165 | 1_1 | -7,32 | | | | | | | | | |
| Fom-dif 166 | 1_1 | -6,39 | | | | | | | | | |
| Fr-dif 167 | 1_1 | -7,36 | | | | | | | | | |

Les résidus connus pour interagir efficacement avec le phosphate au niveau du point d'ancrage se retrouvent dans les résultats issus du docking.

Excepté pour la Ser222, des liaisons hydrogènes ont été prédites entre ces derniers et chacune des molécules analysées. Il en est de même pour les interactions potentiellement hydrophobes où nous retrouvons pour presque chaque composé, le Trp212, la Met214 et le cofacteur. Seule la Fom-difluorée **166** n'interagit favorablement qu'avec le Trp212. Le résidu Met276 est sorti pour deux molécules : le HX **77** et le *N*-méthyle HX-difluoro **165**. Les interactions estimées par les calculs de docking pour le DXP **14**, la fosmidomycine **33** et le FR-900098 **34** corroborent dans l'ensemble avec ceux décrits dans la littérature et ceux issus des analyses de type MM/PBSA réalisées dans de précédents chapitres (par exemple « Etude structurale de la DXR »).^{13,5} N'existant pas de structure de la DXR cocrystallisée en présence des molécules à pince chélatante hydroxamique **77** et **60**, les conformations issues du docking nous servons de références pour les analyses de celles de leurs analogues α,α -difluoro-phosphonates.

B.3. Conclusion de l'analyse

A partir des résultats issus de l'étude de docking, nous pouvons conclure que les conformations des molécules d'intérêts interagissent toutes avec des résidus cruciaux du site actif de la DXR, principalement situés au niveau du point d'ancrage et de la boucle (*i.e.* His209, Trp212, Met214). Les molécules difluorées montrent des énergies légèrement plus favorables que celles non fluorées. Cependant, compte tenu de la marge d'erreur d'estimation propre au logiciel, les écarts d'énergies ne sont pas suffisamment importants pour pouvoir déterminer lequel serait le plus efficace. De plus, les études de docking ont été effectuées sur récepteur rigide. Les chaînes latérales et principales n'ont donc pu se réarranger en fonction des ligands. La DXR est une enzyme flexible donc la fixation du ligand implique d'importants mouvements (*i.e.* conformation ouverte ou fermée de la boucle). Appliquer de telles libertés de flexibilités ne sont réalisables avec le logiciel Autodock4. De ce fait, des études de dynamiques moléculaire couplées à de la décomposition d'énergie libre par résidus de type MM/PBSA ont été utilisées pour analyser chacun des systèmes complet (*i.e.* protéine, molécule, métal et cofacteur).

C. Etudes d'affinité par analyses MM/PBSA

C.1. Méthodes - Préparation des systèmes

Pour chacune des molécules, un complexe l'incluant ainsi que la protéine, le cofacteur et le dication métallique Mg^{2+} , a été construit. Le protocole de préparation de ces complexes et des paramètres des molécules est le même que celui décrit pour le chapitre « Etudes structurales de la DXR ». Les conformations 1_1 issues du docking ont été utilisées pour construire les complexes en présence de la protéine, excepté pour HX 77, pour lequel la conformation 2_1 a été privilégiée pour les raisons citées précédemment.

Après production de trajectoires de 27,5 ns, les 25 dernières nanosecondes sont utilisées pour les calculs de type MM/PBSA, fondés sur le protocole développé par Lafont *et al.* au sein du laboratoire de Modélisation Moléculaire.¹⁶ Cette méthode est vue plus en détails dans les chapitres « Méthodes standard » et « Etude structurales de la DXR ».

C.2. Résultats et discussion

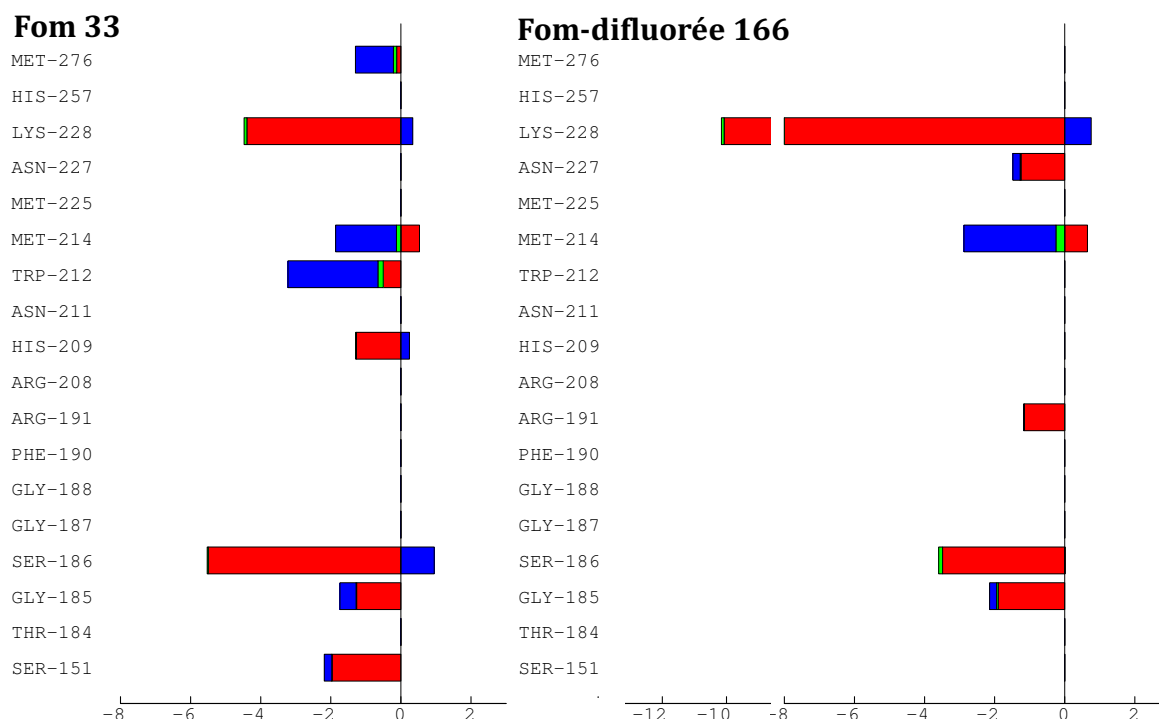
Les analyses des simulations de dynamique moléculaire ont montré que toutes les simulations étaient stables. Les valeurs issues des RMSD sont comprises entre 2 et 4,2 Å, en fonction des complexes (données non présentées).

Pour faciliter les analyses des résultats de décomposition d'énergie libre, un filtre d'énergie a été appliqué. Comme nous nous sommes principalement intéressés aux interactions contribuant à la fixation des ligands, seuls les acides aminés du site actif de la DXR ayant une énergie libre totale inférieure ou égale à -1 kcal/mol ont été sélectionnés pour les analyses. Les contributions d'énergies libres totales pour tous les résidus du site actif sont présentées dans les Annexes p. 439 à 440.

Tous les résidus présentés ont été sélectionnés au moins une fois dans l'un des systèmes. Lorsqu'un résidu ne passe pas le filtre énergétique, aucune énergie ne lui sera attribuée. Les contributions électrostatiques sont représentées en rouge, celles de van der Waals en bleu et l'énergie correspondant à la surface accessible au solvant en vert. Dans un premier temps, les complexes sont analysés par couple de molécules (*i.e.* non-fluorée/fluorée) puis suivront des analyses visuelles, ainsi qu'une comparaison des différents systèmes.

Les résidus de la zone du point d'ancrage sont la Thr182 à l'Arg189, la Met225, l'Asn227, la Lys228 et l'His257. Ceux faisant partie de la boucle sont l'Arg208, l'His209, l'Asn211, le Trp212 et la Met214. La ser151 et le Met276 sont situés à proximité de l'entrée du site actif, vers le métal. Les résidus chélatant le métal (*i.e.* Asp150, Glu152, Glu231) ne sont pas inclus dans ces résultats car leurs énergies sont hautement négatives, du fait des interactions électrostatiques avec le Mg²⁺.

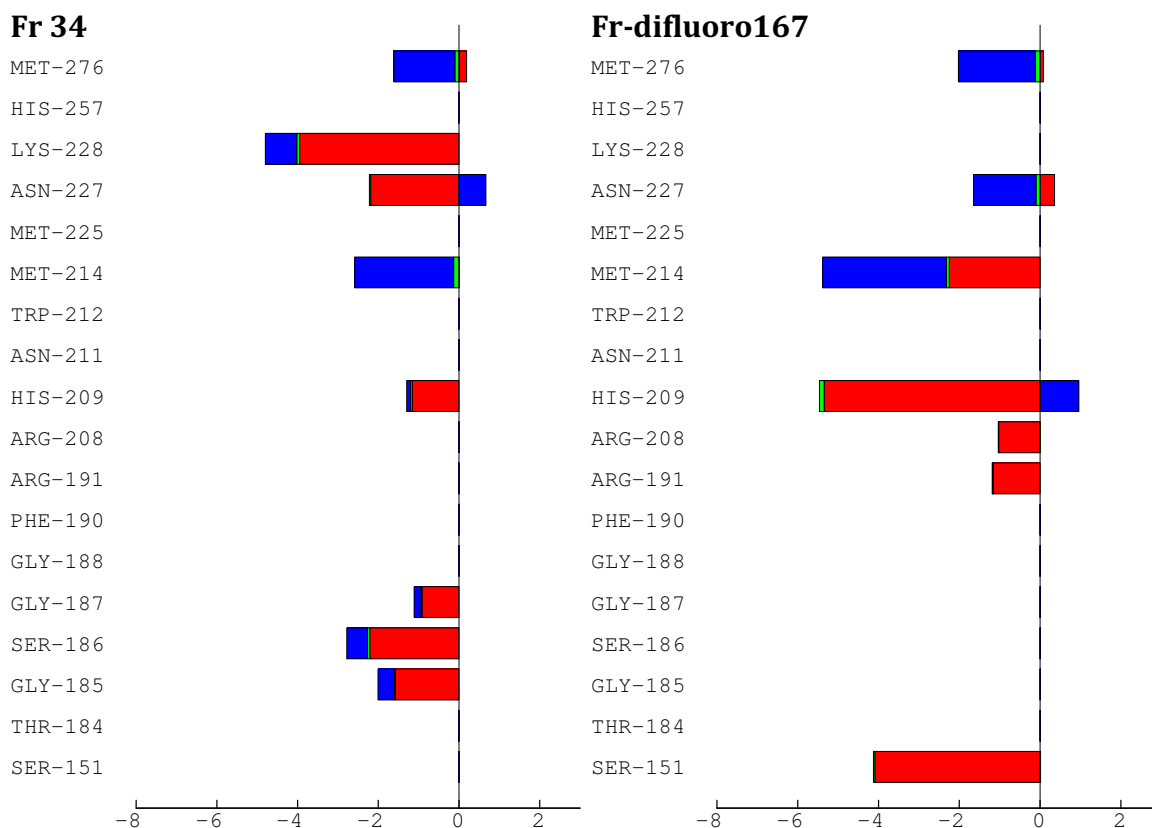
C.2.1. Complexes DXR/Fom 33 et DXR/Fom-difluorée 166



Graph 1: Représentation de la décomposition énergétique en kcal/mol par résidu, des acides aminés du site actif possédant une énergie libre totale inférieure ou égale à -1 kcal/mol, des complexes impliquant la fom 33 et Fom-difluorée 166.

La version fluorée présente un nombre d'interactions avec le site actif moins important que son analogue non fluoré. Bien que l'interaction avec la Lys228 soit électrostatiquement très favorable, du fait de la proximité du groupement α,α -difluoro phosphonate, la perte des interactions avec des résidus clés comme l'His209 et le Trp212 peut s'avérer critique. Le phosphonate étant doublement chargé, nous nous attendions à observer de fortes interactions électrostatiques avec le point d'ancrage. Hors celle de la Ser184 est plus faible que pour la fosmidomycine **33**. De plus, la présence d'une contribution énergétique correspondant à l'accessibilité au solvant pour la version fluorée est suspecte. Cela implique que le point d'ancrage est potentiellement exposé au solvant. Si tel est le cas, cela pourrait provenir d'un soulèvement de la boucle, expliquant ainsi la perte d'interactions avec les résidus la composant.

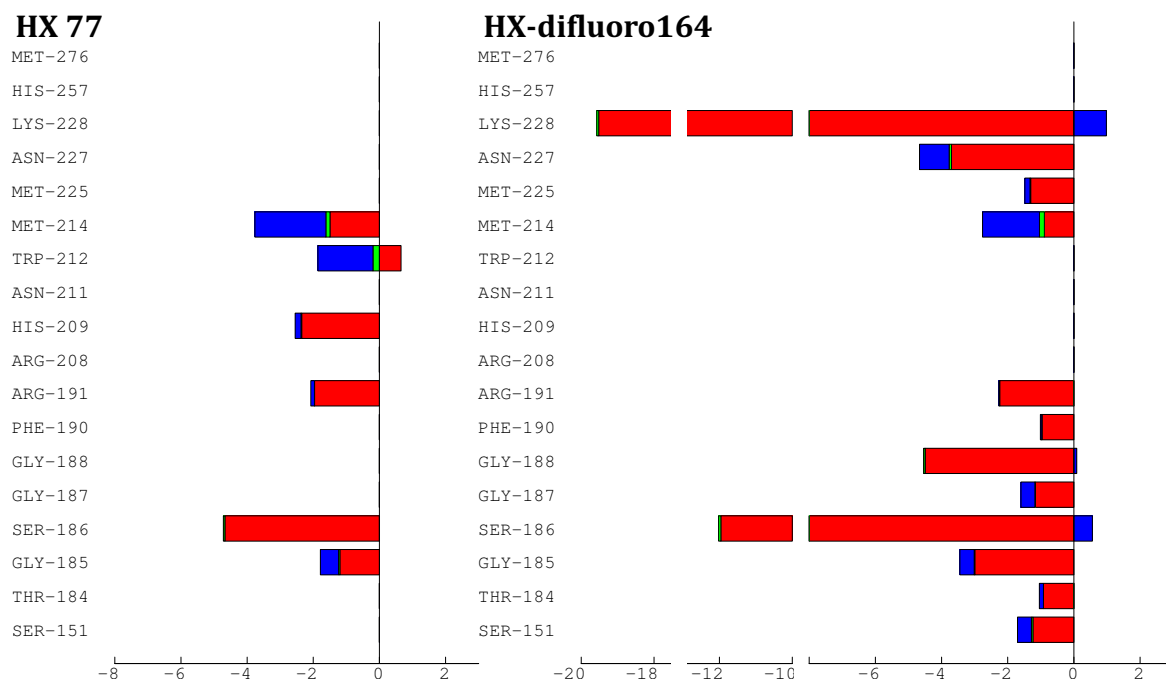
C.2.2. Complexe DXR/Fr 34 et DXR/Fr-difluoro167



Graph 2 : Représentation de la décomposition énergétique en kcal/mol par résidu des acides aminés du site actif possédant une énergie libre totale inférieure ou égale à -1 kcal/mol, des complexes impliquant la fr 34 et Fr-difluoro168.

Les interactions électrostatiques impliquant le phosphonate et les résidus du point d'ancrage contribuent bien à la fixation du Fr **34**, contrairement à la version difluorée **167**. Seule l'His209 semble participer à des interactions importantes avec le phosphonate difluoré du **167**, pourtant doublement chargé. Cette dernière apporte également une contribution d'accessibilité au solvant, indiquant qu'elle est exposée. Le fait de ne pas effectuer d'interaction efficace avec plus de résidus du point d'ancrage, comme la Ser184 et la Lys228, peut s'avérer critique pour le maintien du ligand dans le site actif.

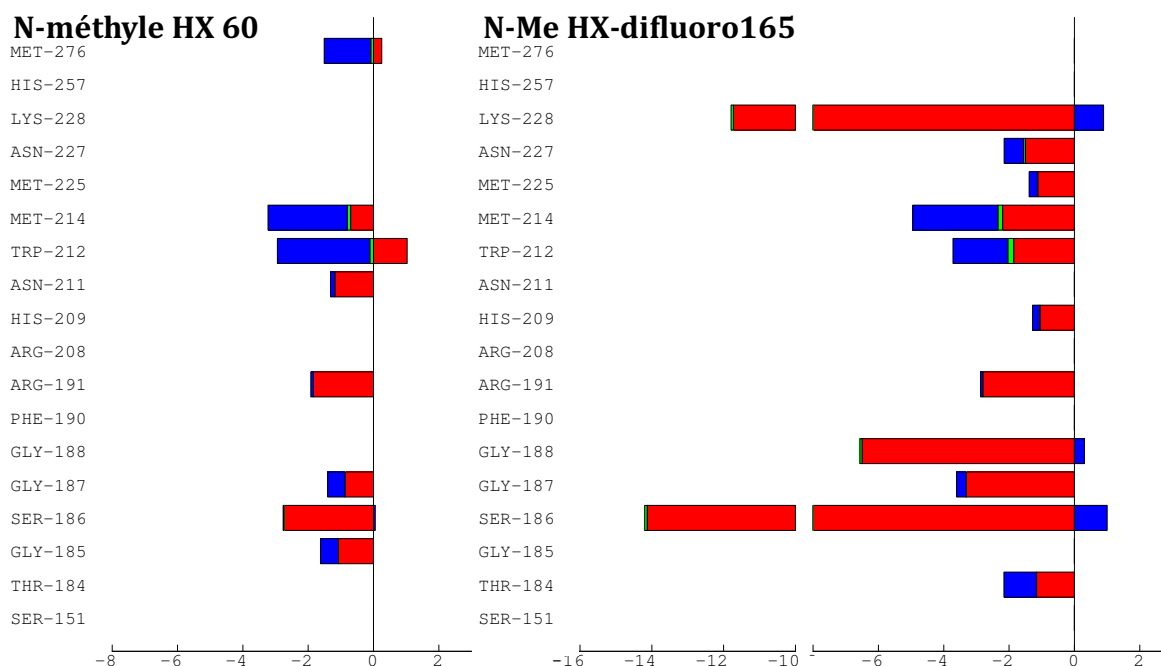
C.2.3. Complexes DXR/HX 77 et DXR/HX-difluoro164



Graph 3: Représentation de la décomposition énergétique en kcal/mol par résidu des acides aminés du site actif possédant une énergie libre totale inférieure ou égale à -1 kcal/mol, des complexes impliquant la HX 77 et HX-difluoro164.

Le groupement α,α -difluoro-phosphonate du composé HX-difluoro**164** participe à d'importantes et de nombreuses interactions électrostatiques avec les acides aminés du point d'ancrage, comparé à celle du non-fluoré **77**. Pour ce couple, le bioisostère fluoré est plus efficace que le phosphonate. Néanmoins, les résidus de la boucle n'ont donc pas été retenus par le filtre (*i.e.* His209, Trp212, Met214). La sollicitation des résidus du point d'ancrage pour la version difluorée **164** résulte principalement de la charge de son phosphonate. La boucle, n'ayant pas d'interaction efficace avec le ligand, risque de ne pas se conserver sa conformation fermée.

C.2.4. Complexes DXR/*N*-méthyle HX 60 et DXR/*N*-méthyle HX-difluoro166



Graph 4: Représentation de la décomposition énergétique par résidu des acides aminés du site actif possédant une énergie libre totale inférieure ou égale à -1 kcal/mol, des complexes impliquant la *N*-méthyle HX 60 et *N*-méthyle HX-difluoro165.

Comme pour les couples précédents, DXR/HX **77** et DXR/HX-difluoro**164**, la fonction α,α -difluoro-phosphonate du *N*-méthyle HX-difluoro**165** est impliquée dans plus d'interactions favorables de type électrostatique que le phosphonate de *N*-méthyle HX **60**. Les interactions avec les résidus clés de la boucle (*i.e.* His209, Trp212 et Met214), en plus de celles du point d'ancrage, indiquent une fixation comprenant un set complet des interactions, favorisant le maintien du ligand dans le site actif de manière optimale.

C.3. Conclusion des analyses MM/PBSA

L'impact des interactions engendrées par la présence du groupement α,α -difluoro-phosphonate est fonction de la structure des molécules. Globalement, les interactions des analogues α,α -difluoro-phosphonate **166** et **167**, possédant tous deux une pince acide rétro-hydroxamique, sont moins importantes que celles de leurs analogues non-fluorés respectif, fosmidomycine **33** et Fr-900098 **34**. Sans les interactions impliquant le point d'ancrage, leurs fixations au site actif pourraient être compromises. A partir des résultats de ces deux couples, nous pouvons supposer que le remplacement du phosphonate par le groupement α,α -difluoro-phosphonate n'induirait peut être pas d'augmentation d'inhibition significative à l'encontre de la DXR de la souche *E. coli*. Pour les molécules difluorées **164** et *N*-méthyle **165**, possédant la pince sous forme acide hydroxamique, les contributions apportées par les résidus du site actif sont plus intéressantes que celles des molécules non-fluorées, HX **77** et *N*-méthyle HX **60**. Le changement de bioisostère pour ces deux molécules semble être un atout favorable pouvant potentiellement augmenter leurs activités inhibitrices sur la DXR d'*E. coli*.

Pour comprendre comment l'orientation de la pince chélatante (rétro-hydroxamique vs. hydroxamique) influe de la sorte sur la fixation des ligands, il nous faudrait utiliser des outils computationnels plus adaptés, qui dépassent le cadre de ce projet. Les méthodes impliquant des simulations de mécanique quantique couplées à de la mécanique moléculaire (QM/MM) pourraient aider à apporter une aide significative lors d'étude future sur ce sujet. De plus, durant les calculs, nous avons utilisé une structure possédant la boucle fermée (*i.e.* 206 à 216), cocrystallisée en présence du DXP et du cofacteur (PDBid 1Q0Q). Cette structure optimale au niveau du site actif peut biaiser les systèmes. En effet, par cette méthode nous partons d'un complexe déjà formé. Nous ne pouvons garantir que le ligand arrivera à atteindre la poche (*i.e.* désolvatation des ligands chargés) et à induire la fermeture de la boucle. L'utilisation d'une structure ouverte ou semi-ouverte aurait permis de s'affranchir de ce problème mais aurait nécessité beaucoup plus de temps de calculs et la mise en place de protocoles plus compliqués.

Computationnellement, le HX **77** présente des interactions comparables à celles des autres inhibiteurs non-fluorés, alors que sa capacité d'inhibition est considérablement plus faible que celles des autres composés. Comme nous l'avons signalé dans le chapitre « VII. Etudes computationnelles d'analogues phosphates d'inhibiteurs de la DXR » p. 178, il est probable qu'il y ait un équilibre entre les formes $R-N(OH)$ et $R-N(H)O^-$, empêchant une fixation efficace de la pince au métal.

Les résultats issus de cette étude computationnelle ont contribué à encourager la synthèse des analogues de type acide α,α -difluoro phosphonate hydroxamique.

D. Synthèses des analogues de type acide α,α -difluoro phosphonate hydroxamique

Les résultats de notre étude de décomposition d'énergie libre par résidu, se sont montrés très intéressants pour les HX **77** et *N*-méthyle HX **60**, possédant tous deux la pince de type acide hydroxamique. Il reste à synthétiser et tester ces molécules sur la *EcDXR* afin de vérifier s'ils sont de bons inhibiteurs. Nous avons entrepris de synthétiser ces deux molécules. Nous pourrions alors comparer leur constante d'inhibition par rapport aux HX **77** et *N*-méthyle HX **60** non fluorés. Une étude cristallographique de ces différents composés pourrait également nous permettre de valider les conformations prédites par le logiciel de docking Autodock4.2 qui nous ont servis de bases durant cette étude.

D.1 Introduction successive des atomes de fluor

D.1.1. Rétrosynthèse

Pour la réalisation de la synthèse des analogues α,α -difluoro phosphonates, l'étape clé est l'insertion des deux atomes de fluor en position α du phosphonate. Nous avons envisagé une stratégie d'insertion successive des deux atomes via le schéma rétrosynthétique suivant (Schéma 31) :

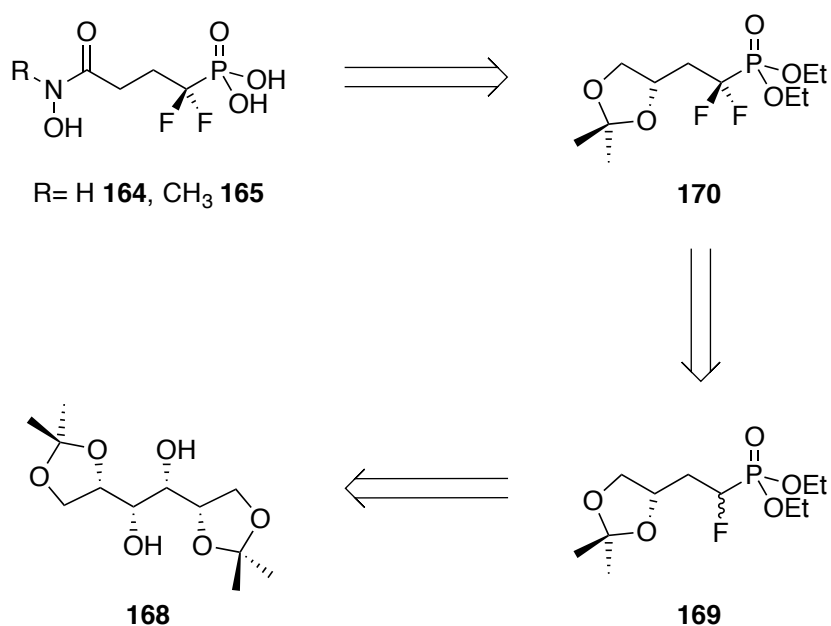


Schéma 31: Rétrosynthèse de **164** et **165** avec introduction successive des deux atomes de fluor.

La synthèse commencerait avec le D-mannitol protégé commercial **168**, sur lequel serait effectuée une coupure oxydante permettant d'obtenir l'aldéhyde correspondant. Une première étape clé serait la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons entre un fluorométhylène diphosphonate préalablement synthétisé et cet aldéhyde, conduisant au α -fluorophosphonate **169**. L'insertion du deuxième atome de fluor en α du phosphonate, deuxième étape clé, permettrait d'accéder au composé **170**. S'en suivraient plusieurs étapes nécessaires à la construction de la fonction acide hydroxamique, conduisant à la formation des produits finaux **164** et **165**.

D.1.2. Résultats et discussion

La synthèse débute par la coupure oxydante du diol vicinal, le 1,2,5,6-di-O-isopropylidène-D-mannitol commercial 168, en présence de periodate de sodium dans l'éther aqueux (Schéma 32).¹⁷ L'aldéhyde 171 résultant est obtenu avec un rendement de seulement 50% car le produit est volatil.

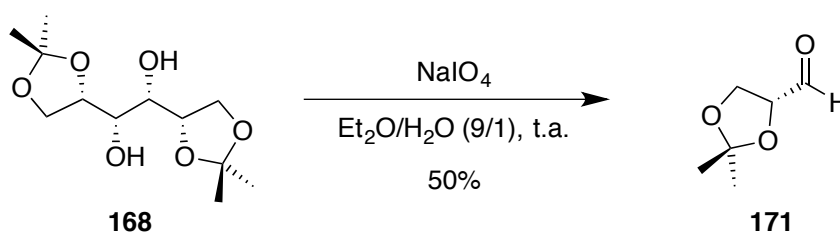


Schéma 32: Coupure oxydante du diol 168.

Parallèlement à la réaction de coupure oxydante, l'anion du méthylène tétraéthylidiphosphonate **172**, formé en présence d'hydrure de sodium, est mis à réagir avec le 1-chlorométhyl-4-fluoro-1,4-diazoniabi-cyclo [2,2,2] octane bis(tétrafluoroborate), SelectfluorTM (Schéma 33).¹⁸ Ce dernier est un agent donneur de fluor électrophile qui permet d'introduire le premier fluor, conduisant au fluorométhylène tétraéthylidiphosphonate **173** avec un rendement de 34%.

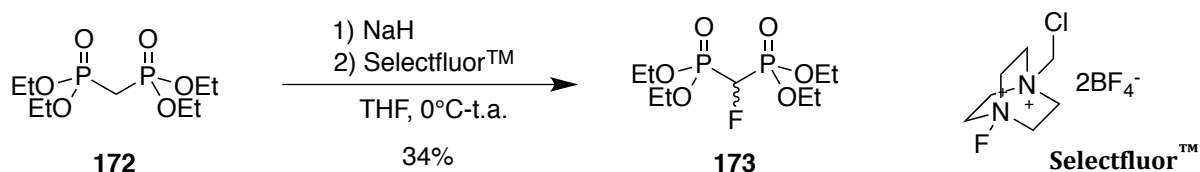


Schéma 33: Formation du composé fluorométhylidiphosphonate 173.

La première étape clé est la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons qui permet de coupler le composé **173** sur l'aldéhyde **171**, formant l'alcène *E* **174** avec un rendement de 62% (Schéma 34). La présence d'un unique isomère *E* a été démontrée par les analyses en RMN du ^1H , du ^{19}F et du ^{31}P . Sur les deux spectres, nous retrouvons un seul doublet avec une constante de couplage de 99 Hz, caractéristique d'un couplage 2J entre un atome de phosphore et de fluor.^{19,20} Cela nous indique que la réaction n'a conduit qu'à un seul composé. De plus, le mécanisme réactionnel nous oriente vers l'alcène *E*.²¹ Les analyses du spectre de RMN ^1H montrent la présence d'un *pseudo*-triplet avec des constantes de couplage *anti* $^3J_{(\text{H-F})}$ de 39 Hz, *syn* $^3J_{(\text{H-P})}$ et $^3J_{(\text{H-H})}$, toutes deux de 7,9 Hz, à 6,01 ppm, couplages caractéristiques d'une double liaison de configuration *E*.^{19,20}

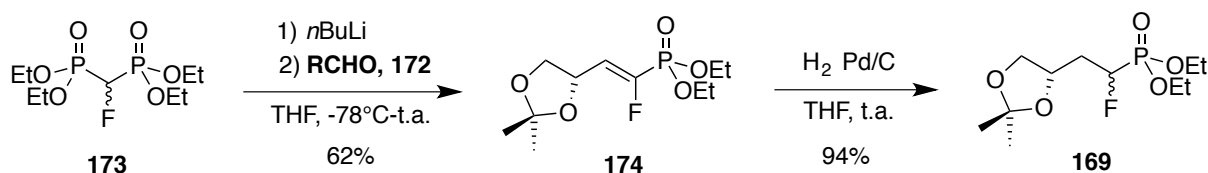
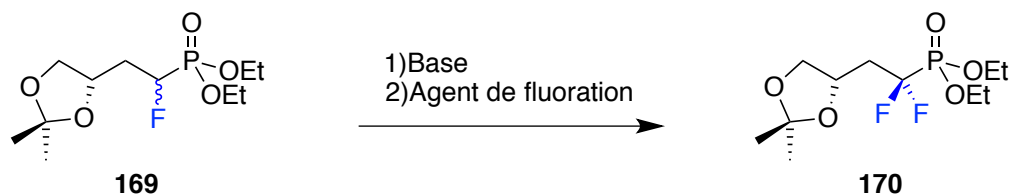


Schéma 34: Réaction de couplage et l'hydrogénation de l'alcène **174**.

L'alcène **174** est réduit par une hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif, conduisant à l' α -fluorophosphonate **169** avec un rendement de 94% (Schéma 34).

La deuxième étape clé de notre synthèse est l'insertion du deuxième atome de fluor en α du phosphonate de **169**. Cette étape s'est avérée délicate, et plusieurs essais ont été effectués (Tableau 26).^{22,23,24}

Tableau 26: Essais d'insertion du deuxième atome du fluor en position α du phosphonate sur 170.



| Entrée | Base | Eq. de Base | Agent de Fluoration | Eq. d'Agent de Fluoration | Proportions solvant (THF:DMF) |
|--------|------|-------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 1 | NaH | 1,1 | Selectfluor™ | 1,2 | 1 : 0 |
| 2 | NaH | 1,1 | Selectfluor™ | 1,6 | 1 : 0 |
| 3 | NaH | 1,1 | Selectfluor™ | 2 | 1 : 0 |
| 4 | NaH | 1,5 | Selectfluor™ | 2 | 1 : 1 |
| 5 | NaH | 2 | Selectfluor™ | 2 | 1 : 1 |
| 6 | NaH | 2 | Selectfluor™ | 2 | 0 : 1 |
| 7 | BuLi | 1,1 | Selectfluor™ | 1,2 | 1 : 0 |
| 8 | BuLi | 1,5 | Selectfluor™ | 1,6 | 1 : 1 |
| 9 | BuLi | 1,5 | Selectfluor™ | 2 | 1 : 1 |
| 10 | NaH | 1,5 | NFSI | 1,4 | 1 : 0 |
| 11 | NaH | 2 | NFSI | 2 | 1 : 0 |
| 12 | BuLi | 1,1 | NFSI | 1,4 | 1 : 0 |
| 13 | BuLi | 1,5 | NFSI | 2 | 1 : 0 |

Différentes conditions expérimentales ont été testées en modifiant soit la base, soit l'agent de fluoration, soit le solvant (Tableau 26). Les deux agents de fluorations que nous avons employé durant ces essais sont le Selectfluor™ et le *N*-fluoro-di(benzènesulfonyl)amine (NFSI), tous deux donneurs d'un fluor électrophile. Toutes les expériences ont été démarrées à -78°C. Vingt minutes après l'ajout de l'agent de fluoration, le milieu réactionnel est laissé à réchauffer à température ambiante.

Les premiers tests impliquent le NaH et le SelectfluorTM (Tableau 26, entrées 1 à 6). N'observant aucune formation d' α,α -difluoro phosphonate **170** en analyse par RMN du ^{19}F et du ^{31}P , les équivalents de chacun des réactifs ont été augmentés, sans plus de résultat. Le SelectfluorTM se solubilisant mal dans le THF, du DMF en proportion équivalente à celle de THF est ajouté (Tableau 26, entrée 5), puis un autre essai est réalisé uniquement en présence de DMF comme solvant (Tableau 26, entrée 6). Aucune formation du produit attendu n'ayant été observée, une base plus forte a été employée, le *n*-butyl lithium, en vain (Tableau 26, entrées 7 à 9). À partir des entrées 10 à 13 (Tableau 26), les essais ont été réitérés, en utilisant cette fois-ci le réactif NFSI comme agent de fluoration. A nouveau, le produit **170** n'est pas observé en analyses par RMN, nous empêchant ainsi de pouvoir continuer la synthèse.

La raison pouvant expliquer l'échec de l'insertion du deuxième atome de fluor viendrait de ses propriétés électroniques inductive et mésomère. Bien que l'électronégativité de cet atome soit très forte (*i.e.* la plus élevée sur l'échelle de Pauling), son influence électronique ne se limite pas qu'à son effet inductif attracteur sigma $-I_\sigma$. La faible longueur de la liaison C-F ($\approx 1,47 \text{ \AA}$) a pour conséquence de lui conférer un fort effet mésomère donneur $+M$, ainsi qu'un fort effet inductif donneur pi $+I_\pi$.²⁵ Par conséquent, un carbocation se trouvant en α d'un atome de fluor se verra stabilisé par les électrons non-liants du fluor. En revanche, un carbanion sera fortement déstabilisé par la répulsion électronique des électrons non-liants de l'atome de fluor (Schéma 35).²⁶

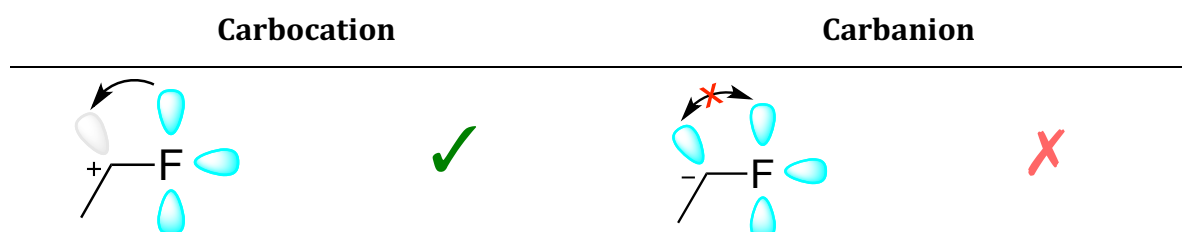


Schéma 35: Stabilisation du carbocation et déstabilisation du carbanion par les électrons non liants de l'atome de fluor.

D.1.3. Conclusion

Nous sommes arrivés jusqu'à l'obtention du mono-fluoré **169** mais nous n'avons pu y introduire le deuxième atome de fluor en α du phosphore. La formation de l'anion sur le carbone en α de l'atome de fluor n'est pas réalisable à partir du composé **169**, nous obligeant à envisager une nouvelle méthode de synthèse.

D.2 Introduction directe des deux atomes de fluor : 1^{ère} tentative

D.2.1. Rétrosynthèse

La stratégie précédente d'insertion successive des fluors ayant échoué, nous avons cherché à les introduire en une seule et même étape (Schéma 36). Afin de palier la difficulté de formation du carbanion au pied de l'atome de fluor, nous avons cherché à augmenter l'acidité du proton s'y trouvant. L'équipe de Périé a publié une synthèse aboutissant à des composés de type α,α -difluoro- β -oxophosphonate.²⁷ L'effet électro-attracteur du carbonyle diminuerait le pKa des protons α -phosphonate. Bien que ces composés soient instables et se dégradent probablement en des phosphites, carbènes de CF_2 et des acides carboxyliques, nous avons voulu appliquer la méthodologie développée par ce groupe dans la synthèse.

Afin d'aboutir aux molécules désirées, nous avons envisagé la voie de rétrosynthèse suivante (Schéma 36) :

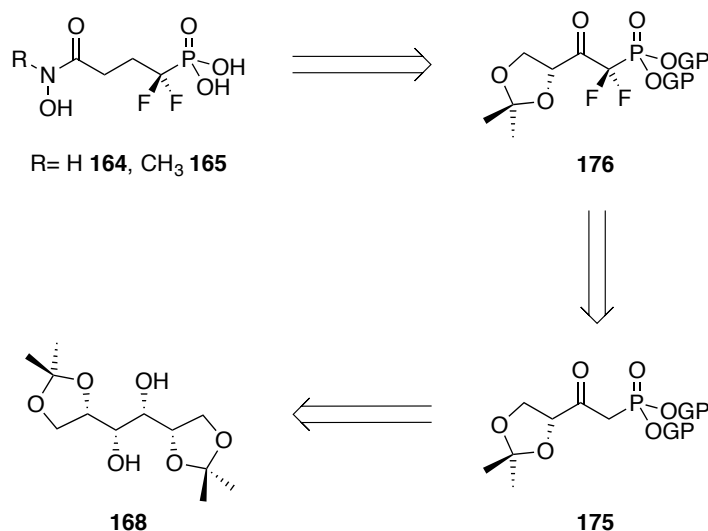


Schéma 36: Rétrosynthèse avec introduction directe par un agent de fluoration électrophile des deux atomes de fluor ; GP indique la présence d'un groupement protecteur.

Cette synthèse débiterait également avec le D-mannitol protégé commercial **168**. Une coupure oxydante permettrait d'obtenir l'aldéhyde correspondant, à partir duquel nous pourrions former un ester. Celui-ci serait couplé, via une réaction de Wittig, avec un méthylphosphonate, conduisant à la formation du composé β -oxo phosphonate **175**. Ensuite viendrait l'étape clé de cette synthèse : l'insertion en une étape des deux atomes de fluor à l'aide d'un agent de fluoration, conduisant au α,α -difluoro phosphonate **176**. Une fois ce produit obtenu, plusieurs étapes nécessaires à la construction de l'acide hydroxamique suivraient, aboutissant à la formation des produits finaux **164** et **165**.

D.2.2. Résultats et discussion

La coupure oxydante du diol 1,2,5,6-di-*O*-isopropylidene-D-mannitol commercial **168** est faite à l'aide du NaIO₄ pour produire l'aldéhyde correspondant. Ce dernier réagit, en milieu basique et en présence de dibrome, avec du méthanol pour former l'ester **177** avec un rendement de 75% (Schéma 37).

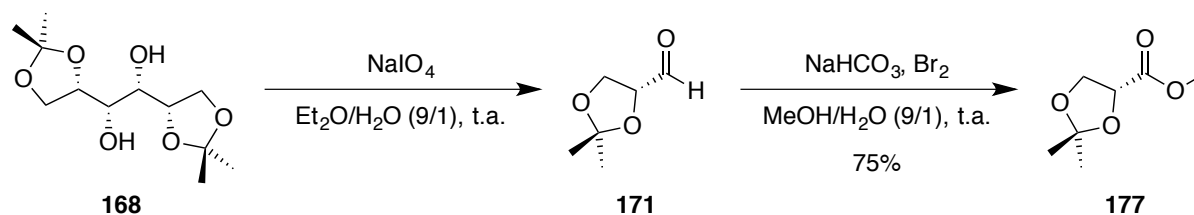


Schéma 37: Formation de l'ester **177** en deux étapes, à partir du produit commercial **168**.

Parallèlement, nous avons effectué une réaction faisant participer des phosphites protégés, soit par des éthyles, soit par des benzyles. Les anions **178-a** et **178-b**, formés par action de NaH, effectuent une substitution nucléophile sur l'iodométhane. Les produits **179-a** et **179-b** sont obtenus avec les rendements respectifs de 67% et 85% (Schéma 38).

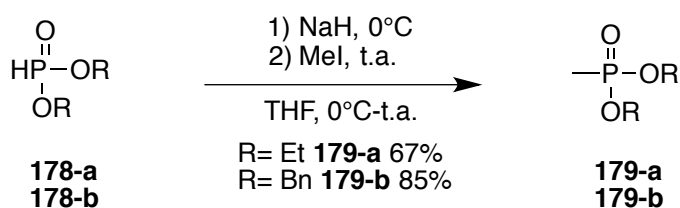


Schéma 38: Préparation des méthylphosponates.

Les phosphonates **179-a** et **179-b** sont mis à réagir avec du *n*-BuLi, puis l'ester **177** est ajouté au milieu réactionnel contenant l'anion, conduisant à la formation de **175-a** et **175-b** avec les rendements respectifs de 38% et 70%. (Schéma 39).²⁸

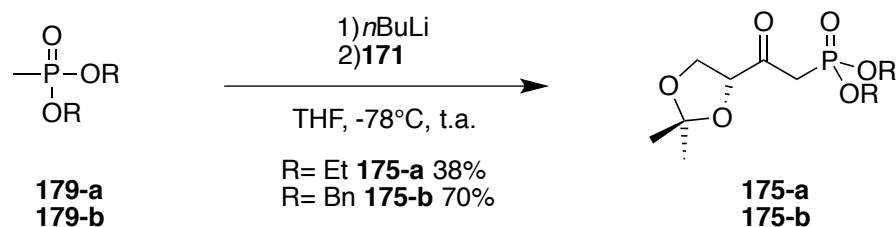


Schéma 39: Formation des β -oxo-phosphonates **175-a** et **175-b**.

L'étape d'insertion des deux atomes de fluor est réalisée en présence de NaH comme base pour former l'anion en α du phosphonate et de SelectfluorTM (Schéma 40). Ce processus se déroule deux fois de suite, conduisant à la formation des **176-a** et **176-b**.²⁷

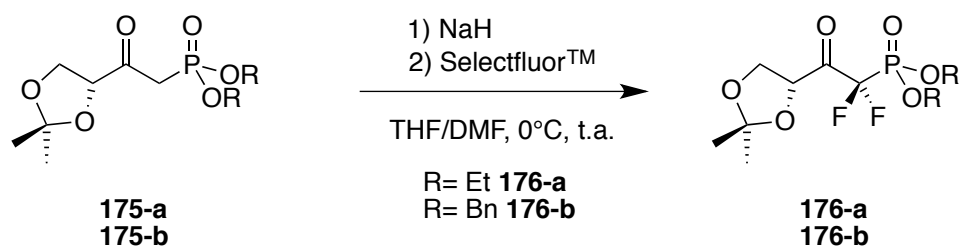


Schéma 40: Insertion directe des deux atomes de fluor.

Les composés ester diéthylique et ester dibenzyle difluorés, **176-a** et **176-b** respectivement, sont observés par RMN du ³¹P des bruts réactionnels, par la présence de deux *pseudo*-triplets ayant une constante de couplage ²J_{P-F} de 96,5 Hz, l'un correspondant à la forme cétone et l'autre à sa forme hydrate.

L'analyse par RMN du brut réactionnel issu de la réaction avec de l'ester diéthylique **175-a** montre la présence de l' α,α -difluoro- β -oxophosphonate **176-a**, et non celle du composé α -fluoro- β -oxophosphonate. Cependant, ce dernier s'est dégradé durant l'étape de purification en des composés non identifiables. Etant trop sensible, l'intermédiaire **176-a** ne pourra être utilisé pour la suite de la synthèse.

L'analyse du brut réactionnel issu de la réaction avec de l'ester dibenzyle **175-b**, indique la présence du difluoré **176-b**, ainsi que celle de son analogue α -fluoro- β -oxophosphonate. Malgré de nombreuses tentatives de purification, nous n'avons pas réussi à les séparer, ni à obtenir une fraction pure du composé souhaité. A la difficulté de la séparation de ces deux molécules, s'ajoute celle de la dégradation du composé d'intérêt sur silice, lors de la purification par chromatographie flash. Le produit **176-b**, partiellement purifié, a alors été engagé pour la suite de la synthèse, en espérant pouvoir effectuer la purification après l'étape de réduction du carbonyle en alkyle. Afin de réaliser la formation du thioacétal, de l'éthane dithiol a été ajouté au composé **176-b** en présence d'éthérate de trifluorure de bore (Schéma 41).

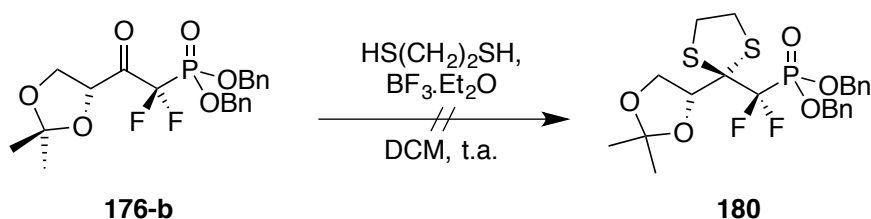


Schéma 41: Tentative de formation du thioacétal **180**, en vue de la réduction de la cétone.

Le composé ester benzylique **180** n'a pu être obtenu et a conduit à des composés non-identifiables, empêchant la poursuite de la synthèse.

D.2.3. Conclusion

Nous avons pu obtenir le composé α,α -difluoro- β -oxophosphonate **176-b** mais nous n'avons pas réussi à le séparer de son analogue α -fluoro- β -oxophosphonate lors de l'étape de purification. Les conditions de la réaction de formation du thioacétal **180** ont conduit à la dégradation des produits, nous empêchant de poursuivre la synthèse. Une nouvelle stratégie a alors été élaborée.

D.3 Introduction directe des deux atomes de fluor : 2^{ème} tentative

D.3.1. Rétrosynthèse

Après nos précédents déboires de synthèse, nous avons choisi d'ajouter un fragment comportant le groupement difluorométhylène phosphonate à partir du bromodifluorométhylphosphonate de diéthyle commercial. L'étape clé de cette synthèse consiste à préparer l'acide **183**, dont deux voies rétrosynthétiques sont envisageables pour l'obtenir (Schéma 42) :

- La première (voie **A**) débiterait à partir du 3-bromopropanoate de méthyle **181** commercial, sur lequel pourrait être introduit le groupement clé : l' α,α -difluoro phosphonate. Pour faciliter cette réaction, un échange d'halogène du brome vers un iode, meilleur groupe partant, serait effectué préalablement. Nous pourrions alors obtenir le phosphonate **182**, sur lequel nous effectuerions une réaction de saponification qui nous conduirait à l'acide carboxylique **183**,

- La seconde (voie **B**) commencerait à partir du prop-2-énol commercial **184**. Après l'insertion d'un meilleur groupe partant, l'introduction du fragment l' α,α -difluoro phosphonate conduirait au produit **185**. Une réaction d'hydroboration mènerait à l'alcool primaire qui serait ensuite oxydé en l'acide carboxylique correspondant **183**.

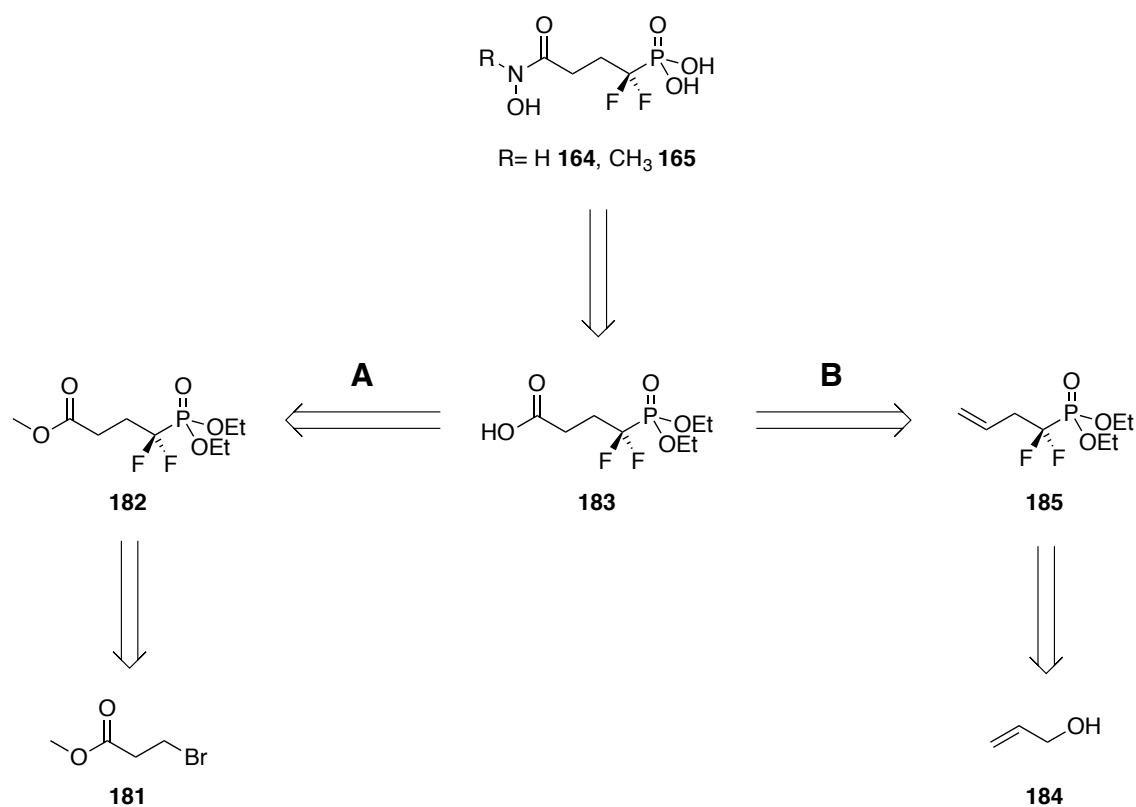


Schéma 42: Deux voies rétrosynthétiques envisagées impliquant une insertion directe des atomes de fluor, via l'utilisation du réactif $\text{BrCF}_2\text{P}(\text{O})(\text{OEt})_2$.

Une fois à l'acide carboxylique **183** obtenu, l'introduction de la fonction hydroxamate via un couplage de type peptidique permettrait d'aboutir à la construction de la pince chélatante hydroxamate, nécessaire à la formation des produits finaux **164** et **165**.

D.3.2. Stratégie A. Résultats et discussion

Le 2-bromo acétate d'éthyle commercial **181** est mis à réagir avec de l'iodure de sodium afin de réaliser la réaction d'échange d'halogène (Schéma 43). Cette étape a pour objectif de faciliter la réaction d'insertion du fragment difluorométhylène phosphonate.

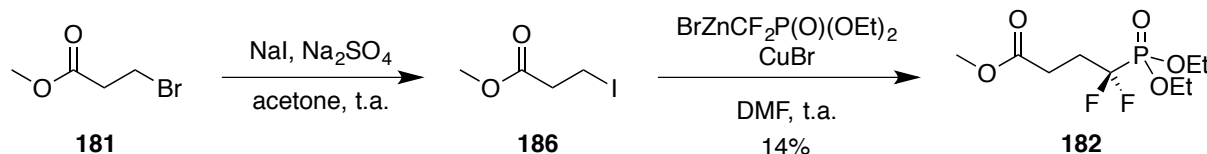


Schéma 43: Echange d'halogène et insertion de BrCF₂P(O)(OEt)₂ conduisant au **182**.

Le composé iodé **186** ne peut être purifié sans prendre le risque d'être dégradé. Nous avons démontré sa formation par les analyses comparatives de ses spectres de RMN du ¹H et du ¹³C avec ceux de la molécule bromée de départ **181**. Pour cette dernière, le triplet correspondant au signal du -CH₂ portant le brome se trouve à 3,50 ppm et possède un couplage ³J de 6,1 Hz. Dans le spectre de RMN du ¹H du brut réactionnel de la molécule iodée **186**, ce signal est présent mais reste faible. Par contre, le triplet majoritaire est à 3,28 ppm et possède un couplage ³J de 6,9 Hz, correspondant au CH₂-I de la molécule. Nous avons pu estimer la présence du composé iodé **186** à environ 80% par rapport à celle de son analogue bromé. L'analyse du spectre de RMN du ¹³C indique également la présence de **186**, par le signal à 0,4 ppm du CH₂-I, ainsi que celle du produit de départ bromé **181**, possédant le signal à 28,7 ppm.^{19,20}

L'étape suivante fait intervenir le réactif clé, permettant l'introduction des atomes de fluor. Le réactif organo-zincique [BrZnCF₂P(O)(OEt)₂] est préparé en présence de BrCF₂P(O)(OEt)₂ et de poudre de Zn (Schéma 43). Le bromure de cuivre est additionné au milieu réactionnel conduisant à la formation du cuprate organozincique correspondant, puis est ajouté au **186**.²⁹ Le produit attendu **182** est obtenu avec un très faible rendement sur deux étapes de 14%. Ce résultat n'étant pas satisfaisant, nous avons envisagé de travailler sur la voie B.

D.3.3. Stratégie B. Résultats et discussion

Le diéthyle allyle phosphate **187** est obtenu en conditions basiques et en présence des produits commerciaux prop-2-énol **184** et ClP(O)(OEt)₂ avec un rendement de 47% (Schéma 44). Lors de sa purification, le produit **188** a également été isolé. Il est issu de la réaction de deux molécules d'alcool allylique **184** avec le réactif ClP(O)(OEt)₂ et est obtenu avec un rendement de 7%.

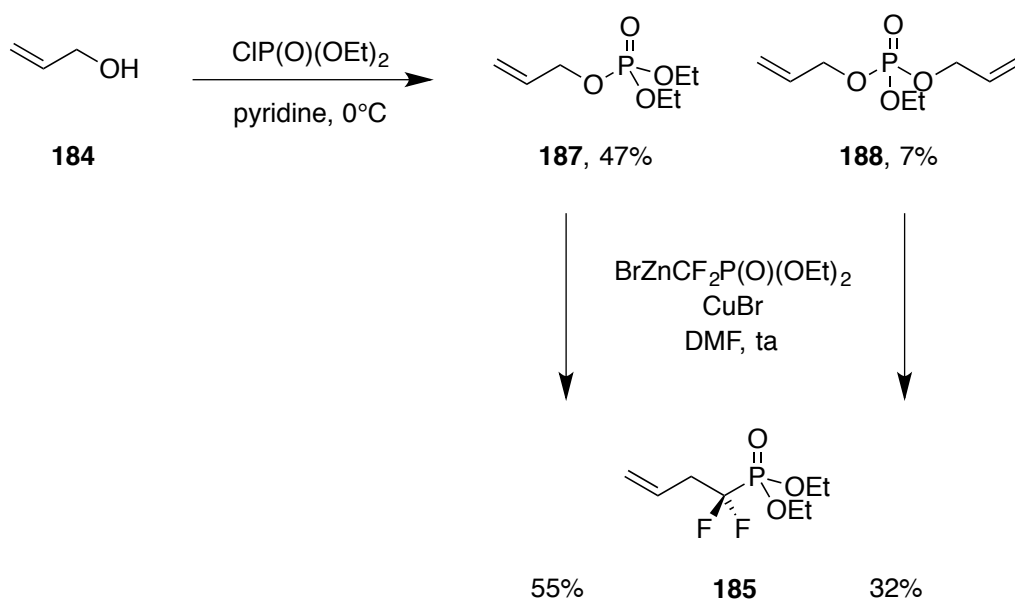


Schéma 44: Insertion du groupement α,α -difluorométhylphosphonate.

Pour l'étape suivante, nous avons préparé, comme précédemment, le réactif organozincique BrZnCF₂P(O)(OEt)₂ à partir de poudre de Zn et de BrCF₂P(O)(OEt)₂. Puis le CuBr est ajouté au milieu réactionnel, conduisant à la formation du composé organozincique-cuprate correspondant (Schéma 44). Nous avons effectué l'addition du composé cuprate organozincique sur chacune des deux molécules **187** et **188**. En présence du diéthyle mono-allyle phosphate **187**, l' α,α -difluoro phosphonate **185** est obtenu avec un rendement de 55%. L'éthyle diallyle phosphate **188** a également conduit au **185** avec un rendement de 32%.

La réaction suivante implique une réaction d'hydroboration, réalisée à l'aide du 9-borabicyclo(3,3,1)nonane sur l'alcène **185** (Schéma 45). Après traitement oxydant à l'aide d'une solution de H_2O_2 et de soude, **189** est obtenu avec un rendement de 92%.³⁰

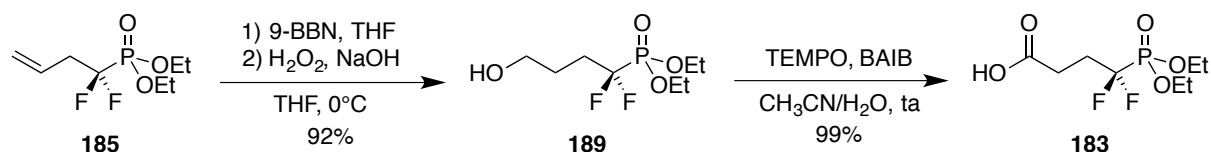


Schéma 45: Hydroboration de l'alcène **185** et oxydation de l'alcool primaire **189** en l'acide correspondant **183**.

Par la suite, l'alcool primaire **189** est oxydé en l'acide carboxylique correspondant **183** par action du (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxyl (TEMPO), en présence de [bis(acétoxy)iodo]benzène comme cooxydant (Schéma 45).³¹ L'acide **183** est obtenu avec un rendement de 99%.

La condensation de l'hydroxylamine benzylée sur la fonction acide carboxylique de **183**, est réalisée en présence de carbodiimidazole (Schéma 46).³² L'hydroxamate protégé **190** est obtenu avec un rendement de 61%.

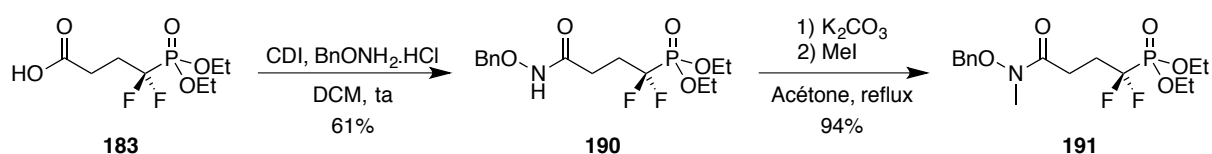


Schéma 46: Formation de l'hydroxamate protégé **190** et méthylation d'une partie du lot conduisant au produit *N*-méthylé **191**.

Une réaction de *N*-méthylation de l'hydroxamate est réalisée à reflux dans l'acétone, en présence de K_2CO_3 comme base et d'iodure de méthyle (Schéma 46). Le dérivé *N*-méthylé **191** est obtenu avec un rendement de 94%, soit un rendement de 57% pour les deux réactions de condensation et de méthylation. Nous avons voulu savoir si le couplage d'une benzylhydroxylamine préalablement méthyliée sur l'acide **183** permettrait d'obtenir un meilleur rendement pour conduire au produit **191**. La *N*-méthyl benzylhydroxylamine a été synthétisée en trois étapes en suivant la procédure de Sharma et *al.* (Schéma 47).³³

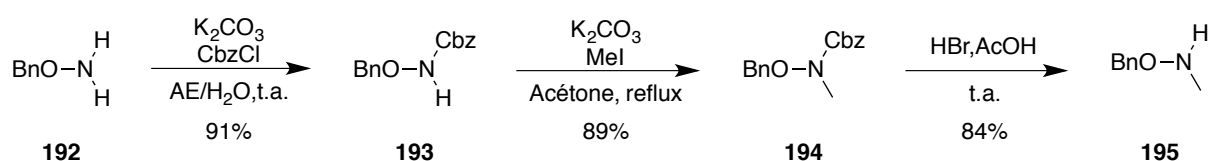


Schéma 47: Préparation de la benzylhydroxylamine *N*-méthylée **195**.

La synthèse du **195** débute par une monoprotection de l'hydroxyle amine benzylée **192** à l'aide de benzylchloroformate en présence de K_2CO_3 , conduisant à la formation de **193** avec un rendement de 91% (Schéma 47). L'hydroxylamine protégée réagit avec le K_2CO_3 pour former l'anion permettant d'effectuer une attaque nucléophile sur l'iodure de méthyle. Le produit **194** est obtenu avec un rendement de 89%. La déprotection du groupement protecteur carboxybenzyle en condition acide avec une solution à 33% d'HBr dans de l'acide acétique glacial conduit au composé *N*-méthylé **195** à 84%, avec un rendement global sur trois étapes de 68%.

Nous avons réalisé le couplage de l'hydroxybenzyle *N*-méthylé **195** sur l'acide **183** dans les mêmes conditions que pour l'*O*-benzylhydroxylamine non-méthylée **192**. L'hydroxamate *N*-méthylé **191** est obtenu avec un rendement de 46%, inférieur au rendement global de 61% obtenu pour les étapes de condensation et de méthylation. Cette procédure n'est donc pas utile à mettre en œuvre pour notre synthèse.

Nous sommes maintenant en possession des molécules *N*-méthylée **191** et non-méthylée **190**, sous forme protégées. La déprotection du groupement benzylé est réalisé par d'une réaction d'hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif. Les produits *N*-méthylé **197** et non-méthylé **196** sont tous deux obtenus quantitativement.

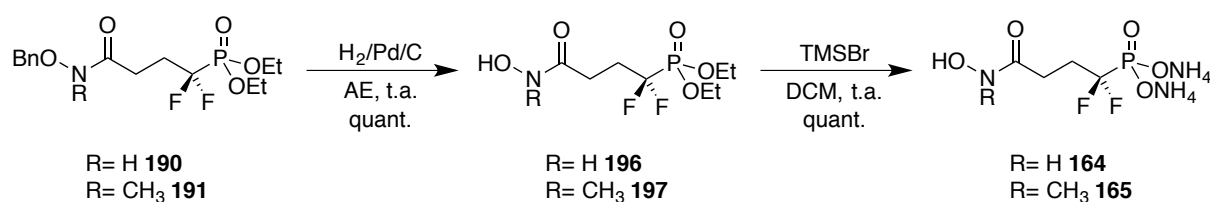


Schéma 48: Etapes de déprotections finales.

La dernière déprotection consiste à déprotéger les éthyles du phosphonate (Schéma 48). Nous avons mis, parallèlement, nos deux composés en solution dans du dichlorométhane auxquels nous avons ajouté du bromure de triméthylsilyle en excès.^{32,34} Cette réaction est très longue, et cela peut s'expliquer par la présence des deux atomes de fluor en position α du phosphore. Leurs effets inductifs attracteurs désactivent les atomes d'oxygènes, diminuant ainsi leur réactivité. Au bout de trois à cinq jours, nous obtenons les produits désirés déprotégés *N*-méthylé **165** et non-méthylé **164** quantitativement. Pour améliorer l'efficacité de cette réaction il est recommandé d'utiliser un flacon de TMSBr neuf ou très récent, car étant très réactif, il se dégrade très rapidement et est très sensible à l'hydrolyse.

La molécule non-méthylée **164** est présente sous forme de trois conformères, qui sont observables par RMN du ^{19}F et du ^{31}P réalisée dans D_2O . Par exemple, en RMN du ^{19}F trois doublets sont visibles à -113,23 ppm, -112,85 ppm et -112,75 ppm avec les constantes de couplage respectives de $^2J = 89,7$, $^2J = 87,0$ et $^2J = 87,7$ Hz.

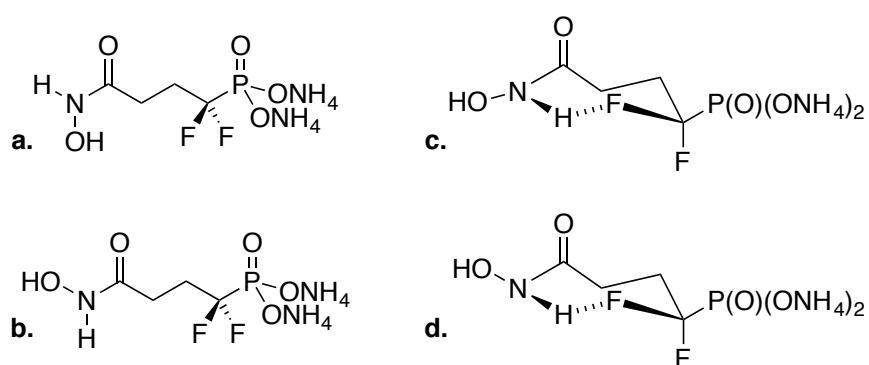


Schéma 49: Conformations supposées de la molécule 164 non-méthylée.

Deux conformères résulteraient des formes *Z* et *E* de l'acide hydroxamique (a, b, Schéma 49). Le dernier conformère pourraient correspondre à l'une des deux conformations c et d, proposées dans le Schéma 49. Une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydrogène porté par l'azote et l'un des fluors conduirait à un cycle à 7 chaînons.³⁵ La présence de l'hydroxyle en position pseudo-équatoriale ou pseudo-axiale est difficile à prédire. Les deux positions pourraient être stabilisées par une liaison hydrogène entre l'hydroxyle et le carbonyle (c et d, Schéma 49). En position pseudo-équatoriale de l'hydroxyle, il y aurait moins de gêne stérique et cette conformation serait plus favorable (c, Schéma 49). Plus d'analyses sont nécessaire pour interpréter ces résultats.

La molécule *N*-méthylée **165** est présente sous forme d'un minimum de quatre conformères d'après la RMN du ^{19}F dans D_2O . La proximité, la faiblesse et la largeur des signaux ne permettent pas d'en déterminer avec précision leur nombre en RMN du ^{31}P dans D_2O . L'analyse par RMN du ^1H indique trois signaux pouvant correspondre au méthyle. L'un est fin à 3,19 ppm, un second très étalé à 3,14 ppm et un d'intensité plus faible à 3,36 ppm.

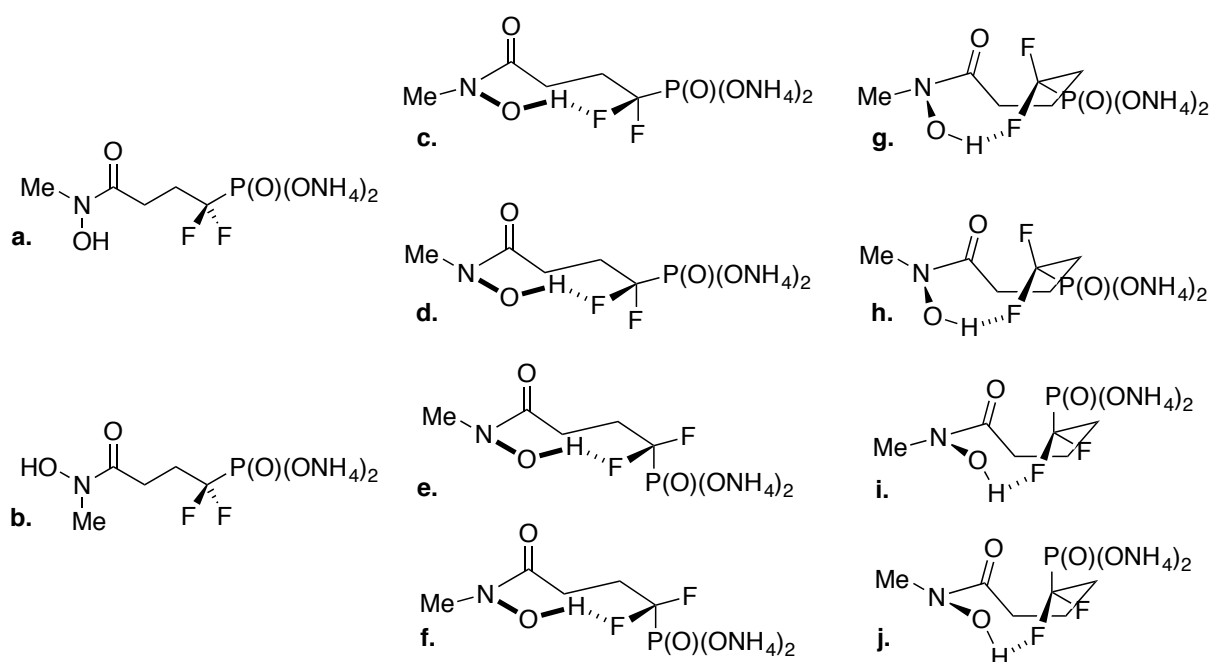


Schéma 50: Conformations supposées de la molécule 165 *N*-méthylée.

Comme pour l'hydroxamate **164** non-méthylé, les conformations *Z* et *E*, de l'acide hydroxamique, seraient présentes (a, b, Schéma 50). Une hypothèse pouvant expliquer le nombre important de conformations visibles par RMN du ^{19}F et du ^{31}P viendrait de la formation de cycles à 8 chaînons. Ces derniers pourraient adopter différentes conformations en fonctions de la position pseudo-axiale ou pseudo-équatoriale du méthyle de l'acide hydroxamique (c, d, e, f, Schéma 50). Le cycle étant grand et le carbonyle voisin plan, la gêne stérique de la position axiale pourrait être suffisamment faible pour permettre aux conformations de coexister dans le milieu.

La position du phosphonate et de ses contre-ions est également une question délicate. Etant volumineux, la position pseudo-équatoriale serait favorable. La principale gêne stérique à sa position axiale proviendrait des hydrogènes des groupements méthyles (g, h, i, j, Schéma 50). Il est alors possible que ces conformations soient présentes en faibles proportions. Nous n'avons pas approfondi nos investigations sur ce sujet.

Dans le but d'écourter le temps de réaction, Nous avons testé cette dernière déprotection en remplaçant le TMSBr par son analogue iodé, plus réactif, mais nous avons observé une dégradation des produits.³⁶ Nous avons alors entrepris des tests, à nouveau en présence de TMSBr, à l'aide d'un appareil à micro-ondes à 40°C avec une puissance de 35W, sur des durées de dix minutes. Encore une fois, les produits ont été dégradés. Pour cette dernière réaction de déprotection, il faut donc se montrer patient.

D.3.4. Conclusion

Les produits α,α -difluoro phosphonate en version méthylée et non-méthylée, **165** et **164** respectivement ont pu être obtenu avec les rendement respectifs de 15 et 17%. Des études conformationnelles plus poussées pourraient être intéressants pour déterminer les conformations que peuvent adopter ces deux composés. Il reste encore à tester ces molécules sur la DXR afin de déterminer leurs efficacités.

D.4. Conclusion des synthèses organiques

Les premières stratégies ont montré que l'insertion à l'aide d'agent donneur de fluor électrophile n'est pas la méthode adaptée pour notre système. L'insertion d'un fragment α,α -difluorométhylphosphonate est plus efficace et permet d'aboutir aux composés désirés non-méthylé **164** et *N*-méthylé **165** avec les rendements respectifs de 17 et 15%, lors de la quatrième stratégie.

Des tests d'inhibitions ont été réalisés sur le composé *N*-méthylé. Ces essais ayant été réalisés plus d'un an et demi après les synthèses, le composé non-méthylé **164** s'est complètement dégradé lors de son stockage et le méthylé **165** contenait environ 30% de dégradation d'après analyses par RMN du ^{31}P et du ^{19}F . Cette dégradation pourrait résulter d'un temps de stockage trop long ou de la présence d'impuretés. L'utilisation de TMSBr peut avoir laissé des traces de HBr dans le milieu. Il est possible que malgré les précautions prises durant les *work up* et le séchage des produits il en soit resté. Néanmoins, la préparation du composé *N*-méthylé **165** testée a montré une IC_{50} de 98 nM sur *EcDXR*. Pour déterminer si l'activité inhibitrice provient des impuretés ou du produit lui-même, cette molécule et sa forme non-méthylée devront être à nouveau synthétisées, et les nouveaux tests d'inhibitions permettront d'obtenir des résultats d'inhibitions exploitables. Si ces derniers se révèlent intéressants, cela permettrait d'encourager l'utilisation de la fonction α,α -difluoro phosphonate pour la conception d'inhibiteurs de la DXR.

E. Conclusion générale

Nous avons mis en place un protocole d'études de composés potentiellement inhibiteurs de la DXR en utilisant des outils de modélisation et de calculs d'énergie libre. Les résultats ont montré une différence de comportement entre les molécules à pince hydroxamate et rétro-hydroxamate. Pour en comprendre la raison, des études computationnelles plus importantes seraient nécessaires. Les composés à pince hydroxamate ont présenté des interactions plus intéressantes que leurs version rétro-hydroxamique. L'évaluation des interactions pouvant avoir lieu entre les molécules difluorées de type hydroxamique **164** et **165** avec la DXR sont plus favorable comparé à leurs analogues non fluorés respectifs, **77** et **60**. Ces résultats encourageants, nous ont incité à poursuivre la synthèse de ces composés malgré les échecs rencontrés. Les synthèses ont pu aboutir aux produits d'intérêts et son en attente d'être testés sur la DXR. En nous fondant sur nos connaissances, nous pouvons supposer que le composé *N*-méthyle α,α -difluoro phosphonate **165** possédera une meilleure activité que son analogue non méthylé **164**.

En fonction des résultats nous pourrions évaluer l'apport de la fonction α,α -difluoro phosphonate par rapport à la fonction phosphonate. Par la suite, une étude cristallographique de ce ou ces composés pourrait être envisagée.

¹ Kuntz, L., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C., Hemmerlin, A., Willem, A., Bach, T. J., Rohmer, M., « Isoprenoid biosynthesis as a target for antibacterial and antiparasitic drugs: phosphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase », *The Biochemical journal*, 2005, 386, 127–135.

² Verbrugghen, T., Cos, P., Maes, L., Van Calenbergh, S., Calenbergh, S. Van, « Synthesis and evaluation of alpha-halogenated analogues of 3-(acetylhydroxyamino)propylphosphonic acid (FR900098) as antimalarials », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53, 5342–5346.

³ a) Xu, C., Hall, R., Cummings, J., Raushel, F. M., « Tight binding inhibitors of N-acyl amino sugar and N-acyl amino acid deacetylases », *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128, 4244–4245 ; b) Nahum, V., Tulapurkar, M., Lévesque, S. A., Sévigny, J., Reiser, G., Fischer, B., « Diadenosine and Diuridine Poly(borano)phosphate Analogues: Synthesis, Chemical and Enzymatic Stability, and Activity at P2Y 1 and P2Y 2 Receptors », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49, 1980–1990; c) Huang, W., Zhang, H., Davrazou, F., Kutateladze, T. G., Shi, X., Gozani, O., Prestwich, G. D., « Stabilized phosphatidylinositol-5-phosphate analogues as ligands for the nuclear protein ING2: Chemistry, biology, and molecular modeling. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129, 6498–6505; d) Zhang, H., He, J., Kutateladze, T. G., Sakai, T., Sasaki, T., Markadieu, N., Prestwich, G. D., « 5-Stabilized phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate analogues bind Grp1 PH, inhibit phosphoinositide phosphatases, and block neutrophil migration », *ChemBioChem*, 2010, 11, 388–395; e) Keddie, N. S., Ye, Y., Aslam, T., Luyten, T., Bello, D., Garnham, C., Conway, S. J., « Development of inositol-based antagonists for the D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor », *Chemical Communications*, 2011, 4, 242–244.

⁴ Black, E., Breed, J., Breeze, A. L., Embrey, K., Garcia, R., Gero, T. W., Tucker, J., « Structure-based design of protein tyrosine phosphatase-1B inhibitors », *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15, 2503–2507; b) Storer, R. I., Jones, L. H. « Squaramides: physical properties, synthesis and applications », *Chemical Society Reviews*, 2011, 40, 2330–2346 ; c) Holmes, C. P., Li, X., Pan, Y., Xu, C., Bhandari, A., Moody, C. M., Grove, J. R., « PTP1B inhibitors: Synthesis and evaluation of difluoro-methylenephosphonate bioisosteres on a sulfonamide scaffold », *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18, 2719–2724.

⁵ Zinglé, C., Kuntz, L., Tritsch, D., Grosdemange-Biliard, C., Rohmer, M., « Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway: Structural Variations around Phosphonate Anchor and Spacer of Fosmidomycin, a Potent Inhibitor of Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase », *Journal of Organic Chemistry*, 2010, 75, 3203-3207.

⁶ Nguyen-Trung, A.T., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., « Synthesis of tetrazole analogues of phosphonohydroxamic acids: an attempt to improve the inhibitory activity against the DXR », *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23, 1643-1647.

⁷ Nieschlalk, J., Batsanov, O'Hagan, D., Howard, J.A.K., « Synthesis of Monofluoro- and Difluoro-methylenephosphonate Analogues of sn-Glycerol-3-phosphate as Substrates for Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase and the X-Ray Structure of the Fluoromethylenephosphonate Moiety », *Tetrahedron*, 1996, 52, 165-176.

⁸ Blackburn, G.M., England, D., Kolkman, F., « Monofluoro- and Difluoro-methylenebisphosphonic Acids - Isopolar Analogues of Pyrophosphoric Acid », *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1981, 17, 930-932.

⁹ I. Ojima, *Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology*, Wiley-Blackwell, 2009.

¹⁰ a) Deutsch, C., Taylor, J.S., Wilson, D.F., « Regulation of intracellular pH by human peripheral blood lymphocytes as measured by ¹⁹F NMR », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1982, 79, 7944-7948 ; b) Zilberstein, D.A.N., Agmon, V., Padan, E., « Escherichia coli Intracellular pH, Membrane Potential, and Cell Growth », *Journal of Bacteriology*, 1984, 158, 246-252; c) Saliba, K. J., Kirk, K., « pH Regulation in the Intracellular Malaria Parasite, *Plasmodium falciparum* », *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274, 33213-33219; d) Rao, M., Streur, T. L., Aldwell, F. E., Cook, G. M., « Intracellular pH regulation by Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium bovis BCG », *Microbiology*, 2001, 147, 1017-1024.

¹¹ Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G. R. « Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform », *Journal of Cheminformatics*, 2012, 4, 1-33.

¹² Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W. L., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J., « AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility », *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30, 2785-2791.

¹³ Mac Sweeney, A., Lange, R., Fernandes, R. P. M., Schulz, H., Dale, G. E., Douangamath, A., Oefner, C., « The crystal structure of E. coli 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation », *Journal of Molecular Biology*, 2005, 345, 115–127.

¹⁴ Henriksson, L.M., Unge, T., Carlsson, J., Åqvist, J., Mowbray, S.L., Jones, T.A., « Structures of Mycobacterium tuberculosis 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase provide new insights into catalysis », *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 19905–19916

¹⁵ Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Richardson, D. C., « MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography », *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, 66, 12–21.

¹⁶ Lafont, V., Schaefer, M., Stote, R. H., Atschuh, D., Dejaegere, A., « Protein-Protein Recognition and Interaction Hot Spots in an Antigen-Antibody Complex: Free Energy Decomposition Identifies “Efficient Amino Acids.” », *Proteins*, 2007, 70, 311–319.

¹⁷ T. Kapfere, R. Brückner, « Asymmetric Dihydroxylation of β,γ -Unsaturated Carboxylic Esters with Trisubstituted C=C Bonds – Enantioselective Syntheses of Trisubstituted γ -Butyrolactones », *European Journal of Organic Chemistry*, 2006, 2119–2133.

¹⁸ P. Cui, W.F. McCalmont, J.L. Tomsig, K.R. Lynch, T.L. MacDonald, « a - and b - Substituted phosphonate analogs of LPA as autotaxin inhibitors », *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2008, 16, 2212–2225.

¹⁹ Pretsch, C., Seibl, S., « Spectral data for structure determination of organic compounds », Springer-Verlag, Berlin, 1983.

²⁰ Pretsch, E., Bühlmann, P., Affolter, C., « Structure Determination of Organic Compounds, Tables of Spectral Data », 3^{ème} édition, Springer-Verlag, Berlin, 2000.

²¹ Thompson, S. K., Heathcock, C. H., « Effect of Cation, Temperature, and Solvent on the Stereoselectivity of the Horner-Emmons Reaction of Trimethyl Phosphonoacetate with Aldehydes », *Journal of Organic Chemistry*, 1990, 3, 3386–3388.

-
- ²² Pham, V., Zhang, W., Chen, V., Whitney, T., Yao, J., Froese, D., Friesen, A.D., Diakur, J.M, Hague, W., « Design and Synthesis of Novel Pyridoxine 5'-Phosphonates as Potential Antiischemic Agents », *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, 46, 3680-3687.
- ²³ Wnuk, S.F., Bergolla, L.A., Garcia, P.I. Jr., « Studies toward the Synthesis of α -Fluorinated Phosphonates via Tin-Mediated Cleavage of α -Fluoro- α -(pyrimidin-2-ylsulfonyl)alkylphosphonates. Intramolecular Cyclization of the α -Phosphonyl Radicals », *Journal of Organic Chemistry*, 2002, 67, 3065-3071.
- ²⁴ Tsukada, T., Takahashi, M., Takemoto, T., Kanno, O., Yamane, T., Kawamura, S., Nishi, T., « Synthesis, SAR, and X-ray structure of tricyclic compounds as potent FBPase inhibitors », *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19, 5909-5912.
- ²⁵ Carroll, T.X., Thomas, T.D., Bergersen, H., Borve, K.J., Saethre, L.J., « Fluorine as a π -Donor. Carbon 1s Photoelectron Spectroscopy and Proton Affinities of Fluorobenzenes », *Journal of Organic Chemistry*, 2006, 71, 1961-1968.
- ²⁶ Dixon, D.A., Fukunaga, T., Smart, B.E., « Structures and Stabilities of Fluorinated Carbanions- Evidence for Anionic Hyperconjugation », *Journal of the American Chemistry Society*, 1986, 108, 4027-4031.
- ²⁷ Ladame, S., Willson, M., Périé, J., «A Convenient Synthesis of Dibenzyl α,α -Difluoromethyl- β -ketophosphonates », *European Journal of Organic Chemistry*, 2002, 2640-2648.
- ²⁸ O. Meyer, C. Grosdemange-Billiard, D. Tritsch, M. Rohmer, « Isoprenoid biosynthesis via the MEP pathway. Synthesis of (3 R ,4 S)-3,4-dihydroxy-5-oxohexylphosphonic acid, an isosteric analogue of 1-deoxy- D -xylulose 5-phosphate, the substrate of the 1-deoxy- D -xylulose 5-phosphate reductoisomerase », *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2003, 1, 4367-4372.
- ²⁹ Yokomatsu, T., Suemune, K., Murano, T., Shibuya, S. « Synthesis of (α,α -Difluoroallyl) phosphonates from Alkenyl Halides or Acetylenes », *Journal of Organic Chemistry*, 1996, 3263, 7207-7211.

- ³⁰ Haelters, J.-P., Couthon-Gourvès, H., Le Goff, A., Simon, G., Corbel, B., Jaffrès, P.-A., « Synthesis of functionalized alkoxyalkylidene gem-bisphosphonates », *Tetrahedron*, 2008, 64(27), 6537–6543.
- ³¹ Epp, J. B., Widlanski, T. S., « Facile Preparation of Nucleoside-5'-carboxylic Acids », *Journal of Organic Chemistry*, 1999, 64, 293–295.
- ³² Verbrugghen, T., Cos, P., Maes, L., Van Calenbergh, S., « Synthesis and evaluation of alpha-halogenated analogues of 3-(acetylhydroxyamino)propylphosphonic acid (FR900098) as antimalarials » *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53, 5342–5346.
- ³³ Sharma, S. K., Miller, M. J., Payne, S. M. « Spermexatin and spermexatol: new synthetic spermidine-based siderophore analogues », *Journal of Medicinal Chemistry*, 1989, 32, 357–67.
- ³⁴ Tasadaque, S.A.S., Guiry, P.J., « The chemoselective and efficient deprotection of silyl ethers using trimethylsilyl bromide », *Organique & Biomolecular Chemistry*, 2008, 6, 2168-2172.
- ³⁵ Howard, J.A.K, Hoy, V.J., O'Hagan, D., Smith, G.T., « How good is fluorine as a Hydrogene Bond Acceptor ? », *Tetrahedron*, 1996, 52, 12613-12622.
- ³⁶ Jung, M.E., Lyster, M.A., « Quantitative dealkylation of alkyl ethers via treatment with trimethylsilyl iodide. A new method for ether hydrolysis », *Journal of Organic Chemistry*, 1977, 42, 3761-3764.

X. Synthèse d'un analogue époxyde du désoxy-D-xylulose 5-phosphate

| | |
|--|------------|
| A. Introduction | 298 |
| A.1 Etude du mécanisme réactionnel de la DXR..... | 298 |
| A.2. Inhibition irréversible potentielle chez la DXR..... | 301 |
| B. Première approche de synthèse de l'analogue époxyde | 302 |
| B.1. Résultats et discussion | 303 |
| <i>B.1.1. Etude d'hydrogénolyse en présence d'un époxyde et d'un phosphate</i> | 309 |
| <i>B.1.1. Application de la méthode d'hydrogénolyse optimisée</i> | 312 |
| B.2. Conclusion..... | 312 |
| C. Seconde approche de synthèse de l'analogue époxyde du DXP | 313 |
| C.1. Résultats et discussion..... | 314 |
| C.2. Conclusion | 316 |
| D. Conclusion générale | 316 |

A. Introduction

A.1 Etude du mécanisme réactionnel de la DXR

La 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR) catalyse la bioconversion du DXP **14** en MEP **15** en présence d'un dication métallique (Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+}), via un réarrangement intramoléculaire formant l'intermédiaire aldéhyde non isolable **26**. Ce dernier est réduit en alcool par le cofacteur NADPH conduisant MEP **15** (Chapitre « I. Introduction », Schéma 7, p. 27).¹ Comme décrit dans l'introduction de cette thèse, le mécanisme catalysé par la DXR a été sujet à débat pendant plusieurs années. Deux mécanismes ont été proposés : un réarrangement α -cétonique et un réarrangement de type rétroaldolisation/aldolisation **15** (Chapitre « I. Introduction », Schéma 8, p. 27).² Plusieurs équipes se sont penchées sur la question et leurs résultats convergent vers le mécanisme de type rétroaldolisation/aldolisation, qui est à ce jour accepté.^{3,4,5,6,7}

Pour étudier le mécanisme réactionnel de la DXR, nous avons imaginé synthétiser un analogue du DXP **14**, le (3*R*,4*S*)-5,6-époxy-3,4-dihydroxypentyl phosphate **198**, où la fonction cétone serait remplacée par une fonction époxyde (Schéma 51). Bien que la géométrie diffère par rapport à celle de la pince chélatante du substrat naturel, nous attendons à ce que les oxygènes de l'époxyde et de l'hydroxyle en C-4 de l'analogue **198** puissent se chélater au dication métallique du site actif de la DXR.



Schéma 51: Le substrat naturel DXP **14** de la DXR, et son analogue époxyde.

Une fois la molécule analogue **198** dans le site actif de l'enzyme, elle pourrait jouer le rôle de substrat et subir le réarrangement catalysé par la DXR. Les produits issus de cette transformation permettraient de confirmer chimiquement le mécanisme impliquant le réarrangement de type rétroaldolisation/aldolisation. En effet, si la réaction suit un réarrangement de type α -cétoïque, nous devrions obtenir l'aldéhyde **199** en une étape (Schéma 52). Si elle suit un réarrangement de type rétroaldolisation/aldolisation, nous devrions former deux fragments intermédiaires, **200-a** et **200-b** qui pourraient se retrouver dans le milieu et être identifiés. L'aldolisation conduirait à l'aldéhyde **199**, commun à la voie α -cétoïque. Après réduction de cet aldéhyde par le cofacteur, nous devrions obtenir le produit **201**.

L'étude pourrait également être effectuée dans différentes conditions, par exemple en présence de l'apoenzyme, de l'enzyme et du dication métallique ou de l'enzyme avec le métal et le cofacteur. L'analyse des produits formés à la suite de ces expériences pourrait nous éclairer sur le mécanisme réactionnel catalysé par la DXR.

Néanmoins, une toute autre réaction peut également avoir lieu dans le site actif. En effet, si un résidu nucléophile se trouvant à proximité du ligand réalise une réaction de substitution nucléophile sur la fonction époxyde du composé **198**, créant ainsi une liaison covalente entre la protéine et le ligand, une inhibition irréversible de la DXR serait observée.

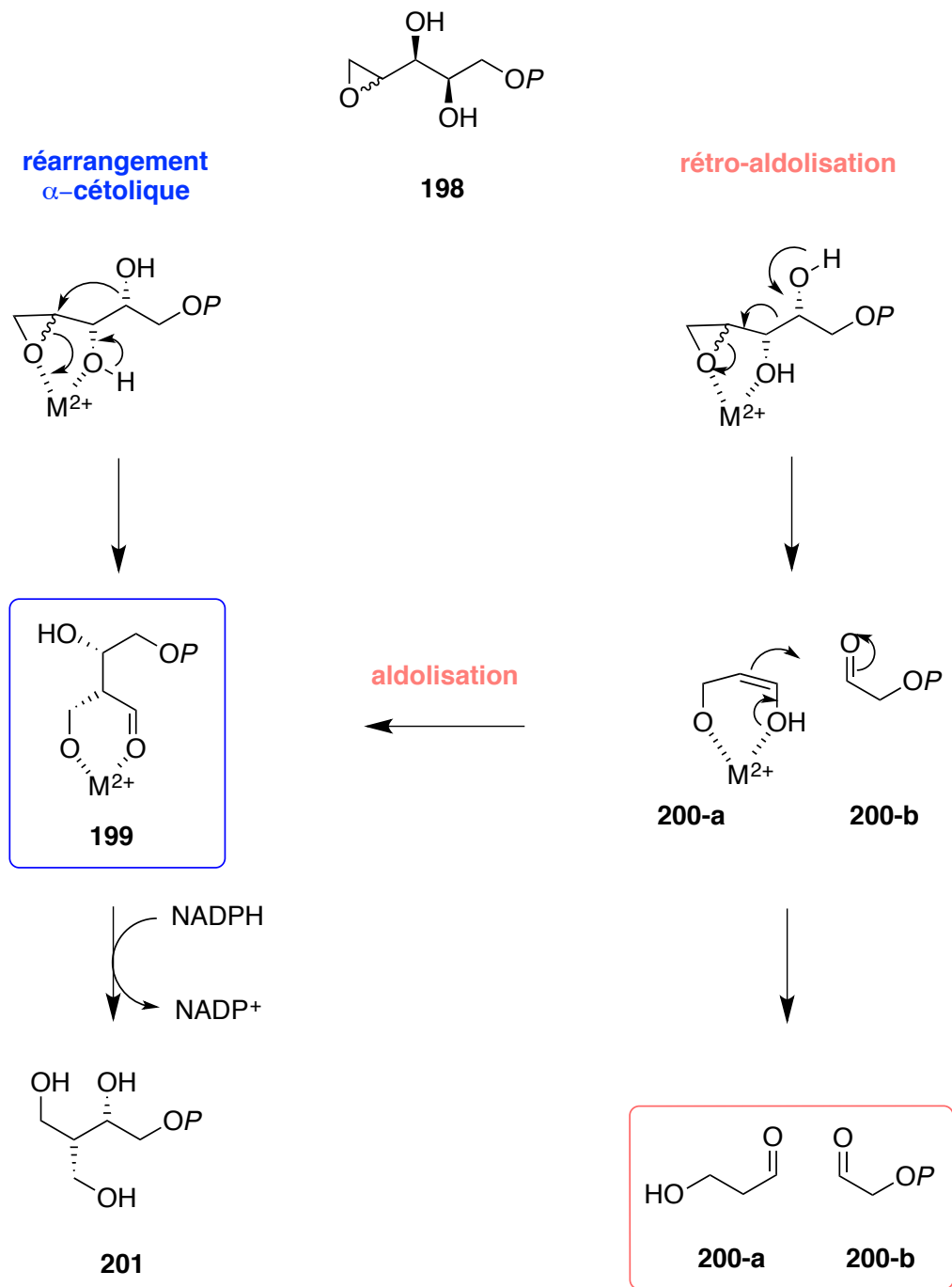


Schéma 52: Mécanismes réactionnels hypothétiques de la DXR avec l'époxyde 198.

A.2. Inhibition irréversible potentielle chez la DXR

Il existe deux types d'inhibition irréversibles : le marquage d'affinité et l'inhibition suicide. Le marquage d'affinité fait intervenir une molécule réactive en elle-même qui se fixe dans le site actif de l'enzyme après réaction avec un groupement nucléophile de ce même site. L'inhibition suicide implique quant à elle une molécule qui est activée par l'enzyme. Généralement, l'activation se fait lors de la ou des premières étapes du mécanisme de la réaction enzymatique normale.^{8,9} Dans ces deux situations, le ligand forme un complexe stable avec son récepteur via une liaison chimique, empêchant le cycle enzymatique de la protéine avec son substrat (Figure 63).

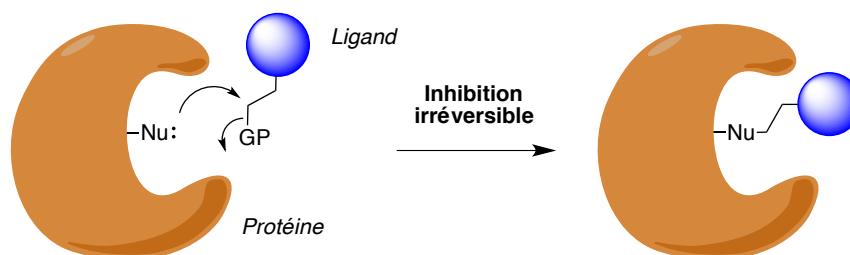


Figure 63: Schéma d'inhibition irréversible d'un ligand sur une protéine.

Le candidat analogue du DXP **198** possède une fonction réactive, l'époxyde, une inhibition irréversible par marquage d'affinité pourrait être envisagée. La présence du dication métallique dans le site actif de la DXR activerait la fonction oxirane, facilitant ainsi l'attaque nucléophile d'un acide aminé du site actif.

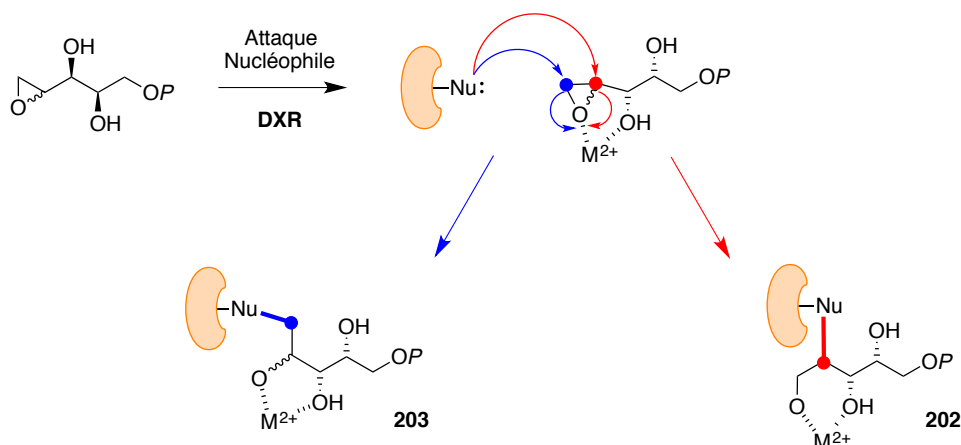


Schéma 53: Mécanismes d'inhibition irréversibles hypothétiques de l'époxyde 198 dans le site actif de la DXR.

Une réaction de substitution sur le C-5, conduirait à la molécule **202**, avec formation d'un cycle à six chaînons par chélation au dication métallique avec les atomes d'oxygènes portés par C-4 et C-6, alors que la substitution nucléophile en C-6, conduirait à la molécule **203**, avec formation d'un cycle à cinq chaînons par chélation au dication métallique des atomes d'oxygènes en C-5 et C-6 (Schéma 53).

B. Première approche de synthèse de l'analogue époxyde

La première approche que nous avons envisagé pour synthétiser l'analogue époxyde **198**, consiste à utiliser un synthon chiral commercial, le (+)-diméthyl-2,3-*O*-benzylidène tartrate **204**, dont la configuration des centres stéréogènes correspond à celle présente dans la molécule époxyde finale **198** (Schéma 54). La réduction des carboxylates conduirait au diol correspondant, qui serait monoprotégé en **205**. L'alcool resté libre pourrait être oxydé en aldéhyde afin de pouvoir réaliser une réaction de Wittig dans le but d'obtenir l'alcène **206**. Après déprotection de l'alcool et l'introduction du phosphate protégé, une réaction de d'époxydation de la double liaison serait réalisée. Le composé final **198** pourrait être obtenu après déprotection (Schéma 54).

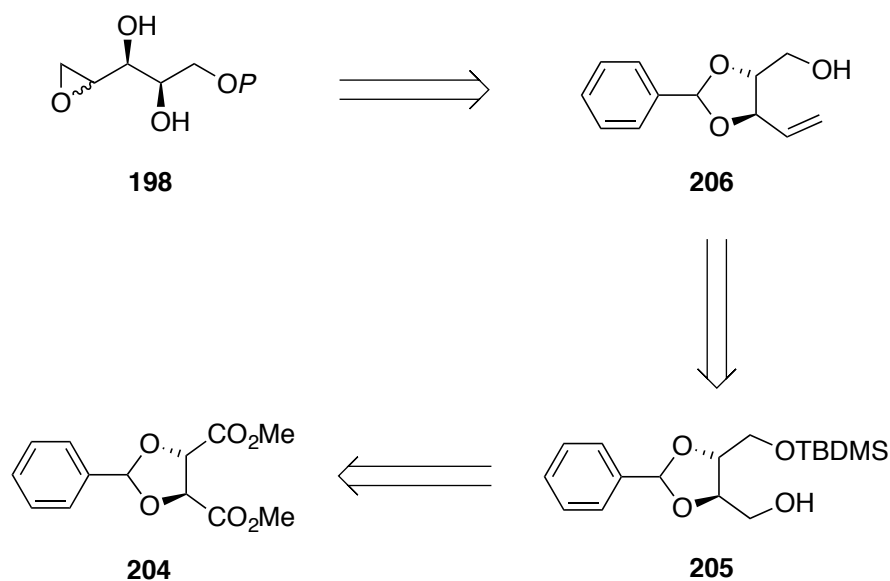


Schéma 54: Voie rétrosynthétique pour la synthèse de l'analogue époxyde du DXP 198.

B.1. Résultats et discussion

La réduction des esters du (+)-diméthyl-2,3-O-benzylidène tartrate **204** est réalisée en présence de LiAlH_4 et conduit au diol, avec un rendement de 99% (Schéma 55).

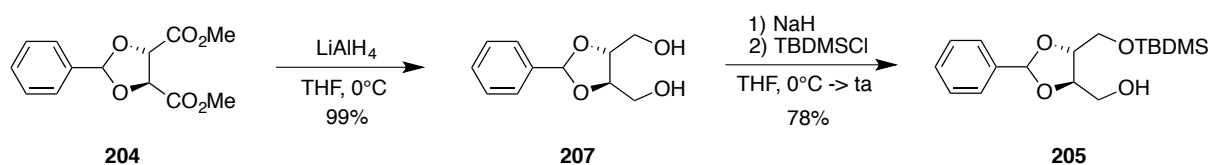


Schéma 55: Réduction du diester **204** en diol **207** et monoprotection du diol en **205**.

La réaction suivante est une monoprotection du diol **207** sous forme d'éther silylé. Nous avons choisi le groupement de *t*-butyldiméthylsilyle, très encombrant, pour limiter les risques de formation du composé diprotégé. La réaction est effectuée avec du chlorure de *t*-butyldiméthylsilyle en présence d'un équivalent de NaH. Le composé **205** monoprotégé est obtenu avec un rendement de 78% (Schéma 55).

L'étape suivante est la formation de l'alcène **209** à partir de l'alcool **205** via la réaction de Swern-Ireland.¹⁰ Cette méthode permet d'effectuer l'oxydation et la réaction de Wittig en *one-pot*, c'est à dire à la suite, dans le même milieu réactionnel. Dans ces conditions, le réactif de Wittig est ajouté à l'aldéhyde **208**, formé *in situ*, pour conduire à l'alcène avec un rendement de 43%. Afin d'améliorer le rendement nous avons choisi d'effectuer cette transformation en deux étapes. L'alcool **205** est oxydé en aldéhyde grâce à la réaction de Swern.¹¹ Un *work-up* est effectué et le produit est engagé dans la réaction de Wittig sans purification préalable, permettant d'aboutir à l'alcène **209** avec un rendement de 64% (Schéma 56).¹²

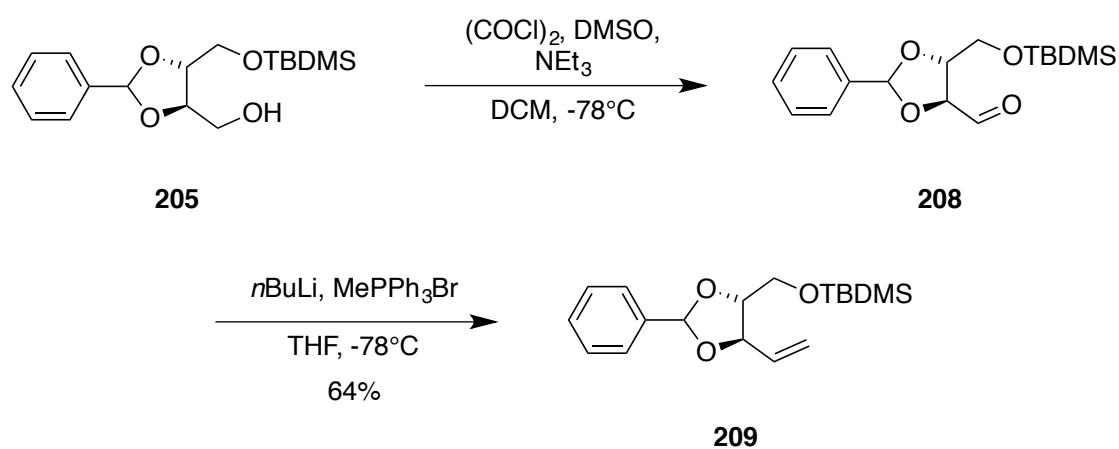


Schéma 56: Formation de l'alcène **209** via une réaction de Swern, suivie dans une deuxième étape, d'une réaction de Wittig.

L'étape de déprotection de l'éthersilylé **209** est réalisée de façon classique en utilisant du fluorure de tétra-*n*-butylammonium permettant l'obtention de l'alcool **206** quantitativement (Schéma 58).

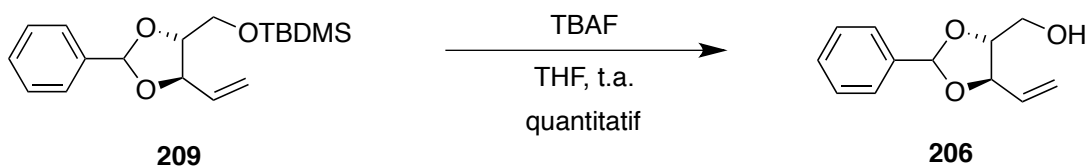


Schéma 57: Déprotection de l'hydroxyle 209.

Afin d'effectuer une seule étape de déprotection finale, un groupement phosphate protégé par deux fonctions benzyles a été choisi. Ils pourront être déprotégés, comme le benzylidène, par une réaction d'hydrogénolyse catalysée par du palladium sur charbon actif. Le phosphate est introduit en faisant réagir du dibenzyle phosphoramidite, en présence de tétrazole, sur l'hydroxyle libre de **206**. Le phosphore III est ensuite oxydé en phosphore V par un agent oxydant, l'acide *m*-chloroperbenzoïque ou le peroxyde d'hydrogène. Ces deux derniers réactifs servent également à la formation d'époxydes à partir d'alcènes, anciennement connue sous le nom de réaction de Prilezhaev.¹³ Nous avons tenté de former en une réaction *one-pot*, la phosphorylation suivie de l'époxydation. Pour ce faire, lors de l'étape d'oxydation du phosphite en phosphate, l'agent oxydant a été mis en large excès (8 équivalents) afin de réaliser la réaction d'époxydation sur l'alcène. Lors des deux essais effectués, en utilisant soit le *m*-CPBA soit l'H₂O₂, seule la formation du phosphate **210** a pu être observée, avec les rendements similaires et respectifs de 68% et 65% (Schéma 58). Les impuretés issues de la réaction de phosphorylation ont pu piéger une partie du réactif, diminuant les chances de former le produit **211**.

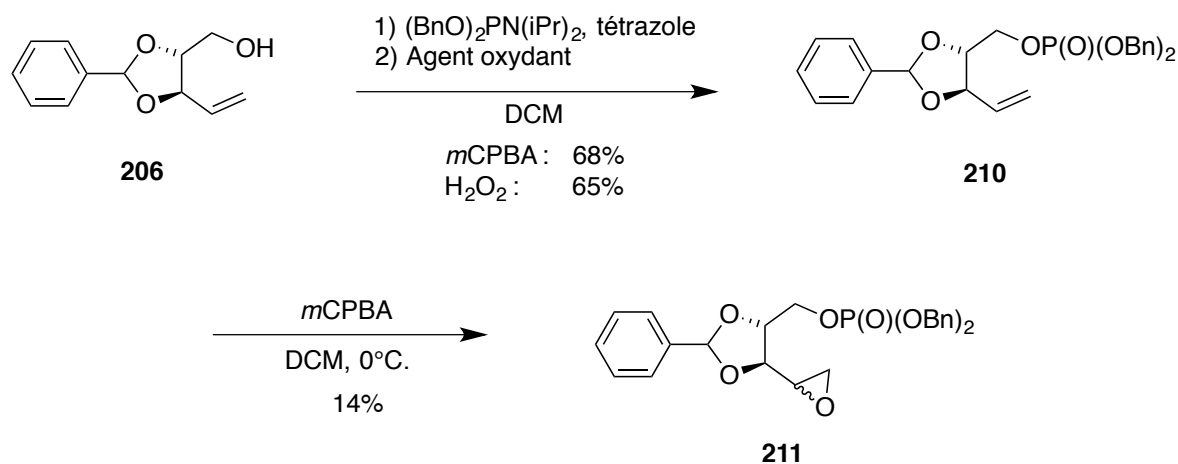


Schéma 58: Phosphorylation de **206** suivie de l'époxydation de l'alcène **210**.

La réaction d'époxydation a été réalisée sur le phosphate **210** en utilisant un excès de *m*-CPBA (5,5 équivalents). Après 5 jours d'agitation à température ambiante, l'époxyde **211** est obtenu après purification avec un rendement de 14%, accompagné de produit de départ et de produits non identifiables.¹⁴ En suivant la séquence réactionnelle, déprotection, phosphorylation et époxydation, le composé **211** est obtenu avec rendement global de 10%. L'analyse de RMN du ^1H confirme la formation de l'époxyde par la disparition des signaux de l'alcène à 5,21, 5,44 et 5,97 ppm et l'apparition de deux multiplets à 2,60-2,84 ppm et 3,06-3,19 ppm correspondant respectivement aux protons en C-6 et C-5 de l'époxyde. Le faible rendement de cette séquence réactionnelle pourrait s'expliquer par le fait que la double liaison de **210** n'est sans doute pas suffisamment électroniquement riche pour pouvoir être époxydée par le *m*-CPBA. Toutefois l'utilisation de H_2O_2 en condition basique n'a quant à elle pas aboutie à la formation de **211**, le produit de départ étant le produit majoritaire de la solution. Il est également probable que la présence du groupement dibenzyle phosphate gêne la réaction d'époxydation. L'époxydation en présence de *m*-CPBA peut être régiosélective en fonction de la structure de l'alcène. La présence de liaison hydrogène, de gêne stérique ou d'interaction π - π avec des aromatiques sur la molécule à époxyder peut influencer son approche.^{15,16} Les groupements aromatiques du phosphate pourraient perturber l'orientation du réactif *m*-CPBA, le rendant incapable de participer à l'époxydation. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé la réaction d'époxydation avant l'introduction du groupement dibenzyle phosphate.

X. Synthèse d'un analogue époxyde du désoxy-D-xylulose 5-phosphate

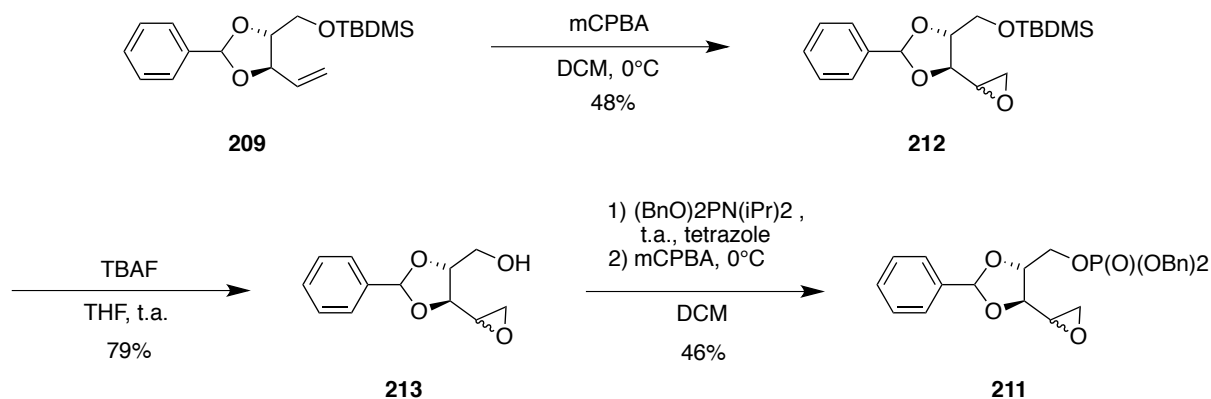


Schéma 59: Epoxydation de l'alcène de la molécule 209, déprotection de 212, et phosphorylation.

L'alcène **209** est mis à réagir avec un excès de *m*-CPBA (5,5 équivalents) pendant 5 jours pour obtenir l'époxyde **212** avec un rendement de 48% après purification (Schéma 59). Ce résultat est nettement plus intéressant que celui que nous avons eu lors de la précédente époxydation sur le phosphate **210** et dans les mêmes conditions (14%).

L'éther de silyle **212** est déprotégée à l'aide du réactif TBAF, pour obtenir l'alcool **213**, avec un rendement de 79% (Schéma 59). Ce dernier **213** a par la suite été mis en réaction avec le dibenzyle phosphoramidite en présence de tétrazole pour obtenir, après oxydation du phosphite intermédiaire, le dibenzyle phosphate **211** avec un rendement de 46%. Nous obtenons cette fois-ci, sur ces trois étapes (*i.e.* déprotection, époxydation, puis phosphorylation), le composé **211** avec un rendement global de 17%. Ces résultats montrent que la présence du dibenzyle phosphate perturbe la réactivité du *m*-CPBA.

Le mécanisme proposé pour la réaction d'époxydation fait intervenir un état de transition plan. L'orbital HOMO π de l'alcène s'approche à 180° de l'oxygène terminal du peracide pour réagir avec la LUMO σ^* de la liaison O-O.^{17,18} Dans notre cas, avec la présence des noyaux aromatiques sur le groupement phosphate des interactions de type π - π , pourrait avoir lieu avec le *m*-CPBA, perturbant l'orientation du réactif et empêchant ainsi la réaction de s'opérer.

La formation de l'époxyde ne serait donc pas favorable en présence du groupement dibenzyle phosphate. Le groupement protecteur TBDMS est lui aussi volumineux, mais plus inerte face à son environnement, perturbant ainsi sans doute moins l'approche du réactif *m*-CPBA.

L'étape finale de cette synthèse consiste en la déprotection de tous les groupements benzyle de l'époxy phosphate **211** par hydrogénolyse, catalysée par du palladium sur charbon. Malgré plusieurs essais, la formation du produit final **198** n'a pas été observée. En effet, les analyses des spectres RMN du ^1H et du ^{13}C confirment l'absence des groupements aromatiques mais les analyses du spectre ^{13}C ne montrent aucun couplage 2J entre les atomes de carbones et l'atome de phosphore, indiquant que les produits obtenus ne possèdent plus de phosphate.

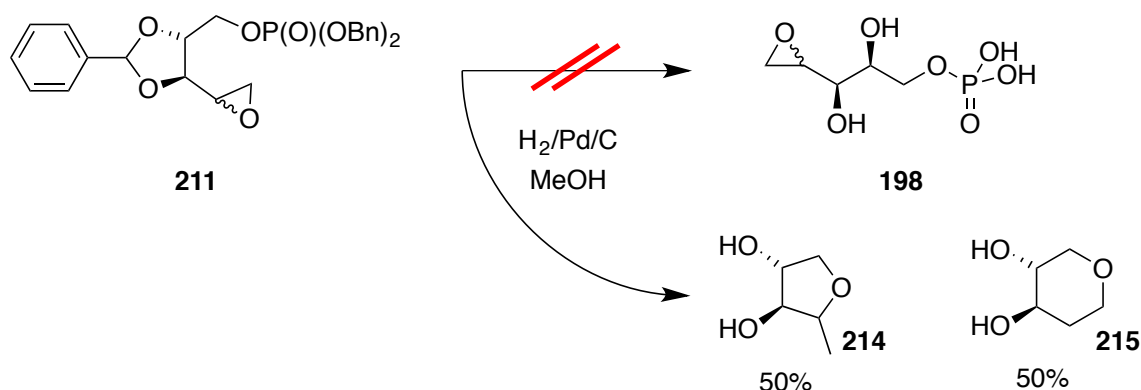


Schéma 60: Hydrogénation catalytique sur charbon conduisant à deux produits non désirés.

Les analyses des spectres RMN indiquent que nous avons formé le tétrahydrofurane **214** et le tétrahydropyrane **215** (Schéma 60). La réaction d'hydrogénolyse a réduit l'époxyde pour donner deux composés alcools, un primaire et un secondaire. Chacun d'eux a pu réagir, via une réaction d'addition élimination intramolécule sur le carbone portant le groupement phosphate bon partant, pour conduire à la formation d'un cycle tétrahydrofurane **214** ou d'un cycle tétrahydropyrane **215**. Les conditions opératoires utilisées pour effectuer la réaction d'hydrogénolyse n'étant pas adaptées à notre composé, nous avons choisi de les modifier afin d'obtenir l'époxy phosphate **198**.

B.1.1. Etude d'hydrogénolyse en présence d'un époxyde et d'un phosphate

Afin d'éviter l'ouverture de l'époxyde lors de la réaction d'hydrogénolyse, nous avons effectué des essais sur une molécule modèle **217**, possédant les fonctions phosphate et époxyde présente dans la molécule **198**. A partir du glycidol racémique commercial **216**, nous avons formé le composé phosphate **217** à l'aide de diisopropylphosphoramidite, en présence de tétrazole et de l'oxydation du phosphite intermédiaire par le *m*-CPBA, avec un rendement de 48% (Schéma 61).

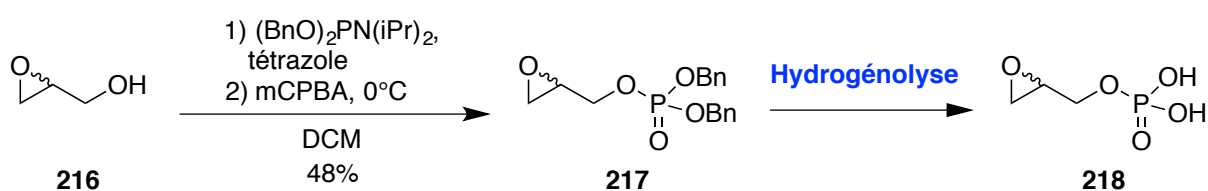
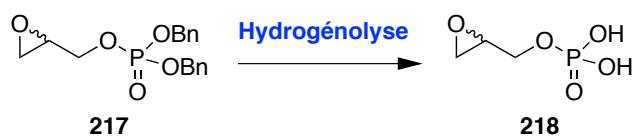


Schéma 61: Préparation de la molécule 217 servant aux essais d'hydrogénolyse.

Plusieurs conditions expérimentales d'hydrogénation ont été effectuées sur la molécule modèle **217** (Tableau 27). La présence des fonctions époxyde et phosphate a été déterminée en analysant les spectres RMN du ¹H et du ³¹P.

Tableau 27: Différents essais d'hydrogénolyse effectués sur la molécule 217.



| Entrée | Base | Solvant | Présence des fonctions | |
|--------|------------------------------------|----------------------------|------------------------|-----------|
| | | | Epoxyde | Phosphate |
| 1 | - | Acétate d'éthyle | - | + |
| 2 | - | Méthanol | - | + |
| 3 | - | Isopropanol | - | + |
| 4 | CH ₃ CO ₂ Na | Acétate d'éthyle | - | + |
| 5 | CH ₃ CO ₂ Na | Méthanol | - | + |
| 6 | K ₂ CO ₃ | Méthanol | - | + |
| 7 | NEt ₃ | Méthanol | + | + |
| 8 | NEt ₃ | Méthanol/ H ₂ O | + | + |
| 9 | NH ₃ aqueux | Méthanol/ H ₂ O | + | + |

Nous avons tout d'abord cherché à savoir si le solvant avait une influence sur les résultats de la réaction (entrée 1 à 3, Tableau 27). Quelle que soit la nature du solvant utilisé, (l'acétate d'éthyle, du méthanol ou de l'isopropanol), nous observons la réduction de l'époxyde. Il est connu que la poudre de palladium sur charbon actif peut être acide.¹⁹ Cette acidité pourrait être à l'origine de l'ouverture de l'époxyde.¹⁶ Nous avons décidé, d'augmenter le pH du milieu réactionnel en ajoutant une base (entrée 4 à 9, Tableau 27).

En présence d'acétate de sodium et de carbonate de potassium, possédant les pKa respectifs de 4,7 et de 12, nous observons en analyse de RMN du ^1H la disparition des protons de l'époxyde (entrée 4 à 6, Tableau 27). Nous nous sommes alors orientés vers des bases ayant des pKa intermédiaires : la triéthylamine (TEA) et l'ammoniaque, possédant des pKa respectifs de 10 et 9,2. Lorsque la réaction d'hydrogénolyse est réalisée en présence de TEA la déprotection des groupements benzyle a lieu sans affecter la fonction époxyde (entrée 7, Tableau 27). L'inconvénient de son utilisation est son élimination. Nous avons réitéré le test d'hydrogénolyse en présence de TEA avec un mélange méthanol-eau comme solvant, dans le but de créer un azéotrope (entrée 8, Tableau 27). Les résultats des analyses RMN du ^1H confirment la présence de l'époxyde de **218**. L'étape de purification est un peu plus efficace mais des traces de TEA persistent, visibles en RMN du ^1H . L'ammoniaque aqueux à 5%, plus volatil que le TEA, s'éliminant beaucoup plus rapidement par évaporation sous pression réduite et servant également de contre ion au phosphate, a été utilisé comme base lors de la réaction d'hydrogénolyse (entrée 9, Tableau 27). Dans ces conditions, nous observons la présence de l'époxyde et du phosphate par analyses des spectres RMN du ^1H et du ^{31}P , indiquant que les fonctions clés n'ont pas été dégradées.

B.1.1. Application de la méthode d'hydrogénolyse optimisée

Nous avons réussi à développer une méthode d'hydrogénolyse en condition basique permettant de déprotéger un groupement dibenzyle phosphate sans induire l'ouverture d'une fonction époxyde. Nous avons décidé d'appliquer ces conditions à la molécule protégée **211**. Cependant, nous n'avons pas observé la formation du produit souhaité. A la place, nous avons observé celle du benzylidène acétal **219** (Schéma 62). Les conditions utilisées pour l'hydrogénolyse n'ont pas permis de déprotéger le benzylidène acétal du composé **211**.

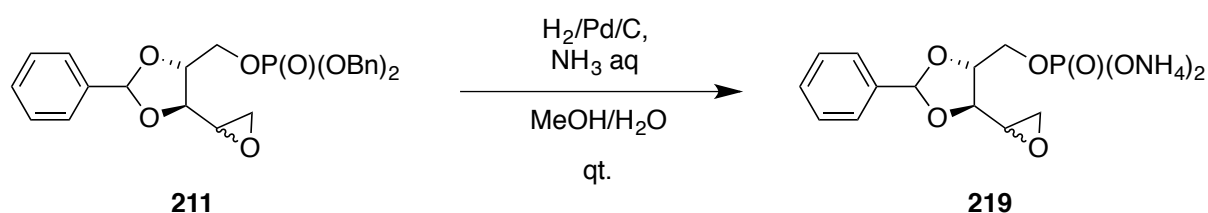


Schéma 62: Tentative d'hydrogénation du composé **211**.

B.2. Conclusion

Malgré les difficultés rencontrées au cours de cette synthèse, comme l'étape d'époxydation de l'alcène, nous avons pu accéder à l'époxy phosphate protégé **198**. La déprotection par hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif a provoqué l'ouverture de la fonction époxyde, conduisant à la formation de deux alcools. Ces derniers ont effectué une addition-élimination intramoléculaire, sur le carbone portant le phosphate, formant deux molécules cycliques non désirées de type tétrahydrofurane et tétrahydropyrane. Nous avons alors travaillé à améliorer les conditions de déprotection, afin de ne pas dégrader l'une des fonctions cruciales. Nous avons réussi à trouver des conditions expérimentales permettant de conserver les deux fonctions époxyde et phosphate, tout en déprotégeant les benzyles portés par cette dernière. Ces conditions impliquent notamment la présence de la base NH_3 à 5% dans l'eau. Cependant, cette méthode n'a pas permis de déprotéger le benzylidène acétal, conduisant à la formation du produit **219**. Nous avons alors envisagé une nouvelle approche pour aboutir à l'analogue époxyde du DXP **198**.

C. Seconde approche de synthèse de l'analogue époxyde du DXP

De par l'expérience issue de la synthèse précédente, nous savons que la déprotection d'un groupement benzylidène acétal s'avère délicate à effectuer du fait de la présence de la fonction époxyde. C'est pourquoi nous avons choisi de le remplacer par un groupement protecteur de type *p*-méthoxybenzylidène. Liu *et al.* ont publié, en 2002, des travaux dans lesquels ils montrent la possibilité de déprotéger un groupement de type *p*-méthoxybenzylidène acétal en utilisant comme réactif du Selectfluor™ (1-chlorométhyl-4-fluoro-1,4-diazoniabi-cyclo [2,2,2] octane bis(tétrafluoroborate)).²⁰ Pour introduire ce groupement et éviter les difficultés rencontrées lors de la réaction d'époxydation, nous avons imaginé un schéma rétrosynthétique, où cette fois, l'époxyde serait introduit via un aldéhyde en utilisant la réaction de Corey (Schéma 63).²¹

Le groupe *p*-méthoxybenzylidène serait introduit sur le (+)-diéthyl-L-tartrate commercial **220** conduisant au diester correspondant **221**. Après réduction des esters, monoprotection du diol, l'alcool primaire serait oxydé en l'aldéhyde **222**. Une réaction de Corey-Chaykovsky devrait permettre d'accéder à l'époxyde **223**. Après déprotection de l'éther de silyle, puis phosphorylation, le composé **224** serait obtenu. La déprotection des groupes protecteurs conduirait au produit souhaité **200**.

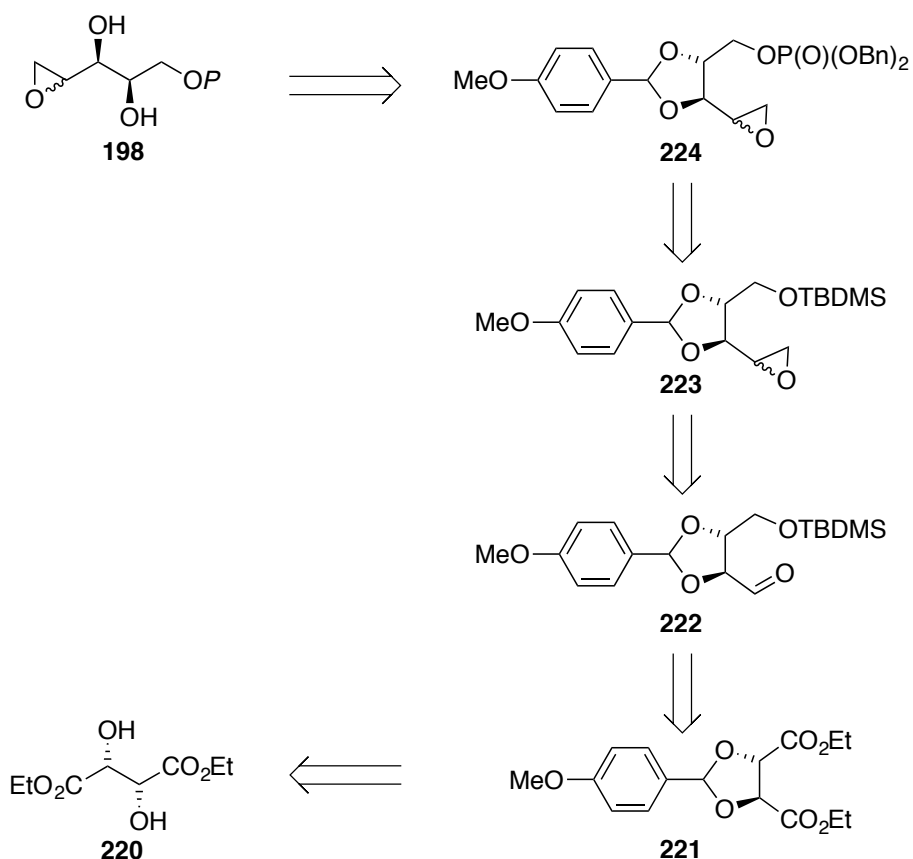
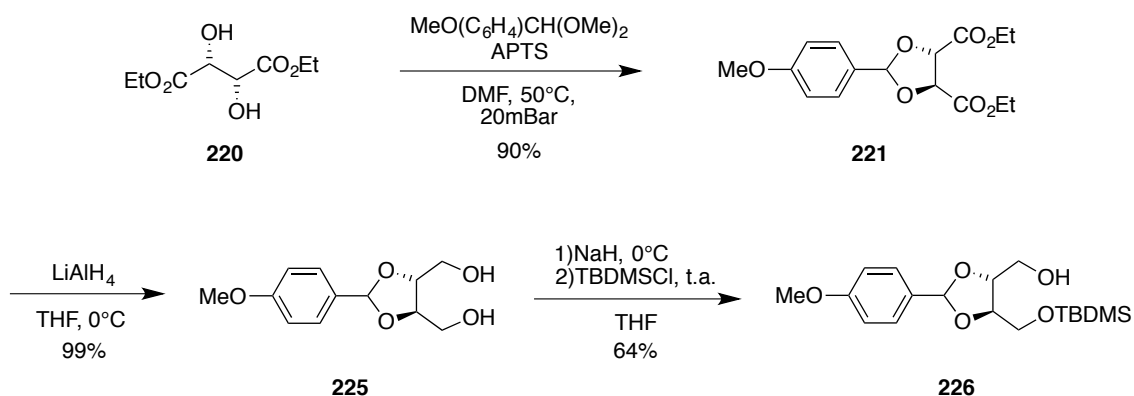


Schéma 63: Schéma de rétrosynthèse de la seconde approche.

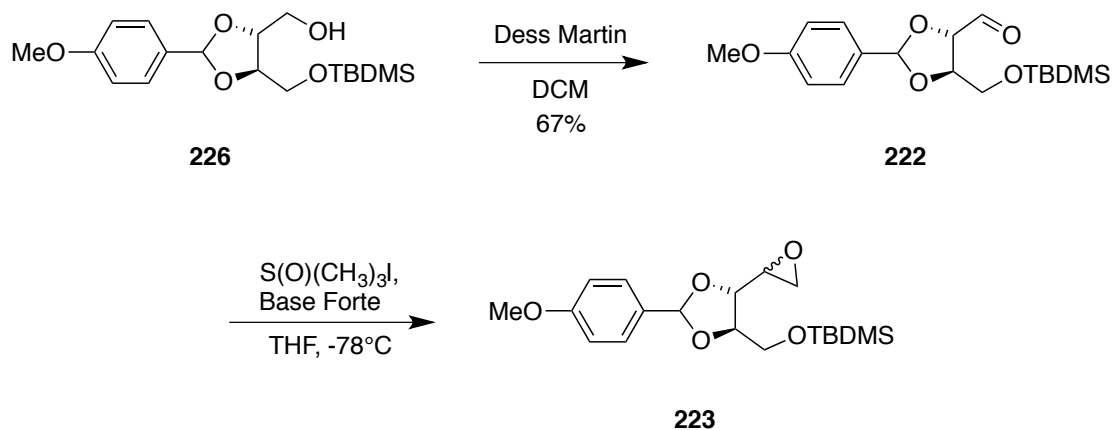
C.1. Résultats et discussion

Afin de vérifier la stabilité des fonctions époxyde et phosphate lors des conditions réactionnelles de déprotection du *p*-méthoxybenzylidène acétal en présence de Selectfluor™, nous les avons testées sur la molécule modèle dibenzyle époxy phosphate **217**. Après plus de 5h à température ambiante, en présence de Selectfluor™ en solution aqueuse d'acétonitrile (CH₃CN) à 5%, les signaux correspondant à l'époxyde et au phosphate sont toujours présents sur les spectres de RMN du ¹H et du ³¹P. Ces résultats étant encourageants nous avons entrepris de débiter la synthèse.

L'introduction du groupement PMB acétal sur le (+)-diéthyl-L-tartrate commercial **220** est réalisée en utilisant une quantité catalytique d'acide *p*-toluènesulfonique, la réaction est mise à une pression de 20 mBar, et conduit à la formation de **221** avec un rendement de 90%.²² La réduction des esters en présence de LiAlH₄ permet d'accéder au diol **225** avec un rendement de 99%. Celui-ci est monoprotégé sous forme d'éther silylé **226** avec un rendement de 64% (Schéma 64).



L'oxydation de l'alcool **226** en aldéhyde est réalisée en présence de periodinane de Dess-Martin, plus efficace et facile à mettre en œuvre que la réaction de Swern. L'aldéhyde **222** formé est obtenu avec un rendement de 67%, puis engagé dans la réaction d'époxydation de Corey-Chaykovsky. L'addition de l'ylure de triméthylxosulfonium formé préalablement en faisant réagir l'iodure de triméthylxosulfonium en présence de NaH, sur l'aldéhyde **222** ne permet pas d'obtenir l'époxyde **223** (Schéma 65).^{21,23}



Les analyses du spectre de RMN du ^1H n'ont pas permis d'observer les déplacements chimiques caractéristique des protons d'époxyde bien que le signal de l'aldéhyde ait disparu. Nous avons réitéré cette expérience mais cette fois en introduisant l'ylure de sulfoxonium, préparé en utilisant le *n*-BuLi comme base. Dans ces conditions, nous observons en RMN du ^1H , la disparition du signal du proton de l'aldéhyde et la présence de deux multiplets à 2,71-2,89 ppm et 3,17-3,26 ppm correspondant aux protons de l'époxyde.

C.2. Conclusion

Suite à des soucis de santé, le projet a été arrêté à cette étape et n'a pu être poursuivi. Néanmoins, le plan de synthèse élaboré pour accéder à l'époxyde final **198** pourrait s'avérer efficace. Hormis la déprotection du *p*-méthoxybenzylidène acétal, le reste de la synthèse reste commun à la voie précédente.

D. Conclusion générale

L'objectif de ce travail était de synthétiser un analogue époxyde du DXP **198** pour réaliser des tests sur la DXR mais nous n'avons pu en terminer la synthèse. Cependant, lors de la première approche de synthèse, nous avons pu développer une méthode permettant une déprotection par hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif d'un dibenzyle phosphate en présence d'un époxyde. Cependant, les conditions expérimentales n'ont pas pu déprotéger la fonction benzyle acétal, nous obligeant à revoir la synthèse. Il serait intéressant de tester la méthode de déprotection sur d'autres modèles pour en évaluer sa spécificité. Pour contourner le problème de déprotection rencontrée en présence d'un benzylidène acétal, nous avons envisagé de le remplacer par un groupement *p*-méthoxybenzylidène acétal, qui peut être retiré en présence de SelectfluorTM. Les essais effectués sur une molécule modèle ont montré que les fonctions époxyde et phosphate ne sont pas affectées par ce réactif. Dans cette seconde approche, l'époxyde pourrait être introduit via la réaction de Corey-Chaykovsky, dont les premiers essais se sont montrés prometteur.

X. Synthèse d'un analogue époxyde du désoxy-D-xylulose 5-phosphate

Après cette étape, il resterait à introduire le phosphate et à retirer les groupements protecteurs pour aboutir à l'analogue époxyde du DXP. Une fois obtenue, il pourra être testé sur la DXR, dont les résultats nous permettrons de savoir si ce composé peut activer le réarrangement enzymatique ou s'il se comporte comme un inhibiteur irréversible.

-
- ¹ Proteau, P. J., « 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: An overview », *Bioorganic Chemistry*, 2004, 32, 483–493.
- ² Kuzuyama, T., Takahashi, S., Watanabe, H. « Direct Formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate from 5-Phosphate Reductoisomerase, a New Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway to Isopentenyl Diphosphate », 1998, 39, 4509–4512.
- ³ Fox, D. T., Poulter, C. D. « Mechanistic Studies with 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Synthase from *Escherichia Coli* », *Biochemistry*, 2005, 44, 8360–8368.
- ⁴ Fox, D. T., Poulter, C. D., « Synthesis and Evaluation of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphoric Acid Analogues as Alternate Substrates for Methylerythritol Phosphate Synthase », *Journal of Organic Chemistry*, 2005, 70, 1978–1985.
- ⁵ Wong, U., Cox, R. J., « The Chemical Mechanism of D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphate Reductoisomerase from *Escherichia Coli* », *Angewandte Chemistry International Edition English*, 2007, 46, 4926–4929.
- ⁶ Munos, J. W., Pu, X., Mansoorabadi, S. O., Kim, H. J., Liu, H., « A Secondary Kinetic Isotope Effect Study of the 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase-Catalyzed Reaction: Evidence for a Retroaldol-Aldol Rearrangement », *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131, 2048–2049.
- ⁷ Zhou, J., Wu, R., Wang, Binju, Cao, Z., Yan, H., Mo, Y., « Proton-Shuttle-Assisted Heterolytic Carbon-Carbon Bond Cleavage and Formation », *Catalysis*, 2015, 5, 2805–2813.
- ⁸ Walsh, C., « Suicide substrates: mechanism-based enzyme inactivators », *Tetrahedron*, 1982, 38, 871–909.
- ⁹ Bey, P., « Design of enzyme-activated irreversible inhibitors of pyridoxal phosphate dependent enzymes », *Chemistry & Industry*, 1981, 138–144.
- ¹⁰ Ireland, R.E., Norbeck, D.W., « Application of the Swern oxidation to the manipulation of highly reactive carbonyl compounds », *Journal of Organic Chemistry*, 1985, 50, 2198–2220.
- ¹¹ Omura, K., Swern, D., « Oxidation of alcohols by activated dimethyl sulfoxide. A preparative, steric and mechanistic study », *Tetrahedron*, 1978, 34, 1651–1660.

¹² Zhou, R., Wang C., Song, H, He, Z., « Wittig Olefination between Phosphine, Aldehyde, and Allylic Carbonate: A General Method for Stereoselective Synthesis of Trisubstituted 1,3-Dienes with Highly Variable Substituents », *Organic Letters*, 201, 12, 976-979.

¹³ Prileschajew, N., « Oxydation ungesättigter Verbindungen mittels organischer Superoxyde », *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1909, 42, 4811-4815.

¹⁴ Feldman, A.K., Colasson, B., Sharpless, K.B., Fokin, V.V., « The allylic azide rearrangement: Achieving selectivity », *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127, 13444-13445.

¹⁵ Kishikawa, K., Naruse, M., Kohmoto, S., Yamamoto, M., Yamaguchi, K., « Investigation of arene-arene interaction in stereoselective MCPBA epoxidation », *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2001, 4, 462-468.

¹⁶ Rao, A. S., « Recent advances in the preparation and the synthetic applications of oxiranes », *Tetrahedron*, 1989, 39, 2323-2367

¹⁷ Woods, K. W., Beak, P. « The Endocyclic Restriction Test: An Experimental Evaluation of the Geometry at Oxygen in the Transition Structure for Epoxidation of an Alkene by a Peroxy Acid », *Journal of the American Chemical Society*, 1991, 113, 6281-6283.

¹⁸ Singleton, D. A., Merrigan, S. R., Liu, J., Houk, K. N., « Experimental geometry of the epoxidation transition state ». *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119, 3385-3386.

¹⁹ Mozingo, R., « Palladium Catalysts », *Organic Syntheses*, 1946, 26, 77-81.

²⁰ Liu, J., Wong, J., « An efficient method for cleavage of *p*-methoxybenzylidene (PMP), tetrahydropyranyl (THP) and 1,3-dithiane protecting groups by Selectfluor™ », *Tetrahedron Letters*, 2002, 43, 4037-4039.

²¹ Corey, E. J., Chaykovsky, M., « Dimethylsulfoxonium Methylide », *Journal of the American Chemical Society*, 1962, 84, 867-868.

²² Heapy, A. M., Brimble, M. A., « Synthesis of the FG ring fragment of pectenotoxins 1-9 », *Tetrahedron*, 2010, 66, 5424-5431.

²³ Corey, E.J., Chaykovsky, M., «Dimethyloxosulfonium methylide ((CH₃)₂SOCH₂) and dimethylsulfonium methylide ((CH₃)₂SCH₂). Formation and application to organic synthesis», *Journal of the American Chemical Society*, 1965, 87, 1353–1364.

XI. Développement d'une méthode de synthèse des D- et L- glycéraldéhyde 3-phosphates énantiomériquement purs

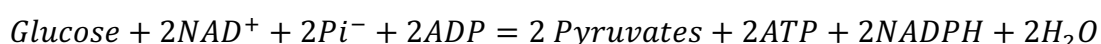
| | |
|---|------------|
| A. Le D-Glycéraldéhyde 3-phosphate, une molécule indispensable | 322 |
| A.1. La glycolyse..... | 322 |
| A.2. La gluconéogenèse..... | 323 |
| A.3. Réaction catalysée par la DXS | 325 |
| B. Etudes d'énantiosélectivité réalisées sur la DXS et objectifs | 325 |
| C. Précédentes synthèses de GAP | 326 |
| D. Synthèses énantiosélectives développées au laboratoire | 330 |
| D.1. Rétrosynthèse..... | 332 |
| D.2. Résultats et discussions | 333 |
| D.3. Réduction régiosélective d'un benzyle acétal : premiers essais..... | 334 |
| D.4. Mécanismes envisagés..... | 336 |
| D.5. Les lanthanides : une famille particulière..... | 337 |
| D.5.1. Définition | 337 |
| D.5.2. Éléments rares?..... | 338 |
| D.5.3. La contraction des Lanthanides | 338 |
| D.5.4. Métaux dits internes | 339 |
| D.5.5. L'état d'oxydation III, état de prédilection..... | 339 |
| D.5.6. Coordination des Lanthanides III..... | 340 |
| D.5.7. Les lanthanides III: acides de Lewis..... | 341 |
| D.6. Réduction régiosélective d'un acétal de benzylidène en présence de Lanthanide..... | 344 |
| D.6.1. Samarium III..... | 345 |
| D.7. Europium III et gadolinium III | 350 |
| D.8. Poursuite de la synthèse..... | 351 |
| D.9. Conservation du centre stéréogène : Esters de Mosher | 352 |
| D.10. Activité optique des alcools primaires R- et S-249..... | 354 |
| E. Conclusion | 355 |

A. Le D-Glycéraldéhyde 3-phosphate, une molécule indispensable

Le glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) est un ester phosphorique à trois carbones possédant un centre stéréogène en C-3. Seul l'énantiomère D-GAP, se retrouve chez les organismes vivants, où il occupe une place très importante. Nous allons rapidement discuter de quelques exemples, comme la glycolyse et la gluconéogenèse.

A.1. La glycolyse

Le D-GAP intervient dans la métabolisation du glucose en molécules de haute énergie, appelée la glycolyse.¹ A partir d'une molécule de glucose, elle permet d'obtenir deux pyruvates, deux adénosines triphosphates (ATP) et deux cofacteurs NADPH. Elle est aussi appelée voie de Embden-Meyerhof, mis en évidence par les travaux des auteurs du même nom dans les années 30. La glycolyse est anaérobie, c'est à dire qu'elle ne nécessite pas la présence de dioxygène. L'équation bilan de la glycolyse est la suivante :



Le glucose est phosphorylé par une hexokinase en présence d'ATP et de Mg^{2+} pour former le glucose 6-phosphate (G-6P) puis traverse la membrane plasmique à l'aide d'un transporteur spécifique (Schéma 66).² L'ajout d'un phosphate active le sucre, permettant ainsi les étapes de métabolisation suivantes. Une fois dans la cellule, la glycolyse débute par l'isomérisation du G-6P, catalysée par la phosphoglucose isomérase, en fructose 6-phosphate (F-6P). Il est par la suite phosphorylé en fructose 1,6-bisphosphate (F-1,6-BP) par une phosphofructo kinase.

Par action d'une aldolase, le squelette carboné du F-1,6-BP est fractionné en deux, conduisant à une première molécule de D-GAP et au phosphate de dihydroxyacétone (DHAP), lui même converti en une deuxième molécule de D-GAP par la triose phosphate isomérase. La glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase catalyse, à l'aide de NAD^+ et d'un ion phosphate, la conversion du D-GAP en 1,3-bisphosphoglycérate (1,3-BPG) et produit un NADH. L'étape de la première formation d'ATP, par la phosphorylation d'ADP par le 1,3-BPG, est réalisée par une phosphoglycérate kinase. Le 3-phosphoglycérate produit est transformé en 2-phosphoglycérate par la phosphoglycérate mutase. L'énolase catalyse ensuite la déshydratation du 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate (PEP), qui est converti en pyruvate **12** par la pyruvate kinase, engendrant une deuxième molécule d'ATP. Comme deux D-GAP sont produits, les transformations l'impliquant sont réalisées deux fois.

A.2. La gluconéogenèse

La gluconéogenèse convertit le pyruvate **12** en glucose, contrairement à la glycolyse qui convertit le glucose en pyruvate **12**. Cependant elle n'est pas la voie inverse de la glycolyse. Elle possède une base commune à cette dernière mais les premières réactions diffèrent (Schéma 66, encadré bleu).¹ Elle débute avec la conversion du pyruvate **12** par la pyruvate carboxylase en oxaloacétate, à son tour modifié en PEP par la phosphoénol pyruvate carboxyl kinase.

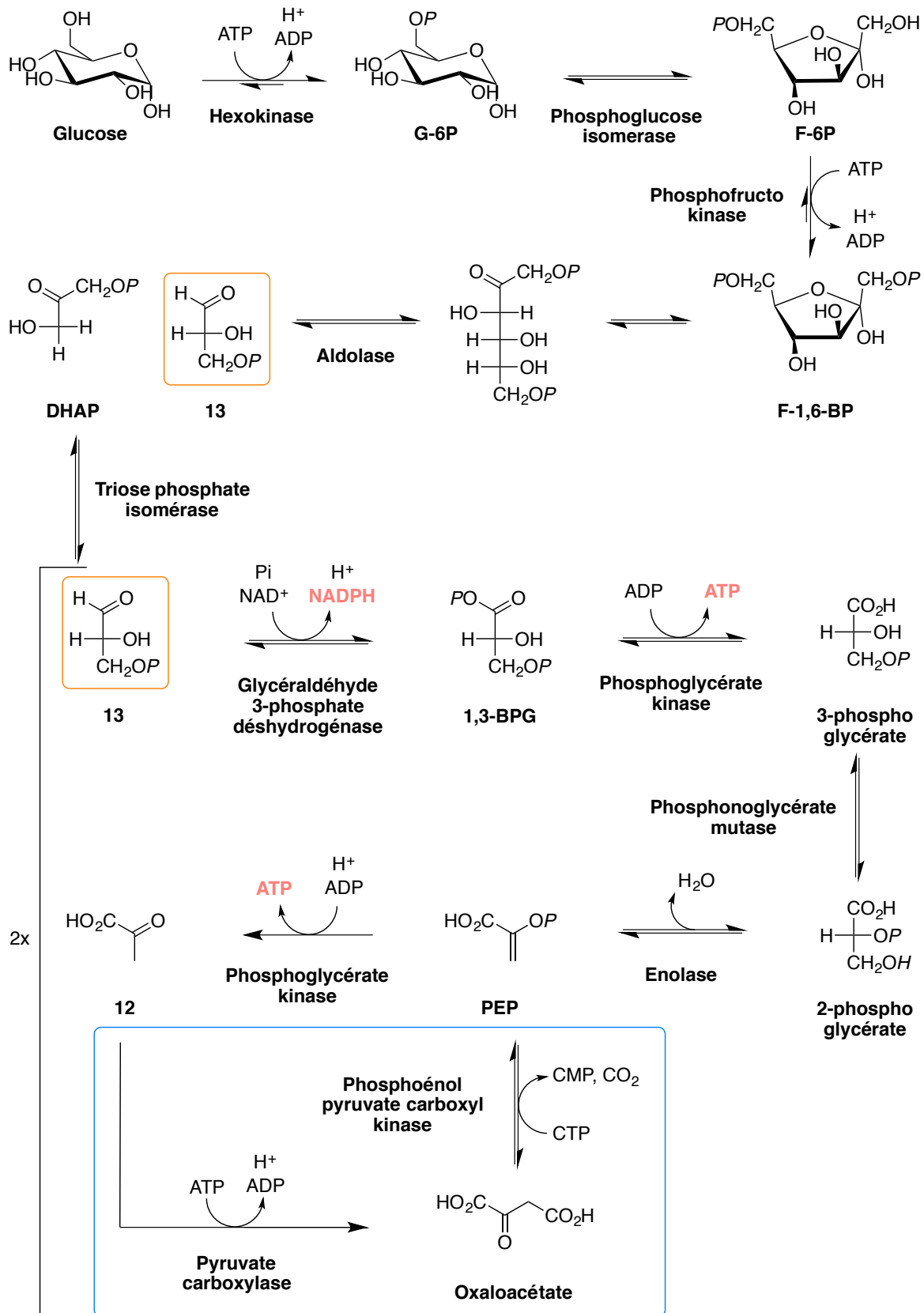


Schéma 66: Voie de glycolyse du glucose au pyruvate 12 et voie gluconéogénèse du pyruvate 12 au glucose.

A.3. Réaction catalysée par la DXS

Comme énoncé dans l'introduction de cette thèse, le D-GAP est le précurseur, avec le pyruvate, des isoprénoïdes issus de la voie du MEP. Ils sont tous les deux substrats de la première enzyme, la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS).³ La DXS catalyse la formation du DXP **14** à partir de la condensation de D-GAP **13** et de pyruvate **12** en présence du diphosphate de thiamine (TPP) (Chapitre « I. Introduction, Schéma 5, p 21).

B. Etudes d'énantiosélectivité réalisées sur la DXS et objectifs

Des incubations d'isostères phosphonates racémiques du D-GAP, noté GAP_N **DL-227**, sur la DXS d'*E. coli* ont été réalisées par Guillaume Hirsch et Grégory Hebingier.⁴ L'avancement des réactions enzymatiques a été suivi par RMN du ³¹P. Ces essais ont montré que les énantiomères D- et L-GAP_N **DL-227** sont tous deux consommés par l'enzyme. La formation du composé D-DXP_N **D-228**, version phosphonate du DXP, est observée, ainsi que la formation du diastéréoisomère L-DXP_N en C-4 **L-228** (Schéma 67).



Schéma 67: Consommation des DL-GAP_N 227 et du pyruvate par la DXS, conduisant au D-DXP_N 228 ainsi qu'au supposé L-DXP_N 228.

La capacité de la DXS à pouvoir utiliser les deux énantiomères D- et L-GAP_N, respectivement **D-** et **L-227**, est surprenante car ce type de comportement est assez inhabituel. Bien souvent, nous avons idée qu'une enzyme ne fixe efficacement qu'un seul énantiomère.

Il existe des exceptions, comme par exemple le L-ATP, qui est reconnu par quelques enzymes impliquées dans la synthèse de nucléotides et d'acides nucléiques.⁵ A la suite de leurs travaux, Focher et son équipe en sont arrivés à la conclusion que le manque d'énantiosélectivité enzymatique vis à vis d'un substrat est plus répandu que nous le pensons.⁶

A partir de ces résultats, une étude cinétique comparative a été envisagée impliquant la bioconversion du D-GAP **D-13** en DXP **14** et du L-GAP **L-13** en diastéréoisomère du DXP, par la DXS d'*E. coli*. Bien qu'étant un produit commercial, le D-GAP contient des impuretés ne permettant pas son utilisation pour ce type d'étude biologique. Le L-GAP n'est quant à lui pas commercial. L'objectif de ce projet est de développer une méthode de synthèse chimique simple et rapide permettant d'accéder aux deux énantiomères D- et L-GAP.

C. Précédentes synthèses de GAP

En 1932, Fischer et Baer ont été les premiers à synthétiser le GAP racémique et un an plus tard, Smythe et Gerisher l'utilisèrent pour réaliser les premières expériences permettant de démontrer l'importance biologique du GAP dans la fermentation et la glycolyse.^{7,8} L'utilité de cette méthode resta par la suite très limitée car les préparations enzymatiques sont le plus souvent aptes à ne réagir qu'avec un énantiomère, le D-GAP. La méthode classique, utilisée pour obtenir le D-GAP énantiomériquement pur se faisait par réaction enzymatique de la voie de glycolyse. Elle implique la triose phosphate isomérase, qui permet de couper le F-1,6-BP en D-GAP (Schéma 66). L'inconvénient est que l'utilisation de synthèse enzymatique était à l'époque très coûteuse et ne permettait pas de travailler sur de grosse quantité.

Ballou et Fischer décidèrent de se pencher sur ce problème et en 1955, ils publièrent une synthèse en neuf étapes permettant l'obtention du D-GAP avec un rendement global de 0,1% (Schéma 68).⁹ La synthèse débute à partir d'une molécule portant la stéréochimie adéquate : le D-mannitol **229**. L'étape clé de la synthèse est l'obtention du 2-benzyl-D-glycéraldéhyde **233** instable qui, en deux étapes, est converti en diméthyle acétal **235**.

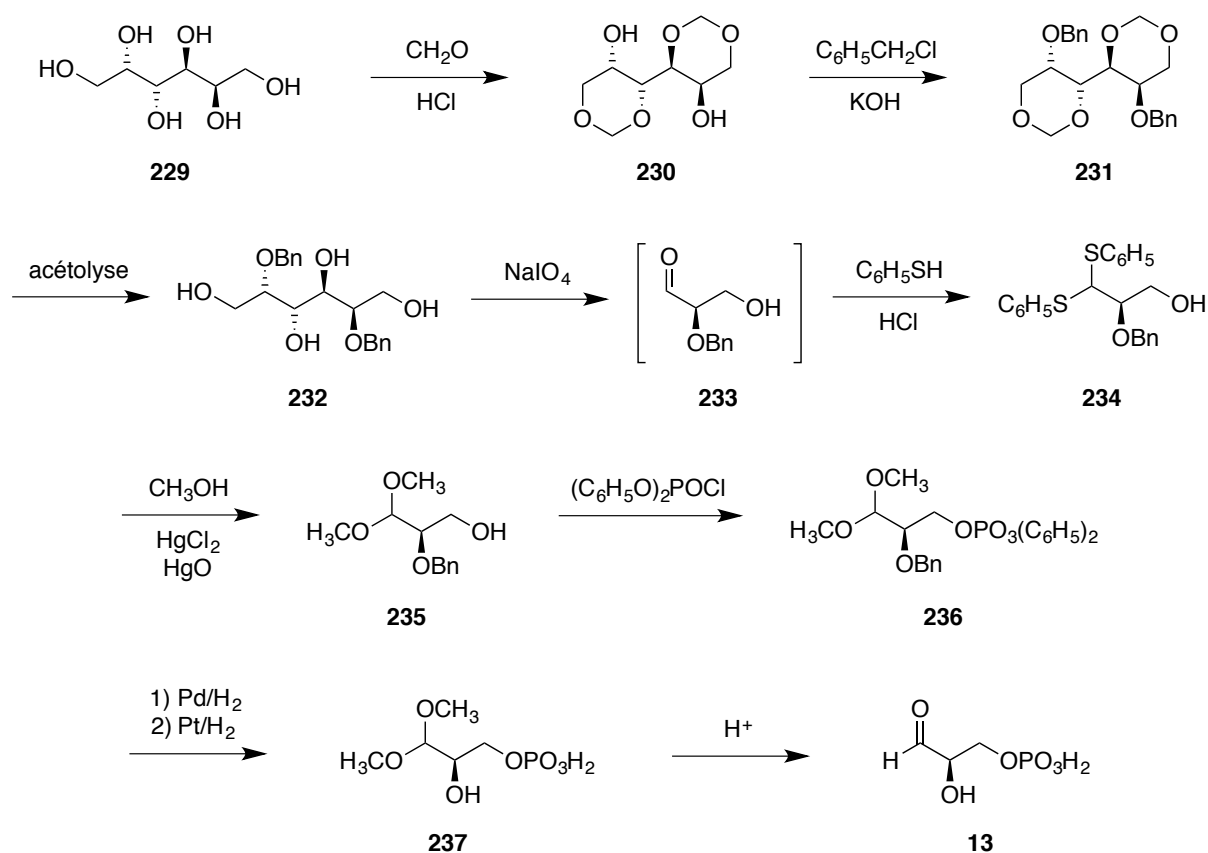


Schéma 68: Méthode de synthèse du D-GAP développée par Ballou et Fisher en 1955.

Malgré un rendement global très faible, cette méthode est intéressante car le dernier intermédiaire **237** est stable et peut être conservé sous forme de sel, le cyclohexylammonium D-glycéraldéhyde diméthyle acétal phosphate convertible en D-GAP **13** avec un rendement de 90%.

Une synthèse du D-GAP a par la suite été développée en 1961 par Szewczuk *et al.*, débutant par le F-6P (Schéma 69).¹⁰ Après une coupure oxydante à l'aide de H_5IO_6 , le D-GAP **13** est obtenu avec un rendement de 70%.

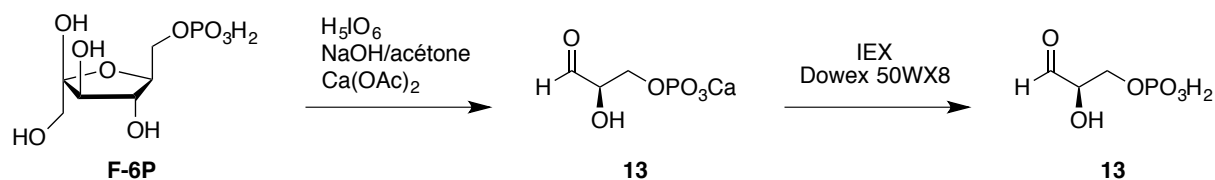


Schéma 69: Méthode de synthèse du D-GAP développée par Szewczuk *et al.*.¹⁰

En 1979, Serianni *et al.* ont cherché à optimiser la méthode de Szewczuk *et al.* pour en améliorer la pureté du D-GAP.¹¹ Ils ont remarqué que le periodate employé incorporait des impuretés et que la méthode de purification finale conduisait à une dégradation partielle du produit, remettant en cause sa pureté. Ils ont remplacé H_5IO_6 par $Pb(OAc)_4$ et ils ont également utilisé un nouveau type de colonne échangeuse d'ions pour la purification. Ainsi, le D-GAP est obtenu avec un rendement global de 81% et une pureté maximale atteinte de 95%. Ce dernier point est dû à la dernière étape de purification qui entraîne une dégradation du produit final, dont l'importance est proportionnelle à la durée de la manipulation.¹²

En 1990, Pederson *et al.* effectuèrent une synthèse du D-GAP **13** en partant du produit de départ racémique **238** et en faisant intervenir une enzyme, la LP-80 Lipase (Schéma 70).¹³ Ils obtinrent un rendement global de 28% en 4 étapes de synthèse.

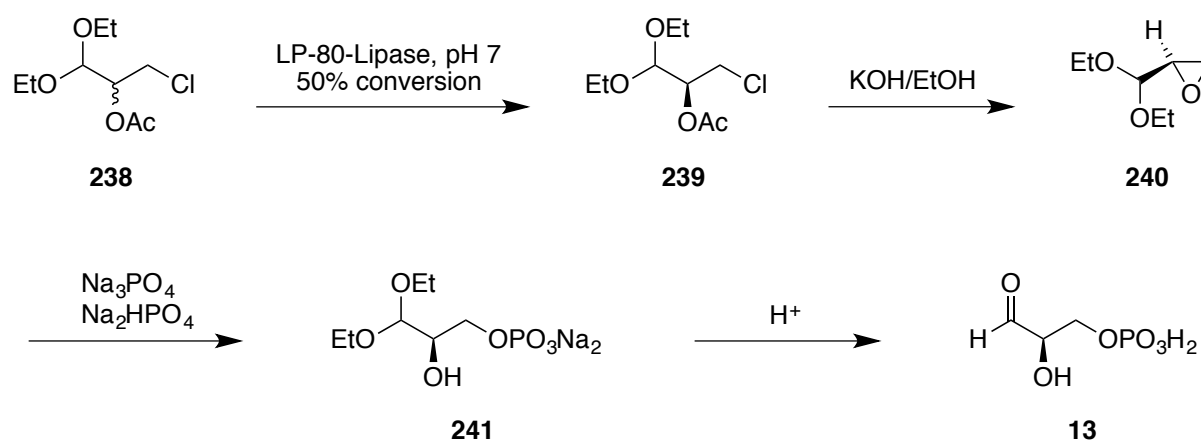


Schéma 70: Méthode de synthèse du D-GAP développée par Pederson *et al.* en 1990.¹³

XI. Développement d'une méthode de synthèse des D- et L- glycéraldéhyde 3-phosphates énantiomériquement purs

Récemment, Gauss *et al.* ont publié la première méthode de synthèse aboutissant au L-GAP énantiomériquement pur.¹⁴ Elle consiste en une phosphorylation du L-glycéraldéhyde **242** par action d'un couple d'enzymes.

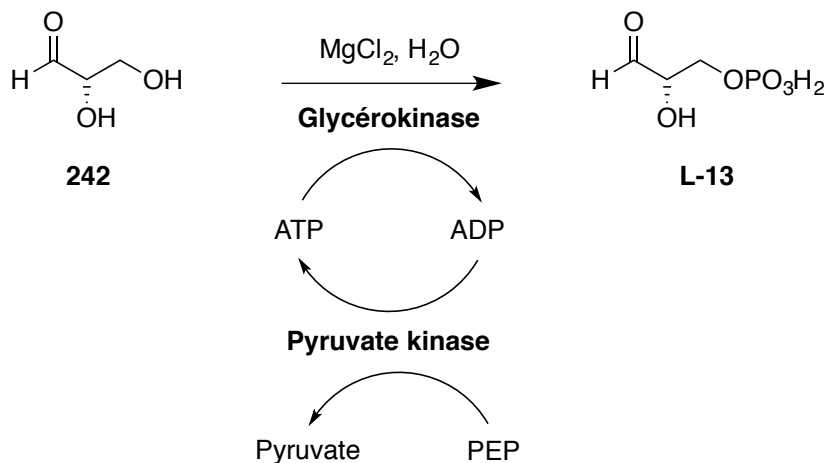


Schéma 71: Méthode de synthèse du L-GAP par Gauss *et al.*¹⁴

Cette approche enzymatique fait intervenir la glycérokinase de *Cellomonas* sp., connue pour phosphoryler sélectivement l'énantiomère L-GA **242**, en présence d'ATP comme agent phosphorylant.¹⁵ Dans ce système, l'ATP est continuellement régénéré par la pyruvate kinase en présence de PEP.

D. Synthèses énantiosélectives développées au laboratoire

Des premiers travaux ont été effectués au laboratoire dans le but de développer une méthode de synthèse chimique énantiomériquement pure des D- et L-GAP, afin d'étudier la cinétique de consommation du D-GAP chez *E. coli* (Schéma 72).¹⁶

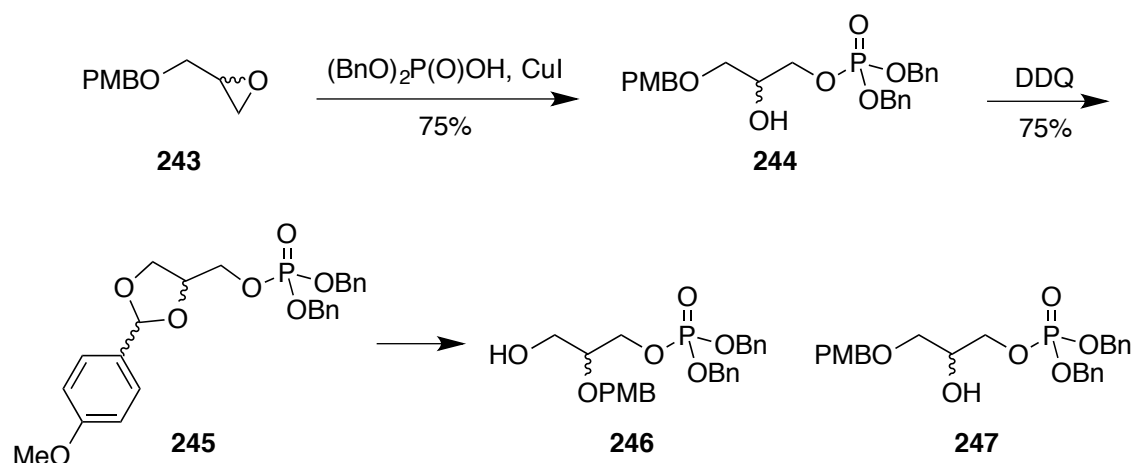


Schéma 72: Travaux réalisés par S. Ponaire.¹⁷

La synthèse débute par l'ouverture du glycidol *p*-méthoxybenzylé **243**. Elle s'opère à l'aide d'un dibenzyle phosphate, assisté d'iodure de cuivre comme acide de Lewis, conduisant à **244**. Le *p*-méthoxybenzyl acétal **245** est formé par réaction du 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) sur **244**. Arrive l'étape cruciale d'ouverture régiosélective réductrice du *p*-méthoxybenzylidène acétal, afin obtenir l'alcool primaire majoritaire **246**.

Tableau 28: Essais d'ouverture régiosélective réductrice en faveur de l'alcool primaire **246** (OH-I) par rapport au secondaire **247** (OH-II).

| | Réactifs | Acide de Lewis | Nbr. d'éq. Réactif/A.L. | Temp. | Solvant | Durée | OH I/OH II |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------|---------------------------------|--------|------------|
| 1 | BH ₃ .THF | Bu ₂ BOTf | 1/10 | -78°C | - | 20 min | 15/85 |
| 2 | BH ₃ .THF | Bu ₂ BOTf | 1/10 | -10°C | - | 10 min | 15/85 |
| 3 | Me ₂ NH.BH ₃ | BF ₃ .Et ₂ O | 1/1 | -40°C | CH ₂ Cl ₂ | 10 min | 30/70 |
| 4 | Me ₂ NH.BH ₃ | BF ₃ .Et ₂ O | 1/1 | -78°C | CH ₂ Cl ₂ | 20 min | 30/70 |
| 5 | Me ₂ NH.BH ₃ | BF ₃ .Et ₂ O | 1/1 | t.a. | CH ₂ Cl ₂ | 10 min | 30/70 |
| 6 | Me ₂ NH.BH ₃ | BF ₃ .Et ₂ O | 1/1 | -78°C | CH ₂ Cl ₂ | 5 h | 10/90 |

Plusieurs conditions ont été expérimentées pour la réaction l'ouverture régiosélective réductrice du **245** en faveur de l'alcool primaire **246** en vain. Le secondaire **247** est majoritaire par rapport au primaire **246** (Tableau 28). Les rapports les plus intéressants sont de 30/70 pour le secondaire (Tableau 28, entrées 3 à 5). Ces trois expériences ont été réalisées en solution dans du CH₂Cl₂ avec le Me₂NH.BH₃ comme réducteur et le BF₃.Et₂O, à -40°C et -78°C, ainsi qu'à température ambiante. Elles ont été laissées à réagir sur de courtes durées, allant de 10 à 20 minutes. Si nous comparons l'entrée 4 avec l'entrée 6, où seule la durée d'expérience change, passant de 20 min à 5 h, le rapport passe de 30/70 à 10/90 en faveur de l'alcool secondaire, nous permettant de supposer que le produit cinétique pourrait être l'alcool secondaire. Ces résultats n'étant pas satisfaisants, cette voie de synthèse n'a pas été poursuivie.

D.2. Résultats et discussions

Le benzaldéhyde **250** et le 3-chloropropan-1,2-diol racémique **251** commerciaux sont mis à réagir en milieu basique pour former le benzyldène acétal avec un cycle à cinq chaînons avec un rendement de 73% (Schéma 74). Cette réaction peut également conduire au benzyldène acétal à six chaînons. Le produit cinétique étant le cycle à cinq, il est important de rester à une température comprise entre 0 et -5 °C.¹⁸

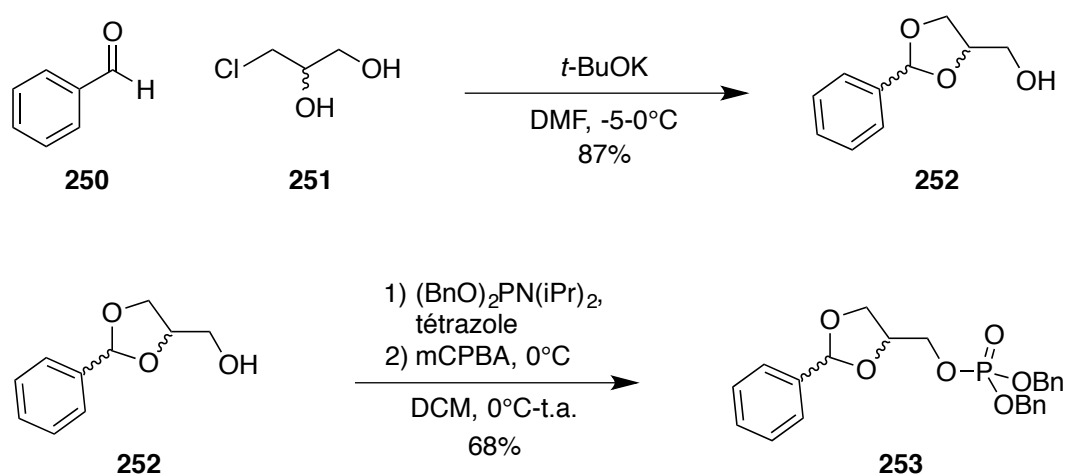


Schéma 74: Formation et phosphorylation du benzyldène acétal 253.

La phosphorylation de **252** est réalisée en présence de dibenzyle *N,N*-diisopropyle phosphoramidite et tétrazole (Schéma 74). Une fois le produit de départ consommé, le *m*-CPBA est ajouté pour oxyder phosphore III intermédiaire en phosphore V, conduisant au phosphate **253** avec un rendement de 68%.

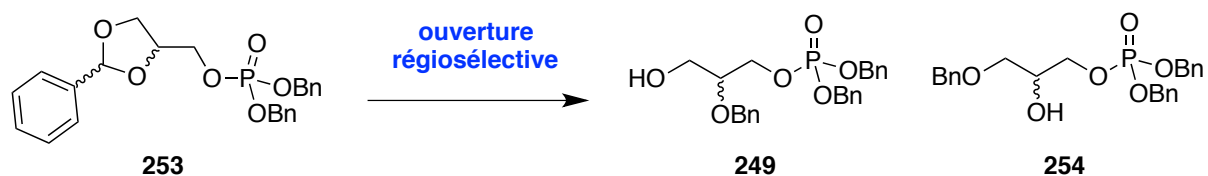


Schéma 75: Etape clé d'ouverture régiosélective par réduction du benzylidène acétal 253.

La prochaine réaction est l'étape clé de cette synthèse, l'ouverture régiosélective réductrice du benzylidène acétal (Schéma 75). De nombreux travaux traitent d'ouvertures régiosélectives réductrices de benzylidène acétals, notamment sur des sucres. En fonction de la méthode employée, ils décrivent comment accéder majoritairement à l'alcool primaire ou secondaire.¹⁹ À notre connaissance et durant l'élaboration de nos travaux, aucune étude ne concerne l'ouverture réductrice d'acétal avec un phosphate en bêta. Afin de favoriser la réduction régiosélective de ces dérivés, nous avons choisi d'ajouter un acide de Lewis.

D.3. Réduction régiosélective d'un benzyle acétal : premiers essais

Pour débiter cette étude, nous avons utilisé des acides de Lewis communs, couramment utilisés et décrits : $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, $\text{Co}(\text{Cl})_2$ et $\text{Al}(\text{Cl})_3$.¹⁹ Les proportions des alcools régioisomères ont été estimées par l'analyse des spectres RMN du ^1H et du ^{31}P . Nous avons effectué ces expériences en utilisant soit $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$, soit $\text{BH}_3\cdot\text{Me}_2\text{S}$, en solution dans du DCM à température ambiante (T.A.) (Tableau 29).

Tableau 29: Essais d'ouverture régiosélective réductrice du benzylidène acétal 253.

| | Métal | %mol | Agt. Réduc. | Nbr. éq. | Durée | Proportions OH-I/OH-II |
|----------|----------------------|------|------------------------------------|----------|--------|---------------------------|
| 1 | - | - | BH ₃ .THF | 5 | 7jr | 40/60 |
| 2 | - | - | BH ₃ .Me ₂ S | 5 | 12jr | 40/60 |
| 3 | - | - | 9BBN | 5 | 14jr | 0/0 |
| 4 | AlCl ₃ | 15% | BH ₃ .THF | 6 | 45 min | 0/0 |
| 5 | Cu(OTf) ₂ | 15% | BH ₃ .THF | 5 | 60 min | 0/0 |
| 6 | Co(Cl) ₂ | 15% | BH ₃ .THF | 5 | 1,5h | 40/60 |

Des tests témoins de réduction du benzylidène ont été effectués sans la présence d'acide de Lewis (entrée 1 à 3, Tableau 29). L'utilisation de BH₃.THF, après une durée de réaction de sept jours, montre toujours la présence de d'environ 80% de produit de départ,—(entrée 1, Tableau 29) accompagné d'alcool primaire et secondaire dans les proportions respectives de 40/60. En remplaçant le BH₃.THF par du BH₃.Me₂S, la réaction, n'est toujours pas totale après 12 jours à T.A., et un mélange d'alcool primaire et secondaire dans les proportions respectives de 40/60 est formé (entrée 2, Tableau 29). Afin de favoriser la formation de l'alcool primaire, nous avons réitérée l'expérience en utilisant un borane encombré, le 9-BBN (entrée 3, Tableau 29). Dans ces conditions et à T.A., aucune formation d'alcool n'a été observée après 14 jours.

L'ajout au milieu réactionnel d'acides de Lewis tels que AlCl₃ et Cu(OTf)₂ (entrée 4 et 5, Tableau 29) conduit à la déprotection de l'acétal de benzylidène accompagné d'alcool benzylique et de composés non identifiables, ayant probablement perdu le phosphate. L'essai réalisé en présence de Co(Cl)₂ et de BH₃.THF a permis d'obtenir la formation des alcools dans les proportions 40/60 en faveur de l'alcool secondaire mais accompagnés de beaucoup de dégradation (entrée 6, Tableau 29).

Les proportions relatives des alcools primaires et secondaires ainsi obtenus, sont identiques à celles observées sans acide de Lewis, mais dans ces conditions tout le produit de départ est consommé en 1,5h. L'assistance d'un acide de Lewis pour effectuer l'ouverture régiosélective du benzylidène acétal **253** s'avère efficace pour optimiser le temps de réaction. L'inconvénient est la présence du phosphate, bon candidat partant. Un acide de Lewis trop réactif dégraderait nos composés comme l'ont montré les essais avec AlCl_3 . Nous nous sommes alors penchés sur le mécanisme potentiel de la réaction.

D.4. Mécanismes envisagés

La formation de l'alcool primaire nécessiterait une chélation de l'oxygène en C-4 avec le borane (Schéma 76). L'assistance électronique de l'oxygène en C-3 permettrait d'ouvrir l'acétal qui après réduction permettrait d'obtenir l'alcool primaire.

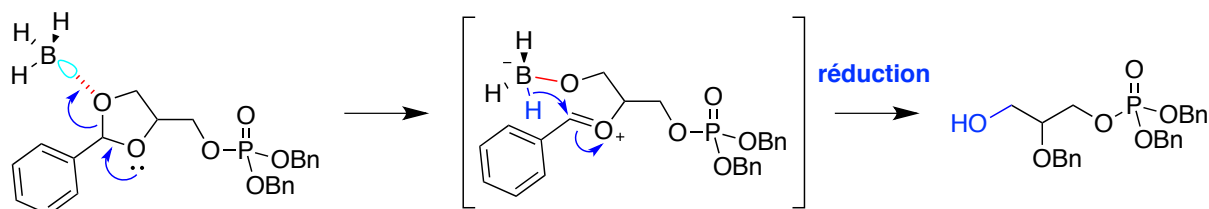


Schéma 76: Ouverture régiosélective vers l'alcool primaire.

La formation de l'alcool secondaire nécessiterait une chélation de l'oxygène en C-3 avec le borane (Schéma 76). L'assistance électronique de l'oxygène en C-4 permettrait d'ouvrir l'acétal, qui après réduction permettrait d'obtenir l'alcool secondaire. Cette seconde voie semble plus favorable à chélater le borane. Ce dernier occupe alors une zone électriquement riche par la présence d'atomes d'oxygènes portés par le phosphate. Il serait alors mieux chélaté, expliquant les résultats en faveur de l'alcool secondaire.

XI. Développement d'une méthode de synthèse des D- et L- glycéraldéhyde 3-phosphates énantiomériquement purs

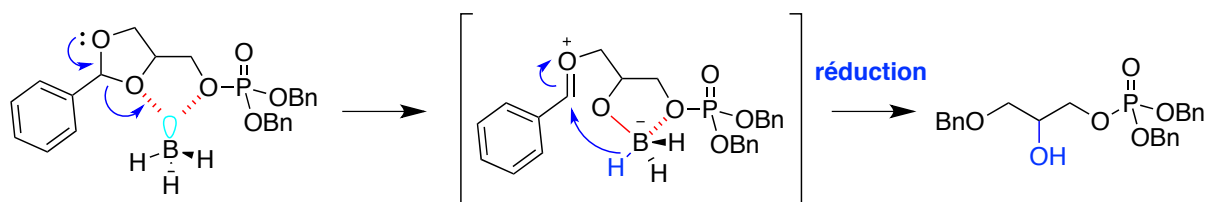


Schéma 77: Ouverture régiosélective vers l'alcool secondaire.

Pour favoriser la formation de l'alcool primaire, l'objectif serait de bloquer la zone de chélation conduisant à l'alcool secondaire. Pour cela, il faudrait un acide de Lewis volumineux, relativement oxophile et dont la nature serait compatible avec notre système, afin de limiter le risque de dégradation. En effet, l'effet principal recherché est le blocage et non l'activation d'un atome ou d'une fonction. Nous avons choisi de nous orienter vers la famille des lanthanides comme source d'acides de Lewis. Cette famille possède des propriétés intéressantes que nous allons brièvement décrire.

D.5. Les lanthanides : une famille particulière

D.5.1. Définition

Terre rare, lanthanide ou encore lanthanoïde sont des termes souvent utilisés pour les nommer. La composition de cette famille est de quinze éléments, du lanthane (^{57}La) au lutétium (^{71}Lu), bien que la présence du lanthane soit sujet à discussion car celui-ci ne possède pas d'électron dans ses orbitales f.^{20,21} Bien souvent y sont également inclus le scandium (^{21}Sc) et l'yttrium (^{70}Y), du fait de leur similarités physiques et chimiques. Leurs histoires sont d'ailleurs voisines. Dans le cadre de cette thèse, nous utiliserons le terme le plus commun de lanthanide dont le symbole général est « Ln ».

D.5.2. Éléments rares ?

Les lanthanides sont appelés à tort éléments rares sur Terre (*rare Earth elements*). Excepté pour le prométhium (^{147}Pm), élément radioactif d'une demi-vie de 2,6 ans, ils sont relativement abondants. Le cérium (^{58}Ce) est le 36^e élément le plus abondant sur Terre et le thulium (^{69}Tm), le plus rare des lanthanides après le prométhium, est plus abondant que l'iode.²² L'appellation d'éléments rares vient du 19^e et du début du 20^e siècle, période de leur découverte, du fait des difficultés rencontrées à les caractériser.²³ Les techniques de séparation et d'analyse n'étaient pas suffisamment performantes pour aisément les différencier et souvent, ce qui était pris pour un seul élément était en réalité un mélange de plusieurs. C'est en 1913, que W. Moseley, grâce à la mise au point de la spectroscopie à rayons X, a pu découvrir la présence de quatorze éléments entre le lanthane et le hafnium (^{72}Hf). Grâce aux travaux de Bohr réalisés de 1918 à 1921, les lanthanides ont pu être identifiés comme les éléments du bloc-f, composé de sept orbitales.

D.5.3. La contraction des Lanthanides

Lorsque le numéro atomique augmente, nous nous attendons à ce que la taille des éléments augmente. Dans la série des lanthanides, la taille des éléments diminue progressivement de la gauche vers la droite du tableau périodique (Tableau 30). Ce phénomène est appelé la contraction des lanthanides (Goldschmidt, 1925) et il s'explique grâce à l'étude électronique des orbitales.²⁴

Tableau 30: Rayon atomique (Ln) et ionique (Ln³⁺) en angström des lanthanides.²²

| | Ln | Ln ³⁺ | | Ln | Ln ³⁺ | | Ln | Ln ³⁺ |
|------------------|-------|------------------|------------------|-------|------------------|------------------|-------|------------------|
| ^{57}La | 1,870 | 1,032 | ^{62}Sm | 1,802 | 0,964 | ^{67}Ho | 1,766 | 0,894 |
| ^{58}Ce | 1,82 | 1,034 | ^{63}Eu | 2,042 | 0,95 | ^{68}Er | 1,757 | 0,881 |
| ^{59}Pr | 1,828 | 1,013 | ^{64}Gd | 1,802 | 0,938 | ^{69}Tm | 1,746 | 0,869 |
| ^{60}Nd | 1,821 | 0,995 | ^{65}Tb | 1,782 | 0,923 | ^{70}Yb | 1,94 | 0,858 |
| ^{61}Pm | 1,810 | 0,979 | ^{66}Dy | 1,773 | 0,908 | ^{71}Lu | 1,734 | 0,848 |

L'augmentation de la charge des noyaux est généralement compensée par la charge des électrons présents dans les orbitales. Les caractéristiques directionnelles des orbitales 4f ne permettent pas de compenser dans son intégralité la charge du noyau. L'attraction du noyau devient alors plus importante que celle de l'écran formé par les électrons occupant les orbitales de valence 4f.²²

D.5.4. Métaux dits internes

Par définition, la distance moyenne d'un électron avec son noyau augmente avec le nombre quantique principal n . Elle augmente également avec le nombre quantique azimutal l mais de manière beaucoup moins significative. Les orbitales 4f sont définies par $n=4, l=3$ alors que les orbitales 5d et 6s sont définies par $n=5, l=1$ et $n=6, l=0$, respectivement (Annexes, Tableau 50 p. 441). Leurs n respectifs sont plus grands que celui des orbitales 4f, les distances moyennes des électrons présents dans ces orbitales avec le noyau de l'atome sont donc plus grandes que celles des 4f. De ce fait, les orbitales 4f de valence, ainsi que leurs électrons, vont être confinés à l'intérieur de l'atome.²² Ce phénomène peut être calculé et est appelé l'effet relativiste.²⁵ Les orbitales 4f ont donc peu d'influence sur la réactivité chimique de l'atome, car les électrons de valences sont internes. Les orbitales externes, 6s et 5d, sont les mêmes pour tous les lanthanides, expliquant la similarité de réactivité chimique entre les éléments de cette famille. Cette caractéristique leur a valu le nom de métaux internes.

D.5.5. L'état d'oxydation III, état de prédilection

L'état d'oxydation III prédomine dans la famille des lanthanides et il s'explique par l'étude de la disponibilité des électrons de valence (Annexes, Tableau 51 p. 442). Nous savons que les électrons de valence composant les orbitales 4f se trouvent proches du cœur de l'atome et que ceux des orbitales 5d et 6s se trouvent en

périphérie. Il faudra donc plus d'énergie pour enlever les électrons de cœur plutôt que les électrons de périphérie.

Les lanthanides, ayant une configuration électronique générale idéale $[\text{Xe}]4f^n5d^16s^2$, vont donc d'abord perdre les électrons périphériques, soit les trois électrons présents dans les orbitales 5d et 6s. La configuration générale observée est alors $[\text{Xe}]4f^n5d^06s^0$. Il existe tout de même trois exceptions :

- . ^{58}Ce : l'effet de contraction et la réduction énergétique des orbitales 4f n'est pas suffisante pour éviter l'occupation des orbitales 5d ;
- . ^{64}Gd : la stabilité des orbitales 4f demi-remplies l'emporte ;
- . ^{71}Lu : les orbitales 4f sont déjà remplies.

Les degrés d'oxydation II et IV existent pour certains atomes : ceux pour qui ces degrés d'oxydation permettent de se rapprocher ou de posséder la configuration des gaz rares, une configuration $4f^0$ ou $4f^7$ ou $4f^{14}$.²⁶ Les Ln^{2+} sont de puissants agents de réduction du fait de la faible énergie nécessaire à céder un électron.²⁷ Les Ln^{4+} sont quant à eux de puissants agents d'oxydation grâce à leur facilité à gagner un électron.

D.5.6. Coordination des Lanthanides III

Les coordinations des Ln^{3+} ont été largement étudiées et sont toujours d'actualité (excepté pour le ^{61}Pm). Notamment grâce à l'évolution des technologies, des besoins des synthèses organiques et de la complexité des ligands. Ils sont de plus en plus utilisés comme catalyseur asymétrique en chimie organique.^{28,29} La coordination des Ln^{3+} hydratés est difficile à définir et dépend beaucoup des méthodes d'analyses. Les résultats varient en générale entre $\text{Ln}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ et $\text{Ln}(\text{H}_2\text{O})_9^{3+}$ pour la première sphère de coordination et va jusqu'à $\text{Ln}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{3+}$ en comptant la deuxième sphère de coordination.^{22,26} La coordination des Ln^{3+} avec des ligands organiques varie de trois à douze coordinations, donnant accès à une très large gamme de géométries.

D.5.7. Les lanthanides III : acides de Lewis

Les éléments des Ln^{+3} sont considérés comme des acides de Lewis durs ayant de très bonnes affinités avec des bases de Lewis dures avec des molécules possédant des atomes d'oxygènes ou d'azotes.³⁰ Ils présentent des caractéristiques intéressantes et sont donc utilisés lors de synthèses.^{28,29}

D.5.7.1. Catalyses en milieux aqueux

Leur tolérance à l'eau permet au Ln^{+3} de catalyser des réactions en milieux aqueux. Cette caractéristique est très recherchée afin d'éviter l'utilisation de solvants nocifs pour l'environnement et la santé. Kobayashi *et al.* montrèrent en 1991, qu'en présence de 10% de triflate de Ln^{+3} (*i.e.* ytterbium, néodyme, gadolinium et lutétium), il est possible de catalyser des réactions d'aldol de Mukaiyama avec de bons rendements.³¹ Depuis, l'utilisation des Ln^{+3} comme acide de Lewis en milieux aqueux s'est étendue à d'autres réactions. Ils catalysent notamment des réactions aqueuses de type azo-Diels-Alder, de Michael ou de Mannich, par exemple.^{32,33,34}

Kobayashi *et al.* ont testé une série de métaux sur une réaction modèle de réaction d'aldol de Mukaiyama et ont analysé ceux présentant les meilleurs résultats. Ils ont noté une corrélation intéressante entre l'activité catalytique d'un cation dans l'eau, sa constante d'hydrolyse (pK_h) et sa constante d'échange de molécules d'eau de sa première sphère de coordination (*water exchange rate constant*, WERC).³⁵ Ils sont arrivés à la conclusion que pour obtenir plus de 50% de rendement, le pK_h du cation doit être compris entre 4,3 et 10,08 et le WERC doit être supérieur à $3,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour leur système. Les cations possédant une valeur de pK_h supérieure à 10,08 ont une acidité de Lewis faible. Ceux possédant une valeur inférieure à 4,3 ont une acidité trop forte pour ce type de réaction. Ces observations expliquent les bons rendements en présence de Ln^{3+} pour cette réaction (Annexes, Tableau 52 p.443).

D.5.7.2. Sélectivité

Les Ln^{3+} peuvent se montrer sélectifs envers un ligand, que ce soit par rapport à une fonction chimique ou une gêne stérique. Nous allons rapidement voir quelques exemples de base.

D.5.7.2-a. Sélectivité chimique

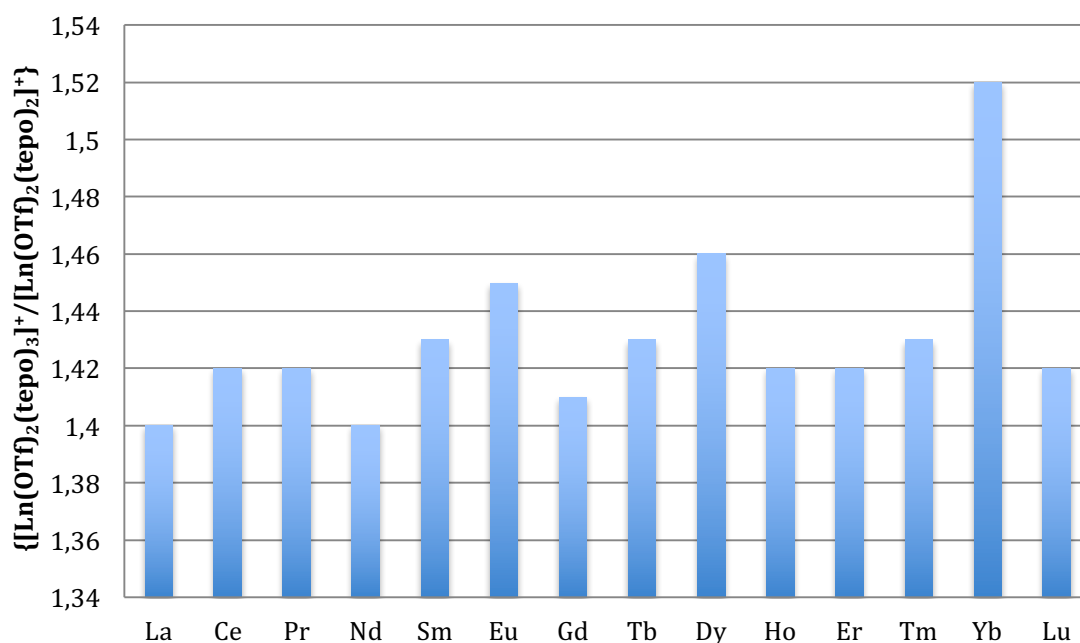
La protection des aldéhydes en acétal est très courante en chimie organique. Cette réaction peut perdre en sélectivité lorsque sur la même molécule il y a la présence d'une autre fonction carbonyle. Dans ce type de situation, un acide de Lewis Ln^{3+} permet la protection sélective de l'aldéhyde.³⁶ De plus, leur utilisation en présence d'aldéhydes chiraux n'entraîne aucune épimérisation.³⁷

D.5.7.2-b. Sélectivité stérique

Les Ln^{3+} sont très utilisés en tant qu'acides de Lewis lors de réactions de Diels-Alder, notamment en présence de diènes pauvres en électrons.^{38,39} En 1984, lors travaux sur les réactions de Diels-Alder optimisées par des Ln^{3+} , Danishefsky *et al.* ont observé la formation de composés *endo* majoritaires à partir d'un aldéhyde achiral.⁴⁰ En raison de la gêne stérique, le Ln^{3+} se chélate en *anti* par rapport au groupement alkyle le plus encombré, conduisant majoritairement à la forme *endo*.⁴¹ Cette sélectivité d'approche en fonction de l'encombrement est exploitée pour d'autres réactions, comme l'ouverture d'époxyde et d'aziridine.²⁹

D.5.7.3. Force d'acidité de Lewis

Les acidités de Lewis des Ln^{3+} ont été évaluées par analyses de spectroscopie de masse en tandem fondée sur la compétitivité de dissociation de ligands de complexes $\text{Ln}(\text{OTf})_3\text{L}_4$ (L= hexaméthyl phosphoramide (hmpa), triéthylphosphine oxyde (tepo)).⁴² Il a pu être observé que l'acidité augmente le long de la série des Ln, où l'Yb présente l'acidité la plus élevée. L'oxophilie des Ln a également pu être mesurée par l'analyse de la perte du ligand OTf ou tepo à partir de $[\text{Ln}(\text{OTf})_2(\text{tepo})_4]^+$ pour former $[\text{Ln}(\text{OTf})_2(\text{tepo})_3]^+$ ou $[\text{Ln}(\text{OTf})_2(\text{tepo})_2]^+$. L'Yb présente encore une fois les meilleurs résultats, cette fois-ci suivi par le Dy et l'Eu (Graph 5).



Graph 5: Ratio des pics issues de l'analyses SM/SM correspondant aux complexes $[\text{Ln}(\text{OTf})_2(\text{tepo})_3]^+$ et $[\text{Ln}(\text{OTf})_2(\text{tepo})_2]^+$.⁴²

D.6. Réduction régiosélective d'un acétal de benzylidène en présence de Lanthanide

Les propriétés d'acide de Lewis des Ln nous ont motivé à les employer dans le cadre de notre étude d'ouverture réductrice régiosélective de l'acétal benzylidène **253**. Nous avons principalement travaillé avec le samarium III comme acide de Lewis, puis nous avons effectué quelques essais avec l'euprécium III et le gadolinium III. Bien que situés à la suite dans le tableau périodique, leurs tailles, leurs acidités et propriétés oxophiles diffèrent (Tableau 30 et Graph 5).

Les analyses d'estimation des proportions des alcools sont identiques à celle réalisées précédemment. Le terme de dégradation fera principalement référence à la formation du diol et d'alcool benzylique, ainsi qu'à la perte du phosphate.

D.6.1. Samarium III

D.6.1.1. Partie I. $\text{Sm}(\text{OTf})_3$

Pour la série d'essais qui va suivre, nous nous sommes procurés l'acide de Lewis chez le fournisseur *Sigma Aldrich*.

Tableau 31: Essais d'ouverture régiosélective en présence de samarium III de *Sigma Aldrich*.

Reaction scheme: **253** (cyclic acetal with Ph and OH) $\xrightarrow{\text{ouverture régiosélective}}$ **249 OH-I** (secondary alcohol) and **254 OH-II** (primary alcohol).

| | %mol $\text{Sm}(\text{OTf})_3$ | Agt. Réduc. | Nbr. éq. | Durée | Proportions OH-I/OH-II |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------|--------|---------------------------|
| 1 | 5 | $\text{BH}_3.\text{THF}$ | 5 | 3 h | 40/60 |
| 2 | 15 | $\text{BH}_3.\text{THF}$ | 5 | 1h30 | 40/60 |
| 3 | 15 | $\text{BH}_3.\text{Me}_2\text{S}$ | 5 | 12 jrs | 20/80 |
| 4 | 15 | $\text{BH}_3.\text{THF}$ | 1,2 | 5h30 | 30/70 |
| 5 | 15 | $\text{BH}_3.\text{THF}$ | 2 | 3h45 | 50/50 |
| 6 | 15 | $\text{BH}_3.\text{THF}$ | 3 | 2h30 | 60/40 |
| 7 | 30 | $\text{BH}_3.\text{THF}$ | 2 | 1h30 | 60/40 |
| 8 | 30 | $\text{BH}_3.\text{THF}$ | 5 | 1 h | 60/40 |
| 9 | 50 | $\text{BH}_3.\text{THF}$ | 2,5 | 45 min | 100/0 |
| 10 | 50 | $\text{BH}_3.\text{THF}$ | 5 | 45 min | - |
| 11 | 100 | $\text{BH}_3.\text{THF}$ | 2,5 | 45 min | 100/0 |

Les résultats des deux premiers tests réalisés avec 5 et 15% de $\text{Sm}(\text{OTf})_3$ et 5 équivalents (éq.) de $\text{BH}_3.\text{THF}$ sont en faveur de l'alcool secondaire dans les proportions 60/40 (Tableau 31, entrée 1 et 2). Une dégradation en diol et l'alcool benzylique, est également observée avec une dégradation légèrement plus importante pour l'essai avec 15% de $\text{Sm}(\text{OTf})_3$.

Pour analyser l'impact que peut avoir la nature de la base de Lewis complexé au borane, nous avons réalisé un essai en présence de $\text{BH}_3\cdot\text{Me}_2\text{S}$ (Tableau 31, entrée 3). Il est effectué en présence de 15% de $\text{Sm}(\text{OTf})_3$ et cinq équivalents de $\text{BH}_3\cdot\text{Me}_2\text{S}$. Après 12 jours de réaction à T.A., le produit de départ est toujours présent et la proportion d'alcool secondaire est largement majoritaire. BH_3 et Me_2S sont respectivement des acides et base de Lewis mous, alors que le THF est une base de Lewis dure. Le couple $\text{BH}_3\cdot\text{Me}_2\text{S}$ est de ce fait plus stable que le couple $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$.⁴³ Cette stabilité a vraisemblablement influencé la cinétique de la réaction. Ces résultats nous ont confortés à poursuivre les essais en employant le $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$.

Dans le but de limiter la dégradation des composés, nous avons diminué le nombre d'équivalents de l'agent réducteur à 1,2, en conservant 15% de sels de Ln. La réaction est stoppée après 5h30, le rapport de 70/30 est obtenu en faveur de l'alcool secondaire et la présence du produit de départ est estimée à 20% (Tableau 31, entrée 4). Néanmoins, très peu de dégradation est observée dans ces conditions. Nous continuons alors nos essais en variant les quantités de borane. En passant à 2 éq. de $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$, la réaction est totale en 2 h et les deux alcools sont formés en proportions égales (Tableau 31, entrée 5). En augmentant à 3 éq. de borane, l'alcool primaire devient majoritaire avec le rapport 60/40 (Tableau 31, entrée 6). Cependant, la présence de dégradation augmente avec le nombre d'équivalent de borane. Nous décidons alors de faire varier cette fois si le pourcentage de $\text{Sm}(\text{OTf})_3$, en l'augmentant à 30%, en présence de 2 éq. de $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$. La réaction est plus rapide, le rapport 60/40 en faveur de l'alcool primaire est conservé et nous observons moins de 5% de dégradation (Tableau 31, entrée 7). Un test en augmentant le nombre d'éq. de $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ à cinq est réalisé pour réaliser une comparaison avec les précédents effectués en présence de 5 et 15% de métal (Tableau 31, entrée 1 et 2). La réaction est plus rapide et se finit en 1 h. Le ratio des alcools est encore de 60/40 pour l'alcool primaire, contre 40/60 avec moins de métal (Tableau 31, entrée 8). La présence de dégradation est cependant très importante et estimée à environ 50%. Un excès de borane de 5 éq. conduit à une dégradation trop élevée.

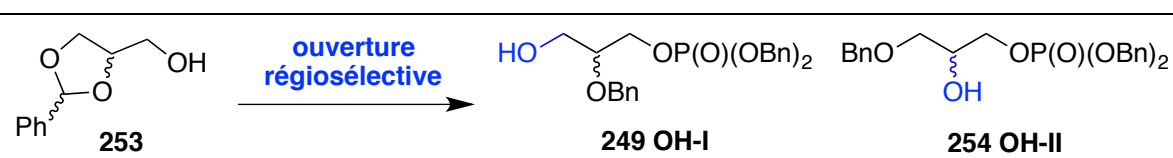
Nous avons continué à étudier l'effet de l'augmentation du pourcentage molaire de $\text{Sm}(\text{OTf})_3$ en réalisant un essai à 50% en présence de 2,5 éq. de $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$. La réaction se termine en seulement 45 min et nous n'observons que la formation de l'alcool primaire avec une dégradation oscillant de moins de 5% à 50% (Tableau 31, entrée 9). Dans ces conditions, des problèmes de reproductibilité furent rencontrés, impliquant probablement les propriétés hygroscopiques du $\text{Sm}(\text{OTf})_3$. L'incorporation de molécules d'eau dans la sphère de coordination de l'acide Lewis pourrait provoquer des dégradations, notamment au niveau du phosphate.⁴⁴ Nous pouvons noter qu'en modifiant la quantité de borane à 5 éq., seuls les produits issus de dégradation sont observés (Tableau 31, entrée 10). En continuant à augmenter le pourcentage de $\text{Sm}(\text{OTf})_3$ à 1 éq., en présence de 2,5 éq. de $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$. La réaction est complète en 45 minutes, et seule la formation de l'alcool primaire (Tableau 31, entrée 11), mais accompagnée de plus de 70% de dégradation, rendant ces conditions non satisfaisantes.

Les résultats les plus intéressants de cette étude concernent l'entrée 9 (Tableau 31). Cependant, nous avons eu des difficultés à reproduire certains résultats au cours du temps. Nous avons changé de fournisseur pour les prochains essais et nous nous sommes fournis en $\text{Sm}(\text{OTf})_3$ chez *Acros Organics*, qui propose un produit d'une pureté de 99% contre 98% pour celui de chez *Sigma Aldrich*.⁴⁵

D.6.1.2. Partie II. Sm(OTf)₃

Afin d'essayer de résoudre le problème de reproductibilité précédemment décrit, nous avons utilisé du Sm(OTf)₃ issu du fournisseur *Acros Organics* pour réaliser de nouveaux essais.

Tableau 32: Essais d'ouverture régiosélective en présence de samarium III de chez *Acros Organics*.

| | %mol Sm(OTf)₃ | Nbr équ. BH₃.THF | Durée | Proportions OH-I/OH-II |
|--|-------------------------------------|--|--------------|-----------------------------------|
|  | | | | |
| 1 | 50 | 2,5 | 45 min | 0/0 |
| 2 | 30 | 1,2 | 30 min | 0/0 |
| 3 | 30 | 0,5 | 30 min | 0/0 |
| 4 | 30 | 0,3 | 45 min | 0/0 |
| 5 | 30 | 0,5 | 15 min | 40/60 |

En appliquant les conditions optimisées précédemment (*i.e.* Sm³⁺ de *Sigma Aldrich*, Tableau 31), aucun des alcools attendus n'est formé. Seuls les produits de dégradation sont visibles par analyse de RMN du ¹H et du ³¹P (Tableau 32, entrée 1). Surpris par ces résultats, nous avons entrepris de nouveaux essais. Précédemment, nous avons observé qu'un excès trop important de borane pouvait être responsable d'une dégradation importante des produits. Le nombre d'équivalents de BH₃.THF a été diminué à 1,2 éq., 0,5 éq. et 0,3 éq., en présence de 30% de métal mais, à nouveau, la dégradation est totale (Tableau 32, entrées 2 à 4). Nous avons donc entrepris de diminuer le temps de réaction à 15 min, avec pour conditions 30% de Sm³⁺ et 0,5 éq. de borane. Cette fois-ci, la formation de l'alcool primaire et secondaire, dans des proportions 40/60, est observée mais accompagnée de beaucoup de dégradation (Tableau 32, entrée 5). Les résultats obtenus lors de l'utilisation du Sm(OTf)₃ provenant du fournisseur *Acros Organics* diffèrent radicalement de ceux obtenus avec le produit issu de chez *Sigma Aldrich*. Ne réussissant pas à former l'alcool primaire dans des proportions similaires à celles issues des tests Sigma Aldrich, nous avons arrêté les essais.

D.6.1.3. Conclusion

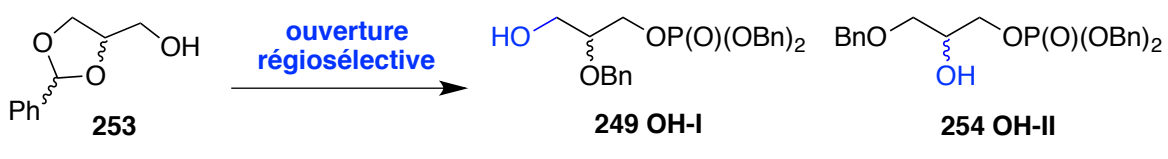
Les expériences, en conditions similaires, en utilisant le Sm(OTf)₃ produit soit par *Sigma Aldrich*, soit par *Acros Organics*, conduisent à des résultats complètement différents. Une impureté pourrait empoisonner la réaction de réduction, provoquant la dégradation des produits, ou à l'inverse, nous permettrait de former le produit souhaité. Ne trouvant d'informations claires concernant les impuretés présentes dans les Sm(OTf)₃ des deux fournisseurs, nous ne pouvons répondre à cette question. Les conditions réactionnelles les plus favorables à la formation de l'alcool primaire sont celles impliquant 50% de Sm(OTf)₃, de *Sigma Aldrich*, et 2,5 éq. de BH₃.THF avec des rendements de 30 à 99%. Les sels de lanthanides sont très hygroscopiques, après de nombreuses manipulations et malgré les précautions prises, il est probable qu'il y ait eu une contamination par des molécules d'eau, qui pourrait expliquer le problème de reproductibilité rencontré.

D.7. Europium III et gadolinium III

D.7.1. Discussion et résultats

Les certaines propriétés des lanthanides varient en fonction de l'élément considéré, comme la taille et l'oxophilie (Tableau 30, Graph 5). L'euprium possède une taille similaire au samarium mais est plus oxophile. Le gadolinium est quant à lui plus petit que ces deux atomes et possède une oxophilie plus faible que le samarium. Pour évaluer l'influence des caractéristiques, nous les avons employés pour effectuer quelques nouveaux essais (Tableau 33).

Tableau 33: Essais d'ouverture régiosélective en présence d'euprium III et de gadolinium III de chez Sigma Aldrich.

| | %mol Ln(OTf) ₃ | Nbr éq. BH ₃ .THF | Durée | Proportions OH-I/OH-II | |
|---|------------------------------|---------------------------------|-------|------------------------|------------------|
| | | | | Eu ³⁺ | Gd ³⁺ |
|  | | | | | |
| 1 | 15 | 5 | 1h30 | 40/60 | 40/60 |
| 2 | 50 | 3 | 1h | 80/20 | 80/20 |

Les premières manipulations en présence de 15% de métal et de cinq équivalents de BH₃.THF nous donnent pour les deux métaux les proportions de 40/60, en faveur de l'alcool secondaire, d'après les analyses en RMN du ¹H et du ³¹P (Tableau 33, entrée 1). Nous observons moins de 30% de dégradation. En passant à 50% de métal et à trois équivalents de borane, la tendance change.

Nous observons la formation de l'alcool primaire majoritairement à 80 contre 20 de secondaire, ainsi qu'une faible dégradation, d'environ 10% (Tableau 33, entrée 2).

D.7.2. Conclusion

Les $\text{Eu}(\text{OTf})_3$ et $\text{Gd}(\text{OTf})_3$ présentent, dans les mêmes conditions, de bons résultats avec des proportions de 80/20 en faveur de l'alcool primaire ainsi que peu de dégradation (Tableau 33, entrée 2). L'euprium étant plus oxophile, nous nous attendions à des résultats différents. Ces résultats ne surpassant pas ceux obtenus en présence de $\text{Sm}(\text{OTf})_3$, nous avons choisi de privilégier l'utilisation de ce dernier lors des réactions sur molécules chirales.

D.8. Poursuite de la synthèse

Plusieurs méthodes d'oxydation ont été testées pour oxyder l'alcool primaire **249**, obtenu par réduction régiosélective du benzylidène acétal, en aldéhyde (Schéma 78). Le réactif de Dess Martin et le perruthénate de tétrapropylammonium en présence de *N*-méthyl morpholine (TPAP-NMO) n'ont pas permis de former le produit attendu.^{46,47} Seul la combinaison des réactifs (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxyl (TEMPO) et [bis(acétoxy)iodo]benzène (BAIB), en condition anhydre, ont produit l'aldéhyde **255** avec un rendement de 92%.⁴⁸

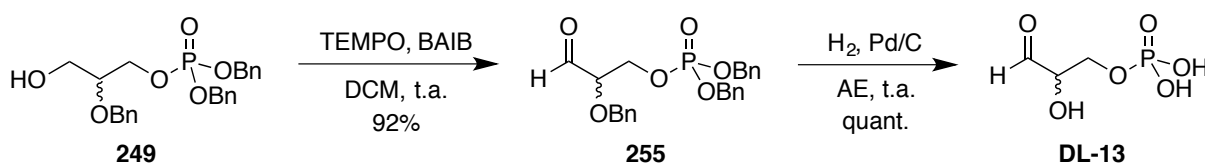


Schéma 78: Oxydation de **249** en aldéhyde **255** puis déprotection pour obtenir le DL-GAP **13**.

Enfin, le composé DL-GAP **13** est obtenu quantitativement après déprotection des benzyles par hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif (Schéma 78). Le DL-GAP **13** racémique a été obtenu en cinq étapes avec un rendement global variant de 14% à 45%. Cet écart découle du problème de reproductibilité rencontré lors d'ouvertures régiosélectives de l'acétal **253**, réalisées en présence de $\text{Sm}(\text{OTf})_3$.

Cette méthode peut maintenant être appliquée à la synthèse énantiosélective des D- et L-GAP **13** optiquement purs, en utilisant cette fois-ci comme produit de départ le **S**- et le **R-251**.

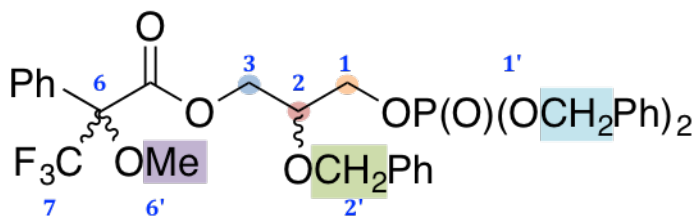
D.9. Conservation du centre stéréogène : Esters de Mosher

Il est possible qu'au cours de l'une des réactions, une épimérisation du centre stéréogène clé est lieu. Pour contrôler la pureté énantiomérique, nous avons utilisé la méthode des esters de Mosher, consistant à ajouter un synthon chiral.⁴⁹ Si aucune épimérisation ne s'est produite au cours de la synthèse, nous devrions obtenir un seul diastéréoisomère.

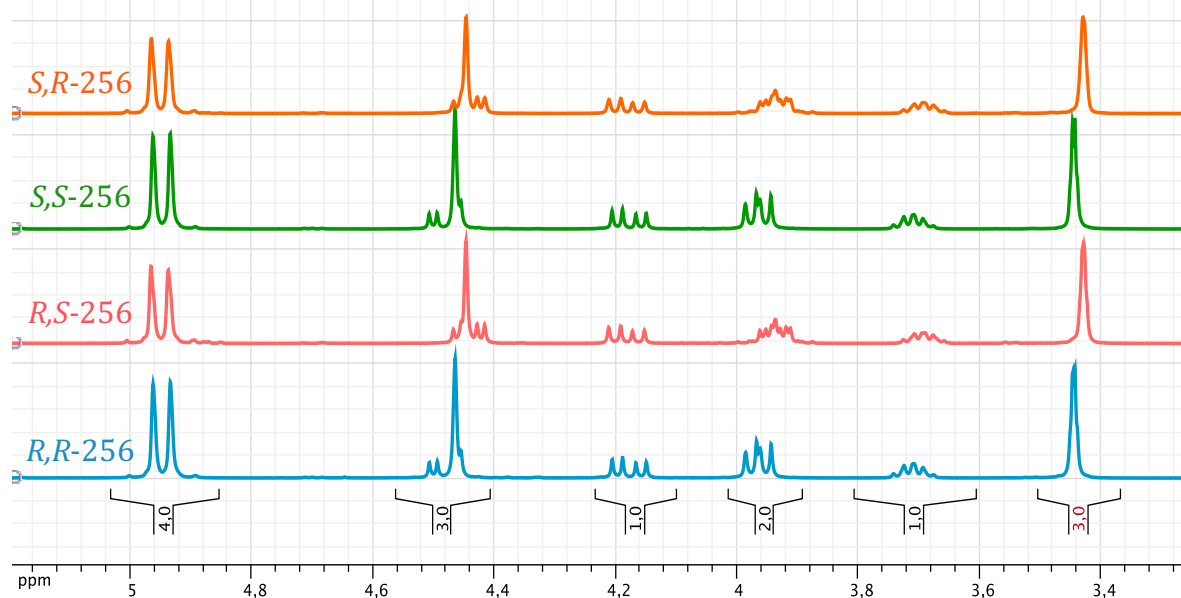
Pour former les esters de Mosher, nous avons utilisé les réactifs *R* et *S* de chlorure d' α -méthoxy- α -trifluorophénylacétyle (*R*-MTPACl et *S*-MTPACl respectivement). Les alcools primaires **R**- et **S-249** sont mis à réagir avec le *R*-MTPACl, en condition basique, conduisant aux **R,S**- et **S,S-256** respectifs. Ces réactions sont réitérées en parallèle, en présence du *S*-MTPACl, conduisant aux **R,R**- et **S,R-256**. Les bruts réactionnels de ces quatre expériences ont été analysés et comparés par RMN du ¹H, du ¹³C, du ¹⁹F et du ³¹P afin de déterminer le rapport diastéréomérique des esters formés.⁵⁰ Les analyses RMN du ¹H, du ¹³C, du ¹⁹F et du ³¹P montrent que pour chacune des réactions de Mosher effectuées, un seul diastéréoisomère est formé. Les signaux issus des couples **R,R**- et **R,S-256** et de **S,S**- et **S,R-256**, bien que proches, ne se superposent pas et ceux des couples énantiomères **R,R**- et **S,S-256** et de **R,S**- et **S,R-256** se superposent (Tableau 34).

XI. Développement d'une méthode de synthèse des D- et L- glycéraldéhyde 3-phosphates énantiomériquement purs

Tableau 34: Comparaison des analyses RMN du ^1H des couples diastéréoisomériques R,S/S,R et R,R/S,S; *s* signifie singulet, *d* doublet, *t* triplet et *q* quadruplet; RMN du ^1H des esters de Mosher R,S-, S,R-, R,R- et S,S-256 de 3,2 à 5,2 ppm.



| RMN du ^1H | | R,S/S,R | | R,R/S,S | |
|---------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-----------|----------------------------|
| | | (ppm) | (Hertz) | (ppm) | (Hertz) |
| Ph | 20H | 7,16-7,46 | m | 7,14-7,45 | m |
| 1 | CH_2 | 3,96 | dd ; $J=7,2, 5,3$ | 3,94 | dddd ; $J= 6, 6, 2,2, 2,2$ |
| 1' | $(\text{CH}_2)_2$ | 4,95 | d ; $J=8,5$ | 4,95 | d ; $J=8,5$ |
| 2 | CH | 3,71 | ddt ; $J=5,2, 5,3, 3,9$ | 3,69 | ddt ; $J=5,9, 5,2, 3,7$ |
| 2' | CH_2 | 4,46 | s | 4,44 | s |
| 3 | CH_aH_b | 4,18 | dd ; $J=11, 6, 5,3$ | 4,18 | dd ; $J=11, 6, 5,9$ |
| | CH_aH_b | 4,48 | dd ; $J=11,6, 3,9$ | 4,44 | dd ; $J=11,6, 3,7$ |
| 6' | CH_3 | 3,44 | q ; $J=1,1$ | 3,42 | q ; $J=0,9$ |



Le groupement CF_3 des esters **R,S-** et **S,R-256** possède un signal avec un déplacement chimique à -72,54 ppm et les esters **R,R-** et **S,S-256** à -72,55 ppm, en RMN du ^{19}F . Le signal du phosphore des esters **R,S-** et **S,R-256** est à -0,73 ppm et celui des esters **R,R-** et **S,S-256** à 0,71 ppm, en RMN du ^{31}P . Les spectres RMN du ^{13}C de chacun sont analysés dans la partie expérimentale dédiée à ce chapitre.

N'observant qu'un seul produit diastéréoisomère pour chacune des expérimentations, nous pouvons en conclure qu'il n'y a pas eu de phénomène d'épimérisation significatif lors de la synthèse de ces composés. Les analyses RMN du ^{19}F et du ^{31}P ont été réalisées sur un spectromètre 300 MHz en découplage proton. Bien que ces noyaux soient de bonnes sensibilités, les acquisitions en découplage proton peuvent faire apparaître des phénomènes de troncature à la base des signaux, rendant les intégrations imprécises. Pour évaluer le rapport diastéréoisomérique de chaque réaction, nous nous sommes appuyés sur les analyses RMN du 1H , effectuées sur un spectromètre de 500 MHz à cryosonde. A partir de nos analyses RMN du 1H , nous observons les satellites ^{13}C , intégrant pour 0,5%, des protons en position **1'** ($2x(O-CH_2-Ph)$). Nous en concluons que si un deuxième diastéréoisomère est présent, sa proportion est alors inférieure à 0,5%.

D.10. Activité optique des alcools primaires **R-** et **S-249**

Les mesures du pouvoir rotatoire α de solutions de **R-** et **S-249** dans du chloroforme ($CHCl_3$), ont été réalisées à 20°C à la longueur d'onde de 359 nm, correspondant à la raie jaune du sodium, dans des cuves d'une capacité de 1,2 mL, aux concentrations respectives de $58,3 \cdot 10^{-3}$ g/mL et de $50,8 \cdot 10^{-3}$ g/mL. La loi de Biot, datant de 1815, est la suivante :

$$\alpha = [\alpha]_{\lambda,T} \cdot l \cdot c$$

où $[\alpha]_{\lambda,T}$ est le pouvoir rotatoire propre à la molécule en solution, l la longueur de la cuve traversée par l'onde et c la concentration de la solution.

Ainsi les pouvoirs rotatoires spécifiques des **R-** et **S-249** ont pu être calculés. Le **R-249**, possède un $[\alpha]_{\lambda,T}$ de $-10,77^{\circ} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^3$ et est une molécule au pouvoir rotatoire lévogyre. Le **S-249**, possède un $[\alpha]_{\lambda,T}$ de $+10,60^{\circ} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^3$ et est une molécule au pouvoir rotatoire dextrogyre. Le pouvoir rotatoire étant différent de zéro pour chacun des essais indique que nous sommes bien en présence d'une substance optiquement active. Les deux énantiomères **R-** et **S-249** possédant un $[\alpha]_{\lambda,T}$ de signe opposé et de valeur absolue similaire, nous en concluons que ces deux produits sont bien l'image l'un de l'autre.

E. Conclusion

Durant ces travaux nous avons développé une méthode de synthèse chimique en cinq étapes permettant d'accéder au DL-GAP **13**. A ce jour, aucune étude de synthèse uniquement chimique de L-GAP n'a été publiée. La conservation du centre des alcools primaires **R-249** et **S-249** stéréogène a été confirmée par les analyses RMN des sels de Mosher et par contrôles d'activité optique. L'étape clé de cette synthèse est l'ouverture réductrice régiosélective du benzyldène acétal **253**, rendue délicate par la présence du phosphate. En utilisant des sels de lanthanide comme acide de Lewis, nous avons réussi à trouver des conditions permettant d'aboutir à la formation de l'alcool primaire souhaité **249** majoritaire. Les trois lanthanides testés ont montré des résultats similaires. Nous pensions que les différences d'acidité de Lewis, de taille et d'oxophilie de ces éléments allaient conduire à des différences. Visiblement, celles-ci ne sont pas suffisamment significatives pour influencer sur notre système. Il serait par la suite intéressant de tester d'autres sels (*i.e.* Sc(OTf)₃, Yb(OTf)₃) et d'appliquer cette méthode à d'autres modèles pour évaluer son efficacité et mieux comprendre son mécanisme.

Suite à des problèmes de santé, l'étude cinétique comparative de bioconversion du D-GAP **D-13** en DXP **14** et du L-GAP **L-13** en la version diastéréoisomérique du DXP, par la DXS d'*E. coli* n'a pu être réalisé.

¹ Freeman, W. H., *Biochemistry international student edition*, 3^{ème} edition, New York, 353-357; 429-431; 536-537, 1988.

² Granner, D., Pilkis, S., « The Genes of Hepatic Glucose Metabolism », *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265, 10173-10176.

³ Mander, L., Lui H., Rohmer, M., *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*, Elsevier, vol 1, Oxford, 524-526, 2010.

⁴ a) Hirsch G., Thèse 2004, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France; b) Hebinger G., Thèse 2009, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

⁵ Spadari, S., Maga, G., Verri, A., Focher, F., «Molecular basis for the antiviral and anticancer activities of unnatural L-beta-nucleosides. *Expert Opin Investig Drugs*, 1998, 7, 1285–1300.

⁶ Verri, A., Montecucco, A., Gosselin, G., Boudou, V., Imbach, J. L., Spadari, S., Focher, F., «L-ATP is recognized by some cellular and viral enzymes: does chance drive enzymic enantioselectivity? », *Biochemical Journal*, 1999, 337 3, 585–590.

⁷ Fischer, H.O.L., Baer, E., *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin*, 1932, 65, 337

⁸ Smythe, C. V., Gerischer, W., *Biochem. Z.*, 1933, 260, 414.

⁹ Ballou, C. E., Hermann, O., Fisc, Her, L., «The Synthesis of D-Glyceraldehyde-3-phosphate», *Journal of the American Society*, 1955, 77, 1951–1953.

¹⁰ Szewczuk, A., Wolny, M., Baranowsky, T., « A new method for preparation of D-glyceraldehyde-3-phosphate », *Acta Biochimica Polonica*, 1961, 8, 201-207.

¹¹ Serianni, A. S., Pierce, J., Barker, R., «Carbon-13-enriched carbohydrates: preparation of triose, tetrose, and pentose phosphates», *Biochemistry*, 1979, 18, 1192–1199.

¹² Li, H., Tian, J., Wang, H., «An Improved Preparation of D-Glyceraldehyde 3-Phosphate and Its Use in the Synthesis of 1-Deoxy-D-xylulose 5-Phosphate», *Helvetica Chimica*, 2010, 93, 1745–1750

¹³ Pederson, R., Liu, K., Rutan, J., «Enzymes in organic synthesis: synthesis of highly enantiomerically pure 1, 2-epoxy aldehydes, epoxy alcohols, thiirane, aziridine, and glyceraldehyde 3-phosphate», *Journal of Organic Chemistry*, 1990, 5, 4897–4901.

¹⁴ Gauss, D., Schoenenberger, B., Wohlgemuth, R., «Chemical and enzymatic methodologies for the synthesis of enantiomerically pure glyceraldehyde 3-phosphates». *Carbohydrate Research*, 2014, 389, 18–24.

¹⁵ Wong, C-H., Whitesides, G.M., «Synthesis of Sugars by Aldolase-Catalyzed Condensation Reactions », *Journal of Organic Chemistry*, 1983, 48, 3199-3205.

¹⁶ Ponaire, S., *Thèse*, 2010, *Université de Strasbourg, Strasbourg, France*.

¹⁷ Meyer, O., Ponaire, S., Rohmer, M., Grosdemange-Billiard, C., «Lewis Acid Mediated Regioselective Ring Opening of Benzylglycidol with Dibenzyl Phosphate : Short and Attractive Synthesis of Dihydroxyacetone Phosphate », *Organic Letters*, 2006, 8, 4347-4350.

¹⁸ Barbasiewicz, M., Makosza, M., «Intermolecular Reactions of Cholohydrine Anions : Acetalization of Carbonyl Compounds under Basic Conditions », *Organic Letters*, 2006, 8, 3745-3748.

¹⁹ a) Shie, C.-R., Tzeng, Z.-H., Kulkarni, S. S., Uang, B.-J., Hsu, C.-Y., Hung, S.-C., «Cu(OTf)₂ as an efficient and dual-purpose catalyst in the regioselective reductive ring opening of benzylidene acetals», *Angewandte Chemie International edition in English*, 2005, 44, 1665–1668; b) Rujirawanich, J., Kongkathip, B., Kongkathip, N., «Regioselective ring opening of exo- and endo-3,4-benzylidene acetals of arabinopyranoside derivatives with Lewis acids and reducing agents», *Carbohydrate research*, 2011, 346, 927–932; c) Wang, C.-C., Luo, S.-Y., Shie, C.-R., Hung, S.-C., «Metal trifluoromethanesulfonate-catalyzed regioselective borane-reductive ring opening of benzylidene acetals: a concise synthesis of 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-xylitol», *Organic letters*, 2002, 4, 847–849; d) Johnsson, R., Cukalevski, R., Dragén, F., Ivanisevic, D., Johansson, I., Petersson, L., Wettergren, E. E., «Reductive openings of benzylidene acetals. Kinetic studies of borane and alane activation by Lewis acids», *Carbohydrate research*, 2008, 343, 2997–3000; e) Ohlin, M., Johnsson, R., Ellervik, U., «Regioselective reductive openings of 4,6-benzylidene acetals: synthetic and mechanistic aspects» *Carbohydrate research*, 2011, 346, 1358–1370; f) Daragics, K., Fügedi, P., «Regio- and chemoselective reductive cleavage of 4,6-O-benzylidene-type

acetals of hexopyranosides using $\text{BH}_3 \cdot \text{THF} - \text{TMSOTf}$ », *Tetrahedron Letters*, 2009, 50, 2914–2916.

²⁰ Holden, N.E., Coplen, T., «The Periodic Table of the Elements», *Chemistry International-News magazine for IUPAC*, 2004, 26, 8-9.

²¹ Jensen, W.B., «The positions of Lanthanum (Actinium) and Lutetium (Lawrencium), in the Periodic Table», *Journal of Chemical Education*, 1982, 59, 634-636.

²² Cotton, S., *Lanthanide and Actinide Chemistry*, Wiley, Chippenhams, England, 2006.

²³ Weeks, M. E., «The discovery of the elements XVI. The rare earth elements», *Journal of Chemical Education*, 1932, 9, 1751–1773.

²⁴ Seitz, M., Oliver, A.G., Raymond, K.N., «The Lanthanide Contraction Revisited», *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129, 11153-11160.

²⁵ Pyykko, P., «Relativistic effects in structural chemistry», *Chemical Reviews*, 1988, 88, 563–594.

²⁶ N. N. Greenwood and A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, Pergamon, first edition, Cambridge, 1423-1449, 1984.

²⁷a) Bond, C., «Application of Lanthanide Reagents in Organic Synthesis», *Chemical Reviews*, 1992, 92, 29–60; b) Dahle, A., «Instantaneous $\text{SmI}_2 - \text{H}_2\text{O}$ -mediated reduction of dialkyl ketones induced by amines in THF», *Tetrahedron Letters*, 2002, 43, 7197–7200; c) Evans, W. J., Allen, N. T., Ziller, J. W., «The Availability of Dysprosium Diiodide as a Powerful Reducing Agent in Organic Synthesis: Reactivity Studies and Structural Analysis of DyI_2 », *Journal of the American Society*, 2000, 122, 11749–11750; d) Evans, W. J., Workman, P. S., «Alkyl Chlorides to Carbonyl Compounds via the NdI_2 », *Organometallics*, 2005, 17, 1989–1991; e) Shie, J., Workman, P. S., Evans, J., & Fang, J., «Comparative study of TmI_2 , SmI_2 , and $\text{SmI}_2 / \text{HMPA}$ in the cross-coupling reactions of 2-acetylthiophene and thiophene-2-carboxylate with carbonyl compounds», *Tetrahedron Letters*, 2004, 45, 2703–2707.

²⁸ Molander, G.A., «Application of lanthanide reagents in organic synthesis», *Chemical Reviews*, 1992, 92, 29-68.

²⁹ a) Aspinall, H.C., «Chiral Lanthanide Complexes: Coordination Chemistry and Applications», *Chemical Reviews*, 2002, 102, 1807-1850; b) Shibasaki, M.,

Yoshikawa, N., « Lanthanide Complexes in Multifunctional Asymmetric Catalysis », *Chemical Reviews*, 2002, 102, 2187-2209.

³⁰ Shibasaki, M., Yamada, Ken-ichi, Yoshikawa, N., « Lewis Acids in Organic Synthesis », Hisashi Yamamoto, Wiley-VCH, Germany, Mörlenbach, 2000.

³¹ Kobayashi, S., « Lanthanide Trifluoromethanesulfonates as Stable Lewis Acids in Aqueous Medio. Tb(OTf)₃ Catalyses Hydroxymethylation Reaction of Silyl Enol Ethers with Commercial Formaldehyde Solution », *Chemistry Letters*, 1991, 20, 2187-2190.

³² Yu, L., Chen, D., Wang, P.G., « Aqueous Aza Diels-Alder Reactions Catalyzed by Lanthanide(III) Trifluoromethanesulfonates », *Tetrahedron Letters*, 1996, 37, 2169-2172.

³³ Kobayashi, S., Ishitani, H., « A novel Mannich-type reaction in aqueous media. Lanthanide triflate-catalysed condensation of aldehydes, amines and vinyl ethers for the synthesis of beta-amino ketones », *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1995, 1379.

³⁴ Keller, E., Feringa, B. L., « Ytterbium Triflate Catalyzed Michael Additions of beta-Ketoesters in Water », *Tetrahedron Letters*, 1996, 37, 1879-1882.

³⁵ Kobayashi, S., Satoshi, N., Tsuyoshi, B., « Lewis Acid Catalysts Stable in Water. Correlation between Catalytic Activity in Water and Hydrolysis Constants and Exchange Rate Constants for Substitution of Inner-Sphere Water Ligands », *Journal of American Chemical Society*, 1998, 120, 8287-8288.

³⁶ Luche, J-L, Gemal, A. L., « Efficient Synthesis of Acetals Catalysed by Rare Earth Chlorides », *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1978, 976-977.

³⁷ Mori, S., Aovama, T., Shioiri, T., « New methods and reagents in organic synthesis. 65. A stereoselective synthesis of tilivalline », *Tetrahedron Letters*, 1986, 27, 6111-6114.

³⁸ a) Daniehefsky, S., Bednarski, M., « Catalysis of homo diels-alder reactions by Yb(fod)₃ », *Tetrahedron Letters*, 1985, 26, 2507-2508, b) Deaton, M.V., Ciufolini, M.A., « Yb(fod)₃-Promoted ene reaction of aldehydes with vinyl ethers », *Tetrahedron Letters*, 1993, 34, 2409-2412.

³⁹ Ishar, M.P.S., Wali, A., Gandhi, R.P., « regio- and stereo-selectivity in uncatalyzed and catalyzed Diels-Alder reactions of allenic esters with furan and 2-methylfuran », *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1990, 2185-2192.

⁴⁰ Danishefsky, S.J., Pearson, W. H., Harvey, D. F., « On the relationship of Topological and Diastereofacial Control in the Lewis Acid Catalyzed Cyclocondensation REaction of Alkoxyaldehydes with Activated Dienes : Metal Tunable Asymmetric Induction », *Journal of American Chemical Society*, 1984, *106*, 2456-2458.

⁴¹ Daniehefsky, S.J., Maring, C.J.J., « A Stereoselective Totally Synthetic Route to Methyl α -Peracetylthiosaminide », *Journal of American Chemical Society*, 1989, *111*, 2193-2004.

⁴² Tsuruta, H., Yamagushi, K., Imamoto, T., « Evaluation of the relative Lewis acidities of lanthanoid (III) compounds by tandem mass spectrometry », *Chemical Communications*, 1999, 1703-1704.

⁴³ Pearson, R. G., «Hard and Soft Acids and Bases», *Journal of Chemical Education*, 1968, *45*, 581-587.

⁴⁴ Kluger, R., Cameron, L.L., « Activation of Acyl Phosphate Monoesters by Lanthanide Ions: Enhanced Reactivity of Benzoyl Methyl Phosphate », *Journal of the American Chemical Society*, 2002, *124*, 3303-3306.

⁴⁵ a)<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/425710?lang=fr®ion=FR> ;b)[http://www.acros.com/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=CatalogSearch&SearchString=%20Sm\(SO3CF3\)3](http://www.acros.com/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=CatalogSearch&SearchString=%20Sm(SO3CF3)3).

⁴⁶ Molander, G.A, Petrillo, D.E., «Oxidation of hydroxyl substituted organotrifluoroborates », *Journal of the American Chemical Society*, 2006, *128*, 9634-9635.

⁴⁷ Dess, D. B., Martin, J. C., «A Useful 12-1-5 Triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin Periodinane) for the Selective Oxidation of Primary or Secondary Alcohols and a Variety of Related 12-1-5 Species», *Journal of the American Chemical Society*, 1991, *113*, 7277-7287.

⁴⁸ Brink, G.-J., Arends, I. W. C. E., Sheldon, R. A., «Catalytic Oxidations of Alcohols in Water». *Science*, 2000, *281*, 1636-1639.

⁴⁹ Dale, J. A., Dull, D. L., Mosher, H. S., «alpha-Methoxy-alpha-trifluoromethylphenylacetic acid, a versatile reagent for the determination of enantiomeric composition of alcohols and amines», *The Journal of Organic Chemistry*, 1969, 34, 2543–2549.

⁵⁰ Dale, J. A., Mosher, H. S., «Nuclear Magnetic Resonance Enantiomer Reagents. Configurational Correlations via Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of Diastereomeric Mandelate, O-Methylmandelate, and α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) Esters», *Journal of the American Chemical Society*, 1973, 95, 512–519.

XII. Conclusion générale

Le travail interdisciplinaire élaboré au cours de cette thèse a permis de combiner des approches théoriques de modélisation moléculaire et expérimentales de chimie organique, autour d'un objectif commun de développement d'inhibiteurs performants de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR), cible importante de la recherche d'antimicrobiens.

Dans ce manuscrit de thèse, nous avons tout d'abord présenté les travaux concernant une étude structurale et énergétique de la DXR. Avant de débiter la conception et la synthèse de nouveaux composés, il est important de comprendre comment le ligand naturel DXP interagit avec sa cible. A l'aide de structures cristallographiques disponibles dans la banque de donnée de protéines (*i.e. Protein data bank*), nous avons été capable d'étendre cette étude à plusieurs inhibiteurs connus de la DXR. En utilisant des techniques de modélisation moléculaire, notamment de simulations de dynamique moléculaire suivies des analyses MM/PBSA, nous avons pu déterminer les interactions cruciales à la fixation du substrat naturel DXP. Nous avons également réussi à montrer que les inhibiteurs connus exploitent des interactions communes à celles impliquées dans la fixation du substrat naturel. Ces résultats ont permis d'identifier d'importantes interactions, par la suite utilisées comme filtres lors des études fondées sur des calculs de docking présentées dans plusieurs chapitres.

Ces calculs préliminaires ont aussi servi à étudier la mutation S222T chez la DXR d'*Escherichia coli*, qui rend l'enzyme résistante à son inhibiteur fosmidomycine tout en restant fonctionnelle, permettant à la bactérie de se développer normalement. Nous avons été capable de montrer que le mécanisme de résistance est lié à la manière dont la mutation affecte la fixation de ligands dans le site actif de l'enzyme. La comparaison des calculs d'énergies libres par résidus de chaque complexe, sauvage et mutant, a permis d'évaluer l'impact de cette mutation sur l'ensemble des

résidus interagissant avec le DXP et la fosmidomycine. Ces résultats suggèrent que, l'inhibiteur perd en efficacité du fait de la diminution de la stabilité de fixation du phosphonate au niveau du point d'ancrage. La richesse électronique apportée par le phosphate présent chez le DXP permet de limiter cet effet. Une telle mutation aurait des conséquences dévastatrices pour les inhibiteurs analogues de la fosmidomycine possédant une fonction phosphonate. Cette dernière possède une fonction chélatant le métal de type rétro-hydroxamique. Il pourrait être intéressant de tester la capacité d'inhibiteurs possédant la version hydroxamique, ainsi que d'étudier comment cette mutation affecte la DXR d'autres organismes.

Un des objectifs du développement d'antibiotiques est de concevoir des composés ayant un large spectre d'action, c'est à dire pouvant inhiber efficacement plusieurs souches pathogènes de la DXR. C'est actuellement un problème qui représente un défi pour la conception de nouveaux inhibiteurs. Pour comprendre ce problème, nous avons travaillé à l'étude comparative d'interactions de plusieurs inhibiteurs chez les DXRs de trois organismes différents (*i.e. Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis* et *Plasmodium falciparum*). L'objectif était de corréler les interactions de chacun des inhibiteurs avec leur capacité d'inhibition respective. Nous avons pu proposer plusieurs hypothèses pour l'origine de cette différence. Ces interactions dépendraient des résidus composant la boucle de confinement, ainsi que ceux de la boucle lui faisant face. En effet, nous avons observé qu'en fonction de la séquence, une interaction plus ou moins favorable entre ces deux boucles se produit, lorsque celle de confinement est en conformation fermée. L'hydratation du site actif est également un critère important à prendre en compte qui semble différer d'un organisme à l'autre et pourrait expliquer la difficulté ou non pour certains composés à s'y fixer. Des études plus poussées pour expliquer plus précisément les raisons de ces différences d'inhibition sont nécessaires.

L'utilisation des informations récoltées à partir de nos travaux nous ont permis de nous orienter vers des applications pratiques concernant des groupes spécifiques de composés. Notamment lors de la collaboration avec l'équipe de chimistes du laboratoire de Chimie et Biochimie de Molécules Bioactives de l'Institut de Chimie, où nous avons appliqué les protocoles et filtres énergétiques à l'étude d'analogues phosphates de la fosmidomycine, inhibiteur de la DXR. Ne disposant pas de structure cristallographique en présence de ces molécules, nous avons modélisé les complexes et effectué des simulations de dynamique moléculaire pour fournir des informations quant aux résidus impliqués dans leur fixation dans le site actif. Combinées avec les données expérimentales de ces mêmes molécules, nous avons pu fournir des résultats pouvant expliquer les performances de cette série d'inhibiteurs phosphates, incluant de plausibles raisons de la non efficacité de composés. Des études expérimentales supplémentaires, comme des tests d'inhibitions sur la DXR de *Synechocystis* sp. PCC6803, et cristallographiques s'avèreraient nécessaires pour compléter ces analyses.

A nouveau, les résultats des calculs obtenus, impliquant des complexes de la DXR avec des ligands connus, nous ont permis de déterminer les interactions clés permettant à un inhibiteur de se fixer à la protéine. Nous avons pu travailler à la conception de nouveaux inhibiteurs potentiels de la DXR de deux types : bisubstrat et biligand. Un nombre important de molécules a été modélisé et docké sur la DXR à l'aide du programme AutoDock4.2 et AutoDock Vina. Les analyses de ces résultats, dans lesquels des filtres d'interactions déterminés à partir de précédentes analyses ont été inclus, ont conduit à la sélection de plusieurs candidats. Dans cette sélection figurent des couples de molécules pour l'approche bisubstrat, ainsi que des produits issus de la réaction bioorthogonale, ainsi que des candidats concernant l'approche biligand, où une même molécule doit pouvoir interagir avec de multiples sites de fixations. Les résultats ont été transmis à nos collaborateurs organiciens. Les futurs résultats d'inhibition de ces composés permettront d'évaluer le protocole appliqué.

Toujours dans le cadre de la conception de nouveaux inhibiteurs de la DXR, la substitution de la fonction phosphonate, d'analogues de la fosmidomycine, vers une fonction α,α -difluoro phosphonate semble être une idée prometteuse, fondée en partie sur les performances d'analogues α -monofluoro phosphonates. Des études de simulations de dynamique moléculaires, suivies d'un protocole d'analyses MM/PBSA, nous ont permis de déterminer les contributions énergétiques pour plusieurs modèles. Cela nous a conduit à la sélection de composés, encourageant leurs synthèses. Les composés α,α -difluoro phosphonate à pince hydroxamique méthylé et non méthylé ont été obtenus avec les rendements respectifs de 15 et 17%. Les prochains tests d'inhibitions sur la DXR permettront de confronter les résultats issus des deux domaines et d'évaluer l'efficacité de l'utilisation de la fonction α,α -difluoro phosphonate. L'obtention de structures cristallographiques permettrait également d'évaluer la prédiction des conformations issues du logiciel de docking utilisé.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un analogue du substrat naturel DXP de type époxyde. L'objectif était double : i) confirmer chimiquement le mécanisme réactionnel de rétro-aldolisation/aldolisation ; ii) obtenir un inhibiteur irréversible de la DXR. Cependant, de nombreuses difficultés ont été rencontrées, impliquant notamment les groupements protecteurs, et malheureusement, la synthèse n'a pu aboutir à l'obtention de l'analogue époxyde du DXP. Cependant, un chemin de rétrosynthèse a pu être mis en place et pourrait conduire au produit époxyde désiré.

En dernier point, nous avons traité un sujet concernant la première enzyme de la voie du MEP, la DXS, dans lequel nous avons développé une méthode de synthèse des D- et L-GAP énantiomériquement purs, avec un rendement oscillant de 14 à 45% pour la version racémique. L'écart important de rendement est principalement dû à un problème de reproductivité de l'étape impliquant l'ouverture régiosélective du benzylidène acétal en présence de sels de lanthanide. De nouveaux essais en utilisant différents sels de lanthanides comme acide de Lewis pourraient optimiser la réaction. La corrélation entre la quantité d'acide de Lewis avec le mécanisme réactionnel de cette dernière n'est pour le moment pas connue.

Des calculs d'études conformationnelles impliquant le lanthanide et le réactif benzylidène acétal permettraient d'y répondre. Les produits issus de cette voie de synthèse pourront servir à démarrer des études cinétiques comparatives de conversion du D-GAP en DXP et du L-GAP en la version diastéréoisomérique du DXP.

Les perspectives pour l'ensemble de ce travail ouvrent sur de multiples directions. D'un point de vue fondamental, il reste des points à étudier plus en détails. L'un de ces points concerne la conformation des molécules à pince hydroxamique non méthylée (HX-phos **76** et HX **77**). Cette question a été abordée dans le chapitre « VII. Etudes computationnelles d'analogues phosphates d'inhibiteurs de la DXR » p.178, ouvrant des pistes qui n'ont pour le moment pas été approfondies. D'un point de vue plus théorique, il serait intéressant d'effectuer une étude sur les changements conformationnelles de la boucle de confinement de la DXR et d'en comprendre le mécanisme qui conduit son ouverture et fermeture. Des analyses plus poussées sur les relations entre la fixation d'un ligand en fonction de la séquence de la protéine pourraient déboucher sur des résultats importants pour le développement de nouveaux inhibiteurs. Cependant, pour répondre à ces questions, l'utilisation de techniques de simulations plus avancées, comme le QM/MM concernant la fixation des ligands ou des méthodes permettant d'améliorer l'échantillonnage conformationnelle pour l'étude de la boucle, s'avère nécessaire.

Ce projet a permis d'acquérir des connaissances qui pourront aider à la conception de nouveaux inhibiteurs potentiels de la DXR, comme par exemple les molécules proposées dans les chapitres « VIII. Conception d'inhibiteurs potentiels de la DXR de type bisubstrat et biligand » p. 202 et « IX. Etudes d'affinités et synthèses de potentiels inhibiteurs de la DXR de type α,α -difluoro phosphonate » p.252, dont la synthèse des composés à pince hydroxamique non méthylé **164** et méthylé **165** est décrite dans cette thèse. Les molécules présentées et sélectionnées à partir de calculs computationnels pourraient à l'avenir être synthétisés et testés sur la DXR.

Suite à mes problèmes de santé, mon travail a été interrompu à plusieurs reprises, impactant directement son avancé. Néanmoins, cette thèse a permis d'enrichir mes connaissances expérimentales et de découvrir la modélisation moléculaire en établissant un lien entre ces deux domaines pour la plupart des projets abordés.

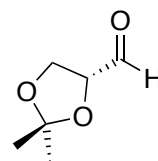
Ces travaux de thèse témoignent de la complémentarité de la chimie théorique et de la chimie organique, ainsi que l'importance des interactions entre les personnes issues de ces deux domaines.

XIII. Experimental part

All non-aqueous reactions were run in dry solvents under an argon atmosphere and dried glassware. All commercial reagents and solvents were reagent grade, purchased from Sigma Aldrich, Acros Organics or Thermo Fisher Scientific. DryStation® purification system was used for drying tétrahydrofurane (THF) and dichloromethane (DCM). Other solvents were dried with classical procedures. Flash chromatography was performed on Merck silica gel 60 230-400 mesh with the solvent system as indicated. Analytical thin layer chromatography (TLC) plates used were silica gel 60 F254 type from Merck, were visualized under a UV light (254 nm) and revealed by spraying with an ethanol solution of *p*-anisaldehyde (2.5%), sulfuric acid (3.5%) and acetic acid (1.6%) or with an ethanolic solution of phosphomolybdic acid (20%) followed by heating. All reaction were TLC monitored. NMR spectra were recorded on Bruker Avance spectrometers: 300 (¹H NMR: 300 MHz; ¹³C NMR: 75 MHz; ³¹P NMR: 121 MHz; ¹⁹F NMR 282 MHz), 400 (¹H NMR: 400 MHz; ¹³C NMR: 100 MHz; ³¹P NMR: 162 MHz), 500 (¹H NMR: 500 MHz; ¹³C NMR, 125 MHz). ¹H-NMR experiments were performed in CDCl₃ or D₂O with CHCl₃ (δ= 7.26 ppm) and DHO (δ= 4.79 ppm), respectively, as internal reference. ¹³C NMR spectra were performed in CDCl₃, with CDCl₃ (δ= 77.16 ppm) as internal reference. ³¹P NMR spectra were recorded with H₃PO₄ (δ= 0 ppm) as external reference, and ¹⁹F NMR ones with CFCl₃ as external reference. Chemical shifts are expressed in ppm and signal multiplicities are described using by the following abbreviations: s for singlet, d for doublet, t for triplet, q for quadruplet and m for multiplet. When it is possible, the coupling constant is indicated (Hz). Stars (*) refer to diastereoisomers and letters (i.e. *a* and *b*) indicate conformers. Negative or positive-mode electrospray mass spectroscopies were performed on a Bruker Daltonics microTOF spectrometer equipped with an orthogonal electrospray interface (ESI). The polarimeter used for optical rotatory dispersion measurements was a Model 341 from PerkinElmer with Na and Hg lamps.

Synthesis of α,α -difluoro phosphonate inhibitors of the DXR

(R)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyde



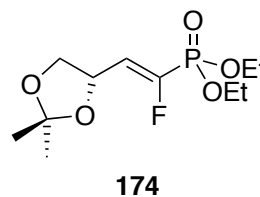
171

To a stirred solution of protected 1,2,5,6-di-*O*-isopropylidene-D-mannitol **168** (1 mmol) in Et₂O/H₂O (8:2) (2 mL) was added NaIO₄ (1.2 mmol). After 3 h, the aqueous layer was extracted with Et₂O (2x 1mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and the solvent was carefully evaporated under a slight reduced pressure. The volatile product is obtained without further purification as colorless oil (50% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.40 (3H, s, -CH₃), 1.47 (3H, s, -CH₃), 4.1 (2H, m, CH₂), 4.34 (1H, ddd, J= 7.5, J= 4.4, J= 1.8), 9.70 (1H, d, J= 1.8).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 25.3, 26.3, 65.5, 95.9, 111.2, 201.9.

Diethyl (*S,E*)-(2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-1-fluorovinyl)phosphonate



To a stirred solution of tetraethyl (fluoromethylene) *bis*(phosphonate) **173** (1 mmol) in THF (5 mL) at -78 °C, were successively added a 1.6 M *n*-BuLi (1.2 mmol) in hexane and after 30 min, a solution of (*R*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyde **171** (1.5 mmol) in THF (5 mL). After 30 min the reaction was allowed to warm up at room temperature overnight, quenched with a saturated solution of NH₄Cl (1 mL) and finally extracted with EA (3x 3 mL). The combined organic layers were washed with brine (1.5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure. The product is obtained after purification by flash chromatography (EA/PE, 5/5) as colorless oil (62% yield).

TLC: R_F = 0.33 (EA/PE, 5/5)

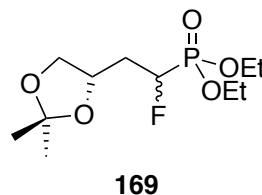
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.31-1.41 (12H, m, 4x-CH₃), 3.66 (1H, dd, J = 21.3, J = 12.1, -CH_aH_b-), 3.99 (1H, dd, J = 21.6, J = 12.1, -CH_aH_b-), 4.07-4.21 (4H, m, 2x-CH₂), 4.95-5.05 (1H, m, -CH-), 6.01 (1H, ddd, J = 39.0, J = 7.8, J = 7.8, -CH-).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 16.3 (d, J = 3.4), 25.8, 26.6, 63.5 (d, J = 5.2), 71.1, 109.4, 110.0, 123.9, 124.2 (dd, J = 27.3, J = 22.5).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 5.14 (d, J = 99.0).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃): δ -126.77 (d, J = 99.0).

Diethyl (2-((*S*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-1-fluoroethyl)phosphonate



To a stirred solution of diethyl (*S,E*)-(2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-1-fluorovinyl)phosphonate **174** (1 mmol) in EA (1 mL) was added Pd 10% wt. on activated carbon (0.1 mmol). The reaction flask was then connected to a balloon of H₂ (1 atm). Every 20 min, a slight vacuum was applied to the reaction flask, which was then backfilled with H₂. When all starting material was consumed, the reaction was filtered over a celite pad and evaporated to dryness under reduced pressure. The product was obtained pure as colorless oil (94% yield).

TLC: $R_F = 0.31$ (EA/PE, 5/5)

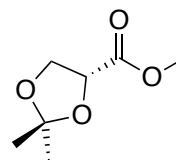
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.33-1.39 (12H, m, 4x-CH₃), 2.15-2.31 (2H, m, CH₂), 3.60-3.68 (1H, m, CH), 4.07-4.37 (6H, m, 3x-CH₂), 4.80-5.10 (1H, m, CH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 16.4 (d, $J = 3.3$), 26.8, 34.6 (d, $J = 2.1$), 35.0 (d, $J = 1.9$), 62.4 (d, $J = 4.2$), 62.9 (d, $J = 4.4$), 68.7, 69.1, 85.4 (dd, $J = 257.1$, $J = 216.3$), 109.1.

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ -207.241 (d, $J = 75.2$), -212.53 (d, $J = 73.1$).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃): δ 18.85 (t, $J = 75.2$), 19.14 (t, $J = 73.1$).

Methyl (*R*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carboxylate



177

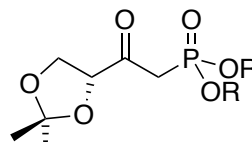
To a stirred solution of (*R*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyde **171** (1 mmol) in H₂O/MeOH (1/9, 2.5 mL) were successively added solid NaHCO₃ (7 mmol) and Br₂ (4 mmol). When all the starting material was consumed, the reaction mixture was quenched with an aqueous solution of 10% Na₂SO₃, filtered and, extracted with DCM (3x 3 mL). The organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, and solvent was removed under reduced pressure. The product was obtained pure as colorless oil (75% yield).

TLC: R_F = 0.71 (EA/PE, 5/5)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1,41 (3H, s, CH₃), 1,50 (3H, s, CH₃), 3,78 (3H, s, CH₃), 4.11 (1H, dd, J = 8,8, J = 5.4, CH_aH_b), 4.24 (1H, dd, J = 8.8, J = 7.2, CH_aH_b), 4.60 (1H, dd, J = 7,2, J = 5.4, CH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 26.0, 26.3, 52.8, 67.7, 74.0, 111.8, 172.1.

Diprotected (*R*)-(2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2-oxoethyl)phosphonate



175-a, R= OEt
175-b, R= OBn

To a stirred solution of diprotected methyl phosphonate **175-a** or **175-b** (1 mmol) in THF (3 mL) under an atmosphere of argon at -78 °C, was added n-BuLi (1.2 mmol). After 20 min, a solution of methyl (*R*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carboxylate (1.2 mmol) in THF (3 mL) was added. The mixture was stirred for 30 min at -78 °C and then allowed to warm up at room temperature. When all the starting material was consumed, the reaction was quenched with a saturated solution of NH₄Cl (2 mL), and the mixture was extracted with EA (2 mL). The combined organic layers were washed with brine (2x 1.5 mL), water (1.5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and solvent was evaporated under reduced pressure. The product is obtained after purification by flash chromatography as colorless oil (38% yield for **175-a** and 70% for **175-b**).¹

Diethyl (*R*)-(2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2-oxoethyl)phosphonate 175-a

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.30 (6H, t, J= 7.2, 2x CH₃), 1.45 (d, J= 17.4, CH₃), 4.01-4.12 (4H, m, 2x CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 10.04 (d, J= 141), 16.07 (d, J= 6.4), 63.75 (d, J= 6.8).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 30.21.

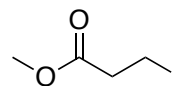
Dibenzyl (*R*)-(2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2-oxoethyl)phosphonate 175-b

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.38 (3H, d, J=17.4, CH₃), 4.97 (2H, dd, J= 12.0, J= 8.4, CH₂), 4.99 (2H, dd, J= 11.7, J= 8.7, CH₂), 7.23-7.27 (10H, m, Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 11.6 (d, J= 144), 67.0 (d, J= 6.8), 127.8, 127.8, 128.3, 128.5, 136.3 (d, J= 2.6).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 31.69.

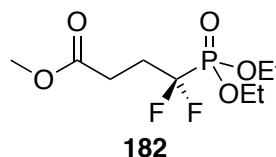
Methyl 3-iodo propionate



186

To a stirred solution of methyl 3-bromo propionate **181** (1 mmol) and anhydrous Na_2SO_4 (5 mmol) in acetone under an atmosphere of argon, was added NaI (5 mmol). The mixture was stirred at least for 5 h, and was filtered and evaporated to dryness. The product was not purified to avoid its degradation and was directly utilized in the next step.

Methyl 4-(diethyl phosphonate) 4,4-difluorobutanoate



A solution of $\text{BrZnCF}_2\text{P}(\text{O})(\text{OEt})_2$ was prepared from diethyl $\text{BrCF}_2\text{P}(\text{O})(\text{OEt})_2$ (1.5 mmol) and Zn dust (1.5 mmol) in DMF (6 mL). The reaction was stirred for 6 h at room temperature under an atmosphere of argon. To the reaction mixture were successively added solid CuBr (1.5 mmol), and a solution of methyl 3-iodo propionate **186** (1 mmol) in DMF (2 mL). The reaction mixture was stirred overnight, carefully filtered without clogging the sintered glass funnel, poured into cold water (5 mL) and extracted with Et_2O (3x 5 mL) (water can be added to dissolve inorganic precipitates). The organic layers were combined, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The product is obtained after purification by flash chromatography as colorless oil (14%).

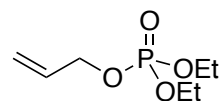
TLC: $R_F = 0.50$ (EA)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.35 (6H, t, $J = 7.0$, $2 \times \text{CH}_3$), 2.29-2.48 (2H, m, 2-H), 2.59-2.67 (2H, m, 3-H), 3.81 (3H, s, CH_3) 4.27-4.31 (4H, dq, $J = 7.2$, $J = 7.2$, $2 \times \text{CH}_2$).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 16.4 (d, $J = 5.7$), 25.8-26.1 (m), 29.2 (dt, $J = 20.5$, $J = 16.8$), 51.8, 64.9 (d, $J = 7.0$), 119.9 (dt, $J = 259.1$, $J = 217.1$), 172.9.

^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3): δ 7.83 (t, $J_{\text{F}} = 107.5$ Hz).

^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3): δ -113.25 (d, $J_{\text{P}} = 107.5$ Hz).

Diethyl-(prop-2-ene)-phosphate**187**

To a stirred solution of prop-2-ene-1-ol **184** (1 mmol) in pyridine (4 mL) at 0°C was added diethyl phosphite chloride (1.2 mmol). The reaction mixture was stirred at the same temperature for 12 h and poured into cold water (2 mL). The solution was then extracted with Et₂O (2x 2 mL). The organic layers were combined and washed with brine (2 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography (EtOAc) and obtained as colorless oil (52% yield).

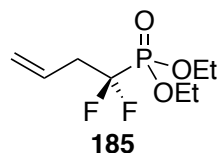
TLC: R_F = 0.59 (EA)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.30 (6H, dt, J = 1.1, J = 7.0, 2xCH₃ ethyl), 4.09 (4H, dq, J = 8.3, J = 7.0, 2xCH₂ ethyl), 4.50 (2H, dddd, J = 8.2, J = 5.7, J = 1.3, J = 1.3, 1-H), 5.21 (1H, ddt, J = 10.4, J = 1.4, J = 1.3, 3-H_{cis}), 5.33 (1H, ddt, J = 17.01, J = 1.4, J = 1.3, 3-H_{trans}), 5.91 (1H, dddd, J = 17.1, J = 10.4, J = 5.7, J = 0.7 Hz, 2-H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 16.0 (d, J = 6.8), 63.7 (d, J = 6.0), 67.8 (d, J = 5.6), 117.9, 132.5 (d, J = 7.0).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 0.31.

**Diethyl 1,1-difluorobut-3-
enylphosphonate**



A solution of $\text{BrZnCF}_2\text{P}(\text{O})(\text{OEt})_2$ was prepared from diethyl $\text{BrCF}_2\text{P}(\text{O})(\text{OEt})_2$ (1.5 mmol) and Zn dust (1.5 mmol) in DMF (6 mL). The reaction was stirred for 6 h at room temperature under an atmosphere of argon. To the reaction mixture were successively added solid CuBr (1.5 mmol), and a solution of diethyl-(prop-2-ene)-phosphate **187** (1 mmol) in DMF (2 mL). The reaction mixture was stirred overnight, carefully filtered without clogging the sintered glass funnel, poured into cold water (5 mL) and extracted with Et_2O (3x 5 mL) (water can be added to dissolve inorganic precipitates). The organic layers were combined, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The product is obtained after purification by flash chromatography (EtOAc/PE , 7:3, to EtOAc) as colorless oil (55% yield).

TLC: $R_F = 0.75$ (EA)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.36 (6H, dt, $J = 7.1, J = 1.5$, 2x CH_3 ethyl), 2.83 (2H, tt, $J = 19.6, J = 6.7$, 2-H), 4.24 (4H, dq, $J = 8.4, J = 7.1$, 2x CH_2 ethyl), 5.22-5.24 (1H, m, 4- H_{cis}), 5.27 (1H, s, 4- H_{trans}), 5.73-5.92 (1H, m, 3-H).

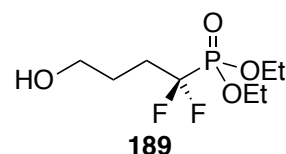
^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 16.4 (d, $J = 5.6$), 38.8 (dt, $J = 15.1, J = 21.5$), 63.8 (d, $J = 4.4$), 64.5 (d, $J = 6.8$), 119.6 (dt, $J = 215.1, J = 260.0$), 121.4, 127.0 (dt, $J = 5.6, J = 11.4$).

^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3): δ 6.90 (t, $J = 107.5$).

^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3): δ 108.05 (d, $J = 107.5$).

MS (ESI⁺): m/z calculated for $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{F}_2\text{O}_3\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 229.07, found 229.08

**Diethyl 1,1-difluorobutan-4-ol
phosphonate**



To a stirred solution of diethyl 1,1-difluorobut-3-enylphosphonate **185** (1 mmol) in THF (10 mL) was added drop wise at 0°C a 1M solution of 9BBN in THF (1.2 mmol). After 10 min, the reaction mixture was allowed to warm up at room temperature for 2 h. Then, water (1 mL), a 3M solution of KOH in water (2.5 mmol) and a solution of 35% H₂O₂ (1.5 mmol) were successively added. The mixture was stirred at room temperature for 12 h, quenched with a saturated aqueous solution of Na₂SO₃ (2 mL) and extracted with EA (3x 5 mL). The organic layers were combined, washed with brine (5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (EA/PE, 9:1, to EA) and obtained as colorless oil (92% yield).

TLC: R_F = 0.56 (EA/PE, 9/1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (1.37 (6H, dt, J = 0.3, J = 7.2, 2xCH₃ ethyl), 1.78-1.87 (2H, m, 2-H), 2.02 (1H, s, 4-OH), 2.06-2.26 (2H, m, 3-H), 3.67 (2H, t, J = 6.2, 4-H), 4.26 (4H, dq, J = 7.6, J = 7.2, 2xCH₂ ethyl).

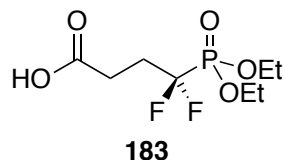
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 16.5 (d, J = 5.7), 24.1 (dt, J = 5.2, J = 4.0), 30.6 (dt, J = 15.1, J = 21.5), 61.8, 64.5 (d, J = 6.9), 120.9 (dt, J = 215.5, J = 259.2).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 8.49 (t, J = 109.5).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃): δ 107.64 (d, J = 109.5).

MS (ESI⁺): m/z calculated for C₈H₁₈F₂O₄P [M+H]⁺ 247.09, found 247.09

**4,4-Difluoro-4-(diethyl phosphonate)
butanoic acid**



To a stirred solution of diethyl 1,1-difluorobutan-4-yl phosphonate **189** (1 mmol) in MeCN (2 mL) were successively added TEMPO (0.2 mmol) and BAIB (2.2 mmol) as solids and water (1.5 mL). The reaction mixture was stirred for 6 h, DCM (2 mL) was added, extracted with an aqueous saturated solution of NaHCO₃ (3x 2 mL). Aqueous layers were combined. After addition 37% HCl solution reach a pH around 2. Then the solution was extracted with DCM (3x 2 mL), and evaporated to dryness. The product was not further purified and obtained as colorless oil (99% yield).

TLC: $R_F = 0.34$ (EA/MeOH, 95/5)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.37 (6H, t, ³J = 7.2 Hz, 2xCH₃ ethyl), 2.32-2.52 (2H, m, 2-H), 2.63-2.68 (2H, m, 3-H), 4.28-4.31 (4H, dq, ³J = 7.2 Hz, ³J_P = 7.2 Hz, 2xCH₂ ethyl), 9.61 (1H, s, CO₂H).

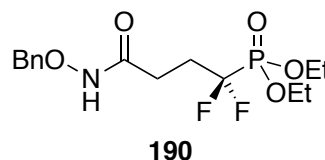
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 16.4 (d, J = 5.7), 25.9-26.2 (m), 29.2 (dt, J = 20.5, J = 16.8), 64.9 (J = 7.1), 119.9 (dt, J = 259.1, J = 217.1), 176.6 (d, J = 6.5).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 7.83 (t, J = 107.5).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃): δ -113.25 (d, J = 107.5).

MS (ESI⁺): m/z calculated for C₈H₁₅F₂O₅PNa [M+Na]⁺ 283.05, found 283.05

Diethyl 4-(*N*-benzyloxy)-amino-1,1-difluoro-4-oxobutyl phosphonate



BnONH₂.HCl (1.5 eq., 1.5 mmol) was dissolved in DCM (2 mL). Et₃N (1.5 mmol) was then added and the mixture was stirred for 30 min. In parallel, a stirred solution of carboxylic acid **183** (1 mmol) in DCM (2 mL) with CDI (1.2 mmol) was prepared. After 1h, the BnONH₂ and Et₃N solution was added to the second one and the mixture was allowed to react overnight under stirring. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of NH₄Cl (2 mL), the resulting mixture was extracted with DCM (3x 2 mL). The organic layers were combined, washed with brine (2 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography (EtOAc/PE, 6:4, to EtOAc) and obtained as colorless oil (92% yield) as a mixture of conformers.

TLC: $R_F = 0.51$ (EA)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.36 (6H, t, $J = 7.1$ Hz, 2xCH₃ ethyl), 2.28-2.51 (4H, m, 2-, 3-H_a), 2.60-2.75 (4H, m, 2-, 3-H_b), 4.23-4.31 (4H, m, 2xCH₂ ethyl), 4.83 (1H, s, CH₂OBnb), 4.88 (1H, s, CH₂OBna), 7.35-7.39 (5H, m, Ar), 8.19 (1H, s, NH_b), 8.79 (1H, s, NH_a).

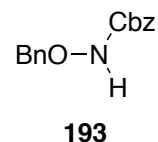
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 16.5 (2C, d, $J = 5.2$), 23.7-23.8, 24.9-25.3, 28.3-28.8, 29.8-29.9, 64.7, 78.3, 120.3 (dt, $J = 260.0$, $J = 216.6$), 128.8, 128.9, 129.3, 135.4, 169.0.

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 6.36 (t, $J = 107.0$), 6.47 (t, $J = 106.9$), 6.51 (t, $J = 106.9$).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃): δ (d, $J = 106.9$), -112.48 (d, $J = 106.9$), -111.14 (d, $J = 107.0$).

MS (ESI⁺): *m/z* calculated for C₁₅H₂₃F₂NO₅P [M+H]⁺ 366.12, found 366.13

***N*-Carbobenzoxy-*O*-
benzylhydroxylamine**



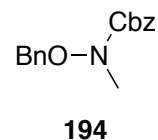
To a stirred solution of *O*-benzyhydroxylamine **192** (1 mmol) in H₂O (5 mL) was slowly added K₂CO₃ (3.5 mmol). After 15 min, a solution of benzyl chloroformate (2.5 mmol) in EA (5mL) was added, and the reaction was warmed at 80°C during 18 h. Then the reaction was quenched with a 3 M HCl solution (2 mL) and extracted with EA (2x 5 mL). The organic layers were combined, washed with a 10% HCl solution (4 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The product was recrystallized from EA/hexane to give (91% yield).²

TLC: $R_F = 0.67$ (EA/PE, 3/7)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.88 (2H, s, ph-CH₂-O-NH), 5.18 (2H, s, Ph-CH₂-CO₂), 7.31-7.38 (10H, m, 2x Ph).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 67.6, 78.8, 128.2, 128.6, 129.2, 131.7, 132.1, 135.4, 135.6, 157.3.

***N*-Carbobenzoxy-*N*-methyl-*O*-
benzylhydroxylamine**



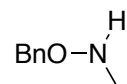
To a stirred solution of *N*-carbobenzoxy-*O*-benzylhydroxylamine **193** (1 mmol) in anhydrous acetone (2 mL) was added anhydrous K₂CO₃ (3 eq., 3 mmol). The reaction was stirred under reflux for 30 min. Then, MeI (6 mmol) was added at room temperature and the solution was stirred again under reflux for another 4 h. When all the starting material was consumed, the solution was filtered and evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography (EA/PE, 2/8), and obtained as colorless oil (89% yield).²

TLC: R_F = 0.65 (EA/PE, 2/8)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.102 (3H, s, CH₃), 4.86 (2H, s, ph-CH₂), 5.21 (2H, s, Ph-CH₂-CO₂), 7.32-7.40 (10H, m, 2x Ph).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 37.1, 67.8, 76.8, 128.1, 128.3, 128.5, 128.6, 128.7, 129.5, 135.5, 135.4, 136.2, 157.6.

***N*-carbobenzoxy-*N*-methyl-*O*-
benzylhydroxylamine**

**195**

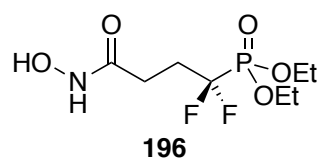
The *N*-carbobenzoxy-*N*-methyl-*O*-benzylhydroxylamine **194** (1 mmol) and 33% HBr in AcOH (2 mL) were stirred at room temperature for 4 h. The aqueous mixture was washed with Et₂O (2x 1 mL), and a solution of 5% NaHCO₃ (2 mL) was added. Then it was extracted with EA (3x 2 mL), the combined organic layers extracts were washed with brine (2 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography. The product was obtained as colorless oil (84% yield).²

TLC: $R_F = 0.78$ (EA/PE, 2/8)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.73 (3H, s, CH₃), 4.71 (2H, s, CH₂), 5.94 (1H, s, NH), 7.29-7.38 (5H, m, Ar).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 39.4, 75.7, 127.9, 128.4, 128.5, 138.0.

Diethyl 4-(*N*-hydroxyl)-amino-1,1-difluoro-4-oxobutyl phosphonate



To a stirred solution of diethyl 4-(*N*-benzyloxy)-amino-1,1-difluoro-4-oxobutyl phosphonate **190** (1 mmol) in EA (1 mL) was added 10% wt Pd on activated carbon (0.1 mmol). The reaction flask was then connected to a balloon of H₂ at atmospheric pressure. Every 20 min, a slight vacuum was applied to the reaction flask, which was then backfilled with H₂. When all starting material was consumed, the reaction was filtered over a celite pad and evaporated to dryness under reduced pressure. The product was obtained pure as colorless oil in a quantitative yield as a mixture of conformers.

TLC: $R_F = 0.23$ (EA)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 11.37 (3H, t, $J = 7.2$, 2xCH₃*a* ethyl), 1.38 (3H, t, $J = 6.8$, 2xCH₃*b* ethyl), 2.35-2.80 (4H, m, 2-, 3-H), 4.22-4.32 (4H, m, 2xCH₂ ethyl), 5.65 (1H, s, OH*a*), 5.78 (1/2H, s, OH*b*), 7.87 (1/2H, s, NH).

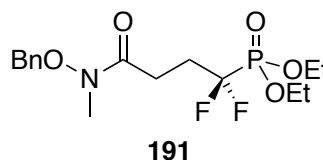
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 15.9 (d, $J = 4.7$), 24.2, 24.2, 29.2, 29.2, 64.5 (d, $J = 6.9$), 168.7, 169.0.

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 6.43 (t, $J = 106.9$), 6.51 (t, $J = 108.4$), 7.07 (t, $J = 106.9$).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃): δ -112.83 (d, $J = 108.6$), -111.68 (d, $J = 106.9$), -111.64 (d, $J = 106.9$).

MS (ESI⁺): m/z calculated for C₈H₁₅F₂NO₅PNa [M+H]⁺ 283.05, found 283.05

**Diethyl 4-(*N,N*-benzyloxy-methyl)-
amino-1,1-difluoro-4-oxobutyl
phosphonate**



To a stirred solution of diethyl 4-(*N*-benzyloxy)-amino-1,1-difluoro-4-oxobutyl phosphonate **190** (1 mmol) in anhydrous acetone (2 mL) was added anhydrous K_2CO_3 (3 mmol). The reaction was stirred under reflux for 30 min. Then, MeI (6 mmol) was added at room temperature and the solution was stirred again under reflux for another 4 h. The solution was filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The product was obtained without other purification as colorless oil (94% yield).

TLC: $R_F = 0.35$ (EA/PE, 7/3)

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.36 (6H, t, $J = 7.2$ Hz, 2x CH_3 ethyl), 2.32-2.44 (2H, m, 3-H), 2.67-2.70 (2H, m, 2-H), 3.20 (3H, s, 5-H), 4.23-4.31 (4H, m, 2x CH_2 ethyl), 4.84 (2H, s, CH_2OBn), 7.36-7.40 (5H, m, Ar).

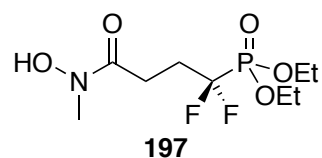
^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 16.4 (d, $J = 5.5$), 24.0, 28.9 (dt, $J = 20.6$, $J = 16.0$), 33.7, 64.5 ($J = 7.0$), 76.3, 120.4 (dt, $J = 260.1$, $J = 216.5$), 128.8, 129.1, 129.4, 134.2, 173.1.

^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$): δ 7.02 (t, $J = 108.1$).

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$): δ -113.35 (d, $J = 108.1$).

MS (ESI⁺): m/z calculated for $C_{16}H_{24}F_2NO_5PNa$ $[M+Na]^+$ 402.13, found 402.13

**Diethyl 4-(*N,N*-hydroxyl-methyl)-
amino-1,1-difluoro-4-oxobutyl
phosphonate**



To a stirred solution of diethyl 4-(*N,N*-benzyloxy-methyl)-amino-1,1-difluoro-4-oxobutyl phosphonate **191** (1 mmol) in EA (1 mL) was added 10% wt Pd on activated carbon (0.1 mmol). The reaction flask was then connected to a balloon of H₂ (1 atm). Every 20 min, a slight vacuum was applied to the reaction flask, which was then backfilled with H₂. When all starting material was consumed, the reaction was filtered over a celite pad and evaporated to dryness under reduced pressure. The product was obtained pure as colorless oil in a quantitative yield.

TLC: R_F = 0.1 (EA/PE, 7/3)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.37 (6H, t, J = 7.1 Hz, 2xCH₃ ethyl), 2.29-2.51 (2H, m, 2-H), 2.58-2.78 (2H, m, 3-H), 3.23 (3H, s, 5-H_a), 3.35 (3H, s, 5-H_b), 4.22-4.29 (4H, m, 2xCH₂ ethyl).

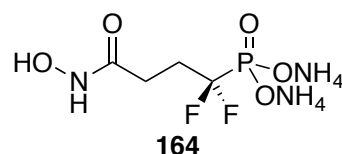
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 16.4 (d, J = 4.7), 23.0, 24.1, 29.3-29.8, 36.2, 64.8 (d, J = 5.2), 65.1 (d, J = 6.6), 120.1 (dt, J = 261.0, J = 220.3), 120.5 (dt, J = 261.0, J = 220.3), 165.4, 172.2.

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 6.37 (t, J = 107.8), 6.42 (t, J = 109.7).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃): δ -112.4 (d, J = 108.2), -110.77 (d, J = 109.6).

MS (ESI⁺): m/z calculated for C₉H₁₉F₂NO₅P [M+H]⁺ 290.10, found 290.10

Diammonium 4-(*N*-hydroxyl)-amino-1,1-difluoro-4-oxobutyl phosphonate



To a stirred solution of hydroxylamine diethyl 4-(*N*-hydroxyl)-amino-1,1-difluoro-4-oxobutyl phosphonate **196** (1 mmol) in DCM (1 mL) at 0 °C was dropwise added TMSBr (5 mmol) and the ice bath was removed. If after 3 days the reaction is not finished, TMSBr (2 mmol) can be added. The reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum of an aqueous NH₃ 5%. Then the reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure. Benzene or toluene can be added to form an azeotropic effect. Water (0.5 mL) was added and the solution was filtered. The aqueous layer was washed with DCM (0.5 mL) and the water was removed under vacuum. Benzene or toluene can be added to form an azeotropic effect. The product was obtained without further purification as colorless oil in a quantitative yield as a mixture of conformers.

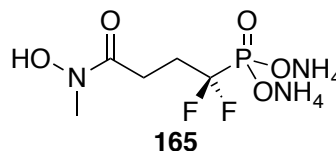
¹H NMR (500 MHz, D₂O): 2.10-2.25 (2H, m, 2-H), 2.29-2.41 (2H, m, 3-H).

¹³C NMR (125 MHz, D₂O): δ 24.8 (d, J=3.9), 27.2 (d, J=4.6), 28.9 (d, J=3.9 Hz), 29.5-30.6 (m), 123.1 (dt, J= 188.0, J= 259.2), 123.2 (dt, J= 158.4, J= 257.8 Hz), 123.2 (dt, J= 216.6, J= 257.6), 172.3, 178.8, 181.9.

³¹P NMR (121 MHz, D₂O): δ 4.94 (t, J= 87.7), 5.02 (t, J= 86.9), 5.34 (t, J= 89.7).

¹⁹F NMR (282 MHz, D₂O): δ -113.23 (d, J= 89.7), -112.85 (d, J= 87.0), -112.75 (d, J= 87.7).

**Diammonium 4-(*N*-hydroxyl-
methyl)-amino-1,1-difluoro-4-
oxobutyl phosphonate**



To a stirred solution of hydroxylamine diethyl 4-(*N*-hydroxyl-methyl)-amino-1,1-difluoro-4-oxobutyl phosphonate **165** (1 mmol) in DCM (1 mL) at 0 °C was dropwise added TMSBr (5 mmol) and the ice bath was removed. If after 3 days the reaction is not finished, TMSBr (2 mmol) can be added. The reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimum of an aqueous NH₃ 5%. Then the reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure. Benzene or toluene can be added to form an azeotropic effect. Water (0.5 mL) was added and the solution was filtered. The aqueous layer was washed with DCM (0.5 mL) and the water was removed under vacuum. Benzene or toluene can be added to form an azeotropic effect. The product was obtained without further purification as colorless oil in a quantitative yield as a mixture of conformers.

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 2.14-2.65 (4H, m, 2-, 3-H), 3.11 (3H, s, 5-H_a), 3.29 (3H, s, 5-H_b).

¹³C NMR (125 MHz, D₂O): δ 24.0 (d, J=4.0), 27.3 (d, J=4.4), 28.9 (d, J=4.3), 28.9-30.7 (m), 35.9, 38.7, 38.8, 120.4-128.6 (m), 174.8, 178.9, 182.2.

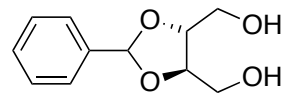
³¹P NMR (121 MHz, D₂O): δ 5.02 (t, J= 87.7), 5.32 (t, J= 89.2).

¹⁹F NMR (282 MHz, D₂O): δ -113.37 (d, J= 89.2), -113.14 (d, J= 81.9), -112.93 (d, J= 87.0), -112.82 (d, J= 85.9), -112.46 (d, J= 87.2).

MS (ESI): *m/z* calculated for C₅H₉F₂NO₅P [M-H]⁻: 232.01, found 232.01

Synthesis of an epoxide analog of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate

(2*R*, 3*S*)-*O*-Benzylidene-*D*-threitol



207

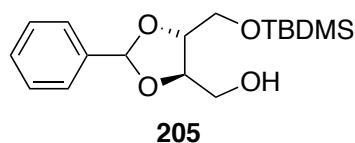
To a stirred solution of 2-3-*O*-benzylidene-*D*-tartrate **204** (1 mmol) in THF (3 mL), at 0 °C under an atmosphere of argon, was slowly added LiAlH₄ (1 mmol). When all the starting material was consumed, the reaction mixture was diluted with Et₂O (1 mL) and a saturated aqueous solution potassium sodium tartrate (1 mL) was slowly added. The resulting mixture was extracted with Et₂O (5x2 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduce pressure. The product was obtained without other purification as a colorless oil (99% yield).³

TLC: $R_F = 0.42$ (EA)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.39 (2H, s, 2xOH), 3.74-3.88 (4H, m, 2xCH₂), 4.10-4.16 (2H, m, 3-, 4H), 5.96 (1H, s, CH-Ph), 7.36-7.49 (5H, m, H Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 62.3, 62.4, 78.5, 79.5, 104.0, 126.6, 128.6, 129.7, 137.3.

**(2*R*, 3*S*)-*O*-benzylidene-4-*O*-*t*-
butyldimethylsilyl-*D*-threitol**

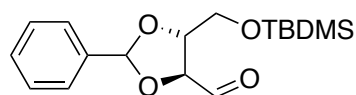


To a stirred solution of 2-3-*O*-benzylidene-*D*-threitol **207** (1 mmol) in THF (2 mL) at 0°C under an atmosphere of argon was slowly added NaH (1,1 mmol). After 15 min after followed the addition of the *t*-butyldimethylsilyl chloride (1 mmol). The reaction was stirred for 20 min and allowed to warm up at room temperature and stirred for another 4h. When all the starting material was consumed, the reaction was quenched with an aqueous saturated solution of NH₄Cl (1 mL) and the resulting mixture extracted with Et₂O (2x 1.5 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduce pressure. The crude was purified by flash chromatography (EA/PE, 2/8), yielding the product obtained as a colorless oil (78% yield).

TLC: R_F = 0.53 (EA/PE, 2/8).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.11 (1/2 of 3H, s, 2xCH₃), 0.11 (1/2 of 3H, s, 2xCH₃*), 0.93 (9H, s, 3xCH₃), 2.29 (1H, dd, J = 7.2, J = 5.5, OH), 3.72-3.91 (4H, m, 1- et 4-H), 4.06-4.27 (2H, m, 2- and 3-H), 5.96 (1H, s, CH-Ph), 7.37-7.49 (5H, m, H Ar).

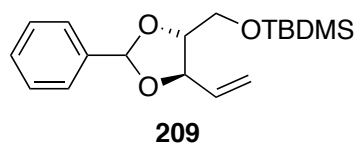
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 5.3, 18.3, 25.9, 62.9, 63.5, 78.1, 80.6, 104.2, 126.6, 128.5, 129.6, 137.5.

(2*R*,3*S*)-*O*-Benzylidene-4-*O*-*t*-butyldimethylsilyl-*D*-butanal**208**

To a stirred solution of oxalyl chloride (3 mmol) in DCM (3 mL), under an atmosphere of argon at -78 °C, was added dropwise over 5 min a solution of DMSO (3.5 mmol) in DCM (3 mL). Then the mixture was allowed to react for 30 min at -40 °C (a milky turbid appearance was observed). A solution of (2*R*,3*S*)-*O*-benzylidene-4-*O*-*t*-butyldimethylsilyl-*D*-threitol **205** (1 mmol) in DCM (2 mL) was added at -78°C and the mixture was stirred during 1h at -40 °C. The reaction was stirred for another 1h at -78°C and anhydrous NEt₃ (5 mmol) was added dropwise. After 20 min, the mixture was allowed to warm up at room temperature. When all the starting material was consumed, the reaction was quenched with water (2 mL) and the resulting mixture extracted with DCM (2x 5 mL). The combined organic layers were washed with a 10% aqueous solution of HCl (5 mL), then with an aqueous saturated solution of NaHCO₃ (5 mL) and finally with brine (5 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduce pressure.

TLC: $R_F = 0.74$ (EA/PE, 1/1).

**(2*R*, 3*S*)-*O*-benzylidene-1-*O*-*t*-
butyldimethylsilyl-but-4-ene**



First way: 2 steps, SWERN then WITTIG

The *n*-BuLi (2.5 mmol) was slowly added to a stirred solution of methyltriphenylphosphonium bromide (2.5 mmol) in THF (15 mL) at -78° C under an atmosphere of Argon. After 15 min, the mixture was allowed to warm up to room temperature for 1 h. When bubbling was no more observed, a solution of the crude aldehyde **208** (1 mmol) in THF (5 mL) was added at -78 °C. The reaction was stirred for 20 min and allowed to warm up to room temperature. When all the starting material was consumed, the solution was poured into Et₂O (20 mL), stirred for 10 min (a white suspension was formed) and it was filtered over celite. The organic solution was successively washed with a 10% aqueous solution of HCl (5 mL), an aqueous saturated solution of NaHCO₃ (5 mL) and finally with brine (5 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduce pressure. The product was purified by flash chromatography (PE to PE/EA, 9/1). The product was obtained as a colorless oil (64% yield).

Second way: one pot, SWERN & WITTIG

To a stirred solution of oxalyl chloride (3 mmol) in THF (3 mL), under an atmosphere of argon at -78 °C, was added dropwise over 5 min a solution of DMSO (3.5 mmol) in THF (3 mL). The mixture was allowed to react for 30 min at -40 °C (a milky turbid reaction mixture appearance was observed). A solution of (2*R*,3*S*)-*O*-benzylidene-4-*O*-*t*-butyldimethylsilyl-*D*-threitol **205** (1 mmol) in THF (2 mL) was added at -78°C and the mixture was stirred during 1h at -40 °C. The reaction was stirred again at -78°C and anhydrous NEt₃ (5 mmol) was added dropwise. After 20 min, the mixture was allowed to warm up to room temperature.

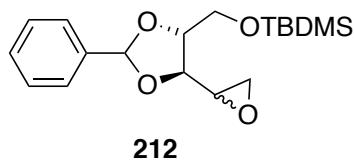
When all the starting material was consumed, the n-BuLi (2.5 mmol) was slowly added to a stirred solution of methyl triphenylphosphonium bromide (2.5 mmol) in THF (15 mL) at -78° C under an atmosphere of Argon. After 15 min, the mixture was allowed to warm up to room temperature for 1 h. When bubbling was no more observed, the solution of the aldehyde **208** (1 mmol) in THF (1.5 mL) was added at -78 °C. The reaction was stirred for 20 min and allowed to warm up to room temperature. When all the starting material was consumed, the solution was poured into Et₂O (20 mL), stirred for 10 min (a white suspension was formed) and filtered over celite. The organic solution was successively washed with a 10% aqueous solution of HCl (5 mL), an aqueous saturated solution of NaHCO₃ (5 mL) and finally with brine (5 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduce pressure. The product was purified by flash chromatography (PE to PE/EA, 9/1) and obtained as a colorless oil with a yield of (43%) as a mixture of diastereoisomers.

TLC: R_F = 0.63 (EA/PE, 1/9).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.08(1/2 of 3H, s, 2xCH₃), 0.10 (1/4 of 3H, s, 2xCH₃a), 0.11 (1/4 of 3H, s, 2xCH₃**), 0.90 (1/2 of 9H, s, 3xCH₃), 0.94 (1/2 of 9H, s, 3xCH₃*), 3.71-4.00 (3H, m, 1- and 2-H), 4.50 (1/2 of H, dddd, J = 6.6, 6.4, 1.3, 1.2, 3-H), 4.58 (1/2H, dddd, J = 7.1, 7.0, 1.2, 1.1, 3-H*), 5.21 (1H, ddd, J = 10.4, 1.3, 1.2, 5-H_{cis}), 5.41 (1/2 of H, ddd, J = 17.1, 1.3, 1.3, 5-H), 5.44 (1/2 of H, ddd, J = 17.1, 1.3, 1.3, 5-H*), 5.97 (1/2 H, ddd, J = 17.1, 10.6, 6.4, 4-H_{trans}), 5.97 (1/2 of H, s, CH-Ph), 5.98 (1/2 H, ddd, J = 17.1, 10.6, 6.4, 4-H_{trans}*), 5.98 (1/2 of H, s, CH-Ph*), 7.36-7.54 (5H, m, H Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ -5.39, -5.36, -5.31, 18.3, 25.8, 25.8, 62.5, 62.8, 79.5, 80.4, 81.3, 82.4, 103.5, 104.1, 117.4, 118.1, 126.6, 128.2, 129.2, 135.2, 135.5, 137.7, 137.8.

***t*-Butyldimethyl (((4*R*,5*R*)-5-(oxiran-2-yl)-2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy) silyl ether**



To a solution of (2*R*, 3*S*)-*O*-benzylidene-1-*O*-*t*-butyldimethylsilyl-but-4-ene **209** (1 mmol) in DCM (5 mL) under an atmosphere of Ar at 0°C was slowly added *m*-CPBA (5.5 eq., 5.5 mmol). The solution was stirred for 5 days, washed with a saturated solution of NaHCO₃ (2x 2 mL) and extracted with DCM (2x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (2x 2 mL), water (2 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography (EA/PE 9.5/0.5). The product was obtained as a colorless oil (48% yield) as a mixture of diastereoisomers.

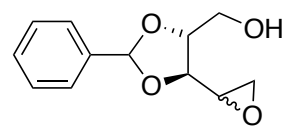
TLC: R_F = 0.55, 0.61 (EA/PE, 5/95).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.07(1/5 of 3H, s, 2xCH₃), 0.08 (1/5 of 3H, s, 2xCH₃*), 0.08 (1/5 of 3H, s, 2xCH₃**), 0.09 (1/5 of 3H, s, 2xCH₃***), 0.10 (1/5 of 3H, s, 2xCH₃****), 0.90 (1/4 of 9H, s, 3xCH₃), 0.90 (1/4 of 9H, s, 3xCH₃*), 0.91 (1/4 of 9H, s, 3xCH₃**), 0.92 (1/4 of 9H, s, 3xCH₃***), 2.71-2.77 (1/2 of 2H, m, -HC(O)CH₂), 2.87-2.91 (1/2 of 2H, m, -HC(O)CH₂), 3.16-3.29 (1H, m, -HC(O)CH₂), 3.73-4.29 (4H, m, 1-, 2- and 3-H), 5.89 (1/4 of H, s, CH-Ph), 5.94 (1/4 of H, s, CH-Ph*), 5.95 (1/4 of H, s, CH-Ph**), 5.97 (1/4 of H, s, CH-Ph***), 7.34-7.51 (5H, m, H Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ -5.2, -5.3, -5.3, 21.1, 25.9, 26.0, 44.1, 44.2, 44.6, 45.5, 51.8, 52.0, 52.1, 52.4, 63.3, 63.5, 63.6, 63.7, 77.3, 78.1, 78.3, 78.6, 78.8, 79.4, 79.5, 80.1, 104.2, 104.6, 104.7, 104.8, 126.7, 126.8, 128.4, 128.4, 128.5, 129.5, 129.6, 137.2, 137.3, 137.4, 137.8.

MS (ESI)⁺ m/z: 335.17 [M-H⁺].

**((4*R*,5*R*)-5-(oxiran-2-yl)-2-phenyl-
1,3-dioxolan-4-yl) methanol**

**213**

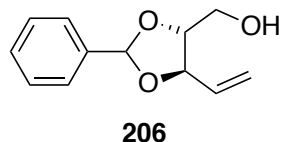
To a stirred solution of **212** (1 eq., 1 mmol) in THF (5 mL) was added TBAF (1.5 eq., 1.5 mL) at room temperature. When the entire starting material was consumed, the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography (EtOAc) and the product was obtained as a colorless oil (76% yield) as a mixture of diastereoisomers.

TLC: $R_F = 0.63$ (EA)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 2.70-2.94 (2H, m, $-\text{HC}(\text{O})\text{CH}_2$), 3.14-3.24 (1H, m, $-\text{HC}(\text{O})\text{CH}_2$), 3.74-4.35 (5H, m, 1-, 2-, 3-H and -OH), 5.93 (1/4 of H, s, CH-Ph), 5.98 (1/4 of H, s, CH-Ph*), 6.00 (1/4 of H, s, CH-Ph**), 6.01 (1/4 of H, s, CH-Ph***), 7.37-7.54 (5H, m, H Ar).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 43.9, 44.4, 45.0, 45.5, 51.4, 51.5, 51.6, 51.9, 62.2, 62.6, 76.3, 76.4, 77.3, 77.7, 78.4, 79.0, 79.8, 79.8, 104.2, 104.4, 104.9, 104.9, 126.6, 126.6, 126.7, 128.5, 128.6, 128.6, 128.6, 129.6, 129.7, 129.8, 136.9, 137.0, 137.3, 137.4.

(((4*R*,5*R*)-2-Phenyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl) methanol



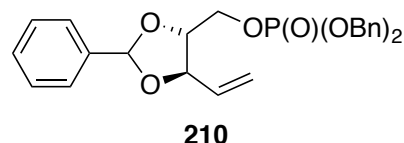
To a stirred solution of (2*R*, 3*S*)-*O*-benzylidene-1-*O*-*t*-butyldimethylsilyl-but-4-ene **209** (1 eq., 1 mmol) in THF (5 mL) was added the TBAF (1.5 eq., 1.5 mL) at room temperature. When the entire starting material was consumed, the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography (EA/PE, 1/1) and the product was obtained as a colorless oil in a quantitative yield as a mixture of diastereoisomers.

TLC: $R_F = 0.70$ (EA/PE, 5/5)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.67-4.02 (4H, m, 1-H₂, 2-H and 3-H), 4.49 (1/2 of 1H, ddd, $J = 7.6, 7.0, 2.8$, -OH), 4.50 (1/2 of 1H, ddd, $J = 7.7, 6.9, 2.7$, -OH*), 5.31 (1/2 of 1H, ddd, $J = 10.2, 1.1, 0.8$, H_{cis}), 5.32 (1/2 of 1H, ddd, $J = 10.2, 1.0, 0.9$, H_{cis}*), 5.42 (1/2 of 1H, ddd, $J = 17.1, 1.0, 1.0$, H), 5.46 (1/2 of 1H, ddd, $J = 17.2, 1.1, 1.0$, H*), 5.94 (1/2 of 1H, ddd, $J = 17.2, 10.2, 6.5$, 5-H_{trans}), 5.95 (1/2 of 1H, ddd, $J = 17.1, 10.0, 7.1$, 5-H_{trans}*), 5.99 (1/2 of 1H, s, CH-Ph), 6.01 (1/2 of 1H, s, CH-Ph*), 7.36-7.53 (5H, m, H Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 61.3, 61.5, 78.7, 80.1, 81.4, 82.6, 103.8, 104.1, 118.6, 119.6, 126.6, 126.6, 128.4, 128.5, 129.5, 129.6, 134.3, 135.0, 137.7, 139.5.

Dibenzyl (((4*R*,5*R*)-2-phenyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl) methyl) phosphate



To a stirred solution of (((4*R*,5*R*)-2-phenyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol **206** (1 mmol) in DCM (2 mL) at room temperature under an atmosphere of argon, *N,N*-diisopropylamine phosphoramidite and a 0.45M solution of tetrazole in CH₃CN (2.5 mmol) were successively added. When all starting material was consumed, the reaction was cooled down at 0°C and *m*-CPBA or 35% H₂O₂ (2.5 mmol) was slowly added in portion over 30 min. The reaction was stirred during 1h at the same temperature and allowed to warm up to room temperature and stirred for another 6h. Then it was quenched with a saturated solution of NH₄Cl (1mL). The reaction was extracted with DCM (3x1.5 mL) and organic layer was washed with brine (2x1 mL) and water (1 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduce pressure. The crude was purified by flash chromatography. The product was obtained pure as colourless oil (yield of 68% after oxidation with *m*-CPBA and 65% after oxidation using H₂O₂) as a mixture of diastereoisomers.

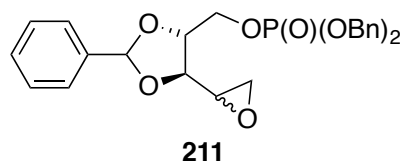
TLC: $R_F = 0.57$ (EA/PE, 5/5)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.96-4.42 (4H, m, 1-H₂, 2-H, 3-H), 5.00-5.10 (4H, m, 2xCH₂OBn), 5.27 (1H, ddd, *J* = 10.5, 3.4, 1.1, 5-H_{cis}), 5.28 (1H, ddd, *J* = 10.4, 3.2, 1.0, 5-H_{cis}*), 5.39 (1H, ddd, *J* = 17.1, 7.3, 1.1, 5-H_{trans}), 5.39 (1H, ddd, *J* = 17.1, 7.3, 1.0, 5-H_{trans}*), 5.88 (1H, dddd, *J* = 17.1, 10.5, 6.4, 1.4, 4-H), 5.88 (1H, dddd, *J* = 17.1, 10.4, 6.4, 1.4, 4-H*), 5.90 (1/2 of 1H, s, CH-Ph), 5.99 (1/2 of 1H, s, CH-Ph*), 7.32-7.49 (5H, m, H Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 66.1 (d, *J* = 5.6), 66.3 (d, *J* = 5.6), 69.5 (d, *J* = 4.2), 79.0, 79.3 (d, *J* = 7.6), 80.1 (d, *J* = 3.9), 80.2 (d, *J* = 3.9), 102.9, 103.2, 118.7, 119.7, 125.7 (d, *J* = 5.4), 128.1, 128.1, 128.4, 128.7 (d, *J* = 3.8), 129.5, 134.1, 134.6, 135.7.

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ -1.06, -0.83.

Dibenzyl (((4*R*,5*R*)-5-(oxiran-2-yl)-2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl) methyl) phosphate



To a stirred solution of dibenzyl (((4*R*,5*R*)-2-phenyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl) phosphate **210** (1 mmol) in DCM (5 mL) under an atmosphere of argon at 0°C was slowly added *m*-CPBA (5.5 mmol). The solution was stirred for 5 days, washed with a saturated solution of NaHCO₃ (2x 2 mL) and extracted with DCM (5 mL). The combined organic were washed with brine (2x 2 mL), water (2 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and the solution was filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography (EA/PE 2/8 to 6/4) and obtained as a colorless oil (14% yield) as a mixture of diastereoisomers.

TLC: R_F = 0.53 (EA/PE, 5/5)

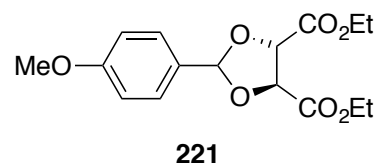
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.59-2.71 (1H, m, 5-Ha), 2.74-2.86 (1H, m, 5-Hb), 3.06-3.19 (1H, m, 4-H), 3.77-4.33 (4H, m, 1-H₂, 2-H, 3-H), 5.76 (1/10 of 1H, s, CH-Ph), 5.86 (4/10 of 1H, s, CH-Ph*), 5.90 (4/10 of 1H, s, CH-Ph**), 5.97 (1/10 of 1H, s, CH-Ph***), 5.02-5.14 (4H, m, 2xCH₂OBn), 7.32-7.54 (5H, m, H Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 47.8, 48.3, 48.9, 49.4, 55.6, 55.9, 56.3, 56.5, 65.8 (d, J= 5.1), 65.8 (d, J= 5.2), 65.8 (d, J= 4.9), 65.9 (d, J= 5.2), 65.9 (d, J= 5.3), 66.0 (d, J= 5.1), 66.0 (d, J= 5.0), 66.0 (d, J= 5.2), 104.7, 104.9, 105.3, 105.5, 126.1 (d, J= 5.2), 126.2 (d, J= 5.2), 128.6, 128.7 (d, J= 3.4), 128.7 (d, J= 3.2), 128.8, 128.8, 128.9, 129.1, 129.2, 135.0, 135.0, 135.4, 135.4.

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ -0.18, -0.05, -0.00, 0.14.

MS (ESI⁺): m/z calculated for C₉H₁₉F₂NO₅PNa [M+Na]⁺ 505.14, found 505.14

**Diethyl (4*S*,5*S*)-2-(4-methoxyphenyl)-
1,3-dioxolane-4,5-dicarboxylate**



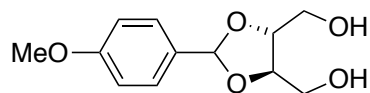
The reaction requires a Dean-Starck glass apparatus water removal. To a stirred solution of commercial L-diethyl tartrate **220** (1 mmol) in DMF (3 mL), was added dimethoxyacetal of *p*-anisaldehyde (1.5 mmol), a catalytic amount of *p*-toluenesulfonic acid (0.2 mmol) and dried Na₂SO₄ (2 mmol). The reaction was kept under 20 mBar pressure, and a temperature of 50 °C. After 6 h, the reaction was cooled down to room temperature and quenched with an aqueous saturated solution of NaHCO₃ (3 mL). It was extracted with Et₂O (3x 2 mL), washed with brine (3x 2 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and the organic phase was filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography (EA/PE, 1/9 to 2/8). The product was obtained as a colorless oil (90% yield) as a mixture of diastereoisomers.

TLC: $R_F = 0.17$ (EA/PE, 1/9)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.31 (3H, t, *J* = 7.2, CH₃), 1.32 (3H, t, *J* = 7.2, CH₃*), 3.80 (3H, s, -OCH₃), 4.28 (2H, q, *J* = 7.2, 2xCH₂), 4.28 (2H, q, *J* = 7.2, CH₂*), 4.80 (1H, d, *J* = 4.1, CH), 4.91 (1H, d, *J* = 4.1, CH), 6.10 (1H, s, CH), 6.88-6.93 and 7.48-7.53 (4H, m, Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 14.2, 14.3, 55.4, 62.1, 77.3, 77.6, 106.8, 113.8, 127.6, 128.9, 161.0, 169.3, 69.8.

((4*R*,5*R*)-2-(4-Methoxyphenyl)-1,3-dioxolane-4,5-diyl) dimethanol



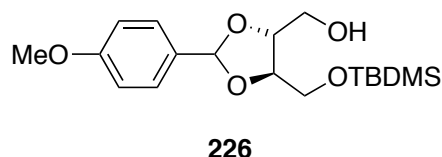
225

To a stirred solution of diethyl (4*S*,5*S*)-2-(4-methoxyphenyl)-1,3-dioxolane-4,5-dicarboxylate **221** (1 mmol) in THF (3 mL), at 0 °C under an atmosphere of argon, was slowly added LiAlH₄ (1 mmol). When all the starting material was consumed, the reaction mixture was diluted with Et₂O (1 mL) and a saturated aqueous potassium sodium tartrate solution (1 mL) was slowly added. Then, it was extracted with Et₂O (5x2 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduce pressure. The product was obtained without further purification as a colorless oil (99% yield) as a mixture of diastereoisomers.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.67-4.23 (8H, m, 2x CH, 2x OH, 2x CH₂), 3.80 (1/2 of 3H, s, CH₃), 3.81 (1/2 of 3H, s, CH₃*), 5.56 (1/2 of 1H, s, CH), 5.57 (1/2 of 1H, s, CH*), 6.88-7.02 and 7.42-7.52 (4H, m, Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 55.4, 55.7, 62.5, 62.4, 78.3, 79.2, 104.0, 104.4, 113.7, 11.8, 113.9, 128.2, 130.0, 130.1, 160.3, 160.2.

**[(4*R*,5*R*)-5-(((*t*-
Butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-2-(4-
methoxyphenyl)-1,3-dioxolan-4-yl]
methanol**



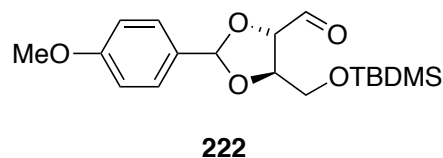
To a stirred solution of [(4*R*,5*R*)-2-(4-methoxyphenyl)-1,3-dioxolane-4,5-diyl] dimethanol **225** (1 mmol) in THF (2 mL) at 0 °C under an atmosphere of argon was slowly added NaH (1.1 mmol). After 15 min, *t*-butyldimethylsilyl chloride (1 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 20 min and allowed to warm up to room temperature and stirred for additional 4h. When all the starting material was consumed, the reaction was quenched with an aqueous saturated solution of NH₄Cl (1 mL) and the mixture extracted with Et₂O (2x 1,5 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduce pressure. The crude was purified by flash chromatography (EA/PE, 2/8), yielding the pure silyl ether **226** obtained as a colorless oil (64% yield) as a mixture of diastereoisomers.

TLC: R_F = 0.51 (EA/PE, 2/8).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.07-0.1 (6H, m, 2xCH₃), 0.90 (1/3 of 3H, s, CH₃), 0.90 (1/3 of 3H, s, CH₃*), 0.91 (1/3 of 3H, s, CH₃**), 3.70-4.23 (7H, m, 2xCH, OH, 2xCH₂), 3.80 (1/2 of 3H, s, CH₃), 3.81 (1/2 of 3H, s, CH₃*), 5.54 (1/2 of 1H, s, CH), 5.91 (1/4 of 1H, s, CH*), 5.92 (1/4 of 1H, s, CH**), 6.88-6.91 and 7.39-7.43 (4H, m, Ar).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ -5.3, -5.3, -5.2, 18.3, 18.4, 18.4, 25.9, 55.4, 55.7, 63.0, 63.0, 63.5, 63.6, 78.0, 79.8, 80.3, 80.5, 101.5, 103.7, 104.1, 113.7, 113.8, 113.9, 114.4, 127.4, 128.1, 128.1, 130.4, 160.1, 160.6.

**(4*S*,5*R*)-5-(((*tert*-
butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-2-(4-
methoxyphenyl)-1,3-dioxolane-4-
carbaldehyde**



To a stirred solution of **226** (1 mmol) in DCM (8 mL) under an atmosphere of argon was slowly added Dess Martin periodinane (1.3 mmol). The reaction was stirred at room temperature. When all the starting material was consumed, the reaction was quenched with a mixture of an aqueous saturated solution of K_2CO_3 and an aqueous saturated solution of $Na_2S_2O_5$ (care is required, the reaction is exothermic). The mixture was extracted with Et_2O (2x 3 mL). The combined organic layers were washed with an aqueous saturated solution of NH_4Cl (2 mL), brine (2 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness under reduce pressure. The crude was purified by flash chromatography (EA/PE, 2/8 to 6/4) yielding the aldehyde **222** as a colorless oil in 67% as a mixture of diastereoisomers.

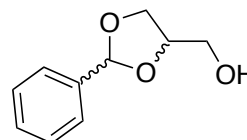
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 0.07-0.12 (6H, m, 2x CH_3), 0.91 (3H, s, CH_3), 0.92 (3H, s, CH_3^*), 0.93 (3H, s, CH_3^{**}), 3.76-4.42 (6H, m, 2xCH, 2x CH_2), 3.81 (3H, s, CH_3), 5.92 (1/8 of 1H, s, CH), 5.94 (1/8 of 1H, s, CH^*), 5.95 (1/4 of 1H, s, CH^{**}), 6.09 (1/4 of 1H, s, CH^{***}), 6.88-6.93 and 7.38-7.45 (4H, m, Ar), 9.81 (1/4 of 1H, s, CH), 9.82 (1/4 of 1H, s, CH^*) 9.86 (1/8 of 1H, s, CH^{**}), 9.89 (1/8 of 1H, s, CH^{***}).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ -5.3, -5.2, -5.2, -5.2, 18.3, 18.4, 18.4, 25.9, 26.0, 26.0, 55.4, 55.4, 63.6, 64.0, 77.6, 78.5, 80.4, 81.6, 104.9, 105.4, 105.7, 106.3, 113.6, 113.7, 113.7, 113.8, 11.8, 114.0, 114.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.8, 160.8, 161.0, 200.7, 200.7, 200.9, 200.9.

Development of a synthesis enantiomerically pure of D- and L-glyceraldehyde 3-phosphate

D,L-(2-Phenyl-1,3-dioxolan-4-yl)

methanol



252

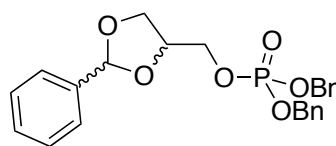
To a vigorously stirred solution of 3-chloropropane-1,2-diol **251** (1 mmol) and benzaldehyde **250** (1.5 mmol) in DMF (2 mL) at -5 °C under an atmosphere of argon, *t*-BuOK (1.5 mmol) was portion wise added over 30 min. The mixture was stirred for 90 min at -5 °C and then the reaction was quenched with an aqueous solution of 5% NH₄Cl (2 mL) and brine (5 mL). Water was added to dissolve inorganic precipitates. The mixture was extracted with ethyl acetate (5x 3 mL). Organic layers were combined and washed with brine (3x 5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduce pressure. The product was purified by distillation under reduced pressure (3 Torr, 145-152 °C) and was obtained pure as colourless oil in (yield of 73%) as a mixture of diastereoisomers.

TLC: $R_F = 0.58$ (EA/PE, 3/7).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.86 (H, s, OH), 1.63 (H, s, OH), 3.67-3.87 (5H, m), 4.01-4.24 (3H, m), 4.35-4.40 (1H, m, CH), 5.83 (1/2H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2H, s, CH-Ph), 7.37-7.50 (10H, m, Ph).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 62.4, 63.3, 66.7, 66.9, 76.7, 77.1, 104.0, 104.6, 126.3, 126.5, 128.1, 128.3, 129.1, 129.4, 136.9, 137.5.

D,L-Dibenzyl ((2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl) methyl) phosphate



253

To a stirred solution of (2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol **252** (1 mmol) in DCM (5 mL) at room temperature under an atmosphere of argon, *N,N*-diisopropylamine phosphoramidite (2.5 mmol) and a 0.45 M solution of tetrazole in CH₃CN (2.5 mmol) were successively added. When all starting material was consumed, the reaction was cooled down to 0°C and *m*-CPBA (2.5 mmol) was slowly added in portions over 10 min. The reaction was stirred for 30 min at the same temperature and allowed to warm up to room temperature for 30 min. Then it was quenched with a saturated aqueous solution of NH₄Cl (2 mL). The mixture was extracted with DCM (3x 4 mL) and the combined organic extracts were washed with brine (2x 2 mL) and water (2 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography (PE/EA, 8/3 progressively to 5/5), affording the pure product as a colorless oil corresponding to the equimolar mixture of diastereoisomers (68% yield) as a mixture of diastereoisomers.

TLC : R_F = 0.35 (EA/PE, 5/5).

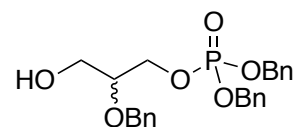
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.59 (4H, m, CH₂-OP, CH₂-O) 4.36 (1H, m, CH), 5.77 (1/2 H, s, CH-Ph), 5.86 (1/2 H, s, CH*-Ph), 7.33-7.44 (15H, m, Ph).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 62.6, 67.1 (d, J=6), 68.7 (d, J=5.3), 69.9 (d, J=5.3), 70.6 (d, J=5.3), 74.3 (d, J=7.9), 74.4 (d, J=7.9), 126.5, 126.7, 128.2, 128.5, 128.7, 129.1, 129.4, 129.6, 134.6, 136.8.

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ -0.17, -0.01.

MS (ESI⁺): m/z calculated for C₂₄H₂₅O₆PNa [M+Na]⁺ 463.13, found 463.12.

D,L-Dibenzyl (2-(benzyloxy)-3-hydroxypropyl) phosphate



249

To a stirred solution of dibenzyl benzylidene acetal phosphate **253** (1 mmol) in DCM (4 mL) at room temperature under an atmosphere of argon, was added LnOTf_3 (0.5 mol) and the reaction mixture was stirred for 10 min. Then 1 M solution of $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ in THF (2.5 mmol) was added dropwise. When all starting material was consumed, the reaction was quenched consecutively with methanol (0.5 mL) and a 15% NH_3 aqueous solution (0.5 mL). When bubbling was no more observed, the crude solution was filtered, the organic layer was washed with brine (2 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered again and vaped to dryness under reduce pressure. The crude was purified by flash chromatography (PE/EA, 5/5 to 2/8) and the pure product was obtained as colourless oil (68% yield).

TLC : $R_F = 0.50$ (EA/PE, 8/2).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 3.58-3.70 (3H, m, -CH-, CH_2 OH), 4.10 (2H, dd, $J=7.8$, $J=4.6$), - $\text{CH}_2\text{-OP}$), 4.58 (2H, dd, $J=30.6$, 12.1, O- $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.04 (4H, m, 2x P-O- $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 7.28-7.35 (15H, m, Ar).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 60.1, 64.7 (d, $J=5.4$), 68.6 (d, $J=3.8$), 68.6 (d, $J=3.8$), 68.6 (d, $J=3.5$), 71.2, 76.6 (d, $J=5.9$), 126.9, 127.0, 127.1, 127.1, 127.6, 127.7, 134.7 (d, $J=2.7$), 134.7 (d, $J=2.7$), 136.3.

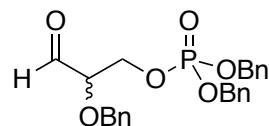
$^{31}\text{P NMR}$ (121 MHz, CDCl_3): δ 0.00.

MS (ESI⁺): m/z calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_6\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 465.14, found 465.14.

(R)-249- $[\alpha]_{\lambda,T} = -10,8$ $^\circ\cdot\text{dm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^3$ in CHCl_3 at 20 $^\circ\text{C}$ and at a concentration of $58.3\cdot 10^{-3}$ g/mL.

(S)-249- $[\alpha]_{\lambda,T} = +10,6$ $^\circ\cdot\text{dm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^3$ in CHCl_3 at 20 $^\circ\text{C}$ and at a concentration of $50.8\cdot 10^{-3}$ g/mL.

**D,L-Dibenzyl (2-(benzyloxy)-
propanal) phosphate**



255

To a stirred solution of the primary alcohol **249** (1 mmol) in DCM at room temperature under an atmosphere of argon were sequentially added TEMPO (0.2 mmol) and BAIB (1.1 mmol). When all starting material was consumed, the reaction was filtered over celite and evaporated to dryness under reduce pressure. The product was obtained pure as colourless oil (97% yield).

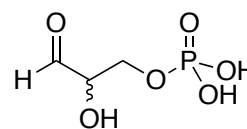
TLC: $R_F = 0.42$ (EA/EP, 8/2)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 3.90-3.93 (1H, m, -CH-), 4.16-4.36 (2H, m, -CH₂-OP), 4.68 (2H, dd, $^2J=18.8$, $^3J=11.8$, CH-O-CH₂-Bn), 5.02 (4H, pseud d, $^3J=8.3$, 2x CH₂-Bn), 7.27-7.36 (15H, m, Ar.), 9.59 (1H, s, -CHO).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 65.7 (d, $J=6$), 69.7 (d, $J=6$), 72.9, 77.3, 81.7 (d, $J=7$), 128.1 (d, $J=2.4$), 128.2, 128.4, 128.7, 135.8 (d, $J=2.7$), 136.8, 200.6.

$^{31}\text{P NMR}$ (121 MHz, CDCl_3): δ -0.007.

MS (ESI⁺) m/z calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{O}_6\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 463.13, found 463.13.

D,L-Glyceraldehyde 3-phosphate**DL-13**

To a stirred solution of dibenzyl (2-(benzyloxy)-propanal) phosphate **255** (1 mmol) in EA (1 mL) was added Pd/C 10% w/w (0.3 mmol). The reaction flask was then connected to a balloon of H₂ (1 atm). Every 20 min, a slight vacuum was applied to the reaction flask, which was then backfilled with H₂. When all starting material was consumed, the reaction was filtered over a celite pad and evaporated to dryness under reduced pressure. The product was obtained pure as colourless oil in a quantitative yield.

This procedure of deprotection may conduct to a degradation of the compound. It is recommended to use water as solvent and to not evaporate to dryness.

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 3.60 (1H, ddt, J=3.3, 0.4, 5.8, -CH), 3.92 (2H, ddd, J=11.1, 5.9, 3.3, -CH₂), 4.90 (1H, d, J=5.9, -CH-).

¹³C NMR (125 MHz, D₂O): δ 64.7 (d, J=5.0), 73.9 (d, J=7.7), 88.2.

³¹P NMR (121 MHz, D₂O): δ 0.00.

¹ Ladame, S., Willson, M., Périé, J., «A Convenient Synthesis of Dibenzyl α,α -Difluoromethyl- β -ketophosphonates », *European Journal of Organic Chemistry*, 2002, 2640-2648.

² Sharma, S. K., Miller, M. J., Payne, S. M. « Spermexatin and spermexatol: new synthetic spermidine-based siderophore analogues », *Journal of Medicinal Chemistry*, 1989, 32, 357-67.

³ Meyer O., Thèse de l'Université de Strasbourg, 2004, France.

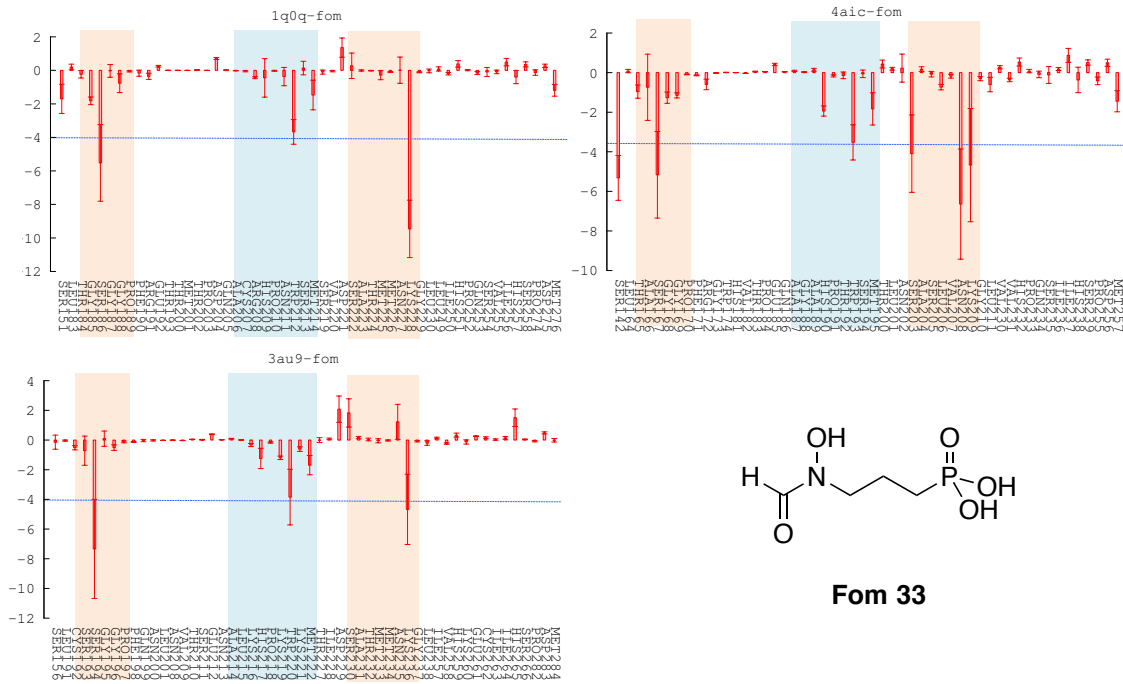
Annexes

Table des matières

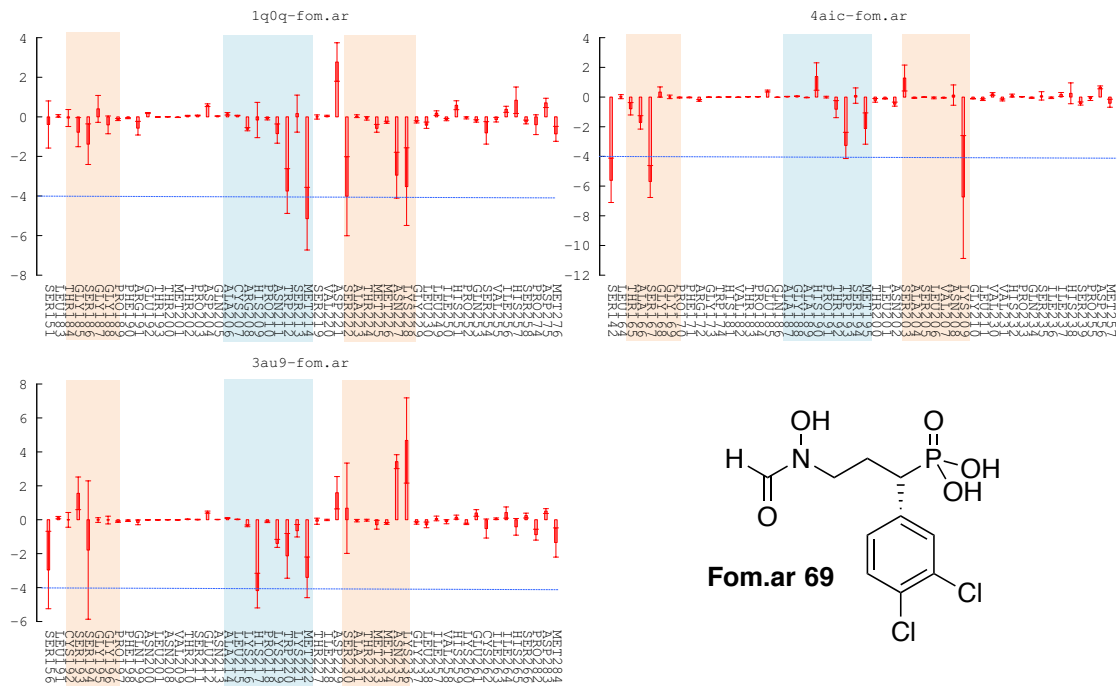
| | |
|--|------------|
| A. Etude comparative des interactions de plusieurs inhibiteurs de la DXR chez trois organismes..... | 414 |
| A.1. Complexes impliquant l'inhibiteur fom 33 avec les <i>Ec-</i> , <i>Mt-</i> et <i>PfDXR</i> | 414 |
| A.2. Complexes impliquant l'inhibiteur fom.ar 69 avec les <i>Ec-</i> , <i>Mt-</i> et <i>PfDXR</i> | 415 |
| A.3. Complexes impliquant l'inhibiteur fr 34 avec les <i>Ec-</i> , <i>Mt-</i> et <i>PfDXR</i> | 415 |
| A.4. Complexes impliquant l'inhibiteur Pyr 70 avec les <i>Ec-</i> , <i>Mt-</i> et <i>PfDXR</i> | 416 |
| A.5. Complexes impliquant l'inhibiteur Pyr 70 avec les <i>Ec-</i> , <i>Mt-</i> et <i>PfDXR</i> | 416 |
| B. Etude computationnelle d'analogues phosphates d'inhibiteurs de la DXR..... | 417 |
| C. Conception d'inhibiteurs potentiels de la DXR de type bisubstrat et biligand..... | 418 |
| C.1. approche bisubstrat..... | 418 |
| <i>C.1.1. Préparation des récepteurs DXR complexés en présence des azotures.....</i> | <i>418</i> |
| <i>C.1.2. Docking cyclooctyne en présence du récepteur de type DXR/Azo1.....</i> | <i>420</i> |
| <i>C.1.3. Docking en présence du récepteur de type DXR/Azo2.....</i> | <i>421</i> |
| <i>C.1.4. Docking en présence du récepteur de type DXR/Azo3.....</i> | <i>422</i> |
| <i>C.1.5. Docking en présence du récepteur de type DXR/Azo4.....</i> | <i>423</i> |
| <i>C.1.6. Docking des Cyclooctynes sur le complexe DXR.....</i> | <i>424</i> |
| C.2. Docking de produits potentiellement issus de la réaction de cycloaddition..... | 427 |
| C.3. approche biligand..... | 428 |
| <i>Conception : 1^{ère} partie.....</i> | <i>429</i> |
| <i>Deuxième méthode : construction à partir de fragments commerciaux.....</i> | <i>434</i> |
| B. Etudes d'affinités et synthèses de potentiels inhibiteurs de la DXR de type α,α-difluoro phosphonate..... | 439 |
| C. Développement d'une méthode de synthèse des D- et L- glycéraldéhyde 3-phosphates énantiomériquement purs..... | 441 |

A. Etude comparative des interactions de plusieurs inhibiteurs de la DXR chez trois organismes

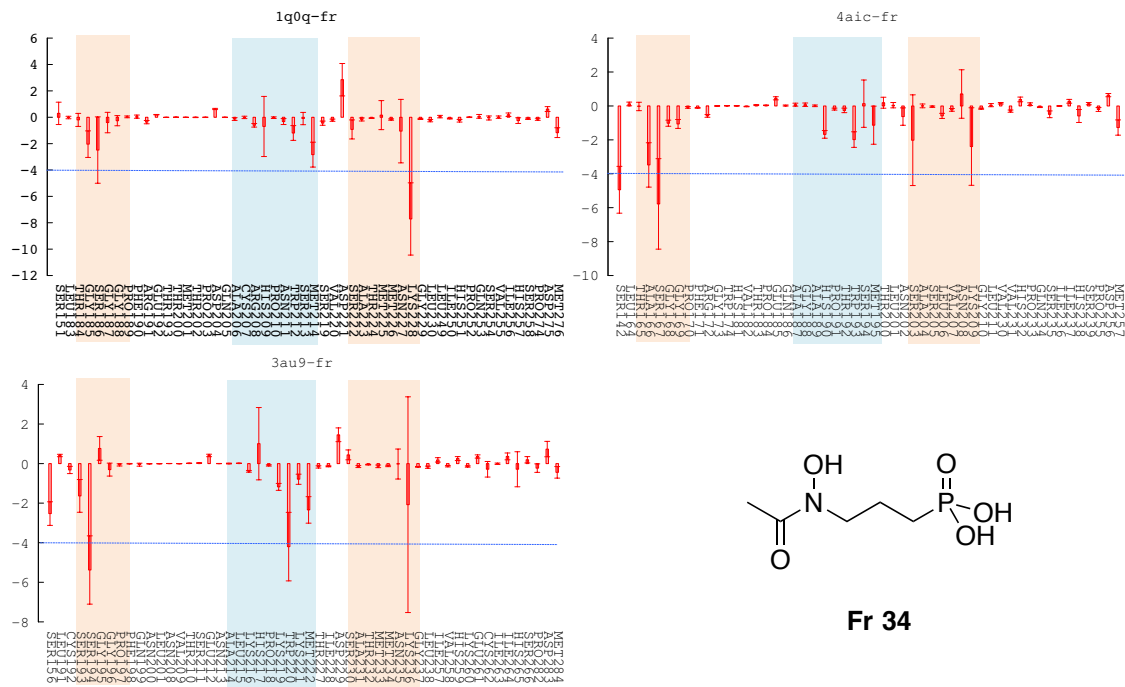
A.1. Complexes impliquant l'inhibiteur fom 33 avec les *Ec*-, *Mt*- et *Pf*DXR



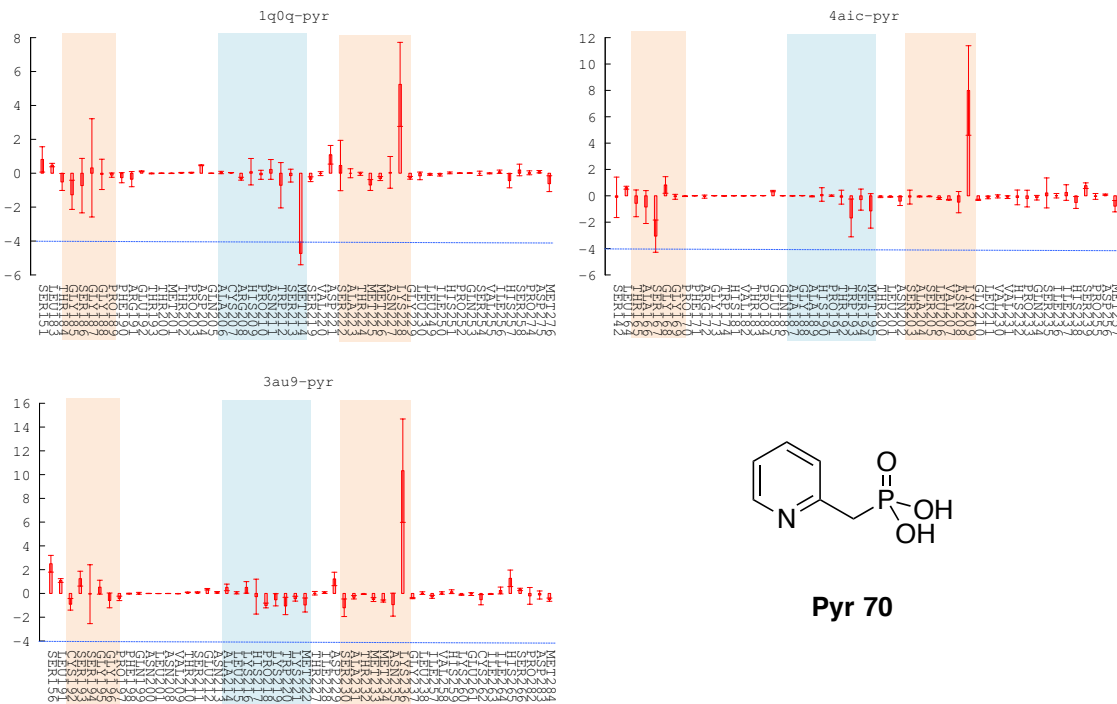
A.2. Complexes impliquant l'inhibiteur fom.ar 69 avec les *Ec*-, *Mt*- et *Pf*DXR



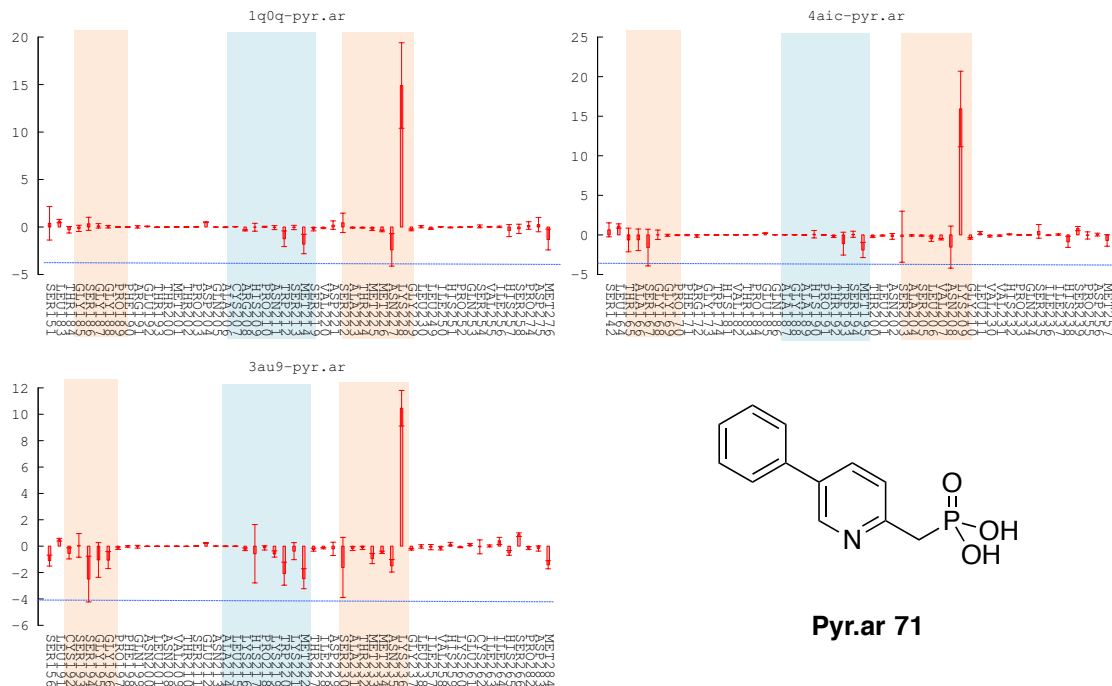
A.3. Complexes impliquant l'inhibiteur fr 34 avec les *Ec*-, *Mt*- et *Pf*DXR



A.4. Complexes impliquant l'inhibiteur Pyr 70 avec les *Ec*-, *Mt*- et *Pf*DXR



A.5. Complexes impliquant l'inhibiteur Pyr.ar 71 avec les *Ec*-, *Mt*- et *Pf*DXR



Etude computationnelle d'analogues phosphates d'inhibiteurs de la DXR

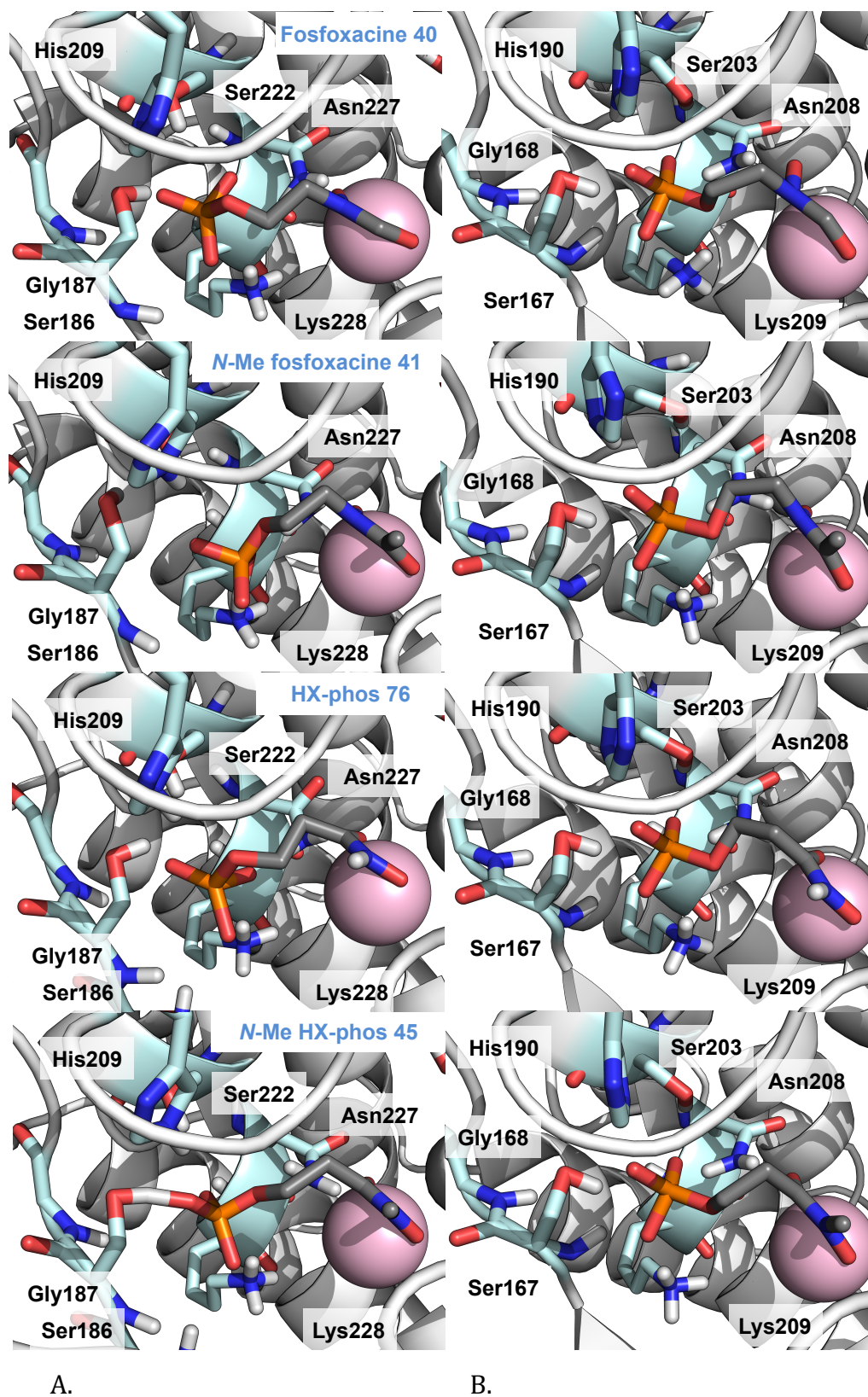


Figure 64: Conformations des quatre molécules issues du docking sur structures minimisées dans les sites actifs *Ec*DXR (A, PDBid 1Q0Q) et *Mt*DXR (B, PDBid 4AIC) ; seuls certains résidus de la zone du point d'ancrage sont représentés.

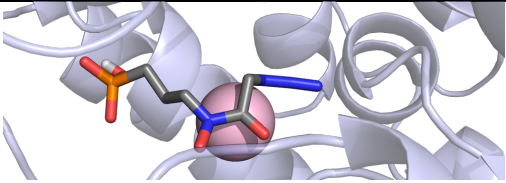
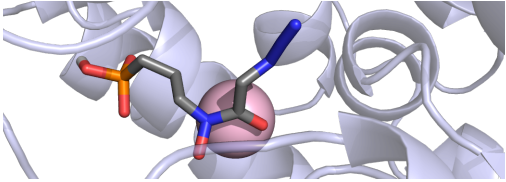
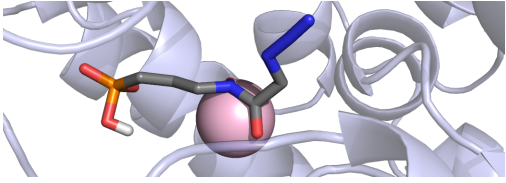
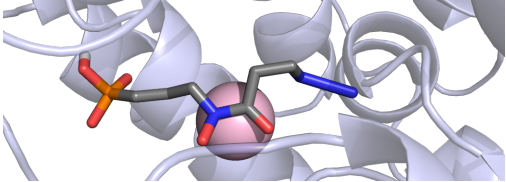
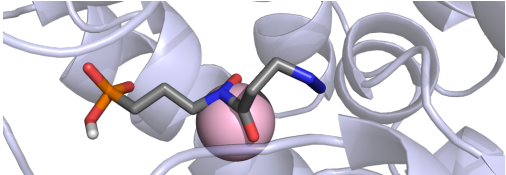
C. Conception d'inhibiteurs potentiels de la DXR de type bisubstrat et biligand

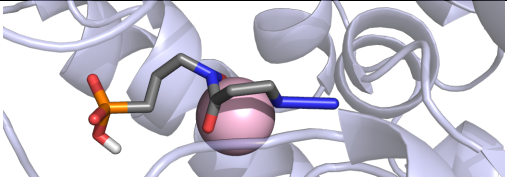
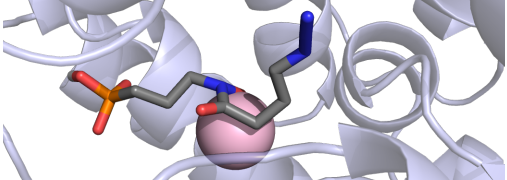
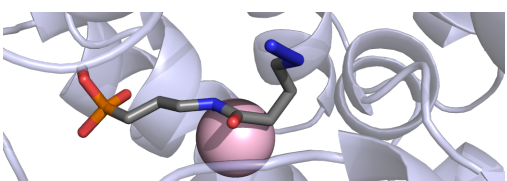
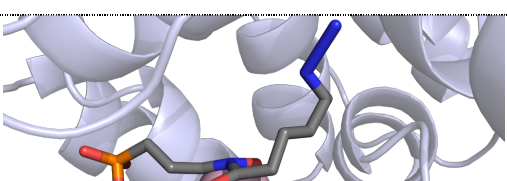
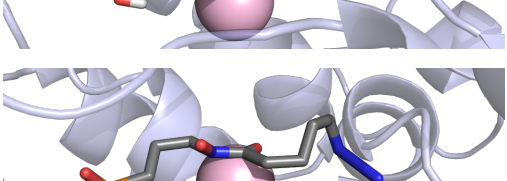
Pour la visualisation de résultats jugés pertinents, la protéine sera représentée en ruban, les molécules d'intérêts (ligands) en bâtonnets gris et le métal en sphère rose.

C.1. approche bisubstrat

C.1.1. Préparation des récepteurs DXR complexés en présence des azotures

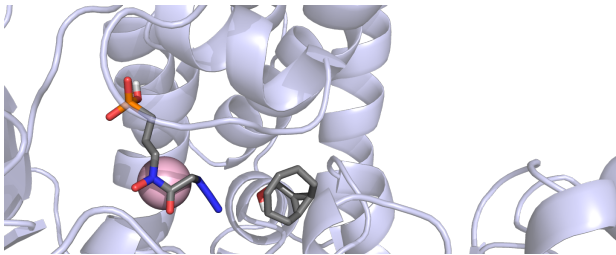
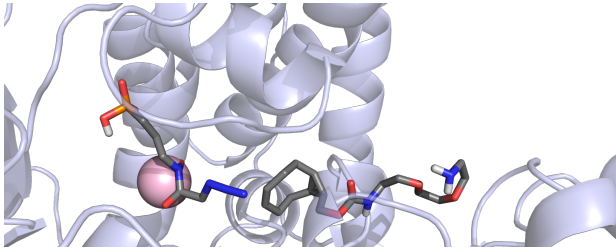
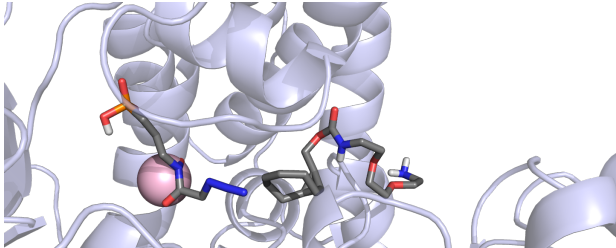
Tableau 35: Estimations des énergies de fixation des conformations des azotures retenues en kcal/mol ainsi que leurs représentation en bâtonnés, dans le site actif de la DXR.

| Molécule | Conf. retenue | E. de fixation estimée (kcal/mol) | |
|--------------------|---------------|-----------------------------------|--|
| Azo1 83 | 1_1 | -7,50 |  |
| | 1_3 | -6,42 |  |
| | 3_1 | -7,2 |  |
| Azo2 84 | 1_1 | -7,64 |  |
| | 1_3 | -7,24 |  |

| Molécule | Conf. retenue | E. de fixation estimée (kcal/mol) | |
|--------------------|---------------|-----------------------------------|--|
| Azo3 85 | 1_5 | -6,45 |  |
| | 1_1 | -7,42 |  |
| | 1_3 | -7,00 |  |
| Azo4 86 | 1_1 | -7,16 |  |
| | 2_1 | -6,79 |  |

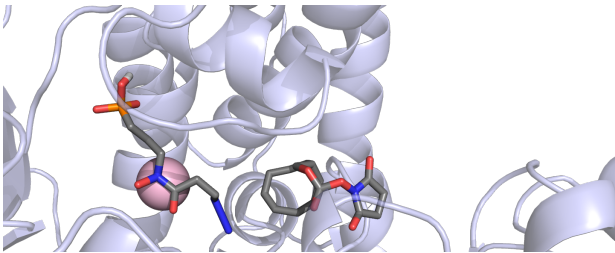
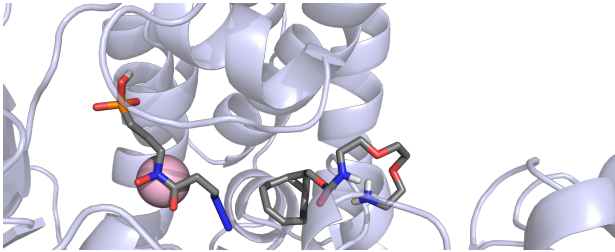
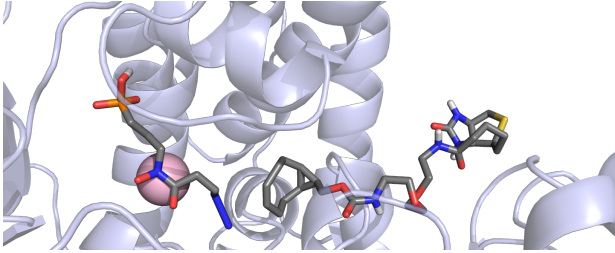
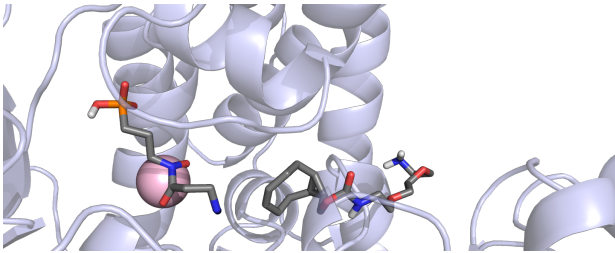
C.1.2. Docking cyclooctyne en présence du récepteur de type DXR/Azo1

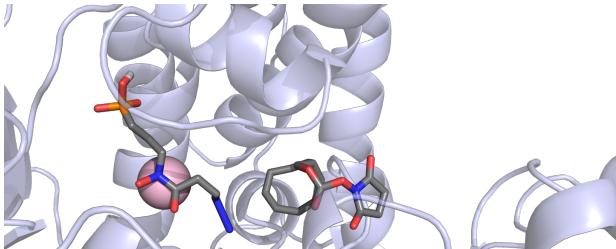
Tableau 36: Conformations retenues des docking de cyclooctynes commerciales sur la DXR en présence de différentes conformations de l'Azo1 et du métal dans son site actif. Les énergies sont en kcal/mol.

| Molécule | Conf. retenue | E. estimée de fixation (kcal/mol) | Représentation |
|------------------------|---------------|-----------------------------------|--|
| DXR/Azo1-1_1 83 | | | |
| CC1 87 | 1_1 | -5,98 |  |
| DXR/Azo1-1_3 83 | | | |
| CC3 88 | 3_1 | -5,64 |  |
| | 4_1 | -5,25 |  |

C.1.3. Docking en présence du récepteur de type DXR/Azo2

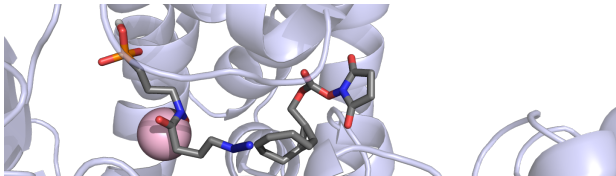
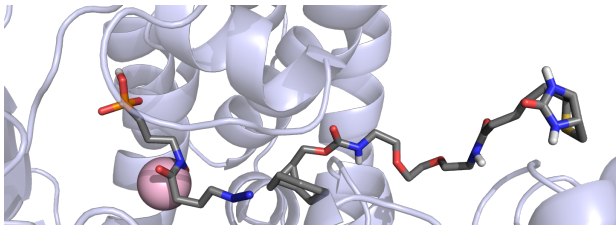
Tableau 37: Conformations retenues des docking des cyclooctynes commerciales sur la DXR en présence de différentes conformations de l'Azo2 dans son site actif. Les énergies sont en kcal/mol.

| Molécule | Conf. retenue | E. estimée de fixation (kcal/mol) | Représentation |
|------------------------|---------------|-----------------------------------|--|
| DXR/Azo2-1_1 84 | | | |
| CC2 87 | 1_7 | -8,24 |  |
| CC3 88 | 2_2 | -4,80 |  |
| CC4 89 | 5_1 | -5,21 |  |
| DXR/Azo2-1_3 84 | | | |
| CC3 89 | 1_1 | -7,19 |  |

| Molécule | Conf. retenue | E. estimée de fixation (kcal/mol) | Représentation |
|------------------------|---------------|-----------------------------------|--|
| DXR/Azo2-1_5 84 | | | |
| CC4 90 | 1_1 | -6,97 |  |

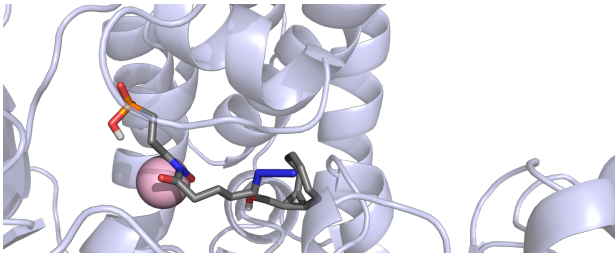
C.1.4. Docking en présence du récepteur de type DXR/Azo3

Tableau 38: Conformations retenues des docking des cyclooctynes commerciales sur la DXR en présence de différentes conformations de l'Azo3 dans son site actif. Les énergies sont en kcal/mol.

| Molécule | Conf. retenue | E. estimée de fixation (kcal/mol) | Représentation |
|---------------------|---------------|-----------------------------------|--|
| DXR/Azo3-1_1 | | | |
| CC2 88 | 1_7 | -8,24 |  |
| CC4 90 | 5_1 | -5,21 |  |

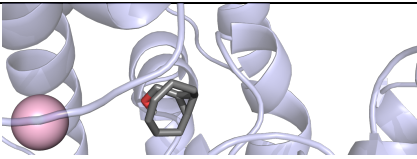
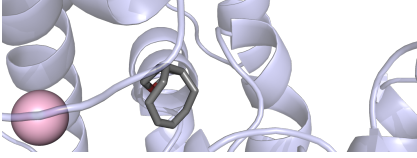
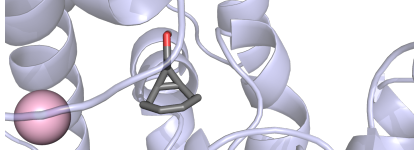
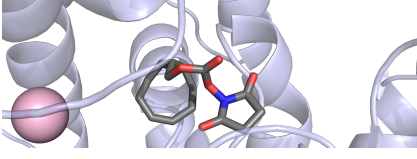
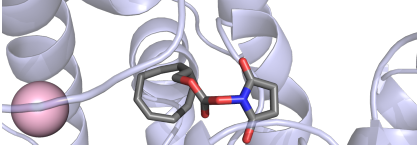
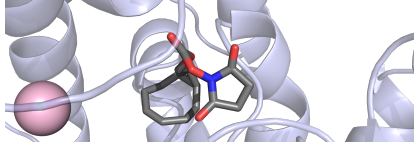
C.1.5. Docking en présence du récepteur de type DXR/Azo4

Tableau 39: Conformations retenues des docking des cyclooctynes commerciales sur la DXR en présence de différentes conformations de l'Azo4 dans son site actif. Les énergies sont en kcal/mol.

| Molécule | Conf. retenue | E. estimée de fixation (kcal/mol) | Représentation |
|---------------------|---------------|-----------------------------------|--|
| DXR/Azo4-1_1 | | | |
| CC1 87 | 2_2 | -5,78 |  |

C.1.6. Docking des Cyclooctynes sur le complexe DXR

Tableau 40: Résultats du docking des cyclooctynes commerciales sur la DXR en présence de Mg^{2+} . Les énergies sont en kcal/mol. Le métal est indiqué en sphère rose comme repère.

| | Conf. Retenue | E. de fixation estimée (kcal/mol) | Représentation |
|-------------------|--------------------------|--|--|
| CC1 87 | 2_1 | -5,61 |  |
| | 2_5 | -5,33 |  |
| | 3_1 | -5,33 |  |
| CC2 88 | 1_1 | -8,53 |  |
| | 1_4 | -7,77 |  |
| | 1_5 | -7,42 |  |

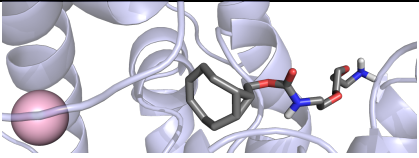
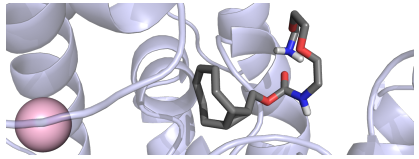
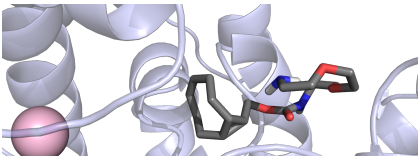
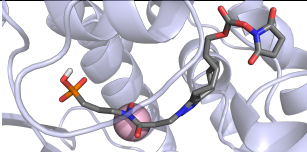
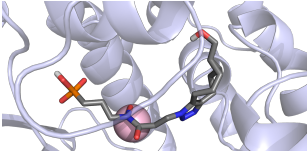
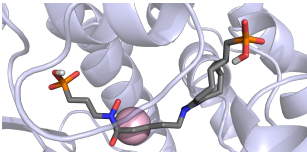
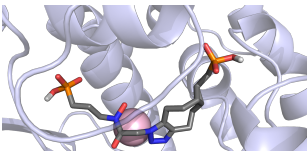
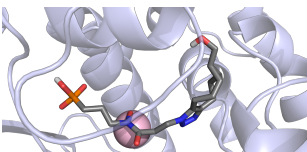
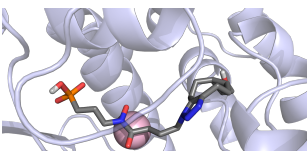
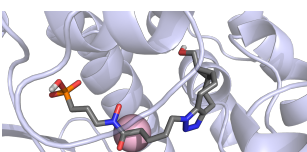
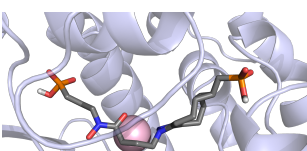
| | Conf. Retenue | E. de fixation estimée (kcal/mol) | Représentation |
|-------------------|--------------------------|--|--|
| CC3 89 | 2_1 | -6,42 |  |
| | 6_2 | -4,12 |  |
| | 7_1 | 7_1 |  |

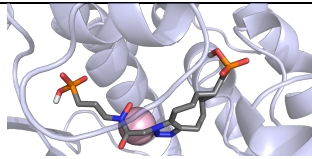
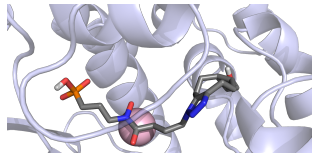
Tableau 41: Conformations retenues des docking des azotures Azo1 à Azo4 sur la DXR en présence de différentes conformations de CC2. Les énergies sont en kcal/mol.

| Molécule | Conf. retenue | E. estimée (kcal/mol) | Représentation |
|------------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| DXR/CC2-1_4 88 | | | |
| Azo1 83 | 1_2 | -7,38 | |
| Azo2 84 | 2_2 | -7,00 | |
| DXR/ CC2-1_5 88 | | | |
| Azo1 83 | 1_4 | -7,38 | |
| Azo2 84 | 1_1 | -7,86 | |
| Azo4 86 | 2_2 | -6,98 | |

C.2. Docking de produits potentiellement issus de la réaction de cycloaddition

Tableau 42: Conformations retenues du docking des produits issus de la potentielle cycloaddition 1,3-dipolaire sur la DXR interagissant avec la Ser186. Les énergies sont en kcal/mol.

| Molécule | E. estimée (kcal/mol) | Représentation |
|-------------------|--------------------------|--|
| Azo2-CC2-b 92 | -10 |  |
| Azo3-CC1P-b 93 | -9,7 |  |
| Azo4-CC1P-a 94 | -9,6 |  |
| Azo1-CC1P-b 95 | -9,3 |  |
| Azo2-CC1-b 96 | -9,3 |  |
| Azo3-CC1-a 97 | -9,2 |  |
| Azo4-CC1-b 98 | -9,1 |  |
| Azo3-CC1P-a 99 | -9,1 |  |

| Molécule | E. estimée (kcal/mol) | Représentation |
|--------------------|--------------------------|--|
| Azo1-CC1P-a 100 | -8,8 |  |
| Azo3-CC1-a 101 | -8,7 |  |

C.3. approche biligand

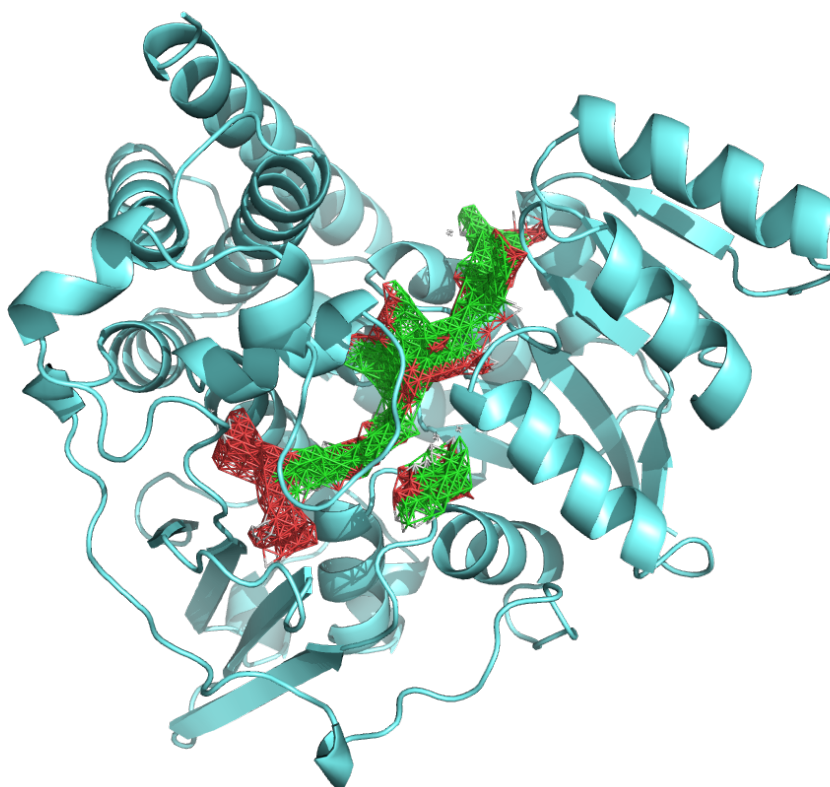
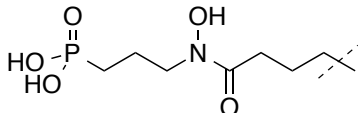
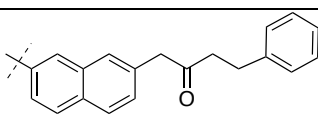
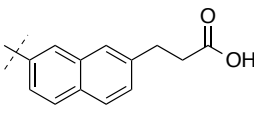
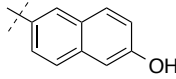
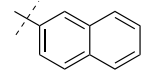
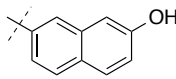
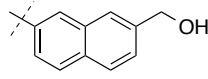
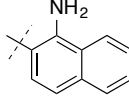
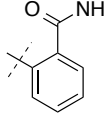
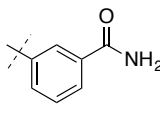
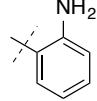
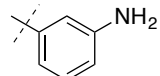
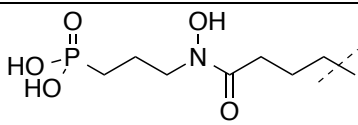
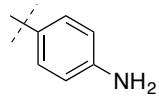
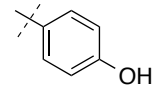
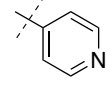
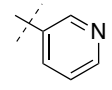


Figure 65: Prédiction issue de l'utilisation du programme AutoSite. En vert sont représentées les interactions hydrophobes potentielles et en rouge en gris celles pouvant participer à des liaisons hydrogènes.

Conception : 1^{ère} partie

Tableau 43: Energies libres de fixation estimées en kcal/mol des meilleures molécules ayant passé le filtre d'interactions avec la Ser186 et/ou l'His209.

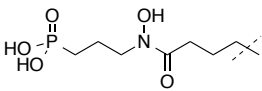
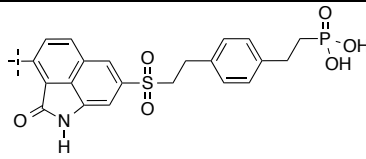
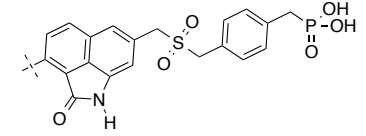
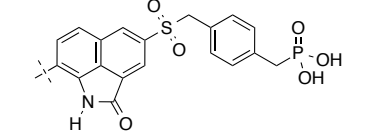
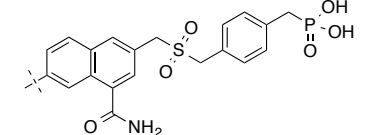
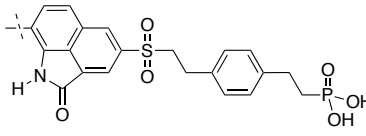
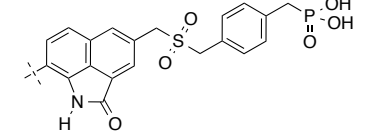
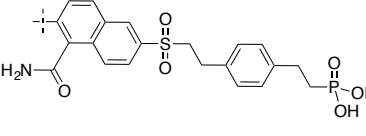
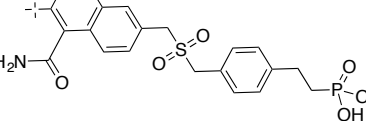
|  | | |
|---|------------------------|--|
| Substituant | ID | Energie de fixation estimée (kcal/mol) |
|  | 92 | -10,6 |
|  | 93 | -10,3 |
|  | 94 | -9,7 |
|  | 95 | -9,7 |
|  | 96 | -9,6 |
|  | 97 | -9,6 |
|  | 98 | -9,3 |
|  | 99 | -8,9 |
|  | 100^a | -8,7 |
|  | 101 | -8,3 |
|  | 102^a | -8 |

|  | | |
|---|------------------------|------|
|  | 103^a | -8 |
|  | 104 | -8 |
|  | 105 | -7,8 |
|  | 106^a | -7,8 |

^a conformation pour laquelle le phosphonate est à proximité du métal.

Conception : 2^{ème} partie

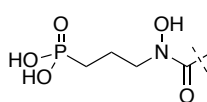
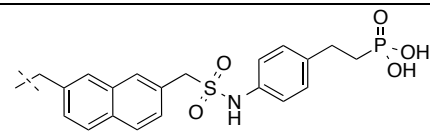
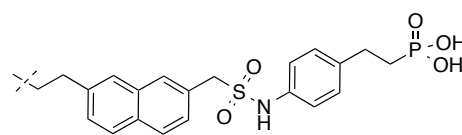
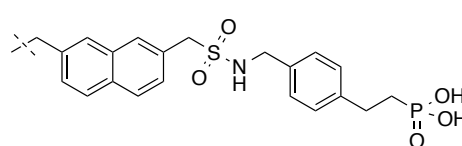
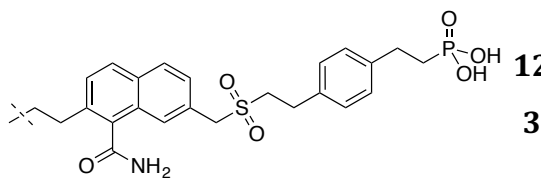
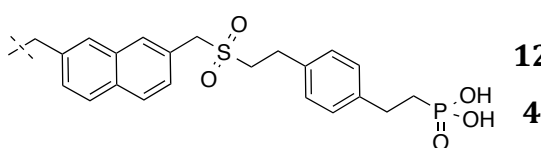
Tableau 44 : Energies libres de fixation estimées en kcal/mol des treize molécules ayant passé le filtre d'interactions avec la Ser186 et/ou l'His209 ainsi que le filtre d'interactions avec la Thr10 et le Trp212. Les énergies sont en kcal/mol.

| Molécule | Energie de fixation estimée (kcal/mol) | |
|---|---|-------|
|  | | |
|  | 107 | -11,7 |
|  | 108 | -11,5 |
|  | 109 | -11,5 |
|  | 110 | -11,4 |
|  | 111 | -11,2 |
|  | 112 | -11,2 |
|  | 113 | -11 |
|  | 114 | -10,9 |

| Molécule | Energie de fixation estimée (kcal/mol) | |
|----------|---|-------|
| | | |
| | 115 | -10,9 |
| | 116 | -10,9 |
| | 117 | -10,4 |
| | 118 | -10 |
| | 119 | -10 |

Conception : 3^{ème} partie

Tableau 45 : Energies libres de fixation estimées en kcal/mol des cinq molécules ayant passé le filtre d'interactions avec la Ser186 et/ou l'His209, la Thr10 et le Trp212.

| Molécule | Energie de fixation estimée (kcal/mol) |
|---|---|
|  | |
|  | 12 0 -11,7 |
|  | 12 1 -11,5 |
|  | 12 2 -10,4 |
|  | 12 3 -10 |
|  | 12 4 -10 |

Deuxième méthode : construction à partir de fragments commerciaux

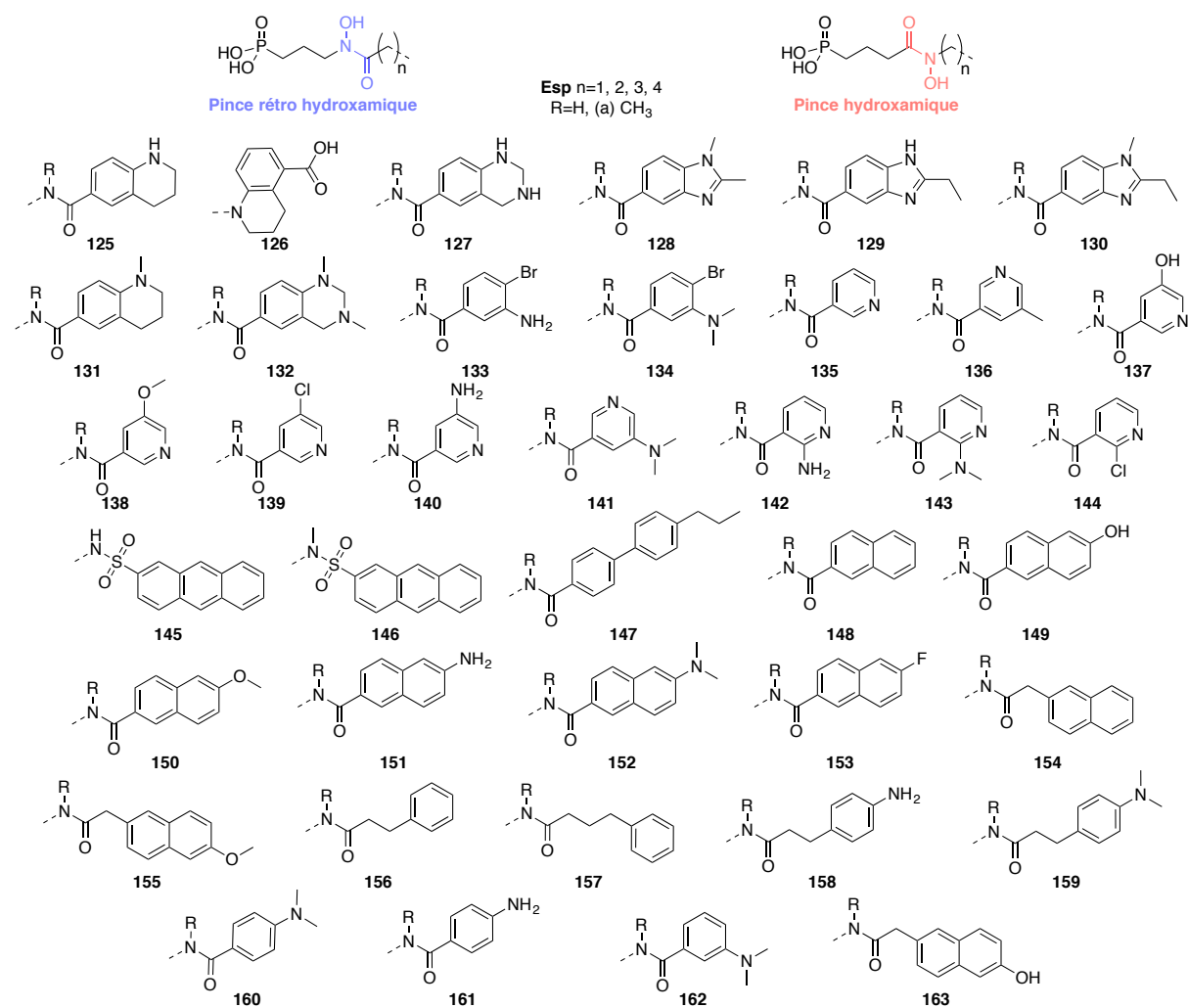
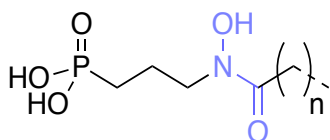


Schéma 79: Molécules conçues à partir de fragments commerciaux et dockées sur la DXR en présence du métal.

Tableau 46: Classement et énergies libres de fixation estimées en kcal/mol des molécules à pince rétro-hydroxamique (base rhx) qui ont passé le filtre d'interactions avec la Ser186; surligné en orange les fragments retenus pour 3 ou 4 espaceurs et en bleu ceux retenus deux fois

| Molécule | E. de fixation estimée (kcal/mol) | Molécule | E. de fixation estimée (kcal/mol) | | |
|---------------|--------------------------------------|---------------|--------------------------------------|---------------|--------------|
| Esp1 | rhx-151-Esp1 | -10,3 | Esp3 | rhx-151-Esp3 | -10,3 |
| | rhx-153-Esp1 | -10,2 | | rhx-149-Esp3 | -10,2 |
| | rhx-131-Esp1 | -10,1 | | rhx-152-Esp3 | -10 |
| | rhx-132-Esp1 | -9,7 | | rhx-129-Esp3 | -9,5 |
| | rhx-125-Esp1 | -9 | | rhx-147-Esp3 | -9,4 |
| | rhx-160-Esp1 | -9 | | rhx-132-Esp3 | -9,2 |
| | rhx-131-Esp1a | -9 | | rhx-134-Esp3a | -9,2 |
| | rhx-129-Esp1 | -8,9 | | rhx-126-Esp3 | -9,1 |
| | rhx-157-Esp1a | -8,8 | | rhx-139-Esp3a | -9 |
| | rhx-133-Esp1 | -8,4 | | rhx-127-Esp3a | -8,9 |
| | rhx-136-Esp1 | -8,4 | | rhx-137-Esp3a | -8,7 |
| | rhx-139-Esp1 | -8,3 | | rhx-125-Esp3 | -8,6 |
| | rhx-162-Esp1a | -8,1 | | rhx-143-Esp3a | -8,5 |
| | Esp2 | rhx-150-Esp2 | | -9,9 | rhx-133-Esp3 |
| rhx-132-Esp2 | | -9,9 | rhx-137-Esp3 | -8,4 | |
| rhx-127-Esp2 | | -9,5 | rhx-141-Esp3 | -8,4 | |
| rhx-125-Esp2a | | -9,5 | Esp4 | rhx-149-Esp4 | -10,2 |
| rhx-131-Esp2a | | -9,4 | | rhx-152-Esp4 | -9,9 |
| rhx-162-Esp2 | | -9 | | rhx-153-Esp4 | -9,7 |
| rhx-160-Esp2 | | -8,9 | | rhx-127-Esp4 | -9,6 |
| rhx-157-Esp2 | | -8,9 | | rhx-163-Esp4 | -9,6 |
| rhx-134-Esp2a | | -8,3 | | rhx-130-Esp4 | -9,5 |
| rhx-138-Esp2a | | -8,3 | | rhx-129-Esp4 | -9,4 |
| rhx-135-Esp2a | | -8,3 | | rhx-152-Esp4a | -9,2 |
| rhx-138-Esp2 | | -8,3 | | rhx-134-Esp4a | -9,1 |
| | | | | rhx-150-Esp4 | -9,1 |
| | | rhx-128-Esp4 | | -9,1 | |
| | | rhx-133-Esp4 | | -9 | |
| | | rhx-125-Esp4 | | -9 | |
| | | rhx-161-Esp4 | -8,4 | | |
| | | rhx-158-Esp4a | -8,3 | | |
| | | rhx-138-Esp4 | -8,1 | | |



Esp n=1, 2, 3, 4

Tableau 47: Résultats de la série à pince chélatante rétro-hydroxamique. Les molécules présentant les deux meilleurs résultats pour chacun des groupes espaceurs sont indiquées et les énergies de fixation estimées sont en kcal/mol.

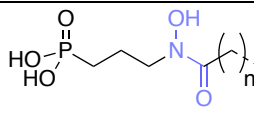
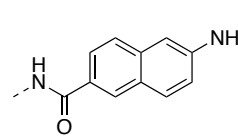
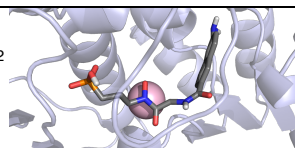
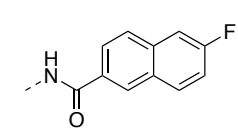
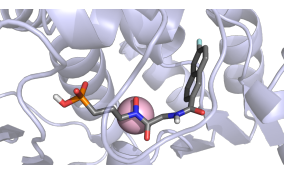
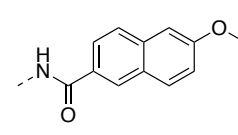
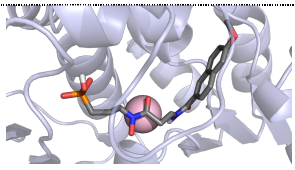
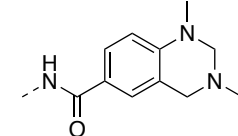
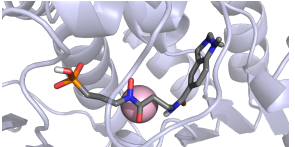
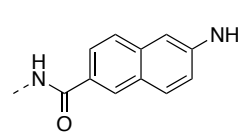
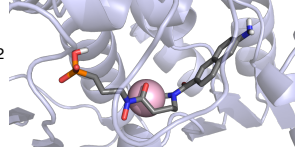
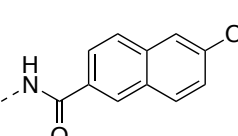
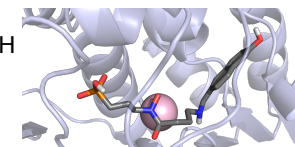
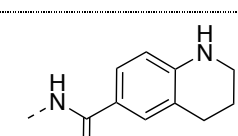
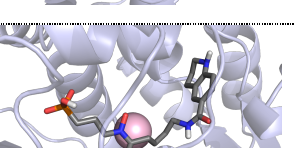
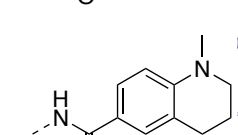
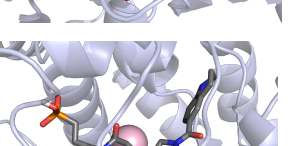
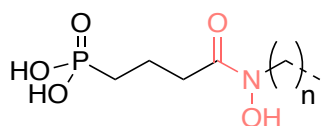
| Molécule | E. de fixation estimée (kcal/mol) | Représentation |
|---|-----------------------------------|--|
|  Esp n=1, 2, 3, 4 | | |
| rhx-151-Esp1 | -10,3 |   |
| rhx-153-Esp1 | -10,2 |   |
| rhx-150-Esp2 | -9,9 |   |
| rhx-132-Esp2 | -9,9 |   |
| rhx-151-Esp3 | -10,3 |   |
| rhx-149-Esp3 | -10,2 |   |
| rhx-125-Esp4 | -9,9 |   |
| rhx-131-Esp4a | -9,7 |   |

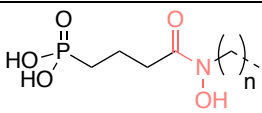
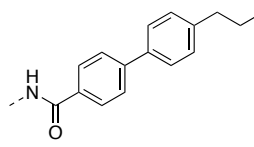
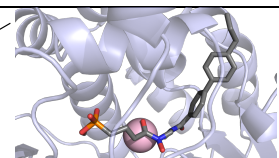
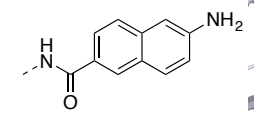
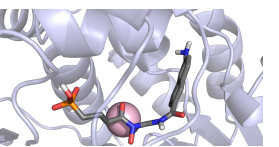
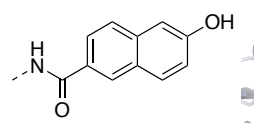
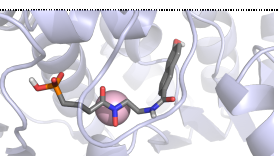
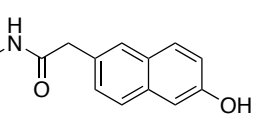
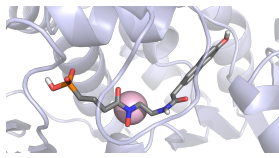
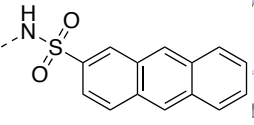
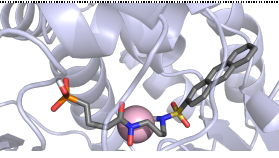
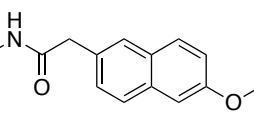
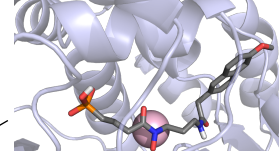
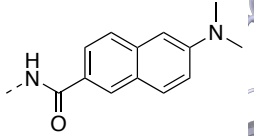
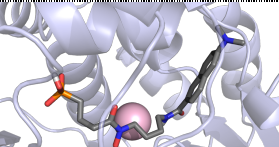
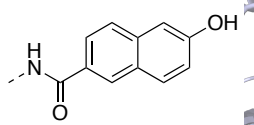
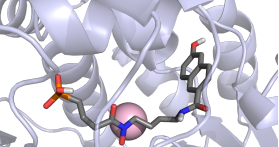
Tableau 48: Classement et énergies libres de fixation estimées en kcal/mol des molécules à pince hydroxamique (base lk) qui ont passé le filtre d'interactions avec la Ser186; surligné en orange les fragments retenus pour 3 ou 4 espaceurs et en bleu ceux retenus deux fois.

| Molécule | E. de fixation estimée (kcal/mol) | Molécule | E. de fixation estimée (kcal/mol) | |
|--------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|------|
| Esp1 | hx-147-Esp1 | Esp3 hx-145-Esp3 | -9,9 | |
| | hx-151-Esp1 | hx-155-Esp3 | -9,7 | |
| | hx-149-Esp1a | hx-149-Esp3a | -9,5 | |
| | hx-128-Esp1a | hx-127-Esp3 | -9 | |
| | hx-160-Esp1 | hx-141-Esp3a | -8,9 | |
| | hx-130-Esp1a | hx-144-Esp3 | -8,7 | |
| | hx-156-Esp1 | hx-138-Esp3 | -8,6 | |
| | hx-160-Esp1a | hx-158-Esp3a | -8,5 | |
| | hx-158-Esp1 | hx-156-Esp3a | -8,5 | |
| | hx-157-Esp1 | hx-158-Esp3 | -8,3 | |
| | hx-161-Esp1a | hx-159-Esp3 | -8,3 | |
| Esp2 | hx-149-Esp2 | hx-137-Esp3 | -8,2 | |
| | hx-163-Esp2 | hx-157-Esp3 | -8,1 | |
| | hx-150-Esp2 | hx-141-Esp3 | -7,4 | |
| | hx-153-Esp2 | hx-136-Esp3 | -7,1 | |
| | hx-147-Esp2 | Esp4 | hx-132-Esp4 | -10 |
| | hx-132-Esp2a | | hx-131-Esp4a | -9,5 |
| | hx-127-Esp2 | | hx-129-Esp4 | -9,4 |
| | hx-125-Esp2 | | hx-154-Esp4 | -9,4 |
| | hx-131-Esp2a | | hx-131-Esp4 | -9,3 |
| | hx-158-Esp2a | | hx-132-Esp4a | -9,1 |
| | hx-144-Esp2a | | hx-127-Esp4 | -9,1 |
| hx-136-Esp2a | hx-134-Esp4a | | -9,1 | |
| | hx-150-Esp4 | | -9,1 | |
| | hx-157-Esp4 | | -8,8 | |
| | hx-134-Esp4 | | -8,8 | |
| | hx-157-Esp4a | -8,8 | | |
| | hx-162-Esp4 | -8,8 | | |
| | hx-144-Esp4a | -8,7 | | |
| | hx-162-Esp4a | -8,5 | | |
| | hx-144-Esp4 | -8,4 | | |
| | hx-143-Esp4 | -8,3 | | |
| | hx-138-Esp4a | -8,2 | | |
| | hx-142-Esp4 | -8,1 | | |
| | hx-133-Esp4 | -7,9 | | |

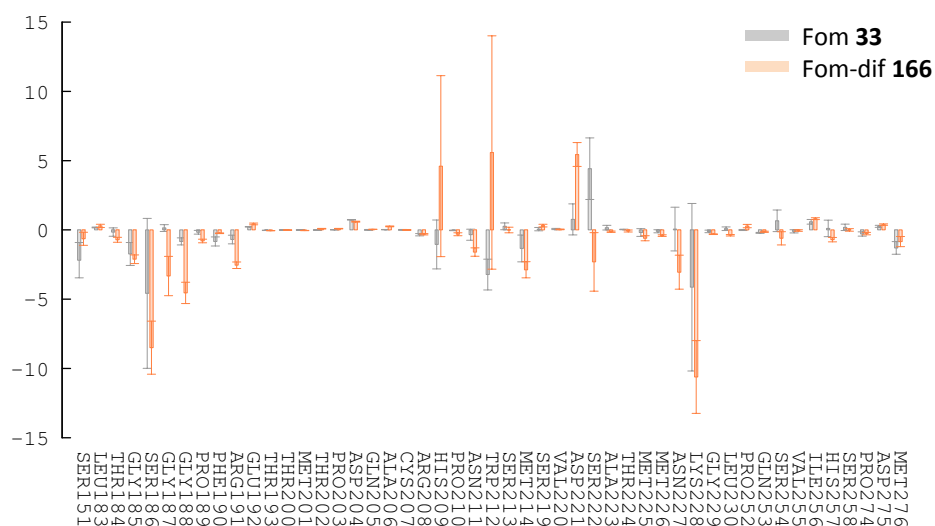


Esp n=1, 2, 3, 4

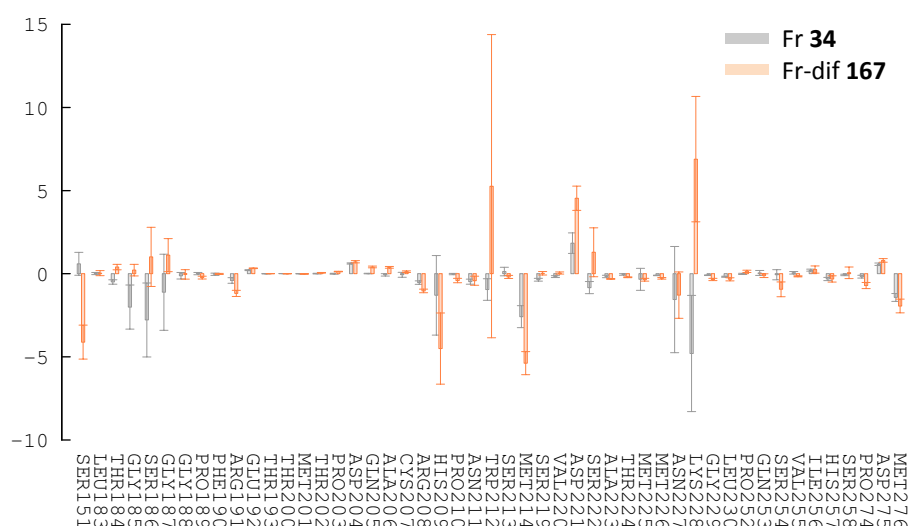
Tableau 49: Résultats de la série à pince chélatante hydroxamique. Les molécules présentant les deux meilleurs résultats pour chacun des groupes espaceurs sont indiquées, ainsi que leurs énergies de fixation estimées, en kcal/mol.

|  Esp n=1, 2, 3, 4 | | |
|---|---|--|
| Molécule | E. de fixation estimée (kcal/mol) | Représentation |
| hx-147-Esp1 | -10,2 |   |
| hx-151-Esp1 | -10 |   |
| hx-149-Esp2 | -10,2 |   |
| hx-163-Esp2 | -10 |   |
| hx-145-Esp3 | -9,9 |   |
| hx-155-Esp3 | -9,7 |   |
| hx-152-Esp4 | -10,4 |   |
| hx-149-Esp4 | -9,9 |   |

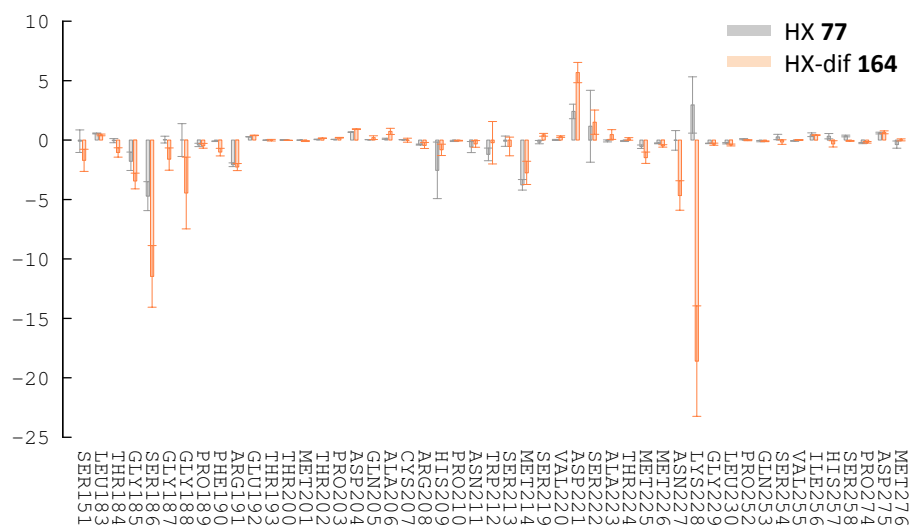
B. Etudes d'affinités et synthèses de potentiels inhibiteurs de la DXR de type α,α -difluoro phosphonate



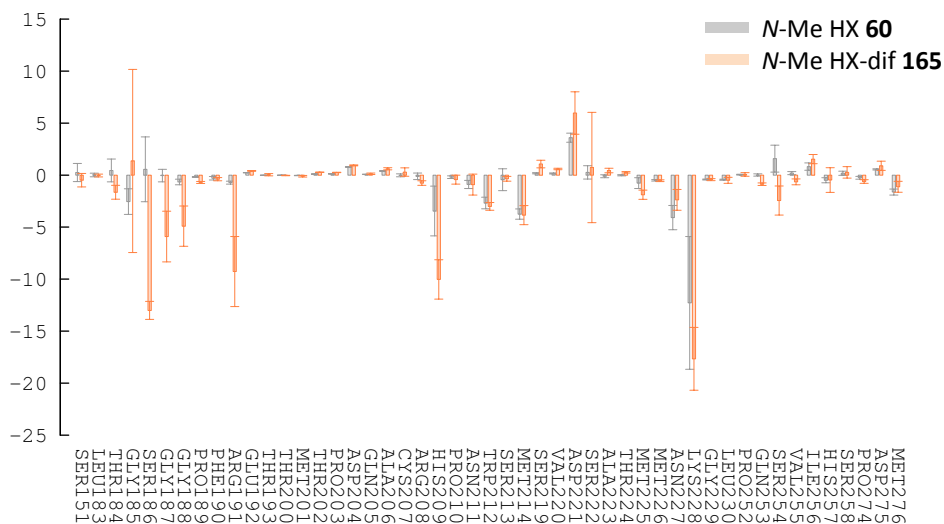
Graph 6: Energies libres totales par résidu en kcal/mol du site actif de la DXR (PDBid 1Q0Q); En gris sont représentés les résultats l'inhibiteur Fom 33 et en orange ceux de son analogue difluoré en alpha du phosphonate Fom.dif 166.



Graph 7: Energies libres totales par résidu en kcal/mol du site actif de la DXR (PDBid 1Q0Q); En gris sont représentés les résultats l'inhibiteur Fr 34 et en orange ceux de son analogue difluoré en alpha du phosphonate Fr.dif 167.



Graph 8: Energies libres totales par résidu en kcal/mol du site actif de la DXR (PDBid 1QOQ); En gris sont représentés les résultats l'inhibiteur LK.NH 77 et en orange ceux de son analogue difluoré en alpha du phosphonate LK.NH.dif 164.



Graph 9: Energies libres totales par résidu en kcal/mol du site actif de la DXR (PDBid 1QOQ); En gris sont représentés les résultats l'inhibiteur LK.NMe 60 et en orange ceux de son analogue difluoré en alpha du phosphonate LK.NMe.dif 165.

C. Développement d'une méthode de synthèse des D- et L-glycéraldéhyde 3-phosphates énantiomériquement purs

Tableau 50: Détermination des orbitales en fonction des nombres quantiques n , l et m_l .

| n | l | m_l | Orbitale | Nombre d'orbitales |
|-----|-----|------------------------|----------|--------------------|
| 1 | 0 | 0 | 1s | 1 |
| 2 | 0 | 0 | 2s | 1 |
| | 1 | -1, 0, 1 | 2p | 3 |
| 3 | 0 | 0 | 3s | 1 |
| | 1 | -1, 0, 1 | 3p | 3 |
| | 2 | -2, -1, 0, 1, 2 | 3d | 5 |
| 4 | 0 | 0 | 4s | 1 |
| | 1 | -1, 0, 1 | 4p | 3 |
| | 2 | -2, -1, 0, 1, 2 | 4d | 5 |
| | 3 | -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3 | 4f | 7 |

Tableau 51: Configurations électroniques des Lanthanides.

| | Ln | Ln²⁺ | Ln³⁺ | Ln⁴⁺ |
|------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|
| ⁵⁷ La | [Xe]5d ¹ 6s ² | - | [Xe] | - |
| ⁵⁸ Ce | [Xe]4f ¹ 5d ¹ 6s ² | - | [Xe]4f ¹ | [Xe]4f ⁰ |
| ⁵⁹ Pr | [Xe]4f ³ 6s ² | - | [Xe]4f ² | [Xe]4f ¹ |
| ⁶⁰ Nd | [Xe]4f ⁴ 6s ² | [Xe]4f ⁴ | [Xe]4f ³ | [Xe]4f ² |
| ⁶¹ Pm | [Xe]4f ⁵ 6s ² | - | [Xe]4f ⁴ | - |
| ⁶² Sm | [Xe]4f ⁶ 6s ² | [Xe]4f ⁶ | [Xe]4f ⁵ | - |
| ⁶³ Eu | [Xe]4f ⁷ 6s ² | [Xe]4f ⁷ | [Xe]4f ⁶ | - |
| ⁶⁴ Gd | [Xe]4f ⁷ 5d ¹ 6s ² | - | [Xe]4f ⁷ | - |
| ⁶⁵ Tb | [Xe]4f ⁹ 6s ² ou [Xe]4f ⁸ 5d ¹ 6s ² | - | [Xe]4f ⁸ | [Xe]4f ⁷ |
| ⁶⁶ Dy | [Xe]4f ¹⁰ 6s ² | - | [Xe]4f ⁹ | [Xe]4f ⁸ |
| ⁶⁷ Ho | [Xe]4f ¹¹ 6s ² | - | [Xe]4f ¹⁰ | - |
| ⁶⁸ Er | [Xe]4f ¹² 6s ² | - | [Xe]4f ¹¹ | - |
| ⁶⁹ Tm | [Xe]4f ¹³ 6s ² | [Xe]4f ¹³ | [Xe]4f ¹² | - |
| ⁷⁰ Yb | [Xe]4f ¹⁴ 6s ² | [Xe]4f ¹⁴ | [Xe]4f ¹³ | - |
| ⁷¹ Lu | [Xe]4f ¹⁴ 5d ¹ 6s ² | - | [Xe]4f ¹⁴ | - |

Tableau 52: Effet du Ln^{+3} sur la réaction d'aldol, constantes d'hydrolyse et d'échange de molécule d'eau dans la sphère de coordination du métal.³⁵

| $\text{Ln}(\text{OTf})_3$ | Rendement (%) | pK_h | WERC |
|---------------------------|---------------|---------------|------------------|
| La^{3+} | 80 | 8,5 | $2,1 \cdot 10^8$ |
| Ce^{3+} | 81 | 8,3 | $2,7 \cdot 10^8$ |
| Pr^{3+} | 83 | 8,1 | $3,1 \cdot 10^8$ |
| Nd^{3+} | 78 | 8,0 | $3,9 \cdot 10^8$ |
| Sm^{3+} | 85 | 7,9 | $5,9 \cdot 10^8$ |
| Eu^{3+} | 88 | 7,8 | $6,5 \cdot 10^8$ |
| Gd^{3+} | 90 | 8,0 | $6,3 \cdot 10^7$ |
| Tb^{3+} | 81 | 7,9 | $7,8 \cdot 10^7$ |
| Dy^{3+} | 85 | 8,0 | $8,0 \cdot 10^7$ |
| Ho^{3+} | 89 | 8,0 | $8,0 \cdot 10^7$ |
| Er^{3+} | 86 | 7,9 | $7,9 \cdot 10^7$ |
| Tm^{3+} | 85 | 7,7 | $7,7 \cdot 10^7$ |
| Yb^{3+} | 92 | 7,7 | $7,7 \cdot 10^7$ |
| Lu^{3+} | 84 | 7,5 | $7,6 \cdot 10^7$ |

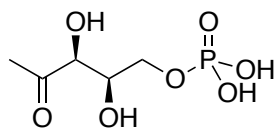
Librairie de molécules

Cette partie regroupe par chapitre les principales molécules discutées au cours de ce manuscrit de thèse.

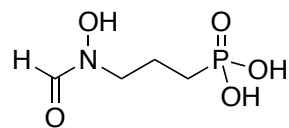
Table des matières

| | |
|--|------------|
| A. Etude structurale de la DXR..... | 446 |
| B. Etude comparative des interactions de plusieurs inhibiteurs de la DXR chez trois organismes..... | 446 |
| C. Etudes computationnelles d'analogues phosphates d'inhibiteurs de la DXR | 447 |
| D. Conception d'inhibiteurs potentiels de la DXR de type bisubstrat et biligand | 447 |
| D.1 Approche bisubstrat..... | 447 |
| D.2 Approche biligand | 448 |
| E. Etudes d'affinités et synthèses de potentiels inhibiteurs de la DXR de type α,α-difluoro phosphonate..... | 451 |
| E.1 Etudes d'affinités computationnelles | 451 |
| E.2 Synthèses organiques..... | 452 |
| <i>E.2.1 Introduction successive des atomes de fluor.....</i> | <i>452</i> |
| <i>E.2.2 Introduction directe des deux atomes de fluor : 1^{ère} tentative.....</i> | <i>452</i> |
| <i>E.2.3 Introduction directe des deux atomes de fluor : 2^{ème} tentative.....</i> | <i>453</i> |
| F. Synthèse d'un analogue époxyde du désoxy-D-xylulose 5-phosphate | 454 |
| F.1 Première approche de synthèse de l'analogue époxyde | 454 |
| F.2 Seconde approche de synthèse de l'analogue époxyde | 454 |
| G. Développement d'une méthode de synthèse des D- et L- glycéraldéhyde 3-phosphates énantiomériquement purs..... | 455 |

A. Etude structurale de la DXR

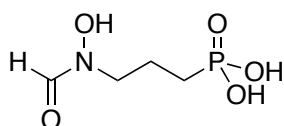


DXP 14

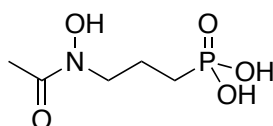


Fom 33

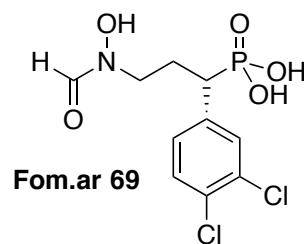
B. Etude comparative des interactions de plusieurs inhibiteurs de la DXR chez trois organismes



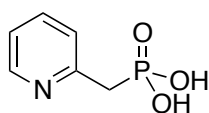
Fom 33



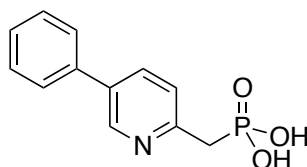
Fr 34



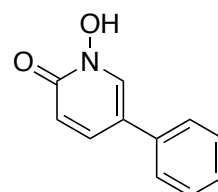
Fom.ar 69



Pyr 70

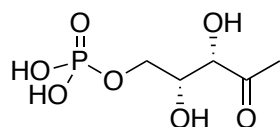


Pyr.ar 71

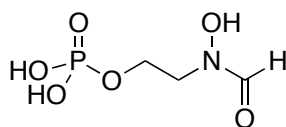


Lip.ar 72

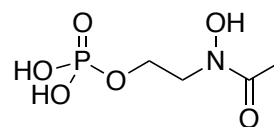
C. Etudes computationnelles d'analogues phosphates d'inhibiteurs de la DXR



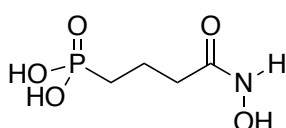
DXP 14



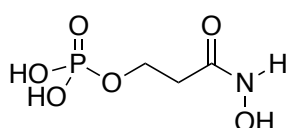
Fosfoxacine 40



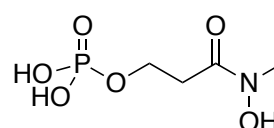
N-Me fosfoxacine 41



HX 77



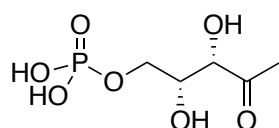
HX-phos 76



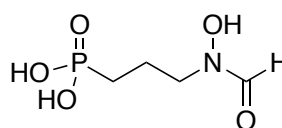
N-Me HX-phos 45

D. Conception d'inhibiteurs potentiels de la DXR de type bisubstrat et biligand

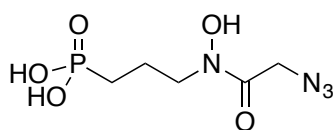
D.1 Approche bisubstrat



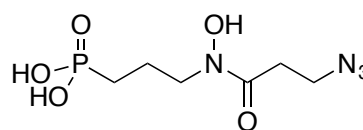
DXP 14



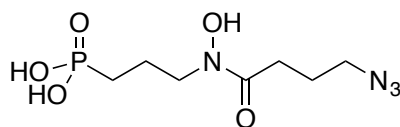
Fom 33



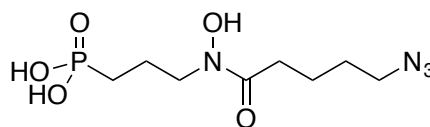
Azo1 83



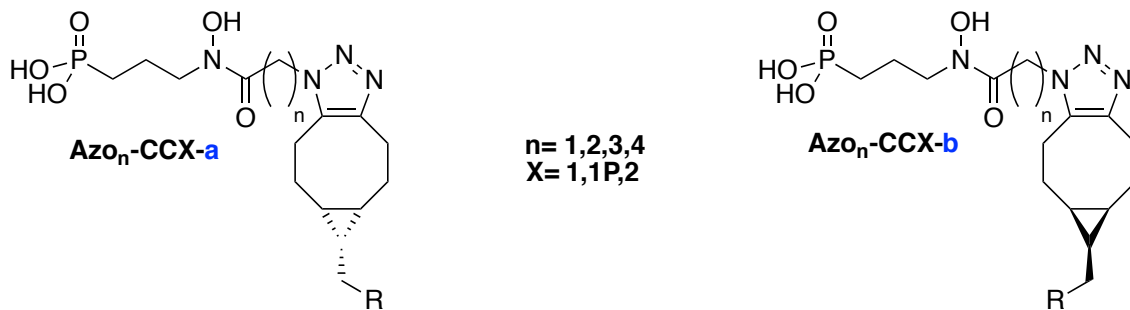
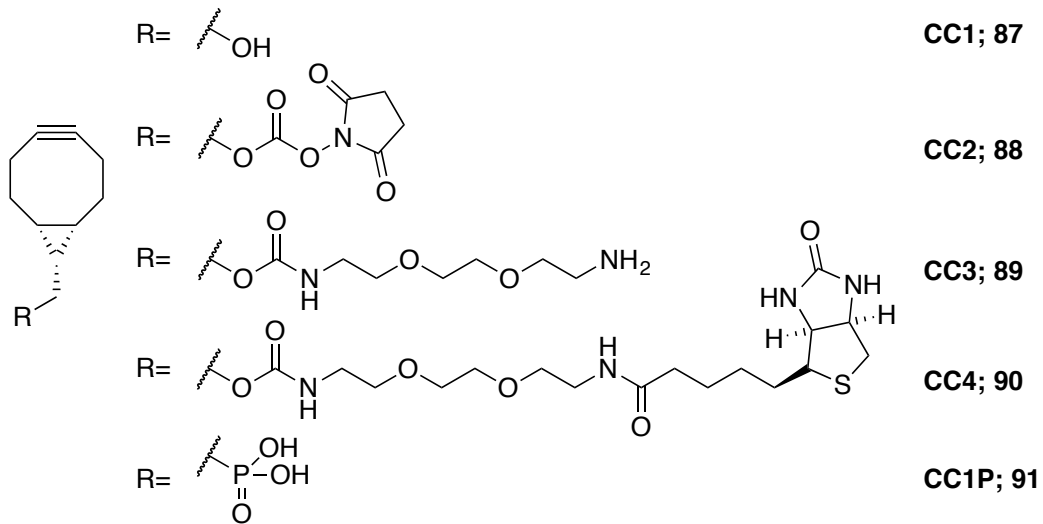
Azo2 84



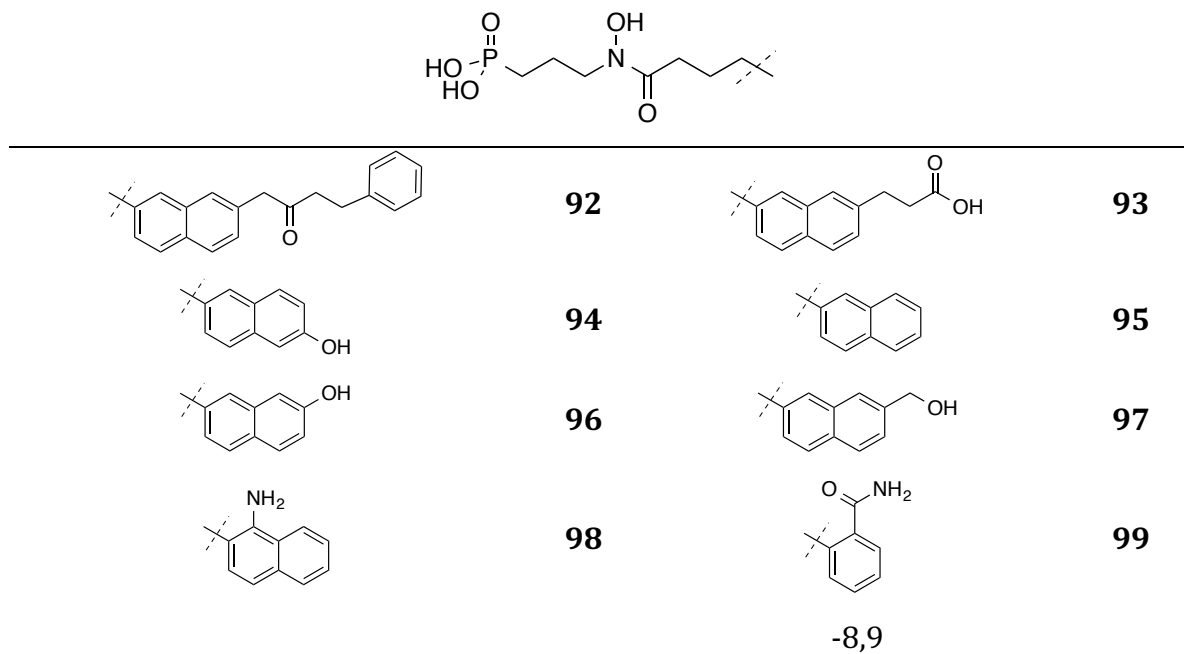
Azo3 85

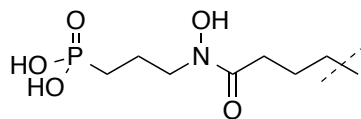


Azo4 86

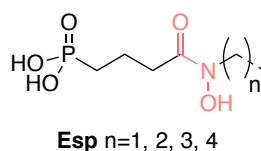
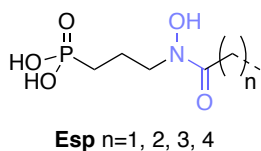
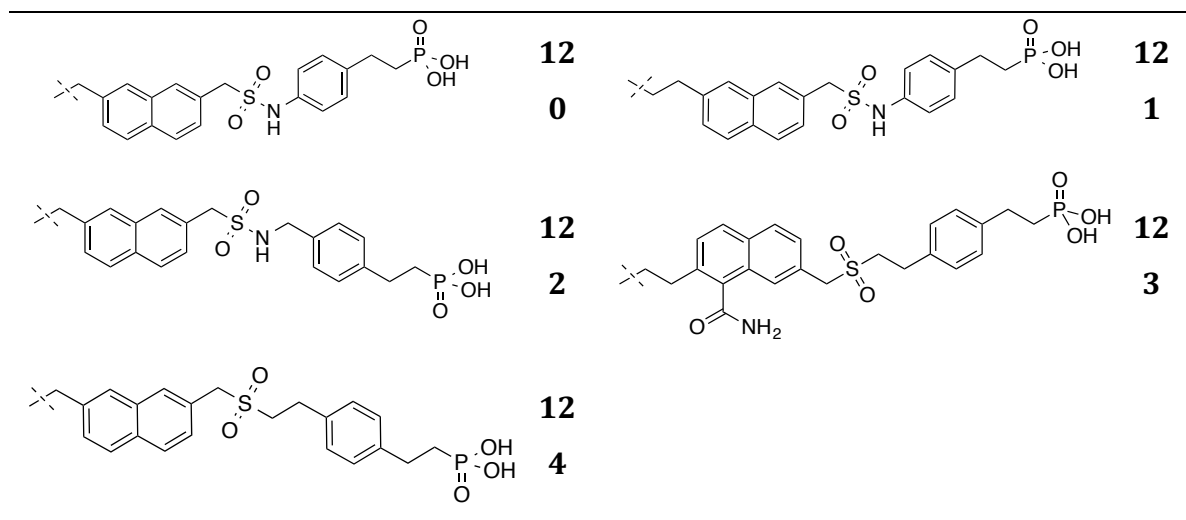
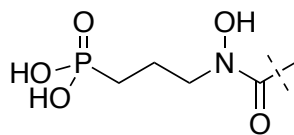


D.2 Approche biligand

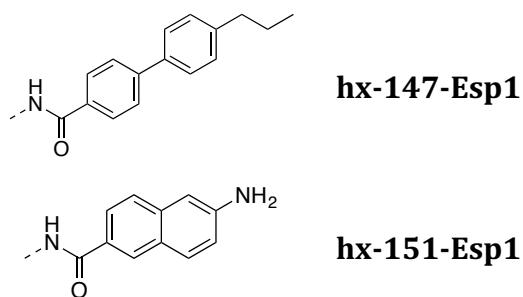
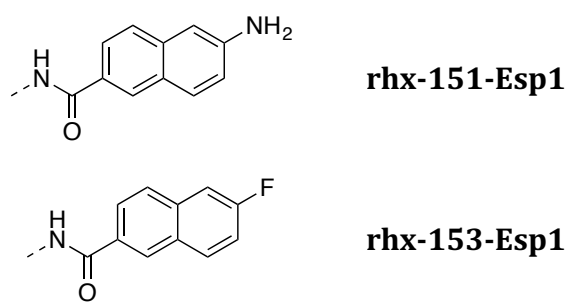




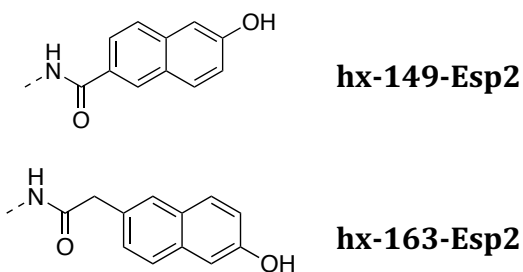
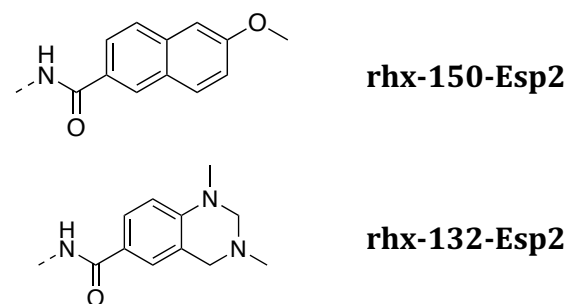
| | | | |
|--|------------|--|------------|
| | 100 | | 101 |
| | 102 | | 103 |
| | 104 | | 105 |
| | 106 | | 107 |
| | 108 | | 109 |
| | 110 | | 111 |
| | 112 | | 113 |
| | 114 | | 115 |
| | 116 | | 117 |
| | 118 | | 119 |

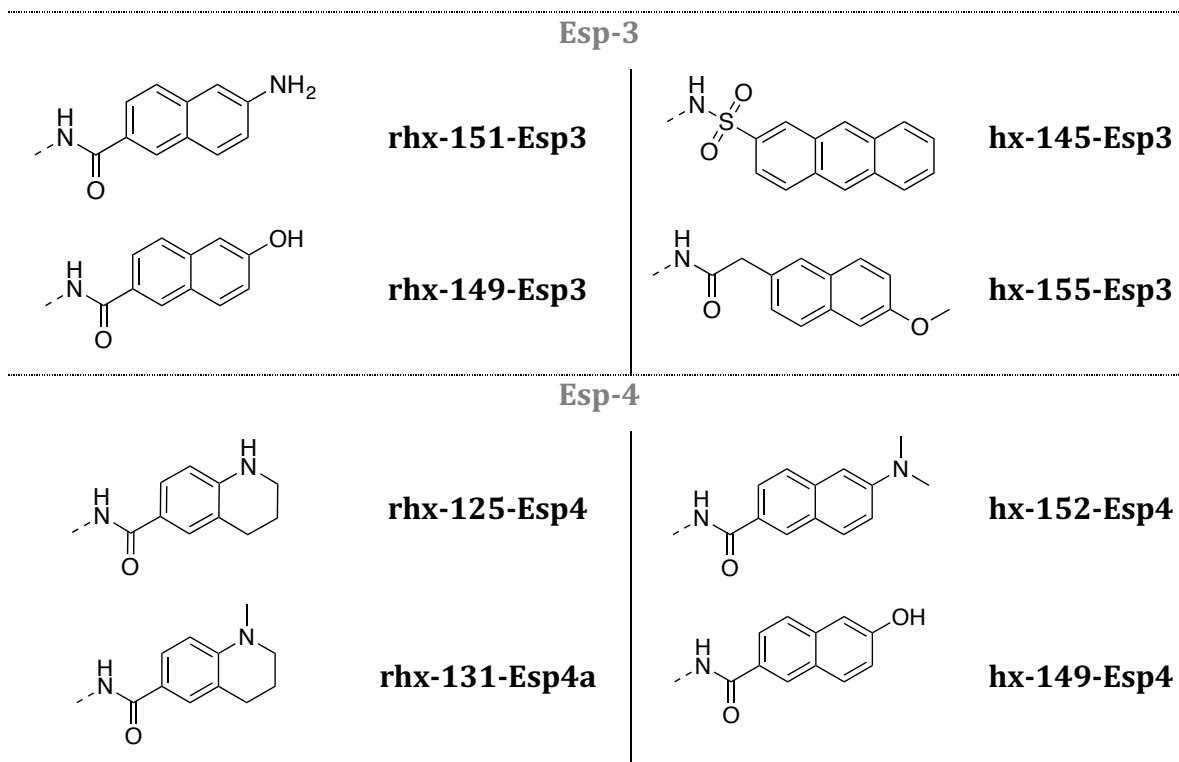


Esp-1



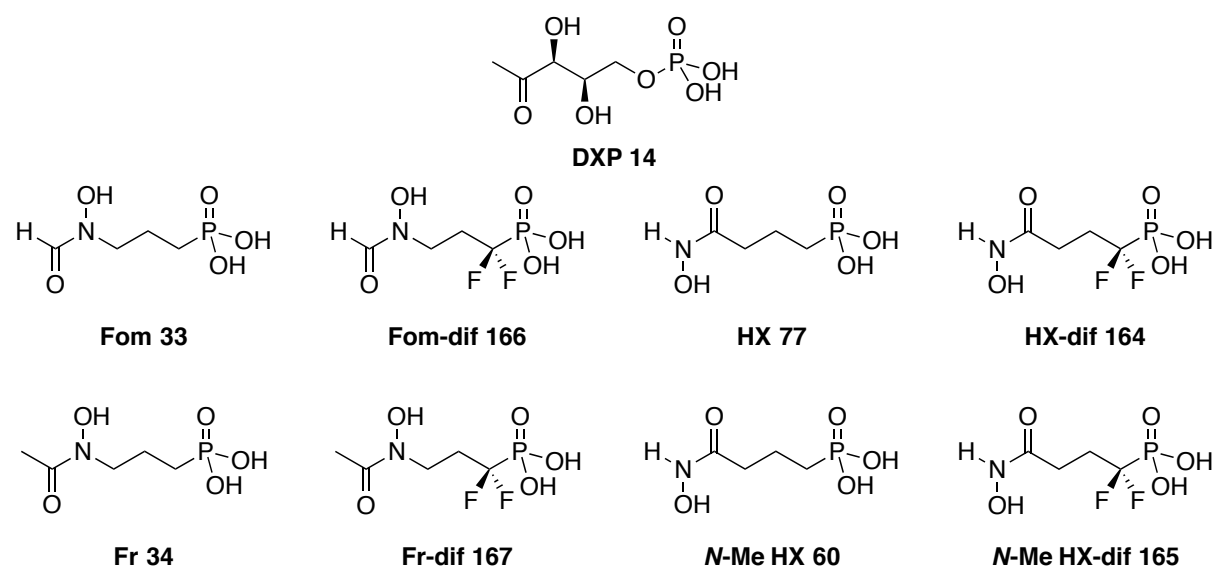
Esp-2





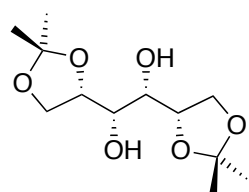
E. Etudes d'affinités et synthèses de potentiels inhibiteurs de la DXR de type α,α -difluoro phosphonate

E.1 Etudes d'affinités computationnelles

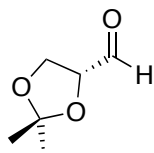


E.2 Synthèses organiques

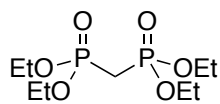
E.2.1 Introduction successive des atomes de fluor



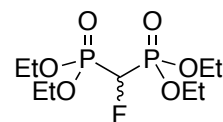
168



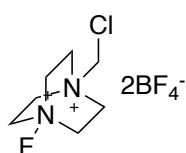
171



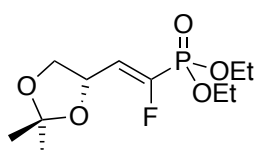
172



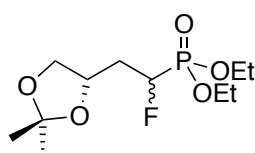
173



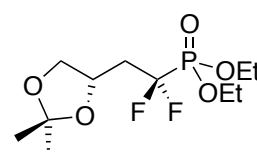
Selectfluor™



174

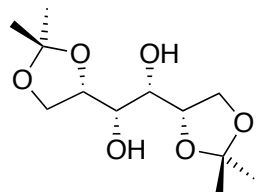


169

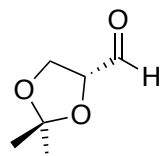


170

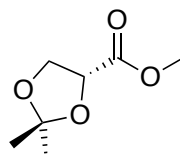
E.2.2 Introduction directe des deux atomes de fluor : 1^{ère} tentative



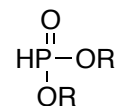
168



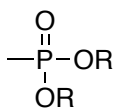
171



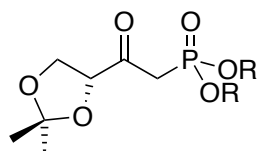
177



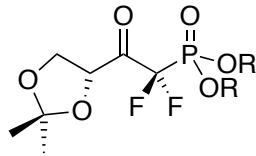
178-a, R= OEt
178-b, R= OBn



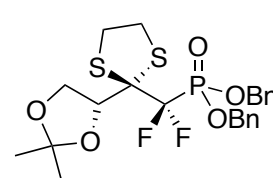
179-a, R= OEt
179-b, R= OBn



175-a, R= OEt
175-b, R= OBn



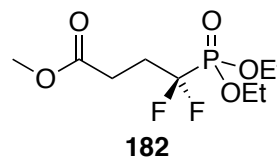
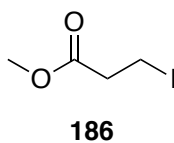
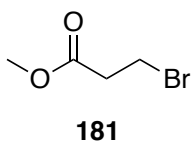
176-a, R= OEt
176-b, R= OBn



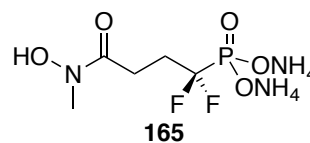
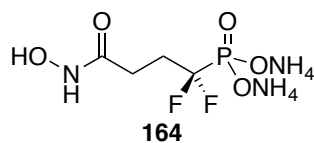
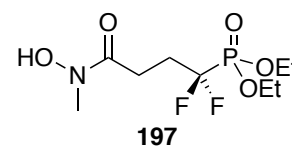
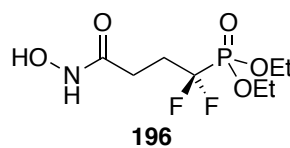
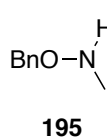
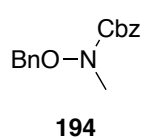
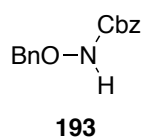
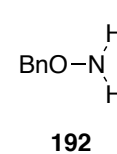
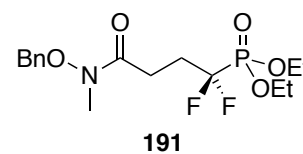
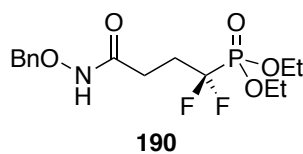
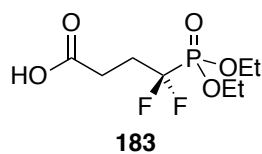
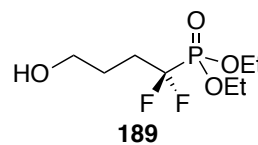
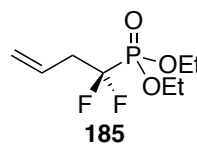
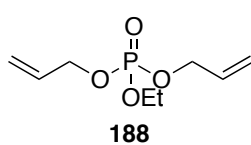
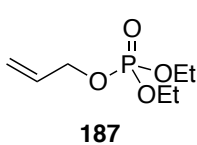
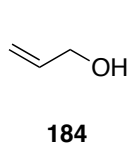
180

E.2.3 Introduction directe des deux atomes de fluor : 2^{ème} tentative

E.2.3.1 Voie A

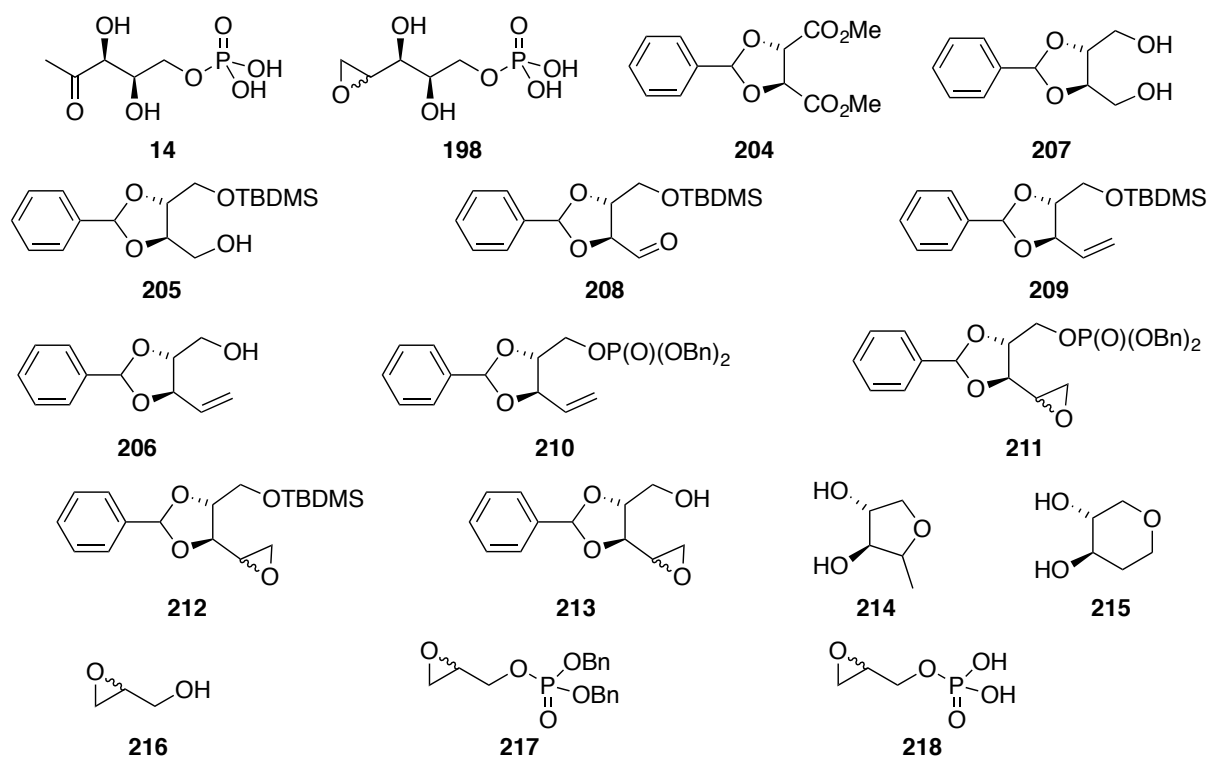


E.2.3.1 Voie B

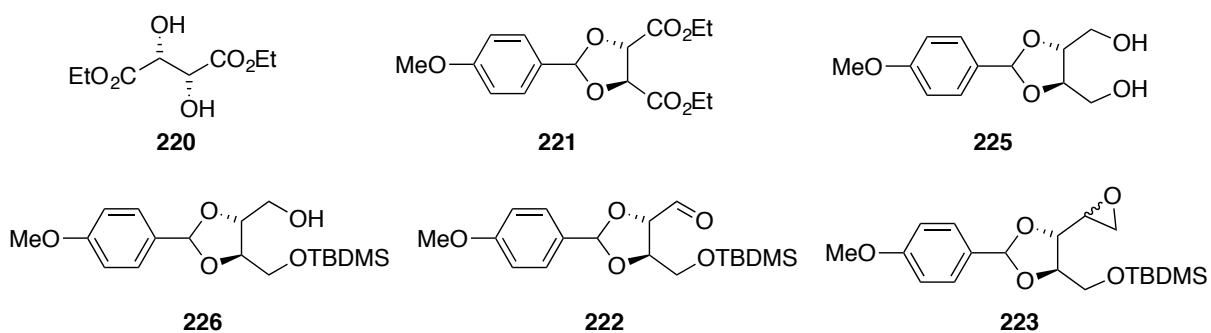


F. Synthèse d'un analogue époxyde du désoxy-D-xylulose 5-phosphate

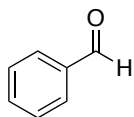
F.1 Première approche de synthèse de l'analogue époxyde



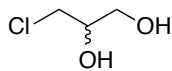
F.2 Seconde approche de synthèse de l'analogue époxyde



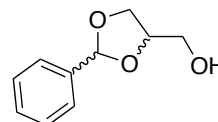
G. Développement d'une méthode de synthèse des D- et L-glycéraldéhyde 3-phosphates énantiomériquement purs



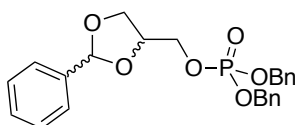
250



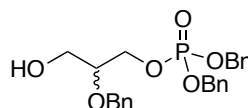
251



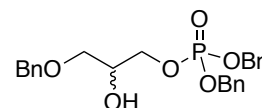
252



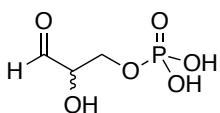
253



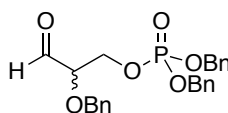
249



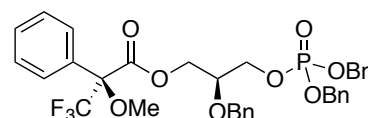
254



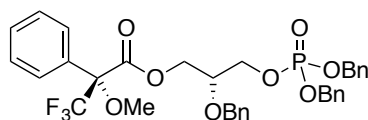
DL-13



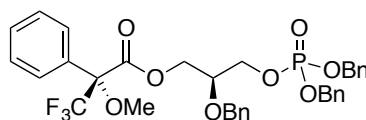
255



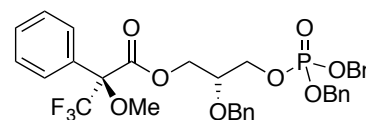
S,S-256



R,R-256



S,R-256



R,S-256

