UNIVERSITE DE STRASBOURG

THESE

Présentation en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

par

Jeanne TOULOUSE

Biosynthèse des isoprénoïdes bactériens : Inhibiteurs potentiels de la désoxyxylulose phosphate synthase et caractérisation des étapes de réduction dans la formation des hopanoïdes

Soutenue le 1er Avril 2011 devant les membres du jury

Dr Richard Robins	Rapporteur Externe
Pr Albert Boronat	Rapporteur Externe
Pr. Serge Neunlist	Examinateur
Pr Daniel Uguen	Examinateur
Dr Denis Tritsch	Co-Directeur de Thèse
Pr Michel Rohmer	Directeur de Thèse

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

Monsieur le Professeur Michel Rohmer pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour ses nombreuses discussions et pour l'attention, l'aide et la confiance dont il a fait preuve durant ces années de thèse.

Monsieur le Docteur Denis Tritsch pour avoir fait les tests biologiques sur la DXS, pour ses conseils, pour son aide quotidienne, son écoute attentive et sa grande sympathie.

Monsieur le Directeur de recherche Richard Robins, ainsi que Messieurs les Professeurs Daniel Uguen, Albert Boronat et Serge Neunlist, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie la région Alsace pour le soutien financier dont j'ai pu bénéficier durant ces trois années.

Merci au Pr. A. Boronat pour le plasmide pTAC-ORF2, contenant le gène codant pour la DXS d'*E. coli*, qui nous a permis de surexprimer la DXS et de réaliser nos tests enzymatiques.

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

Merci au Dr. Anne Bodlenner et au Dr. Jamie Cote pour leurs précieux conseils, leur sympathie, leur amitié et leurs encouragements. Merci à mes camarades et collègues de travail au sein du laboratoire : Myriam S., Philippe C., Magali P., Catherine G-B., Huguette D., Wenjun L., Anh-Thu N., Clément G., Erasmienne N., Thomas C., Nicolas, C., Grégory H., Fanny K., Jessica L. pour nos nombreuses discussions et les bons moments partagés ensemble.

Je remercie aussi tous mes amis, et surtout Rémi (fillot), pour son soutien sans limite à toute heure et pour tous ces bons moments mémorables.

Je remercie mes parents pour leur aide, leur soutien, leur encouragement et particulièrement mon père pour s'être occupé de mes bactéries (« *Zymomo* ») quand je ne pouvais pas.

Abréviations

Ac :	acétyle
ATP :	adénosyltriphosphate
AcOEt :	acétate d'éthyle
CCM :	chromatographie sur couche mince
CDP-ME :	4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate
DAF :	5-déazaflavine
DMAPP :	diphosphate de diméthylallyle
DMSO :	diméthyl sulfoxyde
DTT :	dithiothréitol
DX :	1-désoxy-D-xylulose
DXP :	1-désoxy-D-xylulose 5- phosphate
DXR :	1-désoxy-D-xylulose 5- phosphate réductoisomérase
DXS :	1-désoxy-D-xylulose 5- phosphate synthase
Et_2O :	diéthyle éther
FMN :	flavine mononucléotide
GAP :	glycéraldéhyde 3-phosphate
GcpE :	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase
HMBPP :	(*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle
HSQC :	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IBX :	acide *o*-iodobenzoïque
IC_{50} :	concentration en inhibiteur qui diminue de 50 % l'activité de l'enzyme
IPP :	diphosphate d'isopentényle
IPTG :	isopropyl β-D-thiogalactoside
J :	constante de couplage (Hertz)
K_i :	constante d'inhibition
K_m :	constante d'affinité d'une enzyme pour un substrat
LDH :	lactate déshydrogénase
LytB :	4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate réductase
MECDP :	2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate
MEP :	2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate

MVA : mévalonate

$NAD(P)^+$: nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)

NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit

2P-CDP-ME : 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol

PMSF : fluorure de phénylméthanesulfonyle

R_f : rapport frontal

RMN : résonance magnétique nucléaire

SAM : *S*-adénosylméthionine

SM : spectrométrie de masse

t.a : température ambiante

TBAF : fluorure de tétrabutylammonium

TFA : acide trifluoroacétique

THF : tétrahydofurane

TMS : triméthylsilyle

TMS (RMN) : tétraméthylsilane

TPP : diphosphate de thiamine

UV : ultraviolet

YchB : 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol kinase

YgbB : 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase

YgbP : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyltransférase

Introduction générale 1

I) Les microorganismes 2

1) Généralités 2

2) Les microorganismes pathogènes 4

3) Moyens de lutte contre les microorganismes pathogènes 4

II) Biosynthèse des isoprénoïdes, cible potentielle pour la mise au point de nouveaux antimicrobiens 9

1) Les isoprénoïdes 9

2) La voie du mévalonate 14

3) La voie du 2-*C*-méthyl-D-érithritol 4-phosphate 15

a) Etape catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 17

b) Etape catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase 18

c) Etape catalysée par YgbP 20

d) Etape catalysée par YchB 21

e) Etape catalysée par YgbB 21

f) Etape catalysée par GcpE 22

g) Etape catalysée par LytB 23

4) Distribution de la voie du mévalonate et de la voie du MEP 25

III) Objectifs de la thèse 29

Bibliographie 31

Chapitre 1. Synthèse d'inhibiteurs potentiels de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)

I) La 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) 35

II) Analogues de pyruvate accepteurs de Michael 40

1) Les acides benzylidènepyruviques 40

a) Introduction 40

b) Synthèse des acides benzylidènepyruviques 41

c) Conclusion 44

2) L'acide 2-oxo-3-butynoïque 45

a) Introduction 45

b) Synthèse de l'acide 2-oxo-3-butynoïque 46

c) Conclusion 49

3) L'acide 2-oxo-3-buténoïque 49

a) Introduction 49

b) Synthèse de l'acide 2-oxo-3-buténoïque 50

c) Conclusion 52

III) Analogues phosphorés du pyruvate 53

1) Introduction 53

2) Synthèse de l'acétylphosphinate 53

3) Tentative de synthèse de l'acétylméthylphosphinate 55

4) Conclusion 56

IV) Analogues di- et trihalogénés du pyruvate 57

1) Introduction 57

2) Synthèses 58

3) Conclusion 60

V) Bilan 60

Partie Expérimentale 61

Bibliographie 82

Chapitre 2. Evaluation des propriétés inhibitrices des composés synthétisés sur la DXS

I) Les différents types d'inhibitions 86

II) Tests d'activité de la DXS 91

III) Tests enzymatiques de la DXS 93

1) Méthode utilisée 93

2) Tests d'inhibition de la DXS 96

a) Cinétique de la DXS 96

b) Détermination du K_m du pyruvate vis-à-vis de la DXS 97

3) Inhibition de la DXS 98

a) Test des accepteurs de Michael 99

(i) Dérivés de l'acide benzylidènepyruvique *99*

(ii) Acide 2-oxo-3-butynoïque et acide 2-hydroxy-3-buténoïque *101*

b) Analogue phosphoré du pyruvate 101

c) Analogues tri- et dihalogénés du pyruvate 102

4) Inactivation 104

IV) Conclusion 108

Partie Expérimentale 110

Bibliographie 115

Chapitre 3. Mise en évidence des étapes de réduction de la biosynthèse des hopanoïdes chez *Zymomonas mobilis*

I) Introduction 117

II) Incorporation de [1-^{2}H]glucose dans les hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* 127

1) Marquage au deutérium attendu 127

2) Incorporation de [4-^{13}C]glucose 130

a) Analyse du spectre ^{13}C 132

b) Analyse du spectre HSQC 136

c) Conclusion de l'incorporation du [4-^{13}C]glucose 142

3) Incorporation de [2-^{13}C]glucose 143

a) Analyse du spectre ^{13}C 144

b) Conclusion de l'incorporation du [2-^{13}C]glucose 146

4) Incorporation de [3-^{13}C]glucose 147

a) Analyse du spectre ^{13}C 148

b) Conclusion de l'incorporation du [3-^{13}C]glucose 150

5) Incorporation de [5-^{13}C]glucose 151

a) Analyse du spectre ^{13}C 153

b) Conclusion de l'incorporation du [5-^{13}C]glucose 155

6) Incorporation de [6-^{13}C]glucose 157

a) Analyse du spectre ^{13}C 158

b) Conclusion de l'incorporation du [6-^{13}C]glucose 159

III) Bilan 160

Partie Expérimentale 167

Bibliographie 171

Conclusion générale 172

Annexes 175

Annexe 1. Spectre de RMN ^{13}C de l'acétae de bishomohopanol obtenu à partir des hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* après incorporation du [2-^{13}C]glucose 176

Annexe 2. Spectre de RMN ^{13}C de l'acétate de bishomohopanol obtenu à partir des hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* après incorporation du [3-^{13}C]glucose 190

Annexe 3. Spectre de RMN ^{13}C de l'acétate de bishomohopanol obtenu à partir des hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* après incorporation du [4-^{13}C]glucose 203

Annexe 4. Spectre de RMN ^{13}C de l'acétate de bishomohopanol obtenu à partir des hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* après incorporation du [4-^{13}C]glucose 214

Annexe 5. Spectre de RMN ^{13}C de l'acétate de bishomohopanol obtenu à partir des hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* après incorporation du [6-^{13}C]glucose 227

Introduction générale

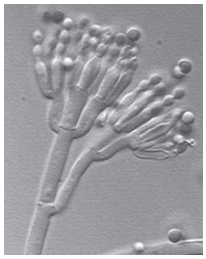
I) Les microorganismes

1) Généralités

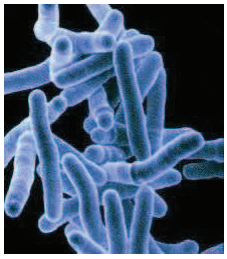
Les microorganismes sont des êtres vivants invisibles à l'œil nu, unicellulaires ou pluricellulaires. Dans ce dernier cas, les cellules ne sont pas différenciées en tissus. Ils ne sont observables qu'à l'aide d'un microscope.

Parmi ces organismes figurent à la fois des procaryotes et des eucaryotes.

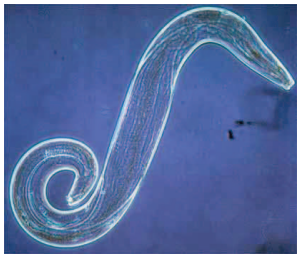
- Les procaryotes possèdent une organisation simple sans noyaux, ni organites. Ils sont haploïdes et ne possèdent qu'un seul chromosome. Parmi eux se trouvent les eubactéries ou bactéries « vraies » (Figure 1) de formes variées, comportant un seul chromosome de forme circulaire. Les archébactéries ou archées représentent un groupe à part, qui comporte des critères métaboliques (structure lipidique de la membrane cellulaire,[1] absence de peptidoglycane dans la paroi cellulaire, protéines participant à la réplication de l'ADN ressemblant à celle des eucaryotes[2]) permettant d'occuper des niches écologiques particulières
- Les eucaryotes sont des organismes complexes dont les cellules comportent de nombreux organites et un noyau entouré d'une membrane. Ils sont diploïdes à 2n chromosomes. Ils comportent certaines algues unicellulaires, les protozoaires, les champignons inférieurs et les levures (Figure 1).



Champignon
Penicillium sp.



Bactérie
Mycobacterium tuberculosis



Protozoaire
Plasmodium falciparum

Figure 1 : Exemples de microorganismes.

Les microorganismes peuvent se trouver dans tous types d'environnement, parfois hostiles. En effet, certaines bactéries et archébactéries, appelées extrémophiles, vivent dans des environnements tels que les pôles, les geysers ou dans les profondeurs marines. Il existe des organismes thermophiles (qui vivent à des températures élevées avoisinant 100°C), des psychrophiles (qui vivent à des températures basses proches de 0°C), des barophiles (qui vivent sous de fortes pressions), les acidophiles (qui vivent à des pH très acides) et des halophiles (qui vivent dans des milieux à forte concentration en sels).

Ces microorganismes sont présents dans les sols et dans les eaux, réalisant des transformations chimiques par dégradation ou synthèse de composés organiques. Dans le sol, la décomposition de la fraction organique aboutit à des composés minéraux tels que le gaz carbonique et l'ammoniaque. Quant au milieu maritime, les algues unicellulaires et les cyanobactéries convertissent le dioxyde de carbone et les substances minérales en matière organique par photosynthèse avec le concours de l'énergie solaire. Leurs capacités à dégrader et à synthétiser les matières organiques et à utiliser les matières minérales leur donnent un rôle en termes de dépollution des eaux surchargées en carbone, azote et phosphore. Dans les fonds marins, il n'y a pas de lumière. Les microorganismes dépendent donc d'une autre source d'énergie : la chimiosynthèse. On trouve ces microorganismes non seulement sur les cheminées des sources chaudes mais aussi dans leur panache noir (à l'intérieur de particules en suspension) et même dans les tissus de certains invertébrés habitués des lieux. Ces bactéries réduisent le dioxyde de carbone en absence de lumière en oxydant les molécules de sulfure d'hydrogène rejetées par les sources hydrothermales, en soufre élémentaire. De cette réaction, elles tirent de l'énergie et un pouvoir réducteur qu'elles utilisent pour fixer le dioxyde de carbone et ainsi fabriquer les molécules organiques indissociables de la vie.

Les bactéries sont également présentes chez l'homme sur la peau et les muqueuses et constituent en majorité la flore normale ou résidente. Les microorganismes (bactéries, levures, champignons inférieurs) peuvent aussi être utilisés dans différents domaines tel que le secteur alimentaire dans les processus de fermentation lors de la fabrication de fromages ou dans la boulangerie. Certains servent, après modification par génie génétique, à la synthèse de molécules à visée thérapeutique (insuline, vaccins contre l'hépatite B).

2) Les microorganismes pathogènes

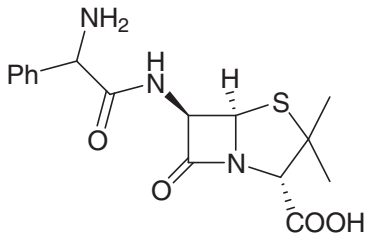
Certains microorganismes peuvent être pathogènes et vont infecter leur hôte, provoquant de nombreuses maladies. Les bactéries peuvent être à l'origine de maladies graves : *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose), *Neisseria meningitidis* (méningite), *Mycobacterium leprae* (lèpre), *Yersinia pestis* (peste) et *Vibrio cholerae* (choléra). D'autres microorganismes, tels que les protozoaires sont responsables de maladies parasitaires : (*Plasmodium falciparum*) agent du paludiusme qui selon l'OMS touche 40% de la population mondiale. On peut citer également le trypanosome *Trypanosoma brucei*, responsable de la maladie du sommeil. Les champignons et les levures peuvent également être préjudiciables aux organismes humains : la levure *Candida albicans* qui provoque des mycoses (candidoses) et *Aspergillus fumigatus*, qui localisé dans les poumons de personnes immunodéprimées, entraîne des aspergilloses invasives.

Ces microorganismes pathogènes sont très nombreux et possèdent une extraordinaire capacité d'adaptation à leur environnement. Etant source de diverses pathologies plus ou moins graves, il est important de développer des moyens efficaces de lutte contre eux.

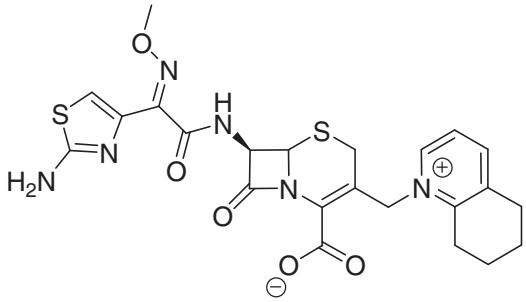
3) Moyens de lutte contre les microorganismes pathogènes

Au siècle précédent, de nouvelles molécules sont apparues montrant leur efficacité antimicrobienne. Ces composés peuvent être obtenus à partir de plantes, par fermentation ou par synthèse. Ils diffèrent par leurs modes d'action.

Les β-lactames (Figure 2), tels que les pénicillines (ex : **ampicilline**) et les céphalosporines (ex : **cefquinome**), empêchent la formation de la paroi bactérienne par inhibition des trans-peptidases, impliquées dans la réticulation de cette paroi[3,4]. D'autres molécules agissent sur la synthèse des précurseurs des peptidoglycanes ou interfèrent sur le transport de ces précurseurs.



Ampiciline



Cefquinome

Figure 2 : Exemple de β-lactames ciblant la paroi bactérienne.

La **bacitracine** (Figure 3) interfère sur le transfert des précurseurs du peptidoglycane par complexation avec l'undécaprényl pyrophosphate, lipide porteur d'unités sucre-peptide, qui permet le transport vers la membrane plasmique.[5] Elle inhibe la déphosphorylation de l'undécaprényl pyrophosphate, essentiel pour la régénération du lipide porteur, qui est nécessaire à la synthèse du peptidoglycane.[6] Les glycopeptides (ex : **vancomycine,** Figure 3) se lient aux résidus D-Ala-D-Ala du peptidoglycane en cours de synthèse et empêchent l'action des transglycosylases La **fosfomycine** (Figure 3) bloque la synthèse de l'acide N-acétylmuraminique, un des constituants du peptidoglycane, entraînant la mort de la bactérie.[7,8]

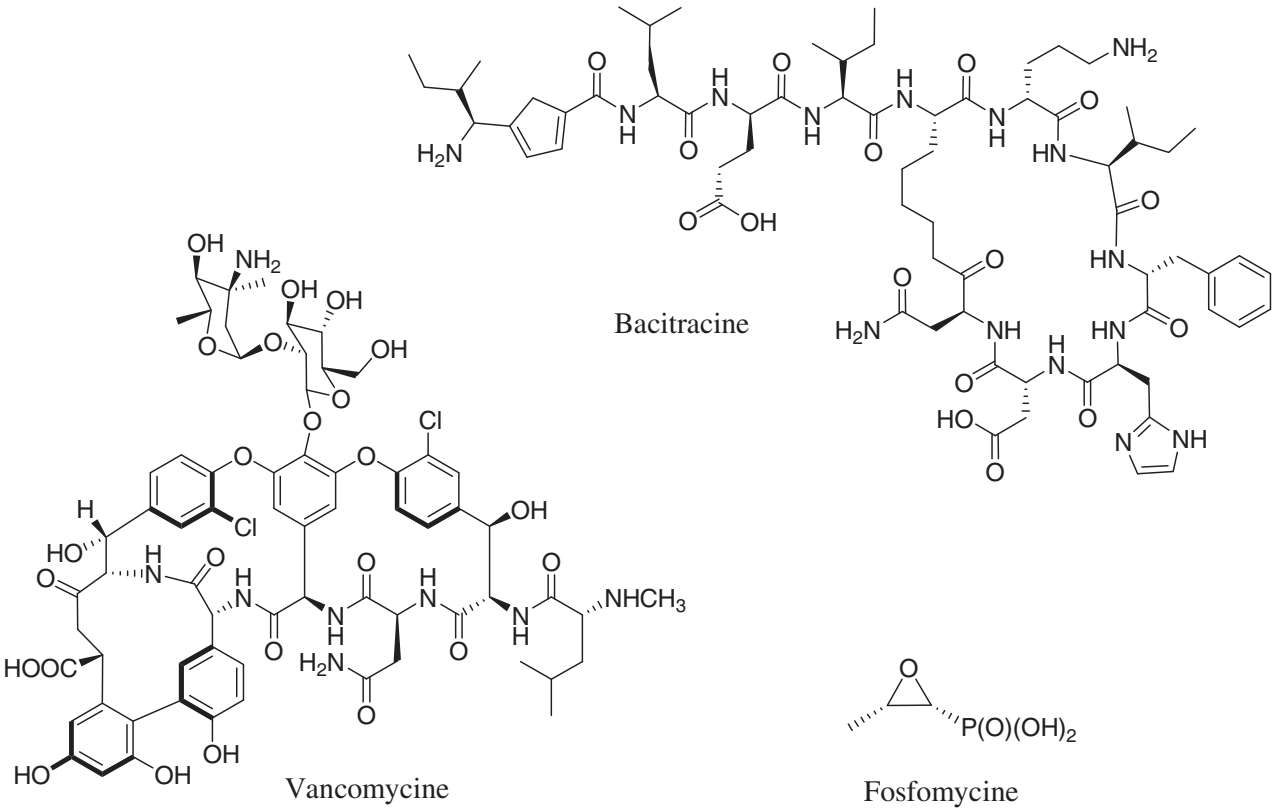


Figure 3 : Molécules agissant sur la paroi bactérienne et ses précurseurs.

Les polymyxines (**polymyxine B,** Figure 4) sont des antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique par perturbation de la structure et de la fonction de cette membrane.[9] Elles possèdent un cycle peptidique et une chaîne hydrophobe qui lui permettent d'interagir à la fois avec les lipopolysaccharides et les phospholipides.

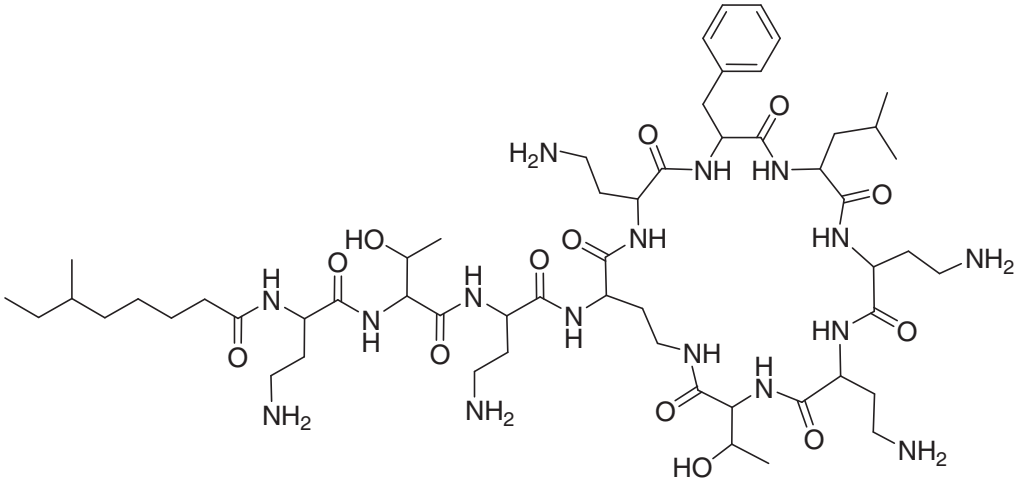
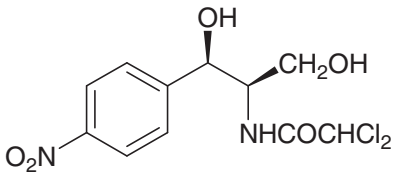
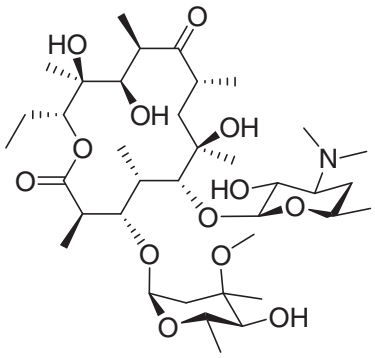


Figure 4 : Polymyxine C

D'autres classes d'antibiotiques ciblent la synthèse protéique en se fixant sur une sous-unité du ribosome et introduisent des erreurs dans la lecture du code génétique. La synthèse de certaines de ces protéines va être stoppée ou d'autres protéines synthétisées ne seront pas utilisables par les microorganismes. Les phénicols (**chloramphénicol**, Figure 5) et les macrolides (**érythromycine**, Figure 5) vont venir se fixer sur la sous unité 50S du ribosome et ainsi bloquer l'élongation de la chaîne peptidique.[10,11]



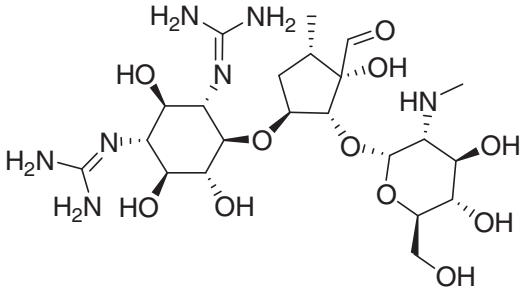
Chloramphénicol



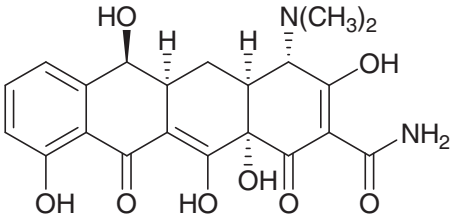
Erythromycine

Figure 5 : Molécules agissant sur la sous unité 50S du ribosome.

Les cyclines (**tétracycline,** Figure 6) et les aminosides (**streptomycine,** Figure 6) se fixent quant à elles, sur l'unité 30S, provoquant des erreurs de lecture qui rendent les protéines inutilisables.[12,13]



Streptomycine



Tétracycline

Figure 6 : Molécules agissant sur la sous unité 30S du ribosome.

Certains antibiotiques jouent un rôle dans la synthèse de l'ADN du microorganisme. Les **sulfamides** (Figure 7) empêchent la synthèse de l'ADN par inhibition de la synthèse de l'acide folique, un des cofacteurs nécessaire à la formation de la thymine.[14] Les quinolones (**ciprofloxacine**, Figure 7) ciblent l'ADN gyrase et la topoisomérase II et IV, empêchant la réplication de l'ADN bactérien. La **mitomycine C** (Figure 7) se fixe sur les brins de l'hélice d'ADN et établit un pontage entre eux,[15] ce qui empêche la réplication de l'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase. Cette molécule est utilisée principalement comme anticancéreux. La **pentamidine** (Figure 7) quant à elle, tue le trypanosome, protozoaire responsable de la maladie du sommeil, par liaison avec son ADN.[16] D'autres études ont montré qu'elle pouvait aussi se lier avec le tARN, entraînant ainsi des modifications de sa structure secondaire.[17]

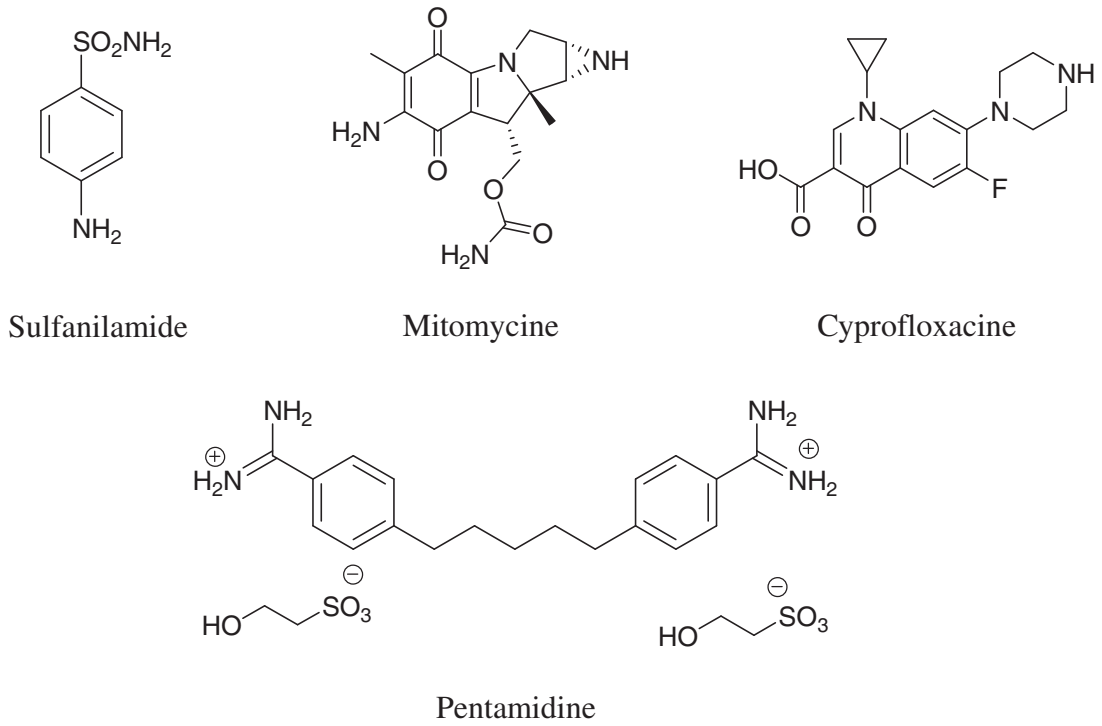


Figure 7 : Molécules agissant sur l'ADN et sa synthèse.

Actuellement de nombreux médicaments antimicrobiens sont sur le marché, mais le développement de souches résistantes diminue leur efficacité. C'est l'utilisation trop fréquente et/ou à dose inadaptée qui est à l'origine du développement de la résistance de certains microorganismes.[18,19] Parmi ces mécanismes,[20] nous notons l'inactivation de l'antibiotique par des enzymes. Ainsi les β-lactames sont éliminés par hydrolyse de la fonction lactame par

des β-lactamases. La survie du microorganisme en présence d'un antibiotique peut être assurée par un autre mécanisme qui consiste en la modification de la cible visée par le médicament. Il est aussi possible pour les bactéries de réduire le nombre de leurs porines et donc de diminuer leur perméabilité membranaire. Par exemple la fosfomycine et la fosmidomycine qui entrent dans la cellule bactérienne via le transporteur du glycérol 3-phosphate, glpT, ne sont plus efficaces chez certaines souches résistantes à cause de la modification de ce transporteur. Enfin, l'antibiotique peut être éliminé par un système de pompe transmembranaire permettant de garder la concentration cellulaire en antibiotique en dessous de la concentration toxique.[21]

Puisque les médicaments classiques perdent leur efficacité, il est donc nécessaire de développer de nouvelles alternatives thérapeutiques jusqu'à présent peu exploitées, en ciblant par exemple la synthèse des isoprénoïdes.

II) Biosynthèse des isoprénoïdes, cible potentielle pour la mise au point de nouveaux antimicrobiens

1) Les isoprénoïdes

Les isoprénoïdes constituent une vaste famille de substances naturelles,[22] dont le squelette carboné est constitué d'un assemblage de sous-unités à cinq atomes de carbone qui sont formellement dérivées de l'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène) **1** (Figure 8). Ces composés se trouvent dans tous les êtres vivants (animaux, végétaux, algues, champignons et microorganismes) et possèdent des structures, des propriétés physiques et chimiques, ainsi que des activités biologiques très diverses.

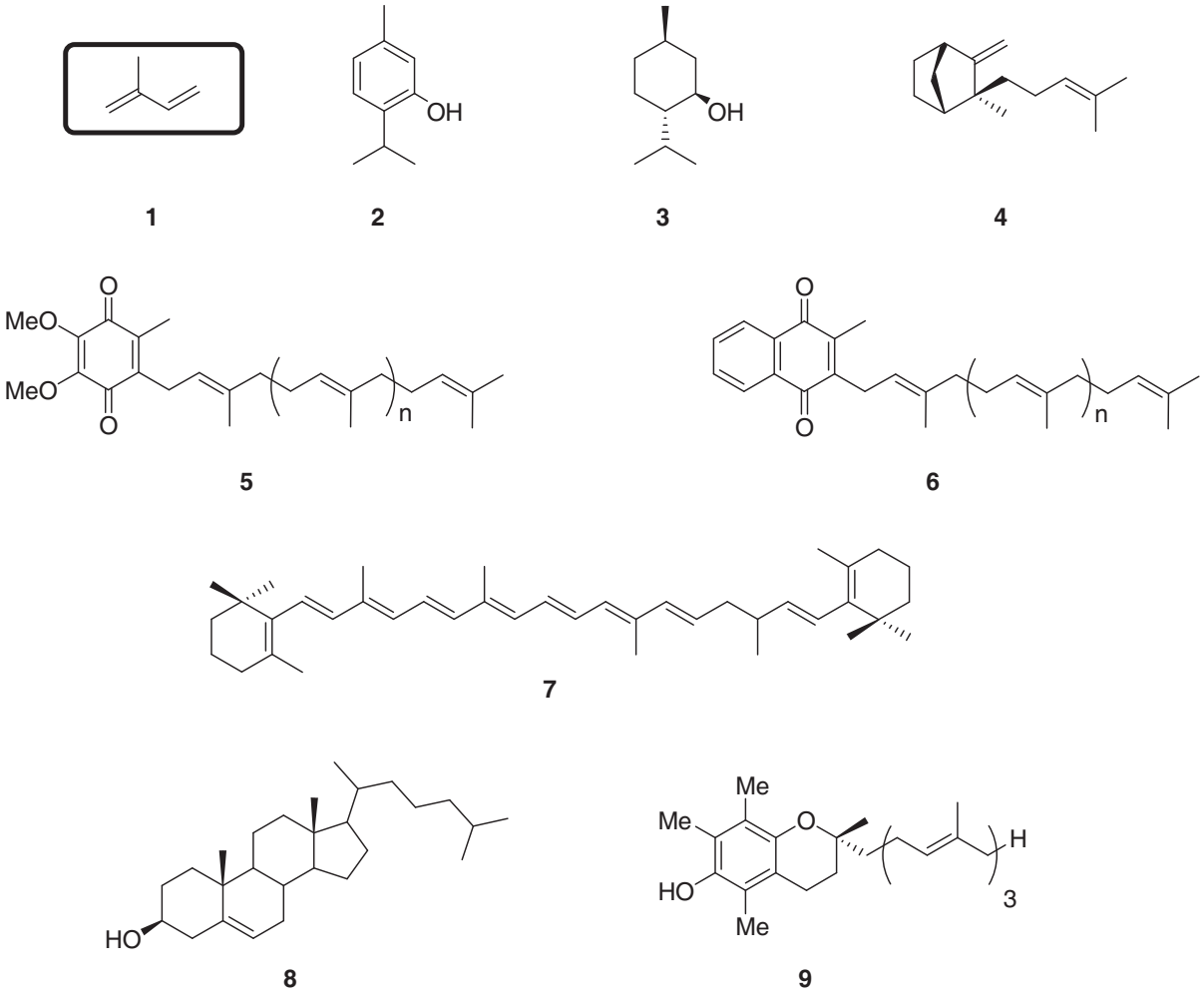
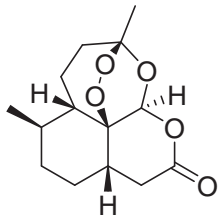


Figure 8 : Exemple d'isoprénoïdes :

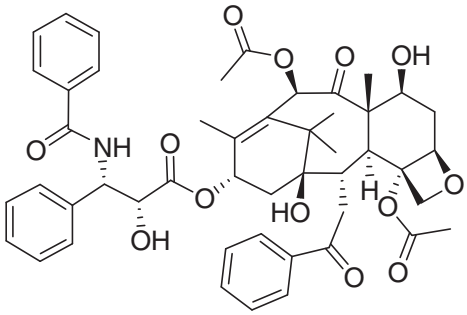
Thymol **2**, Menthol **3**, Santalène **4**, Ubiquinone **5**, Ménaquinone **6**, β-Carotène **7**, Cholestérol **8**, α-Tocotriénol (faisant partie des composés de la vitamine E **9**).

Certains isoprénoïdes comme le thymol **2**, le menthol **3** ou le santalène **4** sont des substances odorantes ou des essences naturelles. D'autres ont des rôles physiologiques importants. L'ubiquinone **5** et la ménaquinone **6** interviennent au niveau de nombreuses réactions d'oxydo-réduction dans le processus respiratoire. Les caroténoïdes comme le β-carotène **7** sont des pigments jouant un rôle protecteur vis-à-vis de la photo-oxydation ou d'antenne dans la photosynthèse, par absorption de la lumière. Les stérols, tel que le cholestérol **8**, ont pour fonction principale la régulation de la stabilité, de la fluidité et de la perméabilité des membranes. La vitamine E **9** est connue pour son action anti-oxydante : elle stabilise *in vivo* les acides gras insaturés et les protège en empêchant leur peroxydation par piégeage des radicaux libres.

Il existe aussi des isoprénoïdes qui sont des molécules thérapeutiques, comme l'**artémisinine** (Figure 9) extraite d'*Artemisia annua,* qui est le traitement le plus efficace aujourd'hui contre le paludisme. Le **taxol®** (Figure 9), extrait de l'écorce de *Taxus brevifolia*, possède des propriétés anticancéreuses. C'est un poison du fuseau, qui inhibe la polymérisation des microtubules, bloquant ainsi le mécanisme de mitose. Le composé se lie à la sous-unité de β-tubuline, accélère la polymérisation de la tubuline et stabilise les microtubules résultants, ce qui mène à l'apoptose.[23]



Artemisinine



Taxol

Figure 9 : Exemple d'isoprénoïdes ayant des propriétés thérapeutiques

Wallach fut le premier en 1887 à envisager l'existence des motifs isopréniques. Il proposa une règle, la règle isoprénique, qui stipule que les condensations successives d'unités isoprène de manière « tête à queue » donnent des composés chimiques à n fois cinq atomes de carbone $(C_5)_n$.[24] Plus tard, cet aspect a été développé par Ruzicka donnant naissance au concept appelé « règle isoprénique biogénétique », qui permet l'explication de la formation des isoprénoïdes quelle qu'en soit la nature.[25,26] Ainsi tous les squelettes isopréniques peuvent être déduits en utilisant des règles en accord avec les réactions classiques de chimie organique, comme par exemple la formation d'isoprénoïdes acycliques par condensation d'unités isopréniques en C_5, la formation de carbocation induisant la cyclisation de 1,5-polyènes et des réarrangements de Wagner-Meerwein.

Les éléments de base pour tous les isoprénoïdes sont le diphosphate d'isopentényle **11** (IPP) (Figure 10) et le diphosphate de diméthylallyle **10** DMAPP) (Figure 10), équivalents biologiques de l'isoprène. Ces composés peuvent s'isomériser grâce à une enzyme, l'IPP isomérase.[27,28,29,30]

10 DMAPP **11** IPP

Figure 10 : Equivalents biologiques de l'isoprène.

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

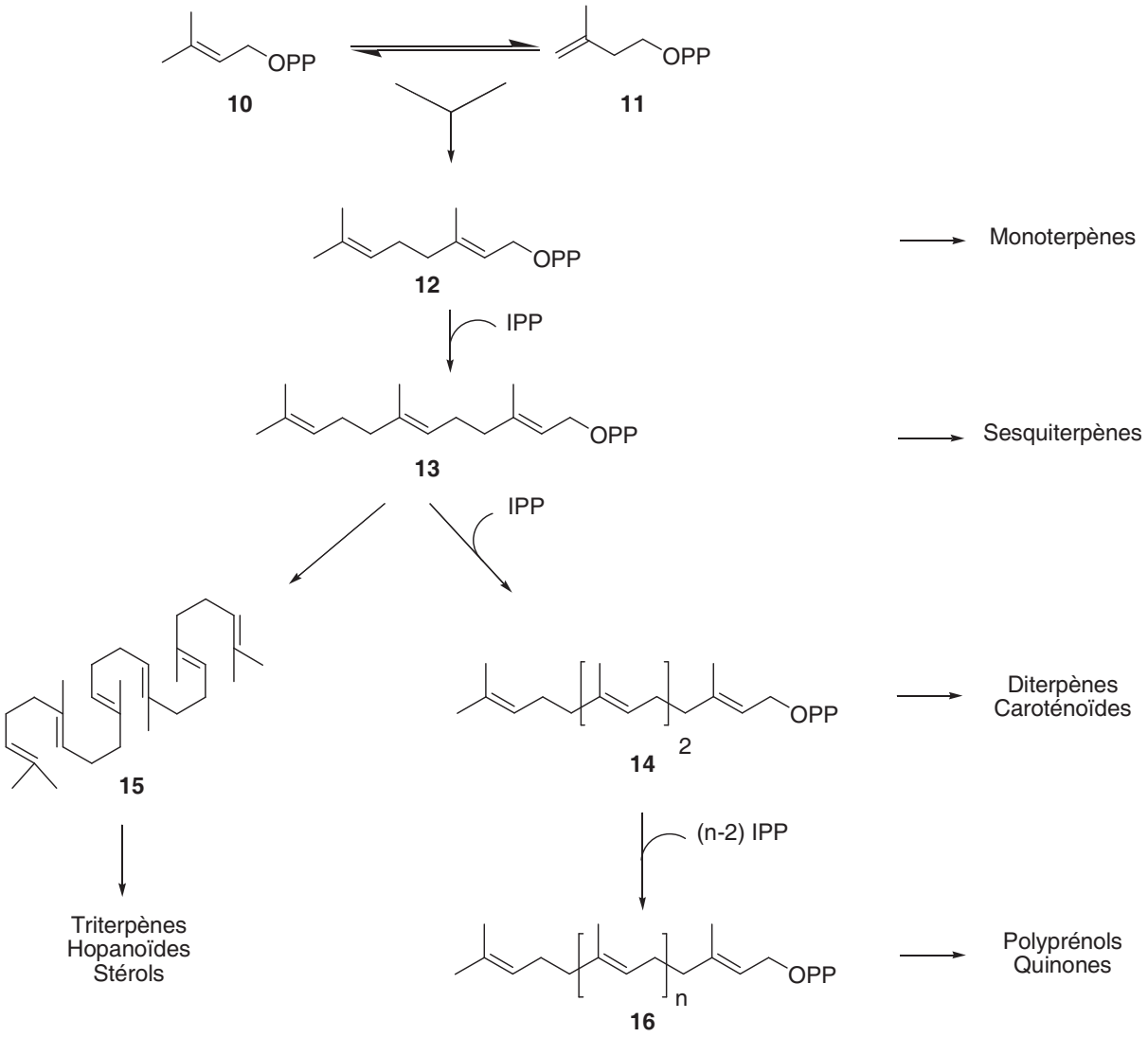


Figure 11 : Biosynthèse des isoprénoïdes à partir de l'IPP **11** et du DMAPP **10**.

La condensation du diphosphate d'isopentényle **10** (entité nucléophile) sur le diphosphate de diméthylallyle **11** (entité électrophile) mène au diphosphate de géranyle (GPP, C_{10}) **12**, précurseur des monoterpènes. La condensation supplémentaire de type « tête à queue » de l'IPP sur le GPP permet la formation du diphosphate de farnésyle (FPP, C_{15}) **13**, précurseur des sesquiterpènes. Une élongation supplémentaire du FPP avec une entité IPP donne le diphosphate de géranylgéranyle (GGPP, C_{20}) **14**, précurseurs des diterpènes et des caroténoïdes. Une condensation « tête à tête » de deux molécules de FPP conduit au squalène (C_{30}) **15**, précurseur des triterpènes, des stérols et des hopanoïdes. Enfin, les condensations successives de l'IPP sur le GGPP aboutissent à la formation de composés en C_{5n} **16**, qui sont des précurseurs des polyprénols et des quinones. L'élongation des chaines prényles par addition d'une molécule d'IPP est catalysée par des enzymes appelées prényles transférases.[31] Des réactions de cyclisation des précurseurs acycliques isopréniques, suivies de transpositions et d'oxydations permettent d'aboutir à plus de 40 000 isoprénoïdes.[13]

Parmi ces isoprénoïdes se trouvent les hopanoïdes, une famille de triterpènes pentacycliques. Leur nom provient du genre *Hopea (Dipterocarpaceae)* nommé en l'honneur de John Hope, botaniste britannique du XVIIIème siècle. Les hopanoïdes sont formés par la cyclisation du squalène **15** donnant ainsi le squelette en C_{30}. Les hopanoïdes bactériens majeurs sont des dérivés de bactériohopane en C_{35}, tels que le bactériohopanetétrol, l'aminobactériohopanetriol, le glycoside de bactériohopanetétrol ou l'éther de bactériohopanetétrol (Figure 12).

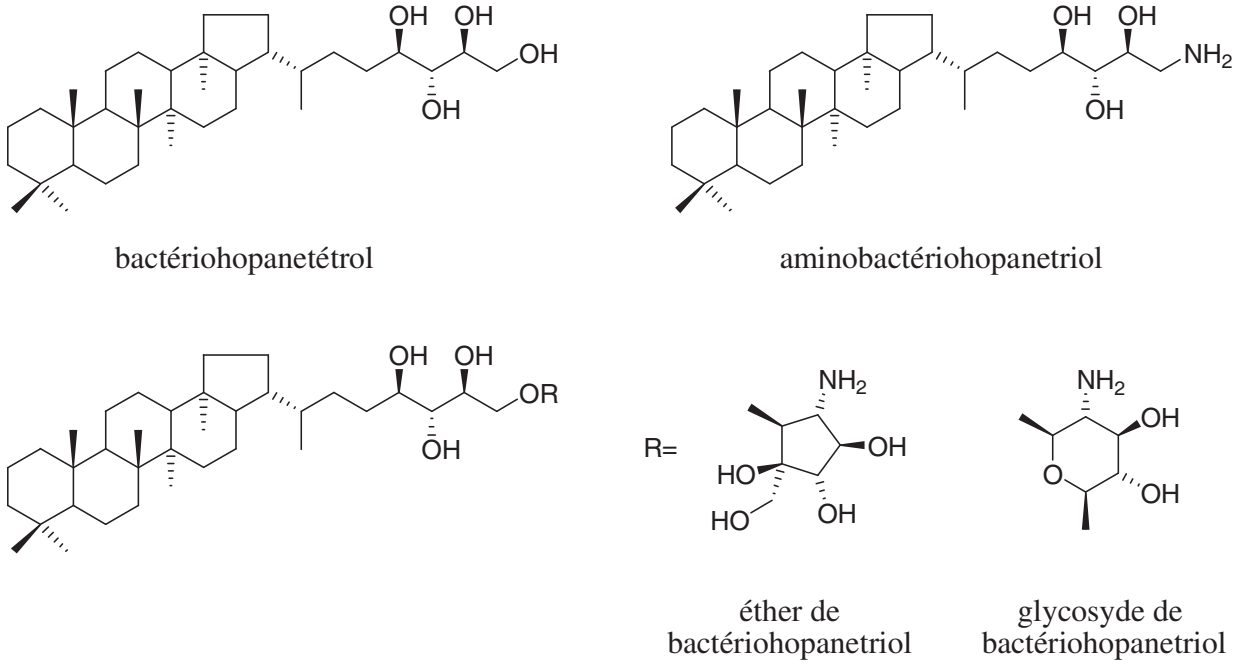


Figure 12 : Exemples de hopanoïdes bactériens.

La formation du diphosphate d'isopentényle (IPP) et du diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) a été beaucoup étudiée. Cela a permis la découverte, dans les années 50, de la voie du mévalonate (MVA), qui fut longtemps considérée comme l'unique voie de biosynthèse des unités isopréniques chez les organismes vivants. Cependant au cours des deux dernières décennies, une voie indépendante du mévalonate a été découverte chez de nombreuses eubactéries, chez les algues et les chloroplastes des plantes supérieures : la voie du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate ou voie du MEP.[32]

2) La voie du mévalonate

Les premières étapes de la voie du mévalonate ont fait l'objet d'études approfondies au cours des soixante dernières années et la littérature rapporte de nombreux travaux concernant son élucidation, ses caractérisations et sa régulation, y compris au niveau des gènes.[33,34,35,36]

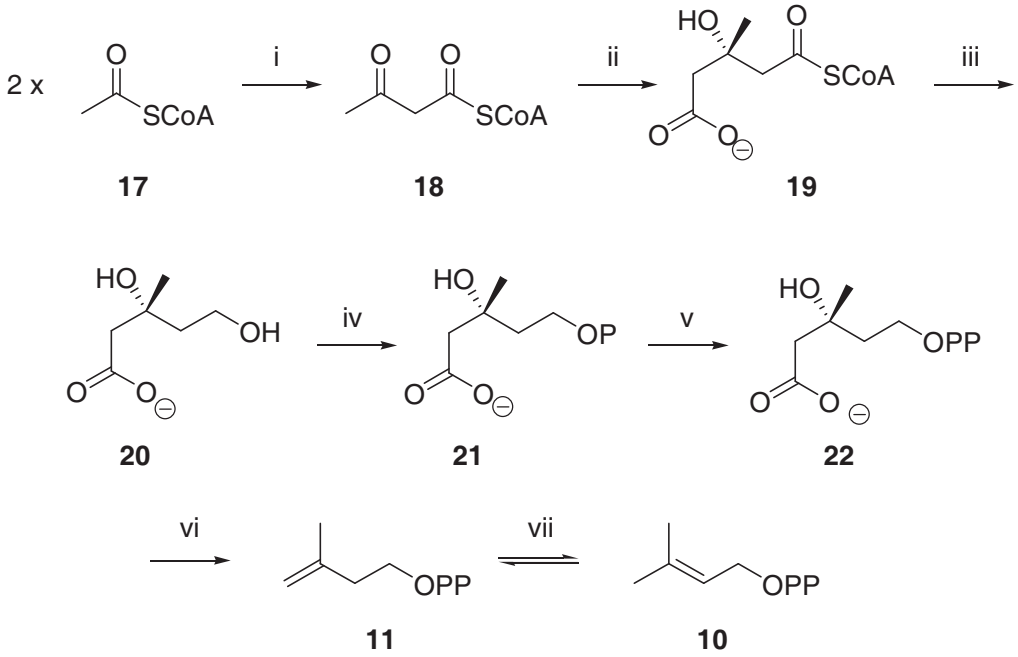


Figure 13 : Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle **10** selon la voie du mévalonate : i. Acétoacétyl-CoA thiolase ; ii. HMGCoA synthase ; iii. HMGCoA réductase ; iv. Mévalonate kinase ; v. Mévalonate 5-phosphate kinase ; vi. Mévalonate 5-diphosphate décarboxylase ; vii. IPP isomérase.

Une condensation de type Claisen de deux molécules d'acétate activées sous forme d'acétyl-CoA **17** (Figure 13) mène à l'acétoacétyl-CoA **18**. La condensation d'une troisième molécule d'acétyl-CoA conduit à la formation de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA **19**. Celui-ci va être réduit en mévalonate **20** par l'HMGCoA réductase, enzyme jouant un rôle important dans la régulation de la biosynthèse des isoprénoïdes chez les animaux. L'hydroxyle primaire du mévalonate est ensuite phosphorylé par la mévalonate kinase, pour mener au phosphate de mévalonate **21**, qui est converti en diphosphate de mévalonate **22** par la phosphomévalonate kinase. Ce dernier subit une décarboxylation catalysée par la diphosphomévalonate décarboxylase, afin de donner l'IPP **11**. Une étape d'isomérisation permet d'obtenir le DMAPP **10**.

3) La voie du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate

Pendant des décennies, la voie du mévalonate a été considérée comme l'unique voie de biosynthèse menant à l'IPP **11** chez tous les organismes vivants. Cependant des résultats

expérimentaux contradictoires ont été obtenus dans la biosynthèse des isoprénoïdes chez certaines bactéries et chez certaines plantes. En effet, l'incorporation d'acétate ou de mévalonate marqué au ^{13}C chez certaines bactéries n'ont pas donné les résultats attendus.[37,38] La localisation du marquage était en contradiction avec celle attendue avec la voie du mévalonate. Suite à de nombreuses expériences d'incorporation de précurseurs marqués, une nouvelle voie de biosynthèse indépendante du mévalonate a été découverte chez les eubactéries, les algues et les plantes supérieures.[39,40,41]

Les précurseurs de cette voie sont le pyruvate **23** et le glycéraldéhyde 3-phosphate **24**, tous deux issus directement du métabolisme du glucose. La première étape est catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) et conduit au 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) **25**. Ce pentulose subit un réarrangement intramoléculaire suivi d'une réduction concomitante de l'aldéhyde intermédiaire formé, pour donner le 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) **26**. Ces deux réactions sont catalysées par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase (DXR). Les étapes suivantes correspondent à des modifications du MEP : formation du 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythitol 4-phosphate (CDP-ME) **27**, suivie de la phosphorylation de l'hydroxyle tertiaire donnant ainsi le 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol (2P-CDP-ME) **28** et enfin la formation du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) **29**. Ce dernier est ensuite transformé en diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle (HMBPP) **30**, dernier précurseur de cette voie indépendante du mévalonate, qui conduit soit à l'IPP **11**, soit au DMAPP **10**. Toutes ces réactions constituent la voie de biosynthèse des isoprénoïdes selon le MEP.[32,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52]

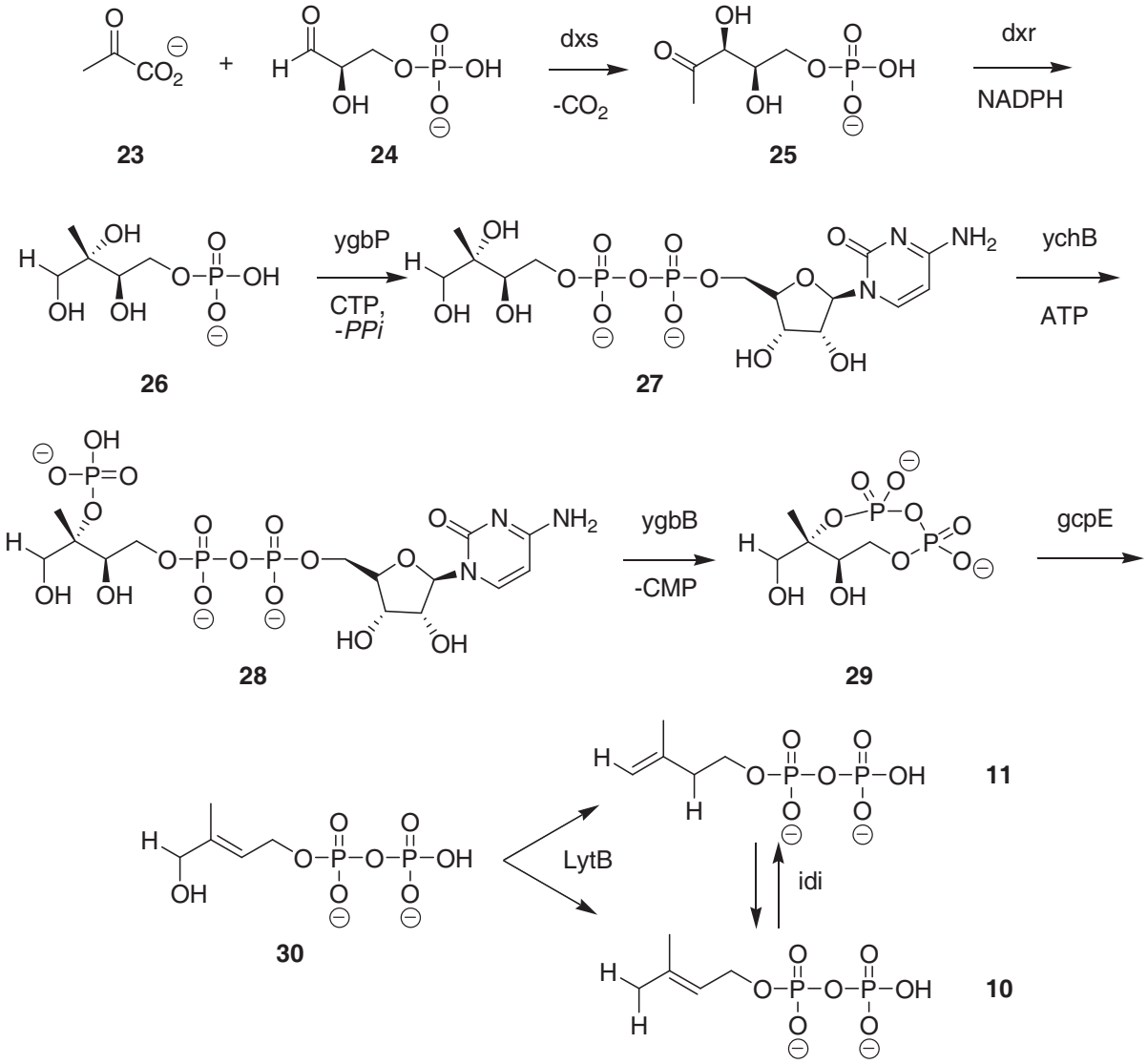


Figure 14 : Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle **11** et du diphosphate de diméthylallyle **10** selon la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate.

a) Etape catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)

L'enzyme catalysant la synthèse du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) **25** à partir du pyruvate **23** et du D-glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) **24** a été identifiée pour la première fois chez *E. coli.*[38] Cette enzyme nécessite le diphosphate de thiamine (TPP) comme cofacteur. Le gène *dxs* codant pour cette enzyme a été cloné, surexprimé, et la DXS a été purifiée et caractérisée.[43,44] Par la suite, le gène de cette enzyme a été cloné chez les plantes : *Capsicum annuum*,[53] *Mentha x piperita*,[54] aussi bien que chez les bactéries *Synechococcus*

leopoliensis,[55] *Bacillus subtilis*,[56] *Synechocystis* sp.[46] et chez *Pseudomonas aeruginosa*.[57] Dans cette dernière bactérie, l'enzyme est un dimère formé de deux sous-unités. La décarboxylation du pyruvate **23**, conduit à l'hydroxyéthylidènethiamine qui va se condenser sur le groupement carbonyle C-1 du GAP **24** (Figure 15).

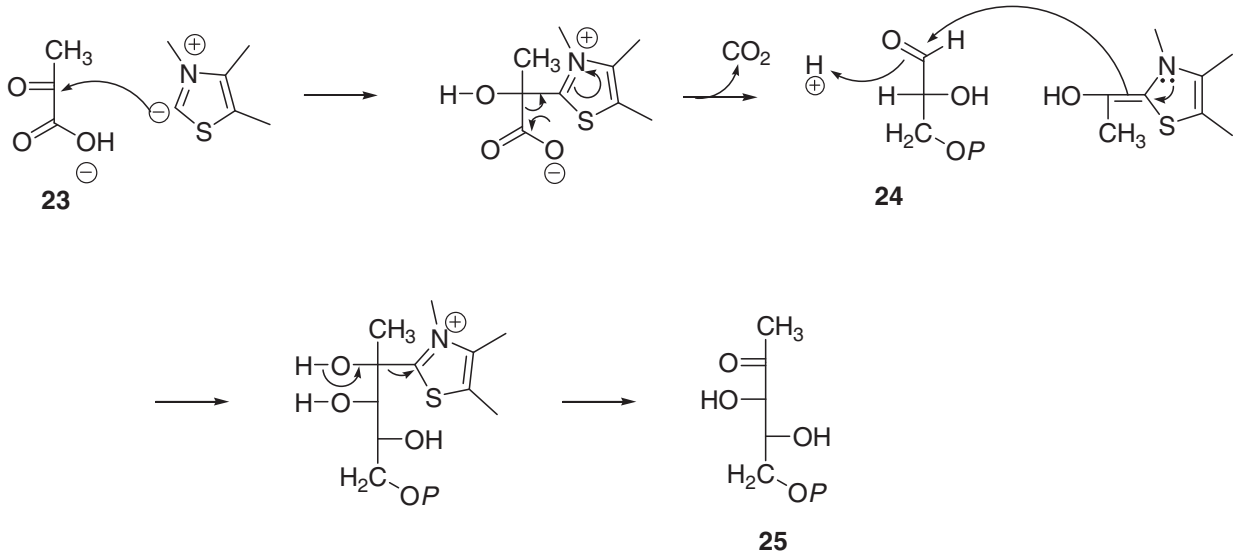


Figure 15 : Etape catalysée par la DXS

Davantage de précisions seront données sur cette enzyme lors de l'étude menée dans le premier chapitre.

b) Etape catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase (DXR)

Le réarrangement et la réduction du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) **25** en 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) **26** sont catalysés par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase (DXR) spécifiée par le gène *ispC* (désigné également par *dxr*) (Figure 16).[58] La présence du groupement 5-phosphate est indispensable car le désoxyxylulose n'est pas substrat de la DXR.

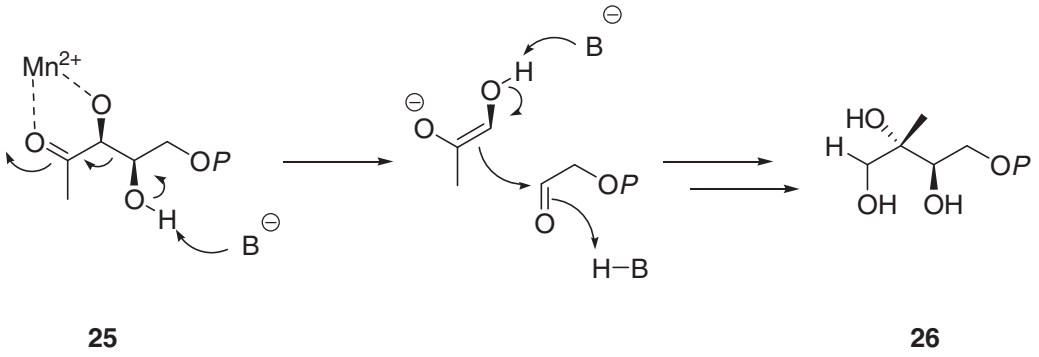


Figure 16 : Etape catalysée par la DXR

Le réarrangement du DXP **25** conduit à un aldéhyde intermédiaire, le 2-*C*-méthyl-D-érythrose 4-phosphate, qui n'a pu être caractérisé à ce jour et qui n'est probablement pas libéré du site actif.[59] L'enzyme requiert la présence d'un cation divalent tel que Mg^{2+}, Mn^{2+} ou Co^{2+}, ainsi qu'un cofacteur, le NADPH qui agit comme un réducteur.

La DXR est une enzyme très étudiée, et différents groupes ont caractérisé et cloné le gène *dxr* de divers organismes, notamment chez les plantes *Arabidopsis thaliana*[60] et *Mentha x piperita*,[61] le parasite *Plasmodium falciparum*[62] et chez les bactéries *Escherichia coli*,[53] *Synechocystis* sp.,[63] *Pseudomonas* aeruginosa,[49] *Zymomonas mobilis*[64] et *Streptomyces coelicolor.*[65] Des études mécanistiques ont été menées à l'aide d'analogues fluorés du DXP et ont suggéré que le réarrangement se fait par un mécanisme de type rétro-aldol/aldol.[66] Ce mécanisme de rétro-aldolisation/aldolisation a finalement été démontré par des mesures d'effets isotopiques. [67,68]

La stéréochimie de l'étape de réduction a été déterminée chez une plante supérieure (*Liriodendron tulipifera*)[69] et chez une cyanobactérie (*Synechocystis* sp. PCC6803).[53] Ces travaux ont montré que le proton pro-*S* de la position C-1 du MEP **26** provient du proton de la position C-3 du DXP **25** lors de la réaction catalysée par la DXR de *Synechocystis* sp. PCC6803.[70] De ce fait, l'attaque de l'hydrure provenant du NADPH a lieu sur la face *Re* de l'intermédiaire aldéhyde. Le proton pro-*S* en C-4 du NADPH est transféré, indiquant ainsi que cette enzyme fait partie de la famille des déshydrogénase de classe B.[53] Des expériences similaires avec l'enzyme d'*E. coli* ont démontré que la DXP réducto-isomérase est également une réductase de classe B.[71]

c) Etape catalysée par YgbP

La conversion du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) **26** en 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (CDP-ME) **27** est catalysée par l'enzyme YgbP ou 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyl transférase. Des incubations de [2-^{14}C]MEP avec un milieu acellulaire d'*E. coli* en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et de Mg^{2+} ont permis de détecter un nouveau composé radioactif.[72] Une fraction de l'enzyme catalysant la formation de ce composé a été partiellement purifiée puis incubée en présence de MEP et de cytidine triphosphate (CTP), ce dernier étant un cofacteur plus efficace que l'ATP. Le produit a été analysé par RMN ^{1}H, ^{13}C et ^{31}P. Ces données ont permis d'identifier le 4-diphosphocytidyl-2-*C*-méthyl-D-érythritol (CDP-ME) **27** (Figure 17).

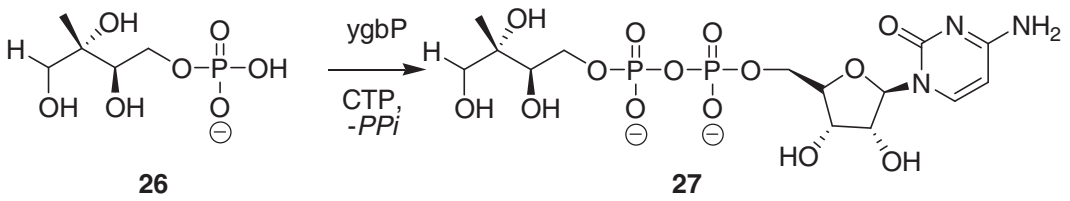


Figure 17 : Etape catalysée par YgbP.

D'autres expériences de marquage ont montré que le [2-^{14}C]CDP-ME est incorporé dans les caroténoïdes des chromoplastes de *Capsicum annuum* et suggère que le CDP-ME soit un intermédiaire de la biosynthèse des isoprénoïdes.[67]

L'équipe de Seto, quant à elle, a également identifié cette enzyme par une approche différente.[73] Leur stratégie reposait sur la production de souches d'*E. coli* par mutations statistiques dont la voie du MEP a été bloquée entre le MEP **26** et l'IPP **11**. De telles mutations sont létales pour la bactérie, c'est pourquoi les gènes de la voie du mévalonate ont été ajoutés dans les mutants d'*E. coli*. Les souches issues de cette transformation peuvent ainsi synthétiser des isoprénoïdes en utilisant la voie du mévalonate mais requièrent impérativement la présence de mévalonate pour se multiplier et survivre. Ces souches ont permis l'identification et le clonage du gène *ispD*, ainsi que la purification de l'enzyme correspondante. Il a été montré qu'elle convertit le MEP **26** en un produit inconnu en

présence de cytidine triphosphate. La structure de ce composé a été déterminée à l'aide de méthodes spectroscopiques comme étant le CDP-ME **27**.

d) Etape catalysée par YchB

Après étude par méthodes bioinformatiques, il a été constaté que le gène *ispE* suit la même distribution que les gènes *dxs*, *ispC* et *ispD* qui sont impliqués dans la voie du MEP. Ce gène *ispE* semblait donc être impliqué dans cette voie de synthèse.[74] Ainsi, le [2-^{14}C]CDP-ME a été incubé avec la protéine YchB d'*E. coli* en présence d'ATP. L'analyse par RMN ^{1}H, ^{13}C et ^{31}P du produit formé a permis d'identifier le 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol (2P-CDP-ME) **28**, comme produit de la réaction catalysée par l'enzyme YchB (Figure 18).

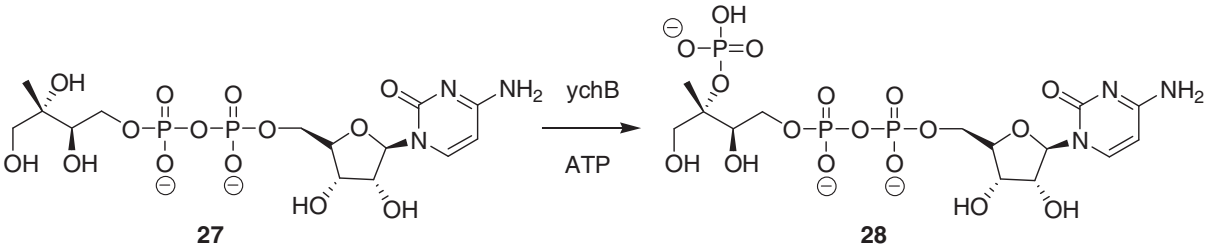


Figure 18 : Etape catalysée par YchB.

Il a été montré que les caroténoïdes de *C. annuum* ont incorporé le 2P-CDP-ME dans les chromoplastes, ce qui montre qu'il est un intermédiaire de la voie du MEP.[67] Comme pour l'étape précédente, l'équipe de Seto a identifié indépendamment ce gène *ispE* ainsi que le produit 2P-CDP-ME **28** de l'enzyme correspondante YchB.[75]

e) Etape catalysée par YgbB

Chez de nombreux organismes, le gène *ispF* est étroitement lié au gène *ispE*.[76] Après expression du gène chez *E. coli*, la protéine correspondante a été incubée avec le 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-méthyl-D-érythritol (2P-CDP-ME) **28** et un cation divalent

(Mn^{2+} ou Mg^{2+}). D'après les données RMN, le 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) **29** est obtenu ainsi que le monophosphate de cytidine (Figure 19).

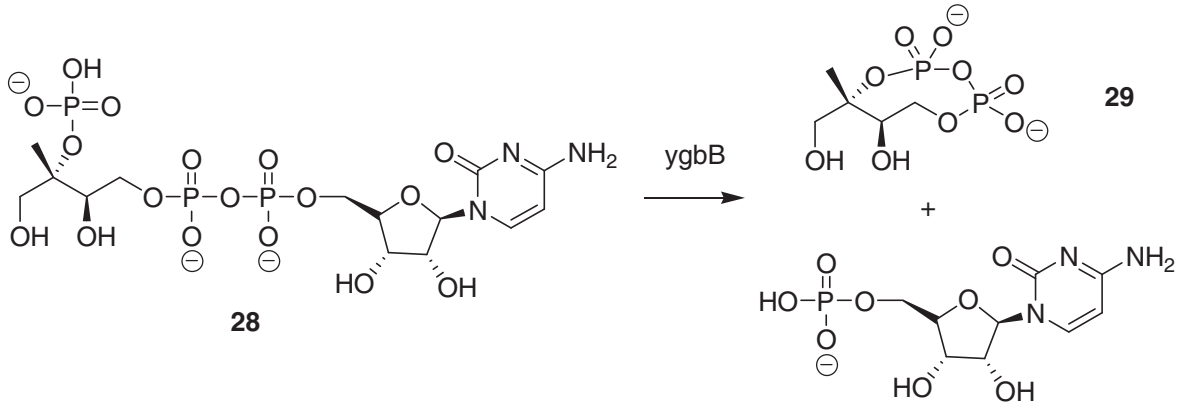


Figure 19 : Etape catalysée par YgbB.

Le MECDP **29** a été incorporé dans les caroténoïdes des chromoplastes des *C. annuum*, ce qui indique qu'il est bien un intermédiaire de la voie du MEP.[67] L'équipe de Seto a également identifié le gène *ispF* ainsi que le produit, MECDP de l'enzyme correspondante YgbB à partir de mutants d'*E. coli*.[77]

f) Etape catalysée par GcpE

L'avant-dernière étape de la voie du MEP est catalysée par l'enzyme GcpE qui transforme le 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) **29** en diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle (HMBPP) **30.** La construction de mutants d'*E. coli* a permis de montrer que le gène *ispG,* codant pour l'enzyme GcpE, est essentiel pour la voie du MEP[78] et que le substrat de cette enzyme est le 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) **29.**[79] Cette enzyme a ensuite été clonée puis surexprimée chez *E. coli* et incubée en présence de [2-^{14}C]ME cyclodiphosphate et d'un inhibiteur de phosphatase. Les résultats ont montré que le produit formé est le diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle (HMBPP) **30.**[80,81]

Au laboratoire, il a été montré que l'enzyme GcpE possède un cluster $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ et est activée en présence d'un réducteur chimique tel que la DAF (5-déazaflavine) ou en présence de réducteur biologique, tel qu'un système flavodoxine/flavodoxine réductase/NADPH.[82,83]

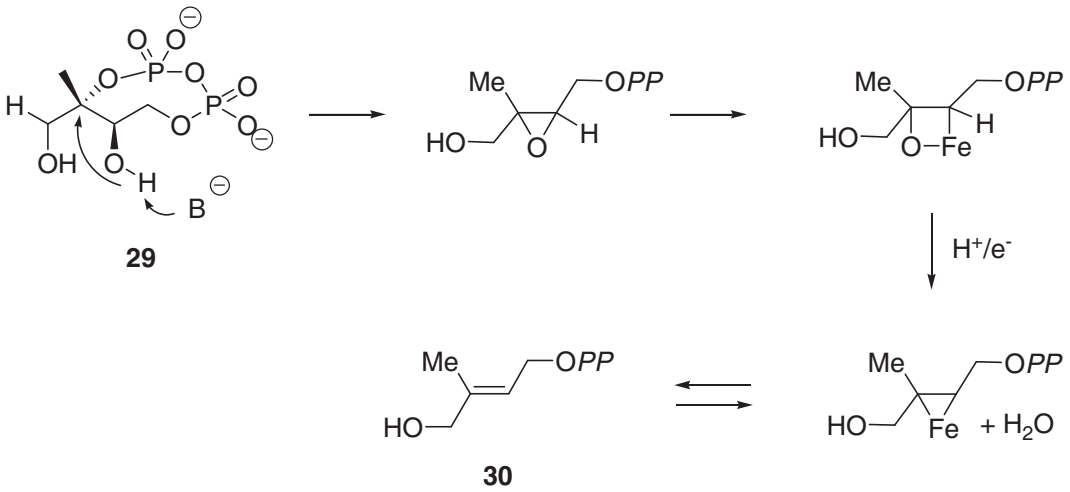


Figure 20 : Etape catalysée par GcpE
et mécanisme hypothétique de la réaction.[84]

La présence du cluster [4Fe-4S] dans GcpE suggère une réaction radicalaire correspondant à une réduction par transfert de deux électrons. Un mécanisme hypothétique a été proposé par l'équipe d'Oldfield.[84] L'ouverture du cycle du MECDP **29** conduirait à un époxyde. Ce dernier réagirait avec le cluster pour conduire à un ferraoxétane, qui sera converti en π/σ métallacycle pour donner le dernier intermédiaire de la voie du MEP, le diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle (HMBPP) **30**.

g) Etape catalysée par LytB

A l'aide d'une recherche bioinformatique et de construction de mutants d'*E. coli*, il a été montré que *ispH* est un gène de la voie du MEP et qu'il est essentiel, car sa délétion est létale.[85,86] Il a été également établi que le diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle (HMBPP) **30** est le substrat de LytB, que le gène *ispH* correspond au point de branchement de la voie du MEP et que l'IPP **11** et le DMAPP **10** sont les produits de la réaction catalysée par LytB (Figure 21).[87,88]

Au laboratoire, il a été montré que l'enzyme LytB possède un cluster $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$.[89] Le test enzymatique nécessite la présence d'un système réducteur endogène d'*E. coli* (flavodoxine/flavodoxine réductase/NADPH).[71,90]

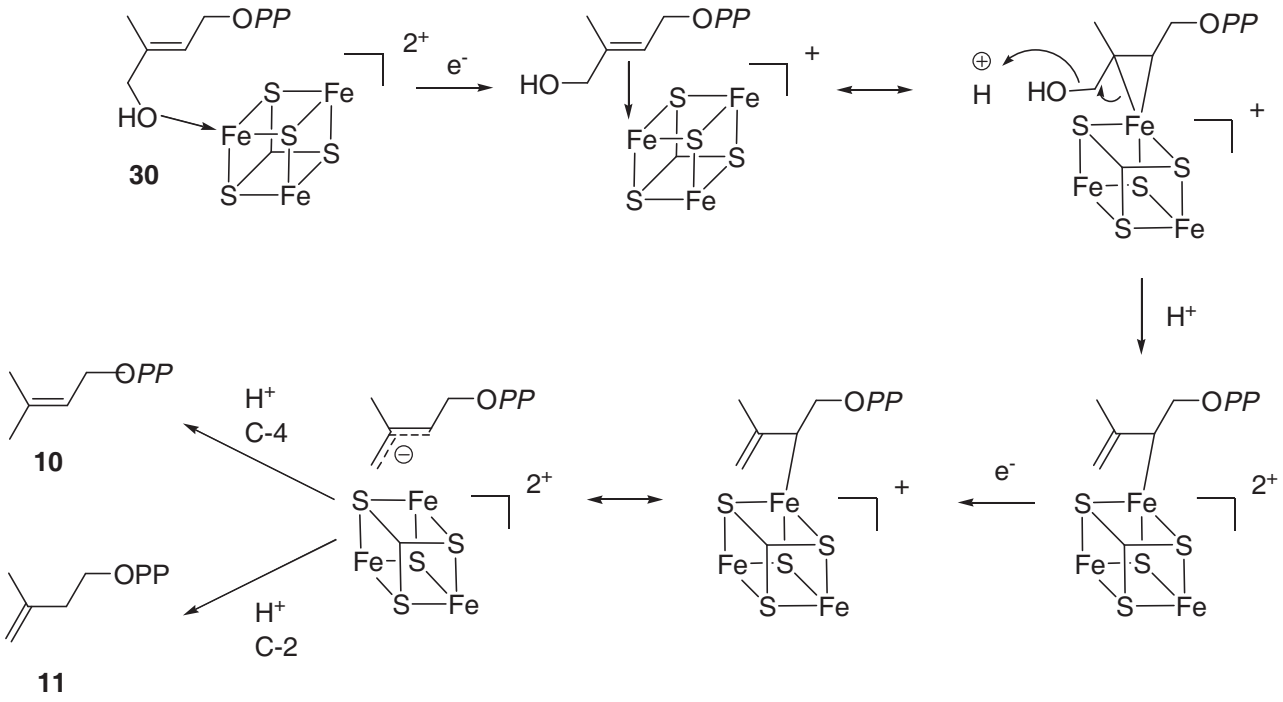


Figure 21 : Etape catalysée par LytB
et mécanisme hypothétique de la réaction.[92]

Le site actif de LytB est un cluster $[4Fe\text{-}4S]^{2+/1+}$ et un mécanisme hypothétique a été proposé.[91,92,93,94] Après une première liaison entre l'hydroxyle du composé **30** et le cluster oxydé, ce dernier est réduit et active le substrat sous forme de métallacycle, qui après protonation va permettre l'élimination de l'hydroxyle sous forme d'eau. Le cluster est ensuite réduit par un deuxième électron, permettant ainsi la formation d'un anion allylique. La protonation de cet anion en C-4 donne le DMAPP **10**. La formation de l'IPP **11** résulte de la protonation de l'anion en C-2.[95] Lors des essais enzymatiques, le centre oxydé est alors réduit en présence soit de dithionite, soit du radical semiquinone de la DAF, soit du système réducteur flavodoxine/flavodoxine réductase/NADPH.

4) Distribution de la voie du mévalonate et de la voie du MEP

La voie du mévalonate est présente chez les animaux, les végétaux (cytoplasme), quelques eubactéries et les archébactéries (Figure 22).[39]

Bactéries	
Borrelia burgdorferi	*Nannocystis exedens*
Chloroflexus aurantiacus	*Paracoccus* sp.
Enterococcus faecalis	*Staphylococcus aureus*
Flavobacterium sp.	*Staphylococcus carnosus*
Lactobacillus helveticus	*Streptococcus mutans*
Lactobacillus plantarum	*Streptococcus pneumoniae*
Myxococcus fulvus	*Streptococcus pyogenes*

Figure 22 : Distribution de la voie du mévalonate chez les bactéries.[39]

La voie du MEP a pu être détectée et identifiée soit par incubation de précurseurs marqués par des isotopes stables et analyse des marquages des isoprénoïdes obtenus,[28,96] soit par analyse bioinformatique des gènes connus de la voie du MEP dans les microorganismes étudiés (Figure 23).[74,85,86,97]

La voie du MEP est en grande partie présente chez les bactéries pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis* et les parasites comme chez *Plasmodium falciparum*. Du fait de son absence chez les animaux, elle peut être prise comme cible pour la mise au point de nouveaux antimicrobiens. Dans plusieurs *Streptomyces* sp. et chez *Listeria monocytogenes,* les deux voies sont présentes, mais ne s'expriment pas simultanément.[98,99,100] La voie du MEP est préférentiellement utilisée pendant la phase exponentielle de croissance, correspondant à la biosynthèse des métabolites essentiels tels que les ménaquinones, tandis que la voie du mévalonate est impliquée dans la phase stationnaire permettant la synthèse de métabolites secondaires tels que les antibiotiques à motifs isopréniques.

Bactéries		
Acinetobacter calcoaceticus	*Ehrlichia chaffeensis*	*Psychrobacter* sp.
Acinetobacillus actinomycetemcomitans	*Erwinia carotovora*	*Ralstonia pickettii*
Acinetobacillus pleuropneumoniae	*Escherichia coli*	*Rhodobacter capsulatus*
Acinetoplanes sp A40644	*Eubacterium sp*	*Rhodopseudomonas acidophila*
Alicyclobacillus acidoterrestris	*Francisella tularensis*	*Rhodopseudomonas palustris*
Anaplasma phagocytophilum	*Fusobacterium nucleatum*	*Salmonella enterica*
Aquifex aeolicus	*Gardnerella vaginalis*	*Salmonella enteritidis*
Bacillus anthracis	*Haemophilus ducreyi*	*Salmonella typhi*
Bacillus cereus	*Haemophilus influenzae*	*Salmonella typhimurium*
Bacillus subtilis	*Helicobacter jejuni*	*Serratia marcescens*
Bacteroides fragilis	*Helicobacter pylori*	*Shewanella putrefaciens*
Bacteroides thetaiotaomicron	*Klebsiella pneumoniae*	*Shigella flexneri*
Bifidobacterium longum	*Leptospira interrogans*	*Shigella dysenteriae*
Bordetella bronchiseptica	*Listeria monocytogenes**	*Sphingobacterium multivorum*
Bordetella pertussis	*Mannheimia haemolytica*	*Streptomyces aeriouvifer CL190**
Brucella melitensis	*Methylobacterium fujisawaense*	*Streptomyces blastmyceticum*
Brucella suis	*Methylobacterium organophilum*	*Streptomyces exfoliatus*
Burkholderia caryophylli	*Moraxella catarrhalis*	*Streptomyces ghanaensis*
Burkholderia cepacea	*Mycobacterium avium*	*Streptomyces griseolosporeus**
Burkholderia gladioli	*Mycobacterium bovis*	*Streptomyces niveus*
Burkholderia mallei	*Mycobacterium leprae*	*Streptomyces spheroides*
Burkholderia pseudomallei	*Mycobacterium phlei*	*Streptomyces* sp *QC45B*
Campylobacter jejuni	*Mycobacterium smegmatis*	*Streptomyces* sp *UC5319*
Caulobacter crescentus	*Mycobacterium tuberculosis*	*Streptomyces* sp *JP95*
Chlamydia muridarum	*Mycoplasma penetrans*	*Synechocystis* sp *PCC 6803*
Chlamydia pneumoniae	*Neisseria gonorrhoeae*	*Tannerella forsythensis*
Chlamydia trachomatis	*Neisseria meningitidis*	*Thermotoga maritima*
Chlamydophila pneumoniae	*Nocardia brasiliensis*	*Thiobacillus ferrooxidans*
Chlorobium tepidum	*Neorickettsia sennetsu*	*Treponema denticola*
Citrobacter freundii	*Pasteurella multocida*	*Treponema pallidum*
Clostridium acetobutylicum	*Peptostreptococcus* sp	*Tropheryma whipplei*
Clostridium botulinum	*Porphyromonas gingivalis*	*Vibrio cholerae*
Clostridium difficile	*Prevotella intermedia*	*Vibrio vulnificus*
Clostridium perfingens	*Proteus mirabilis*	*Wolbachia* sp.
Clostridium tetani	*Providencia stuartii*	*Xylella fastidiosa*
Corynebacterium ammoniagenes	*Pseudomonas aeruginosa*	*Yersinia pestis*
Corynebacterium diphtheriae	*Pseudomonas fluorescens*	*Yersinia enterocolitica*
Deinococcus radiodurans	*Pseudomonas putida*	*Zymomonas mobilis*

* Organismes possédant les deux voies

Figure 23 : Distribution de la voie du MEP chez les bactéries.[97]

La voie du MEP est également présente dans les chloroplastes de plantes supérieures. En effet, chez les végétaux où coexistent les deux voies de biosynthèses, une compartimentation a été trouvée.[101] La voie du mévalonate est présente dans le cytoplasme où sont synthétisés les triterpènes, incluant les stérols qui jouent le rôle de stabilisateur membranaire et la chaîne prénylée de l'ubiquinone, tandis que la plastoquinone, le phytol, des chlorophylles et les caroténoïdes sont formés dans les chloroplastes par la voie du MEP (mono-, di-, sesqui-, tétraterpénoïdes).[102] Toutefois l'échange de molécules d'IPP et d'autres phosphates de prényle entre le cytoplasme et les chloroplastes a été mis en évidence (Figure 25).[103,104,105,106]

Algues vertes	***Plantes supérieures***	
Scenedesmus obliquus	*Daucus carota*	*Hordeum vulgare*
Chlorella fusca	*Hordeum vulgare*	*Persea americana*
Chlamydomonas reinhardtii	*Lemna gibba*	*Spinacea oleacea*
Prototheca wickermanii	*Ginkgo biloba*	*Eucalyptus globulus*
Conocephalum conicum	*Taxus chinensis*	*Clematis vitisalba*
Ricciocarpos natans	*Salvia miltiorrhiza*	*Hedera helix*
Botryococcus braunii	*Marrubium vulgare*	*Passiflora caerulea*
	Mentha x piperita	*Callicarpa japonica*
Algues rouges	*Mentha pulegium*	*Nicotiana tabacum*
Cyanidium caldarium	*Thymus vulgaris*	*Catharanthus roseus*
	Geranium graveolens	*Ipomoea parasitica*
Chrysophyte	*Chelidonium majus*	*Liriodendron tulipifera*
Ochromonas danica	*Populus nigra*	*Scoparia dulcis*
	Salix viminalis	*Lepidolaena hodsgonie*
Diatomées	*Catharanthus roseus*	*Cinchona 'Robusta'*
Phaeodactylum tricornutum	*Matricaria recutita*	
Nitzschia ovalis	*Mentha citrata*	
	Phaseolus lunatus	
Protozoaires	*Apium graveolens*	
Plasmodium spp.	*Solidago canadensis*	

Figure 24 : Distribution de la voie du MEP hors bactéries.[94,107,108,109,110]

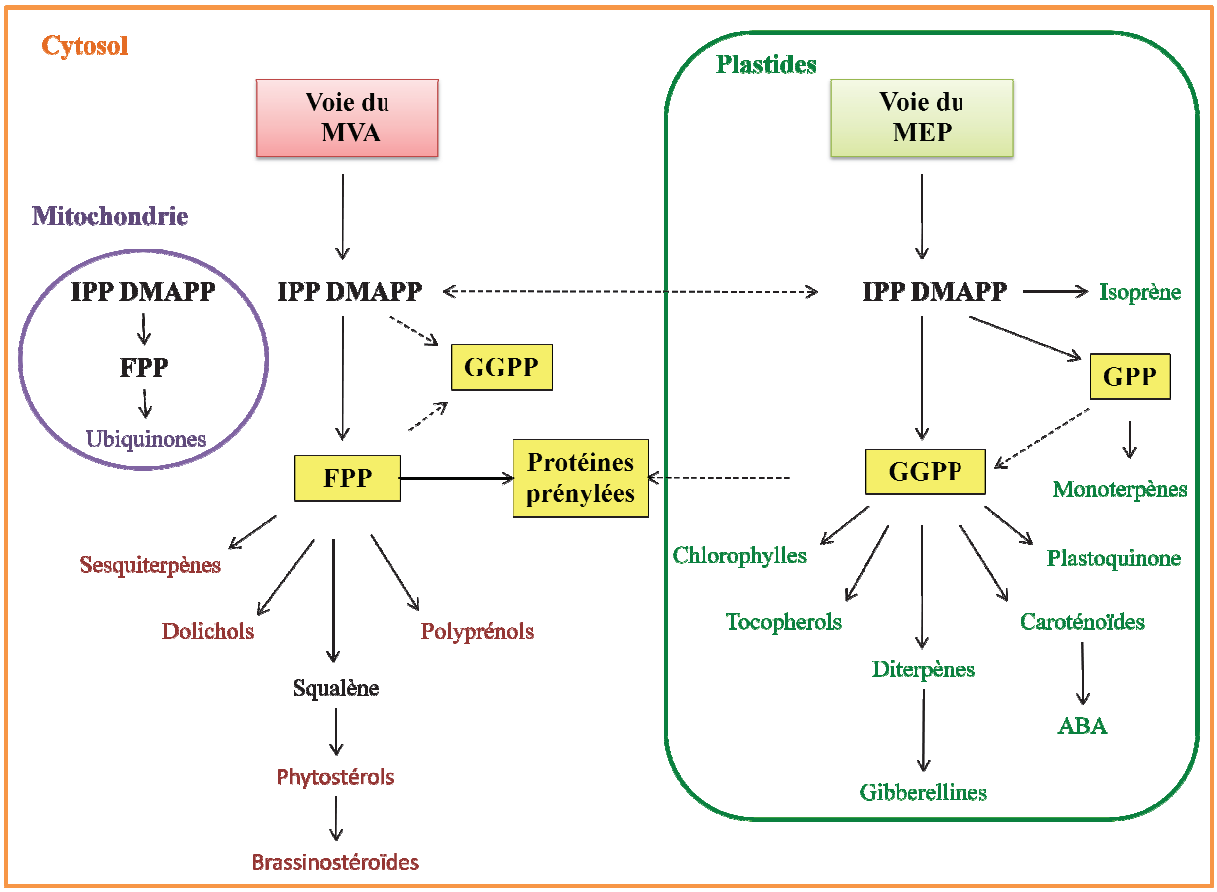


Figure 25 : Voie de biosynthèse de l'IPP et DMAPP chez les plantes.[98]

MVA : mévalonate ; MEP : 2-*C*- méthyl-D-érythritol 4-phosphate ; FPP : diphosphate de farnésyle ; ABA, acide abscisique ; GPP : diphosphate de géranyle ; GGPP : diphosphate de géranylgéranyle ; IPP : diphosphate d'isopentényle ; DMAPP : diphosphate de diméthylallyle

La répartition dans le monde du vivant des deux voies de biosynthèse des isoprénoïdes permet de proposer la biosynthèse de ces composés comme cible pour la mise au point d'antimicrobiens et d'herbicides.

Voie du MVA	Voie du MEP
Champignons Végétaux (cytoplasme) Quelques Eubactéries Archébactéries Animaux	Algues vertes unicellulaires Végétaux (plastides) Eubactéries *Plasmodium* spp.

III) Objectifs de la thèse

Les enzymes impliquées dans la voie du MEP n'étant pas présentes chez l'homme et les animaux, elles représentent des cibles potentielles pour le développement de nouvelles molécules permettant de lutter contre les bactéries pathogènes ou les parasites.

Dans cette optique, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS), la première enzyme de la voie du MEP. Elle participe à la biosynthèse de l'IPP et du DMAPP, et joue aussi un rôle, chez certaines bactéries dans la synthèse des hétérocycles de la thiamine[111] et du pyrodoxol[112]. C'est pour cela qu'il paraît intéressant de synthétiser des inhibiteurs de cette enzyme. Il pourrait conduire à de nouveaux antimicrobiens potentiels en bloquant plusieurs voies de biosynthèse vitales pour les bactéries. Seuls deux inhibiteurs de cette enzyme sont actuellement connus : l'oxoclomazone[113,114] pour la DXS de plantes et le fluoropyruvate[115,116] pour la DXS bactérienne. Cette enzyme combine les caractéristiques des mécanismes réactionnels d'une transcétolase et d'une pyruvate décarboxylase. Comme ces deux dernières enzymes, la DXS utilise le diphosphate de thiamine comme cofacteur et le pyruvate comme substrat.

Le premier objectif de cette thèse est le développement de nouveaux antimicrobiens potentiels agissant comme substrat suicide de la DXS. Ce sont des analogues du pyruvate qui devraient être aussi substrat de l'enzyme. Il possède une fonction réactive masquée, qui nécessite l'action catalytique de l'enzyme pour être dévoilée. Cette action ne se produit que dans le site actif de l'enzyme. La réaction de l'espère active engendrée par l'enzyme avec un groupe nucléophile de l'enzyme conduit à la formation d'une liaison stable qui a pour conséquence l'inactivation de l'enzyme. Les composés synthétisés sont inspirés d'inhibiteurs de pyruvate décarboxylase et de pyruvate déshydrogénase ou des analogues du pyruvate. Ils seront ensuite testés sur l'enzyme DXS, afin de mesurer leur activité.

Le passage du DXP à l'IPP et au DMAPP nécessite plusieurs étapes de réduction comme les réactions catalysées par la désoxyxylulose phosphate isoméro-réductase (DXR) et l'hydroxyméthylbutényl diphosphate réductase (LytB). L'origine des atomes d'hydrogène lors de ces étapes de réduction n'est que partiellement élucidée. La connaissance de l'origine des atomes d'hydrogène du diphosphate d'isopentényle (IPP) devrait nous permettre de conclure sur la formation de l'IPP à partir du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) et d'expliciter une partie du mécanisme de la réaction catalysée par LytB. Dans la réduction catalysée par cette dernière enzyme, les électrons proviennent de la forme réduite d'un cluster

[4Fe-4S], et l'hydrogène est introduit par protonation d'un anion allylique. Des études préliminaires ont suggéré que le donneur de proton serait la flavine réduite de la flavodoxine, associée à la réduction du cluster [4Fe-4S] de LytB, qui serait utilisée à la fois comme donneur d'électrons et de protons.[117]

Le second objectif de cette thèse est la mise en évidence de la signature de ces étapes de réduction. Le métabolisme de la bactérie *Zymomonas mobilis* a été utilisé, car il permet la formation *in vivo* d'un pool de NADPH deutérié en incubant du [1-^{2}H]glucose. Le deutérium est donc incorporé dans tous les cofacteurs de réduction (NAD(P)^{2}H et cofacteurs dérivés) et serait transféré sur les unités isopréniques dérivées de l'IPP (C-2) ou du DMAPP (C-4). Ce deutérium peut être repéré par RMN du ^{13}C, car il induit un déplacement, en général vers les champs forts, des signaux du ^{13}C, l'intensité de ce déplacement dépendant des positions relatives du ^{2}H et du ^{13}C (α, β ou γ). Les positions du deutérium seront déterminées dans les triterpénoïdes de série hopane par RMN ^{13}C en analysant les déplacements vers les champs forts des signaux du ^{13}C (shift du signal). Des études préliminaires au laboratoire par incorporation de [1-^{2}H]glucose et analyse par RMN du ^{13}C en abondance naturelle ont déjà été réalisées, mais la sensibilité n'était pas suffisante et de nombreux signaux n'étaient pas ou peu visibles. Afin d'augmenter la sensibilité, nous avons utilisé du glucose enrichi en ^{13}C sur diverses positions pour marquer toutes les positions stratégiques.

[1] Margulis, L *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996), *93*, 1071-1076.
[2] Kelman, Z. *Curr. Protein Pept. Sci.* (2000), *1*, 139-154.
[3] Blumberg, P. M., & Strominger, J. L. *Bacteriol. Rev.* (1974) , *38*, 291-335.
[4] Page, M.I. *Acc. Chem. Res*. (1984), *17*, 144-151.
[5] Strom, D.R. ; Strominger, J.L. *J. Biol. Chem.* (1973), *248*, 3940-3945.
[6] Stone, K.J. ; Strominger, J.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1971), *68*, 3223-3227.
[7] Hendlin, D. ; Stapley, E.O. ; Jackson, M. ; Wallick, H. ; Miller, A.K. ; Wolf, F.J. ; Miller, T.W. ; Vhaiet, L. ; Kahan, F.M. ; Foltz, E.L. ; Woodruff, H.B. ; Mata, J.M. ; Hernandez, S. ; Mochales, S. *Science* (1969), *166*, 122-123.
[8] Osborne, M.J. *Annu. Rev. Biochem*. (1969), *38*, 501-505.
[9] Dixon, R.A. ; Chopra, I. *Antimicrob. Agents. Chemiother.* (1986), *29*, 781-788
[10] Fry, M. ; Israeli-Reches, M. ; Artman, M. *Biochemistry*, (1972), *11*, 3054-3059.
[11] Capobianco, J.O. ; Cao, Z. ; Shortrige, V.D. ; Ma, Z. ; Flamm, R.K., Zhong, P. *Antimicrob. Agent. Chemiother.* (2000), *44*, 1562-1567.
[12] Boothe, J.H. ; Morton, J. ; Petisi, J.P. ; Wilkinson, R.G. ; Wiliams, J.H. *J. Am. Chem. Soc*. (1953), *75*, 4621-4622.
[13] Biswas, D.K. ; Gorini, L. *Proc. Nat. Acad,. Sci. USA* (1972), *69*, 2141-2144
[14] Chu, E.J-H. *J. Am. Chem. Soc.* (1945), *67*, 2243-2244.
[15] Iyver, V.N. ; Szybalski, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1963), *55*, 355-362
[16] Donkor, I.O. ; Huang, T.L. ; Tao, B. ; Rattenti, D. ; Lane, S. ; Vargas, M. ; Goldberg, B. ; Bacchi, C. *J. Med. Chem.,* (2003), *46*, 1041-1048.
[17] Tao, S. ; Zhang, Y. *Nucleic Acids Res.,* (2008), *36*, 1654–1664.
[18] Trouiller, P. ; Olliaro, P. ; Torreele, E. ; Orbinski, J. ; Laing, R. ; Ford, N. *Lancet*, (2002), *359*, 2188-2194.
[19] Neu, H.C. *Science* (1992), *257*, 1064-1073.
[20] Walsch, C. ; Wright, G. *Chem. Rev*. (2005), *105*, 391-394.
[21] Poole, K. *J. Antimicrob. Chemother.* (2005), *56*, 20-51.
[22] Connolly, J.D. ; Hill, R.A. *Dictionary of terpenoids*. (1992), New-York : Charpmann and Hall
[23] Guénard, D. ; Guéritte-Voegelein, F. ; Potier, P. *Acc. Chem. Res.* (1993), *26*, 160-167.
[24] Wallach, O. *Liebigs Ann. Chem*. (1887), *239*, 1-54.
[25] Ruzicka, L., Eschenmoser, A. Heusser, H. *Experientia*, (1953), *9*, 357-396.
[26] Ruzicka, L. *Proc. Chem. Soc.* (1959), 341-360.
[27] Agranoff, B.W. ; Eggerer, H. ; Henning, U. ; Lynen, F. *J. Am. Chem. Soc.* (1959), *81*, 1254-1255
[28] Agranoff, B.W. ; Eggerer, H. ; Henning, U. ; Lynen, F. *J. Biol. Chem.* (1960), *235*, 326-332
[29] Clifford, K. ; Cornforth, J.W. ; Mallaby, R. ; Phillips, G.T. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. (1971), 1599-1600.
[30] RamosValdivia, A.C. ; van der Heijden, R. ; Verpoorte, R. *Nat. Prod. Rep*. (1997) ; *14*, 591-603.
[31] Ogura, K. ; Koyama, T. *Chem. Rev*. (1998), *4*, 1263-1274.
[32] Rohmer, M. *Nat. Prod. Rep.* (1999), *16*, 565-574.
[33] Spurgeon, S.L. ; Porter, J.W. *Biosynthesis of isoprenoids Compounds* (Porter, J.W. and Spurgeon, S.L., Eds), *New-York : Wiley* (1981), *1*, 1-46.
[34] Qureshi, N. ; Porter, J.W. *Biosynthesis of isoprenoids Compounds* (Porter, J.W. and Spurgeon, S.L., Eds), *New-York : Wiley* (1981), *1*, 47-94.
[35] Bloch, K. *Steroids*, (1992), *57*, 378-383.

[36] Bochard, D.A. ; Friesen, J.A. ; Stauffacher, C.V. ; Rodwell, V.W. *Comprehensive Natural Product Chemistry, Isoprenoids, Carotenoids and Steroids* (Cane, D.E., Ed.) *Oxford : Pergamon* (1999), *2*, 15-44.
[37] Bach, T.J. *Lipids* (1995), *30*, 191-202.
[38] Rohmer, M. *Comprehensive Natural Product Chemistry, Isoprenoid Carotenoids and Steroid* (Cane, D.E., Ed.) *Oxford : Pergamon*, (1999), *2*, 45-67.
[39] Rohmer, M. ; Knani, M. ; Simonin, P. ; Sutter, B. ; Sahm, H. *Biochem. J.* (1993), *295 (Pt 2)*, 517-524.
[40] Schwartz, M. ; Arigoni, D. ; *Comprehensive Natural Product Chemistry, Isoprenois, Carotenoids and Steroids* (Cane, D.E., Ed.) *Oxford : Pergamon*, (1999), *2*, 367-400.
[41] Flesch, G. ; Rohmer, M. *Eur. J. Biochem.* (1988), *175*, 405-411.
[42] Rohmer, M. ; Seemann, M. ; Horbach, S. ; Bringer-Meyer, S. ; Sahm, H. ; *J. Am. Chem. Soc.* (1996), *118*, 2564-2566.
[43] Sprenger, G.A. ; Schorken, U. ; Wiegert, T. ; Grolle, S. ; de Graaf, A.A. ; Taylor, S.V. ; Begley, T.P. ; Bringer-Meyer, S. ; Sahm, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997), *94*, 12857-12862.
[44] Lois, L.M. ; Campos, N. ; Putra, S.R. ; Danielsen, K. ; Rohmer, M. ; Boronat, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998), *95*, 2105-2110.
[45] Kuzuyama, T. ; Shimizu, T. ; Takahashi, S. ; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* (1998), *39*, 7913-7916.
[46] Rohdlich, F.; Kis, K.; Bacher, A. ; Eisenreich,W. *Curr. Op. Chem. Biol.*, (2001), *5*, 535-540.
[47] Eisenreich, W. ; Rohdich, F ; Bacher, A. *Trends Plant. Sci.* (2001), *6*, 78-84
[48] Rohmer,M.; Grosdemange-Billiard, C. ; Seemann, M. *Biopolymers* (2001), *2*, 49-72
[49] Kuzuyama,T.; Seto, H. *Nat. Prod. Rep.*, (2003), *20*, 171-183
[50] Seemann, M.; Tse Sum Bui, B.; Wolff, M.; Miginiac-Maslow, M ; Rohmer, M. *FEBS Lett.*, (2006), *580*, 1547-1552.
[51] Rohmer, M. *Pure Appl. Chem.* (2007), *79*, 739-751.
[52] Tritsch, D; Hemmerlin, A; Bach, T ; Rohmer, M. *FEBS Lett.*, (2010), *584*, 129-134
[53] Bouvier, F. ; d'Harlingue, A. ; Suire, C. ; Backhaus, R.A. ; Camara, B. *Plant. Physiol.* (1998), *117*, 1423-1431.
[54] Lange, B.M. ; Wildung, M.R. ; McCaskill, D. ; Croteau, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998), *95*, 2100-2104.
[55] Miller, B. ; Heuser, T. ; Zimmer, W.A. *FEBS Lett.* (1999), *460*, 485-490.
[56] Harker, M. ; Bramley, P.M. ; *FEBS Lett.* (1999), *448*, 115-119.
[57] Altincicek, B. ; Hintz, M. ; Sanderbrand, S. ; Wiesner, J. ; Beck, E. ; Jomaa, H. *FEMS Microbiol. Lett.* (2000), *190*, 329-333.
[58] Takahashi, S. ; Kuzuyama, T. ; Watanabe, H. ; Seto, H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1998), *95*, 9879-9884.
[59] Hoeffler, J.F. ; Tritsch, D. ; Grosdemange-Billiard, C. ; Rohmer, M. *Eur. J. Biochem.* (2002), *269*, 4446-4447.
[60] Schwender, J. ; Muller, C. ; Zeidler, J. ; Lichtenthaler, H.K. *FEBS Lett.* (1999), *455*, 140-144
[61] Lange, B.M. ; Croteau, R. *Arch. Biochem. Biophys.* (1999), *365*, 170-174
[62] Jomaa, H. ; Wiesner, J. ; Sanderbrand, S. ; Altcincek, B. ; Weidemeyer, C. ; Hintz, M. ; Turbachova, I. ; Eberl, M. ; Zeidler, J. ; Lichtenthaler, H.K. ; Soldati, D. ; Beck, E. *Science*, (1999), *285*, 1573-1576
[63] Proteau, P.J. ; Woo, Y.H. ; Williamson, T. ; Phaorisi, C. *Org. Lett.* (1999), *1*, 921-923
[64] Grolle, S. ; Bringer-Meyer, S. ; Sahm, H. *FEMS Microbiol. Lett.* (2000), *191*, 131-137

[65] Cane, D.E. ; Chow, C. ; Lillo, A. ; Kang, I. *Bioorg. Med. Chem.* (2001), *9*, 1467-1477
[66] Fox, D.T. ; Poulter, C.D. *Biochemistry* (2005), 44, 8360-8368
[67] Munos, J.W. ; Pu, X. ; Mansoorabadi, S.O. ; Kim, H.J. ; Liu, H-W. *J. Am. Chem. Soc.* (2009), *131*, 2048-2049.
[68] Wong, U. ; Cox, R.J. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2007), *119*, 5014-5017.
[69] Arigoni, D. ; Giner, J.L. ; Sagner, S. ; Wungsintaweekul, J. ; Zenk, M.H. ; Kis, K. ; Bacher, A. ; Eisenreich, W. *Chem. Commun.* (1999), *61*, 841-843
[70] Proteau, P.J. *J. Nat. Prod.* (1998), *61*, 841-843
[71] Radykewicz, T. ; Rohdich, F. ; Wungsintaweekul, J. ;Herz, S. ; Kis, K. ; Eisenreich, W. ; Bacher, A. ; Zenk, M.H. ; Arigoni, D. *FEBS Lett.* (2000), *465*,157-160
[72] Rohdich, F. ; Wungsintaweekul, J. ; Fellermeier, M. ; Sagner, S. ; Herz, S. ; Kis, K. ; Eisenreich, W. ; Bacher, A. ; Zenk, H.K. *Proc. Nalt. Acad. Sci. USA* (1999), *96*, 11758-11763
[73] Kuzuyama, T. ; Tagaki, M. ; Kaneda, K ; Watanabe, H. ; Dairi, T. ; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* (2000), *41*, 703-706
[74] Luttgen, H. ; Rohdich, F. ; Hrez, S. ; WungsintaweelkulJ. ; Hecht, S. ; Schuhr, C.A. ; Fellermeier, M. ; Sagner, S. ; Zenk, M.H. ; Bacher, A. ; Eisenreich, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000), *97*, 1062-1067
[75] Kuzuyama, T. ; Tagaki, M. ; Kaneda, K. ; Watanabe, H. ; Dairi, T., Seto, H. *Tetrahedron Lett.* (2000), *41*, 2925-2928
[76] Herz, S. ; Wungsintaweelkul, J. ; Schuhr C.A. ; Hecht, S. ; Luttgen, H. ; Sagner, S. ; Fellermeier, M. ; Eisenreich, W. ; Zenk, M.H. ; Bacher, A. ; Rohdich, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000), *97*, 2486-2490
[77] Tagaki, M. ; Kuzuyama, T. ; Kaneda, K., Watanabe, H. ; Dairi, T. ; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* (2000), *41*, 3395-3398
[78] Campos, N. ; Rodrigez-Conception, M. ; Seemann, M. ; Rohmer, M. ; Boronat, A. *FEBS Lett.* (2001), *488*, 170-173
[79] Seemann, M. ; Campose, N. ; Rodriguez-Conception, M. ; Hoeffler, J.F. ; Grosdemange-Billiard, C. ; Boronat, A. ; Rohmer, M. *Tetrahedron Lett.* (2002), *43,* 775-778
[80] Seemann, M. ; Campos, N. ; Rodriguez-Conception, M. ; Ibanez, E. ; Duvold, T. ; Tritsch, D. ; Boronat, A. ; Rohmer, M. *Tetrahedron Lett.* (2002), *43*, 1413-1415
[81] Wolff, M. ; Seemann, M. ; Grosdemange-Billiard, C. ; Tritsch, D. ; Campos, N. ; Rodriguez-Conception, M. ; Boronat, A. ; Rohmer, M. *Tetrahedron Lett.* (2002), *43*, 2555-2559
[82] Seemann, M. ; Bui, B.T. ; Wolff, M. ; Tritsch, D. ; Campos, N. ; Marquet, A. ; Rohmer, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2002), *41*, 4337-4339
[83] Seemann, M. ; Rohmer, M. *C. R. Chimie* (2007), *10*, 565-574
[84] Wang, W. ; Li,J. ; Wang, K. ; Huang, C. ; Zhang, Y. ; Oldfield, E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (2010), *107*, 11189-11193.
[85] Cunningham, F.X.Jr ; Lafond, T.P. ; Gantt, E. *J. Bacteriol.* (2000), *182*, 5841-5848
[86] Altincicek, B. ; Kollas, A.K. ; Sanderbrand, S. ; Wiesner, J. ; Hintz, M. ; Beck, E. ; Jomaa, H. *J. Bacteriol.* (2001), *183*, 2411-2416
[87] Rohdich, F. ; Hecht, S. ; Gärtner, K. ; Adam, P. ; Krieger, C. ; Amslinger, S. ; Arigoni, D. ; Bacher, A. ; Eisenreich, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002), *99*, 1158-1163
[88] Adam, P. ; Hecht, S. Eisenreich, W. ; Kaiser, J. ; Gräwert, T. ; Arigoni, D. ; Bacher, A. ; Rohdich, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002), *99*, 12108-12119
[89] Seemann, M. ; Janthawornpong, K. ; Schweizer, J. ; Böttger, L.H. ; Janoschka, A. ; Ahrens-Botzong, A. ; Ngouamegne Tambou, E. ; Rotthaus, O. ; Trautwein, A.X. ; Rohmer, M., Schünemann, V. *J. Am. Chem. Soc.* (2009), *131*, 13184-13185.

[90] Wolff, M. ; Seemann, M. ; Tse Sum Bui, B. ; Frapart, Y. ; Tritsch, D. ; Estrabot, A.G. ; Rodriguez-Conception, M. ; Boronat, A. ; Marquet, A. ; Rohmer, M. *FEBS Lett*. (2003) ; *541*, 115-120

[91] Wang, W. ; Li, J. ; Wang, K. ; Huang, C. ; Zhang, Y. ; Oldfield, E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (2010), *107*, 4522-4527.

[92] Gräwert, T. ; Span, I. ; Bacher, A. ; Groll, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2010), *49*, 8802-8809.

[93] Wang, K. ; Wang, W. ; No, J-H. ; Zhang, Y. ; Oldfield, E. *J. Am. Chem. Soc.* (2010), *132*, 6719-6727.

[94] Gräwet, T. ; Span, I. ; Eisenreich, W. ; Rohdich, F. ; Eppinger, J. ; Bacher, A. ; Groll, M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (2010), *107*, 1077-1087.

[95] Laupitz, R. ; Gräwert, T. ; Rieder, C. ; Zepeck, F. ; Bacher, A. ; Arigoni, D. ; Rohdich, F. ; Eisenreich, W. *Chem. Biodiv.* (2004), *1*, 1367-1376.

[96] Rosa-Putra, S. ; Disch, A. ; Bravo, J. ; Rohmer, M. *FEMS Microbiol. Lett.* (1998), *164*, 169-175

[97] Boucher, Y. ; Doolittle, W.F. ; *Mol. Microbiol*. (2000), *37*, 703-716

[98] Seto, H. ; Watanabe, H. ; Furihata, K. *Tetrahedron Lett*. (1996), *37*, 7979-7982

[99] Seto, H. ; Orihara, N. ; Furihata, K. ; *Tetrahedron Lett*. (1998), *39*, 9497-9500

[100] Begley, M. ; Bron, P.A., Heuston, S. ; Casey, P.G. ; Englert, N. ; Wiesner, J. ; Jomaa, H. ; Gahan, C.G.M. ; Hill, C. *Infect. Immun.* (2008), *76*, 5392-5401.

[101] Disch, A. ; Hemmerlin, A. ; Bach, T. ; Rohmer, M. *Biochem. J.* (1998), *331*, 615-621

[102] Schwarz, M. Thèse ETH Zürich, Suisse (1994)

[103] Rodriguez-Conception, M. ; Boronat, A. ; *Plants Physiol*. (2002), *130*, 1079-1089

[104] Hemmerlin, A. ; Hoeffler, J-F. ; Meyer, O. ; Tritsch, D. ; Kagan, I.A. ; Grosdemange-Billiard, C. ; Rohmer, M. ; Bach, T.J. *J. Biol. Chem.* (2003), *278*, 26666-26676.

[105] Bouvier, F. ; Rahier, A. ; Camara, B. *Prog. Lipid. Res.* (2005), *44*, 357-429.

[106] Adam, K-P. ; Thiel, R. ; Zapp, J. *Arch. Biochem. Biophys.* (1999), *369*, 127-132.

[107] Piel, J. ; Donath, J. ; Banderner, K. ; Boland, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* (1998), *37*, 2478-2481.

[108] Zeidler, G.J. ; Lichtenhaler, H.K. ; May, H.U., Lichtenhaler, F.W. *Z. Naturforsch.* (1997), *52c*, 15-23.

[109] Lichtenhaler, H.K. ; Rohmer, M., Schwender, J. *Physiol. Plant.* (1997), *101*, 643-652.

[110] Lichtenhaler, H.K. ; Schwender, J. ; Disch, A. ; Rohmer, M. *FEBS Lett.* (1997), *400*, 271-274.

[111] Settembre, E. ; Begley, T.P. ; Ealick, S.E. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2003), *13*, 739-747.

[112] Hill, R.E. ; Himmerlick, K. ; Kennedy, I.A. ; Pauloski, R.M. ; Sayer, B.G. ; Wolf, E. ; Spenser, I.D. *J. Biol. Chem.* (1996), *271*, 30426-30435.

[113] Matsue, Y. ; Mizuno, H. ; Tomita, T. ; Asami, T. ; Nishiyama, M. ; Kuzuyama, T. *J. Antibiotics* (2010), *63*, 583-588

[114] Zeidler,J. ; Schwender, J. ; Mueller, C. ; Lichtenthaler, H.K. *Biochem. Soc. Trans.* (2000), *28*, 796-798

[115] Eubanks, L.M. ; Poulter, C.D. *Biochemistry* (2003), *42*, 1140-1149.

[116] Altincicek, B. ; Hintz, M. ; Sanderbrand, S. ; Wiesner, J. ; Beck, E. ; Jomaa, H. *FEMS Microbiol. Lett.* (2000), *190*, 329-333.

[117] Charon, L. ; Pale-Grosdemange, C. ; Rohmer, M. *Tetrahedron Lett.* (2000), *40*, 7231-7234.

Chapitre I

Synthèse d'inhibiteurs potentiels de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)

I) La 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)

La 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) est la première enzyme de la voie du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) catalysant la synthèse du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) **25** à partir du pyruvate **23** et du D-glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) **24** (Figure 1). Son mécanisme de type ping-pong, a été découvert lorsque les deux précurseurs de la voie du MEP ont été identifiés.[1,2] De plus, il combine les caractéristiques des mécanismes réactionnels d'une transcétolase et d'une pyruvate décarboxylase. (Figure 1)

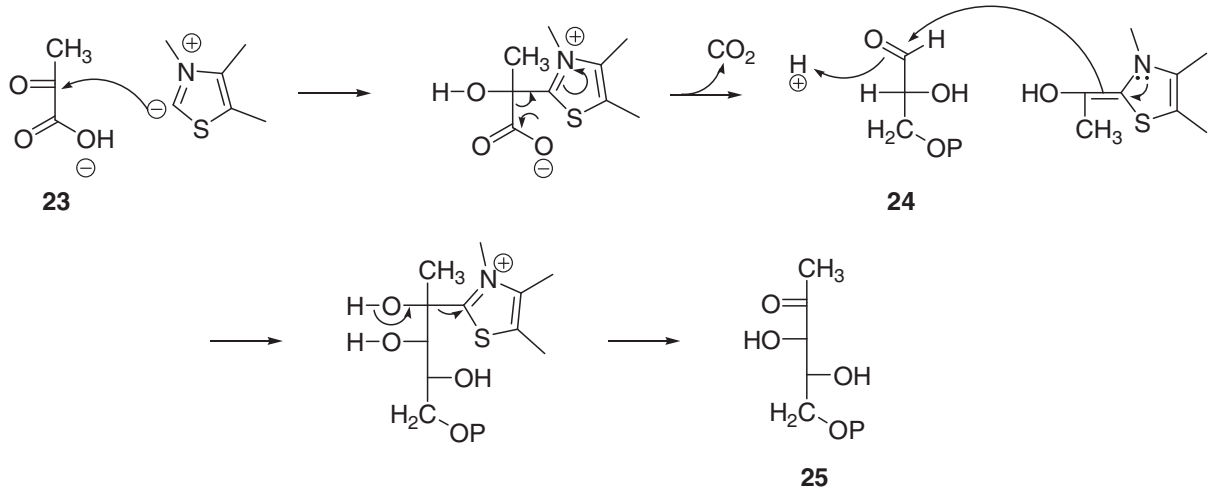


Figure 1 : Mécanisme de réaction de la DXS.

Après condensation du cofacteur sur le pyruvate **23**, ce dernier est décarboxylé et conduit à l'hydroxyéthylidènethiamine. Cette dernière va ensuite se condenser sur le groupement carbonyle en C-1 du D-glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) **24** conduisant tout d'abord à l'adduit du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate et du cofacteur, puis à la libération du pentulose phosphate libre (DXP, **25**). Le DXP est ensuite utilisé par la voie du MEP pour la synthèse de l'IPP et du DMAPP, mais aussi dans la biosynthèse de la thiamine,[3](vitamine B1) et du pyridoxol[4] (vitamine B6) chez certaines bactéries.

Des études sur la sélectivité de la DXS envers différents substrats, ont montré qu'elle n'était pas très sélective pour les analogues du D-glycéraldéhyde-3-phosphate. En effet, des dérivés de sucres tels que le D-érythrose-4-phosphate et le D-ribose-4-phosphate ont été testés en présence de pyruvate et ont été transformés respectivement en 1-désoxy-D-fructose 6-

phosphate et en 1-désoxy-D-sedoheptulose 7-phosphate.[5] De même la DXS utilise l'acétaldéhyde, le propanal et le butanal pour donner respectivement l'acétoïne, la 3-hydroxypentan-2-one et la 3-hydroxyhexan-2-one. [6]

De plus, au laboratoire, une étude a été réalisée sur la sélectivité vis à vis du D-glycéraldéhyde 3-phosphate et du L-glycéraldéhyde 3-phosphate et leur isostères phosphonates. Cette expérience a montré que la DXS utilise tous ces produits comme substrats et les transforme respectivement en isostère phosphonate du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (D-*thréo*pentulose 5-phosphate) et en isostère phosphonate du 1-désoxy-L-*érythro*pentulose 5-phosphate.[7]

Concernant les analogues de pyruvate, la DXS est plus sélective.[8] L'hydroxypyruvate, l'acétaldéhyde et l'acétoïne ont été incubés avec du D-glycéraldéhyde 3-phopsphate et de la DXS pour donner respectivement le D-xylulose et du 1-désoxyxylulose 5-phosphate.

Cette enzyme, identifiée pour la première fois chez *E. coli*[9] et chez *Mentha x piperita,*[10] est un homodimère formé de deux sous-unités à 67 kDa et requiert le diphosphate de thiamine (TPP) comme cofacteur et un cation divalent tel que Mg^{2+} ou Mn^{2+} (Figure 2).

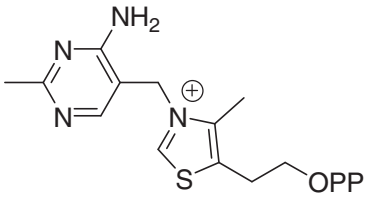


Figure 2 : Diphosphate de thiamine (TPP)

La structure cristalline de la DXS d'*E. coli* a été déterminée avec une résolution de 2,4 Å. Cette première structure correspond à une enzyme partiellement dégradée par une protéase de champignon, ce qui a rendu possible la cristallisation (Figure 3). [11] La DXS de *Deinococcus radiodurans* quant à elle a pu être cristallisée avec une séquence d'aminoacides complète (Figure 4). [11]

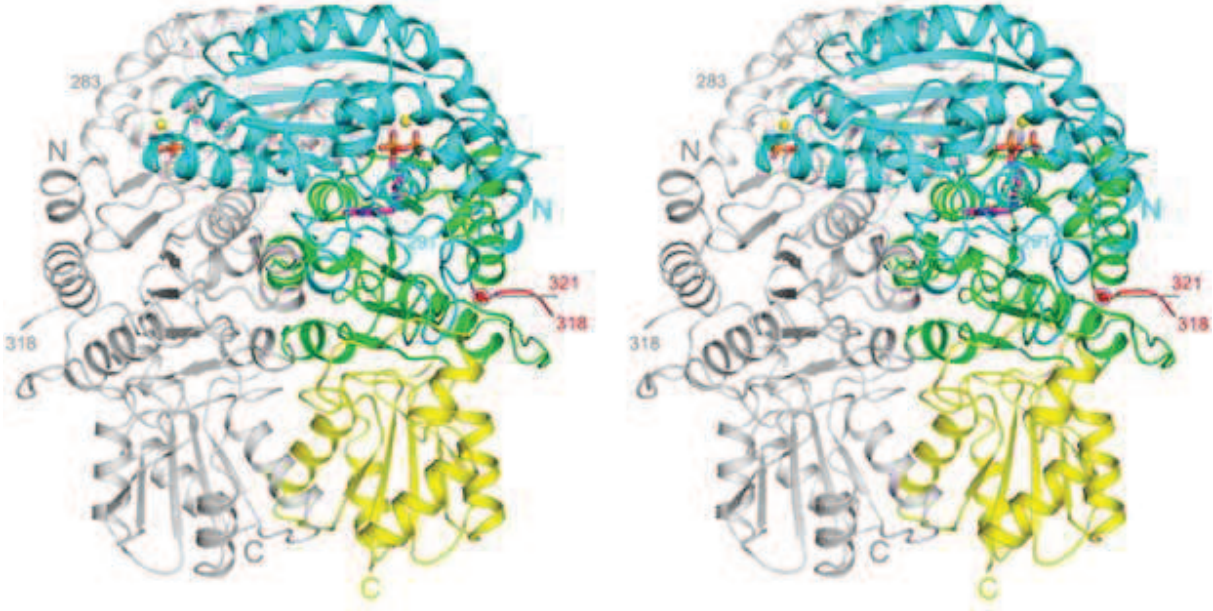


Figure 3 : Structure cristalline de la DXS d'*Escherichia. coli.*[11]

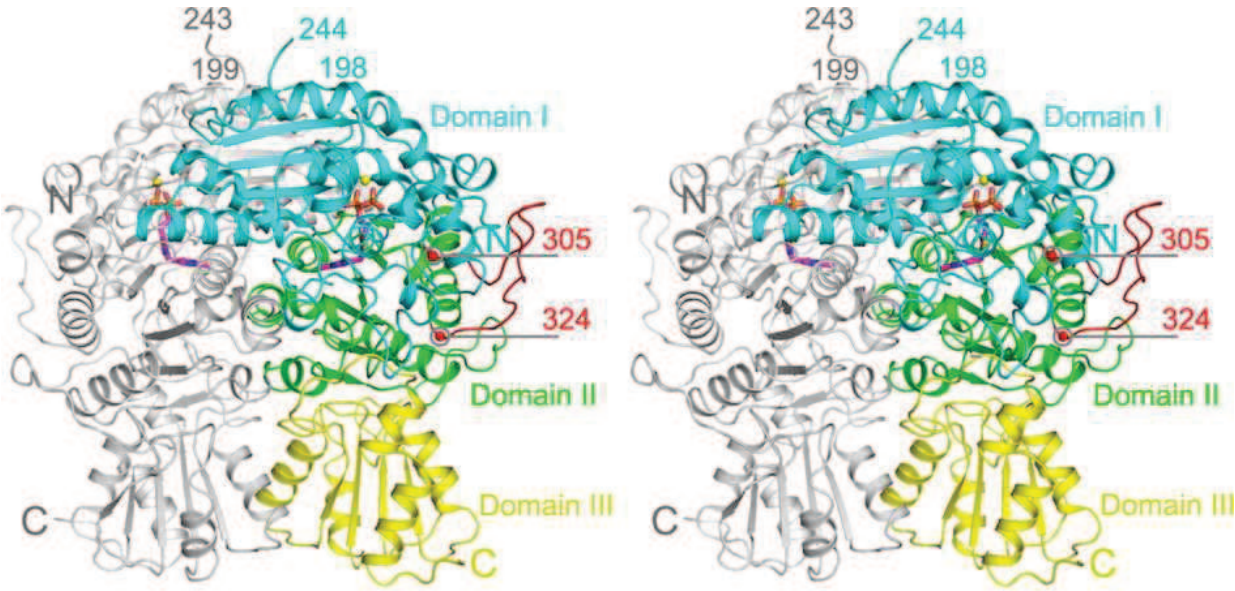


Figure 4 : Structure cristalline de la DXS de *Deinococcus. radiodurans.*[11]

Le monomère de la DXS est composé de trois domaines différents.

- Le domaine I (résidus 1-319) comporte cinq rangées parallèles de feuillets β. Ce domaine est plus large car il possède des résidus aminoacides terminaux.

- Le domaine II (résidus 320-495) possède six rangées parallèles de feuillets β.
- Le domaine III (résidus 496-629) contient cinq feuillets β, dont le premier est antiparallèle aux quatre autres.

Le site actif de la DXS se situe à l'interface entre le domaine I et le domaine II du même monomère, sans contribution directe du résidu du deuxième monomère de l'homodimère (Figure 5). Les feuillets β centraux des deux domaines sont orientés de façon telle que leurs extrémités C-terminales sont pointées l'une vers l'autre et que le cofacteur TPP est situé au fond de la poche de cette interface (Figure 6). La structure du site actif de la DXS est proche de celles des transcétolases et de la sous-unité E1 de la pyruvate déshydrogénase.

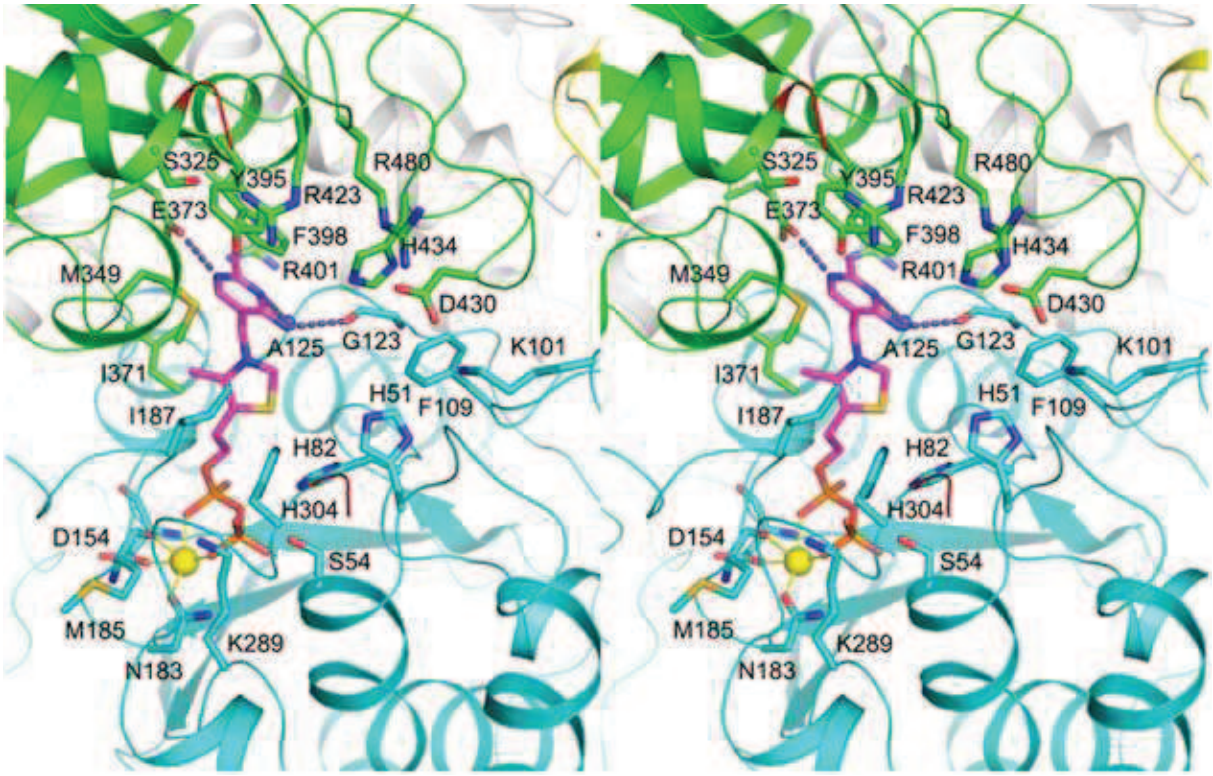


Figure 5 : site actif de la DXS de Deinococcus *radiodurans* [7]

Des essais de cristallisation de la DXS de *D. radiodurans* avec ses substrats n'ont pas été fructueux. Néanmoins, l'ajout de pyruvate au cristal de la DXS montre un changement de la densité électronique autour du C-2 du TPP, ce qui confirmerait la formation d'un adduit covalent entre le pyruvate et le TPP. Ces mêmes essais ont été réalisés avec le D-glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP), mais il a été impossible d'observer le GAP dans le site

actif de l'enzyme. Seules des hypothèses sur les modes de liaisons des substrats dans le site actif ont pu être réalisées sur la base de la fixation de l'érythrose 4-phosphate dans une transcétolase (Figure 6).[11,12]

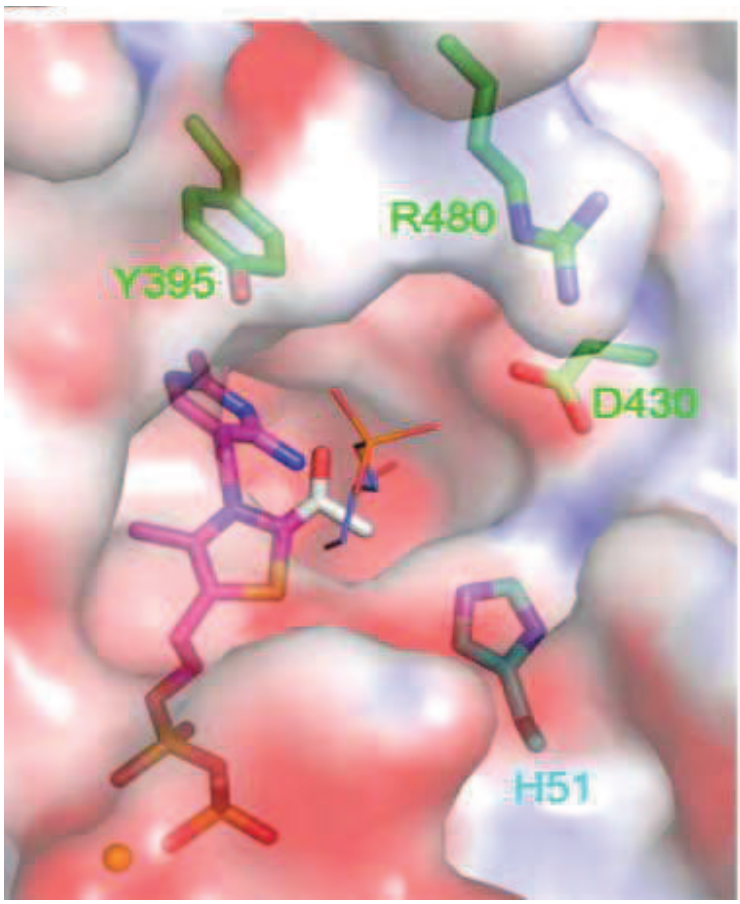
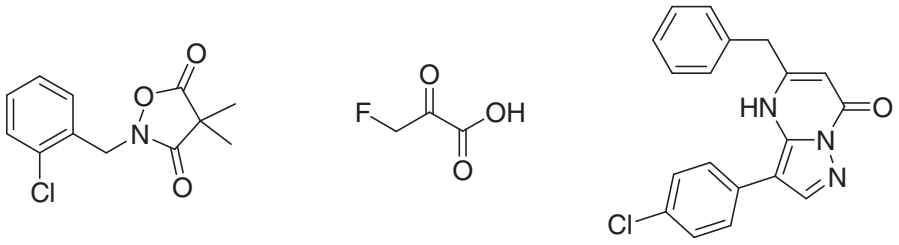


Figure 6 : Modèle du mode de liaison du pyruvate et du GAP dans le site actif [7]

A ce jour, trois inhibiteurs de la DXE sont connus. L'oxoclomazone[13,14,15] **30** qui inhibe la DXS de plante est incompétitif vis-à-vis du pyruvate et mixte vis-à-vis du glycéraldéhyde 3-phosphate, cependant son site de liaison reste encore à déterminer.[13] Le fluoropyruvate[16,17] **31**, inhibiteur de la DXS de *Rhodobacter capsulatus* est un inhibiteur compétitif de la DXS. Puis les dérivés du 3-(4-chloro-phényl)-5-benzyl-4H-pyrazolo[1,5-a]pirimidin-7-one **32**, inhibiteur de la DXS de *Mycobacterium tuberculosis*[18] (Figure 7).



30 **31** **32**

Figure 7 : Inhibiteurs connus de la DXS.

II) Analogues de pyruvate accepteurs de Michael

1) Les acides benzylidènepyruviques

a) Introduction

Le 4-(4-chlorophényl)-2-oxo-3-buténoate **33** est un composé décrit dans la littérature[19] comme étant un inhibiteur irréversible entraînant le suicide de la pyruvate décarboxylase.[20] Le composé **33** est reconnu puis décarboxylé dans le site actif de la pyruvate décarboxylase (Figure 8). L'adduit ainsi formé peut être protoné en α du cycle thiazolium conduisant au *p*-chlorocinnamaldéhyde. Il peut aussi être protoné en γ du cycle thiazolium, donnant l'énol du 2-acyl-TPP, qui est en équilibre avec le 2-acyl-TPP. L'hydrolyse de ce dernier conduit à la libération du cofacteur et à l'acide *p*-chlorodihydrocinnamique. L'addition d'une partie nucléophile de l'enzyme sur le 2-acyl-TPP, conduit alors à son inactivation irréversible.

La pyruvate décarboxylase possède deux sites de liaisons du substrat : un site régulateur et un site actif. La première liaison se fait avec le site régulateur, entraînant ainsi l'activation de l'enzyme, et la seconde dans le site actif, permettant la transformation du substrat. Lors de l'étude d'analogue du composé, la formation de l'énamine (Figure 8) a été détectée par l'apparition d'une absorption proche de 440 nm,[21,22] ce qui confirme la décarboxylation de l'inhibiteur. Si le carbone de l'énamine est protoné, il est possible que le produit soit libéré par l'enzyme sous forme de *p*-chlorocinnamaldéhyde.

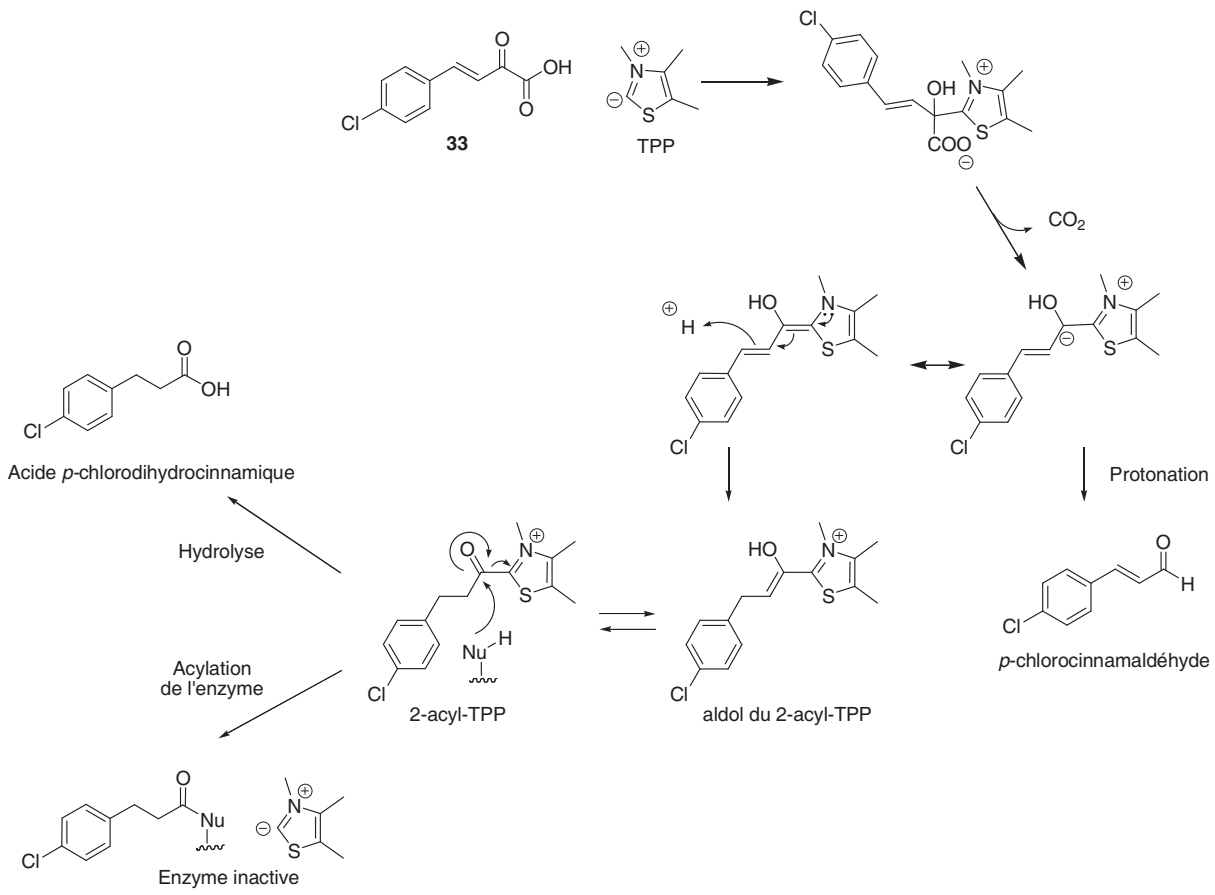


Figure 8 : Réaction de l'acide 4-(4-chlorophényl)-2-oxo-3-buténoïque **33** avec la pyruvate décarboxylase.

La DXS ayant un mécanisme analogue à celui de la pyruvate décarboxylase, nous avons choisi de synthétiser l'acide 4-(4-chlorophényl)-2-oxo-3-buténoïque **33** ainsi que d'autres dérivés d'acides benzylidènepyruviques et de les tester sur cette enzyme.

b) Synthèse des acides benzylidènepyruviques

Certaines synthèses d'acide benzylidène pyruvique sont décrites dans la littérature.[3,23,24,25] L'acide 4-(4-chlorophényl)-2-oxo-3-buténoïque **33** est synthétisé à partir de pyruvate de sodium et de 4-chlorobenzaldéhyde en une seule étape.

Le pyruvate est condensé sur le 4-chlorobenzaldéhyde en présence de soude et le sel obtenu précipite. Il est filtré, remis en solution dans l'eau et acidifié à l'aide d'acide chlorhydrique concentré, jusqu'à précipitation de l'acide. Ce dernier est filtré et rincé avec de

l'eau afin de retirer un maximum d'impuretés. Nous obtenons ainsi l'acide avec un rendement de 39%, dont le spectre RMN ne montre aucune impureté.

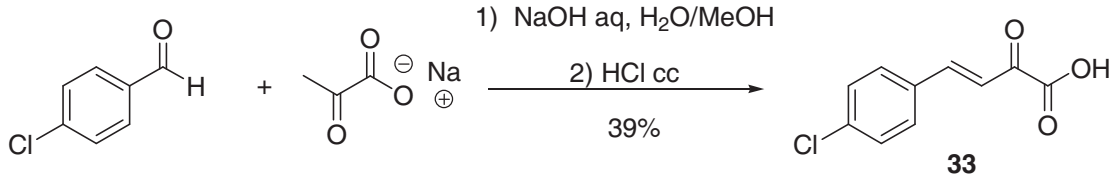


Figure 9 : synthèse de l'acide 4-(4-chlorophenyl)-2-oxo-3-buténoique **33**

Il paraissait intéressant de changer le substituant sur le cycle ou de l'enlever afin de voir l'effet des groupements électrodonneurs et électroattracteurs sur l'inhibition. Nous avons donc choisi de synthétiser l'acide 4-(4-hydroxyphényl)-2-oxo-3-buténoïque **34**, l'acide 4-(4-méthoxyphényl)-2-oxo-3-buténoïque **35**, l'acide 4-phényl-2-oxo-3-buténoïque **36**, l'acide 4-(4-nitrophényl)-2-oxo-3-buténoïque **37** et l'acide 4-(3-sulfophényl)-2-oxo-3-buténoïque **38**.

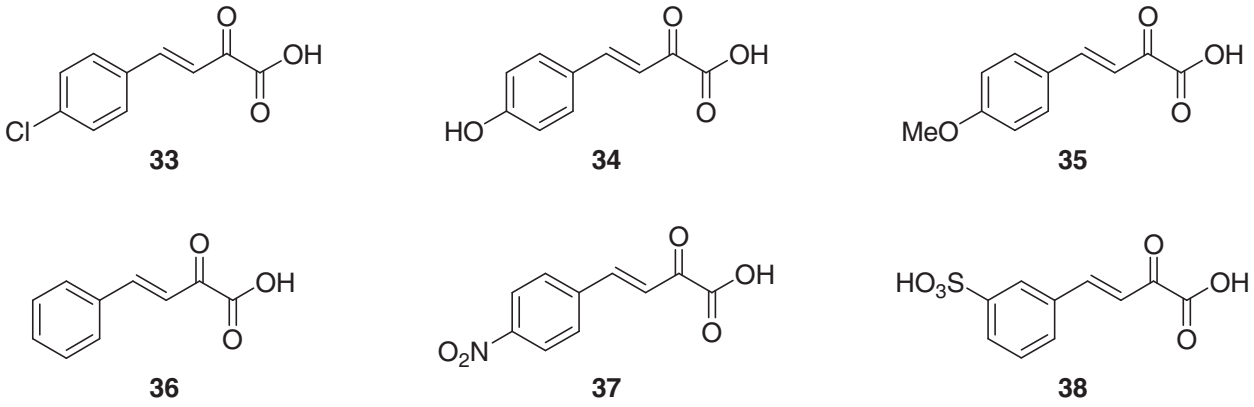


Figure 10 : Dérivés de l'acide benzylidènepyruvique.

Pour tous les composés, à l'exception de l'acide sulfonique **38**, nous avons en première intention choisi la même méthode de synthèse que précédemment, c'est-à-dire partir de l'aldéhyde déjà fonctionnalisé et du pyruvate de sodium. Il a été possible d'obtenir l'acide 4-(4-hydroxyphényl)-2-oxo-3-buténoïque **34** et l'acide 4-(4-méthoxyphényl)-2-oxo-3-buténoïque **35** à partir des aldéhydes correspondants, par cette voie de synthèse avec des rendements respectifs de 2% et de 34% (Figure 11).

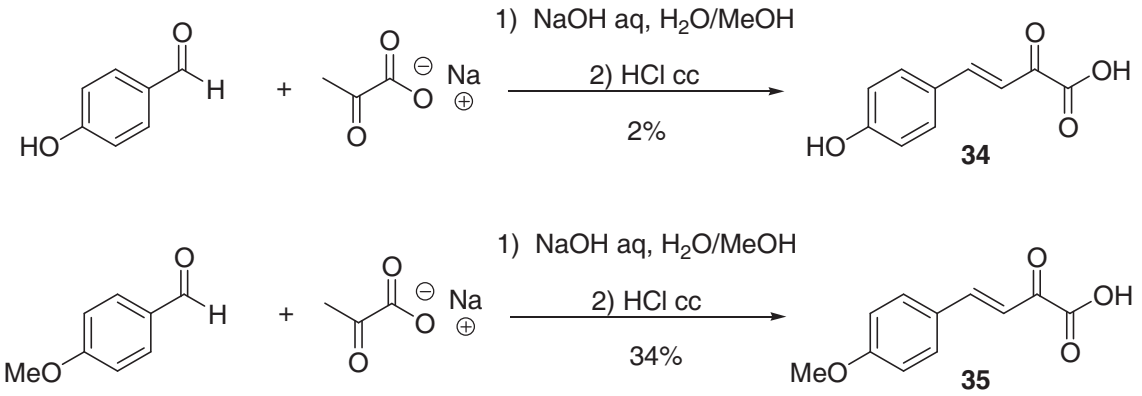


Figure 11 : Synthèses des composés **34** et **35**.

En ce qui concerne la synthèse de l'acide 4-phényl-2-oxo-3-buténoïque **36**, la méthode de synthèse précédente n'a pas donné de résultats. Le remplacement de la soude par la potasse et l'utilisation de méthanol absolu comme solvant et de l'acide pyruvique comme réactif, nous ont permis d'obtenir le composé voulu avec un rendement de 90%. [26] Nous avons ensuite remis ce produit en solution dans l'eau et acidifié cette solution avec de l'acide chlorhydrique concentré. Nous n'avons observé aucune précipitation, et il était impossible d'isoler et de purifier le produit de cette façon. Il a donc été conservé sous forme de sel de potassium (Figure 12).

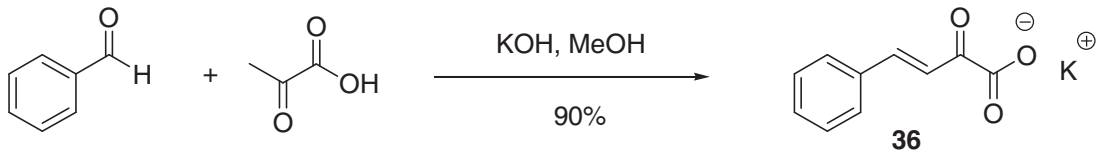


Figure 12 : Synthèse du 4-phényl-2-oxo-3-buténoate de potassium **36.**

La synthèse du composé **37** est décrite dans la littérature.[27] Le pyruvate est condensé sur le 4-nitrobenzaldéhyde en présence de soude dans un mélange EtOH/H_2O. La solution obtenue est acidifiée à l'aide d'acide chlorhydrique (2 M), jusqu'à précipitation de l'acide. Ce dernier est filtré et rincé avec de l'éthanol afin de retirer un maximum d'impuretés. Nous obtenons ainsi l'acide **37** avec un rendement de 13% (Figure 13).

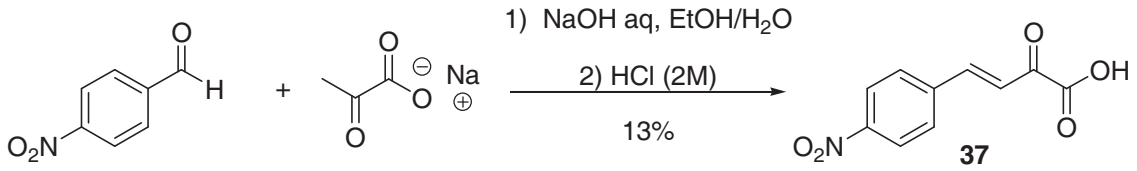


Figure 13 : Synthèse du composé **37**.

Pour le composé **38**, il a fallu dans un premier temps synthétiser l'aldéhyde correspondant, puis condenser le pyruvate. La réaction de sulfonation du benzaldéhyde à l'aide d'oléum a donné le 3-sulfonobenzaldéhyde. Pour la seconde étape, la condensation n'a jamais été possible (Figure 14).

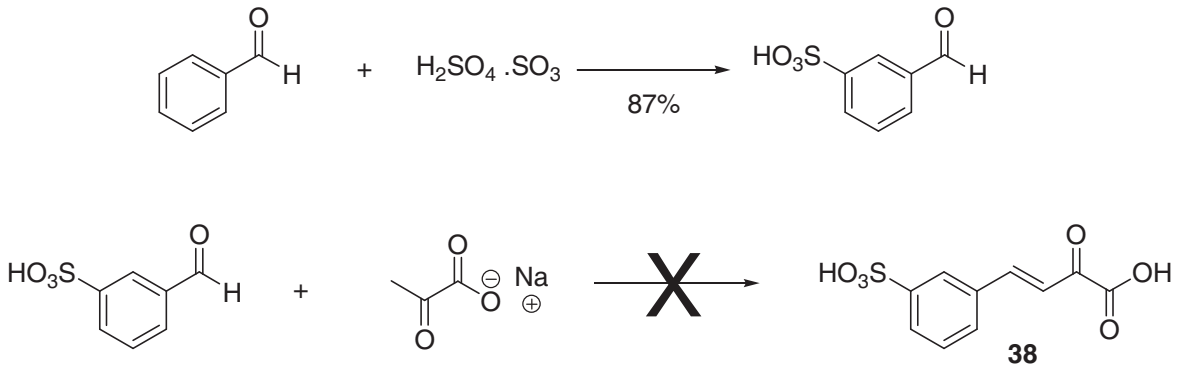


Figure 14 : Synthèse du composé **38.**

c) Conclusion

Nous avons pu synthétiser quatre dérivés d'acide benzylidènepyruvique, en une seule étape avec des rendements allant de 2% à 90%. Aucun des acides benzylidènepyruviques n'ayant donné de résultat intéressant au niveau de l'inhibition de la DXS, les investigations n'ont donc pas été poussées plus loin.

2) L'acide 2-oxo-3-butynoïque

a) Introduction

L'équipe de Jordan, après avoir testé des dérivés de l'acide benzylidènepyruvique, a testé l'acide 4-aryl-2-oxo-3-butynoïque[28]. Ce composé est également un accepteur de Michael, qui inhibe fortement la pyruvate décarboxylase. La liaison de ce produit avec l'enzyme se fait probablement au niveau de la cystéine 221 du site régulateur de la pyruvate décarboxylase. Ce produit n'est cependant pas actif sur la pyruvate déshydrogénase d'*E. coli*. Afin de tester si ces acides 2-oxo-3-alkynoïques sont des inhibiteurs potentiellement actifs sur d'autres enzymes à diphosphate de thiamine, les analogues à 4, 5 et 7 carbones aliphatiques ont été synthétisés.[29]

L'acide 2-oxo-3-butynoïque **41** paraît être le plus intéressant, car sa structure est celle qui se rapproche le plus de celle du pyruvate. De plus, des tests réalisés sur la pyruvate déshydrogénase donne un K_i = 7.9 µM pour ce composé. Il apparaît comme le plus efficace, et cette valeur suggère qu'il forme de façon irréversible un adduit relativement stable avec l'enzyme (Figure 15).[29]

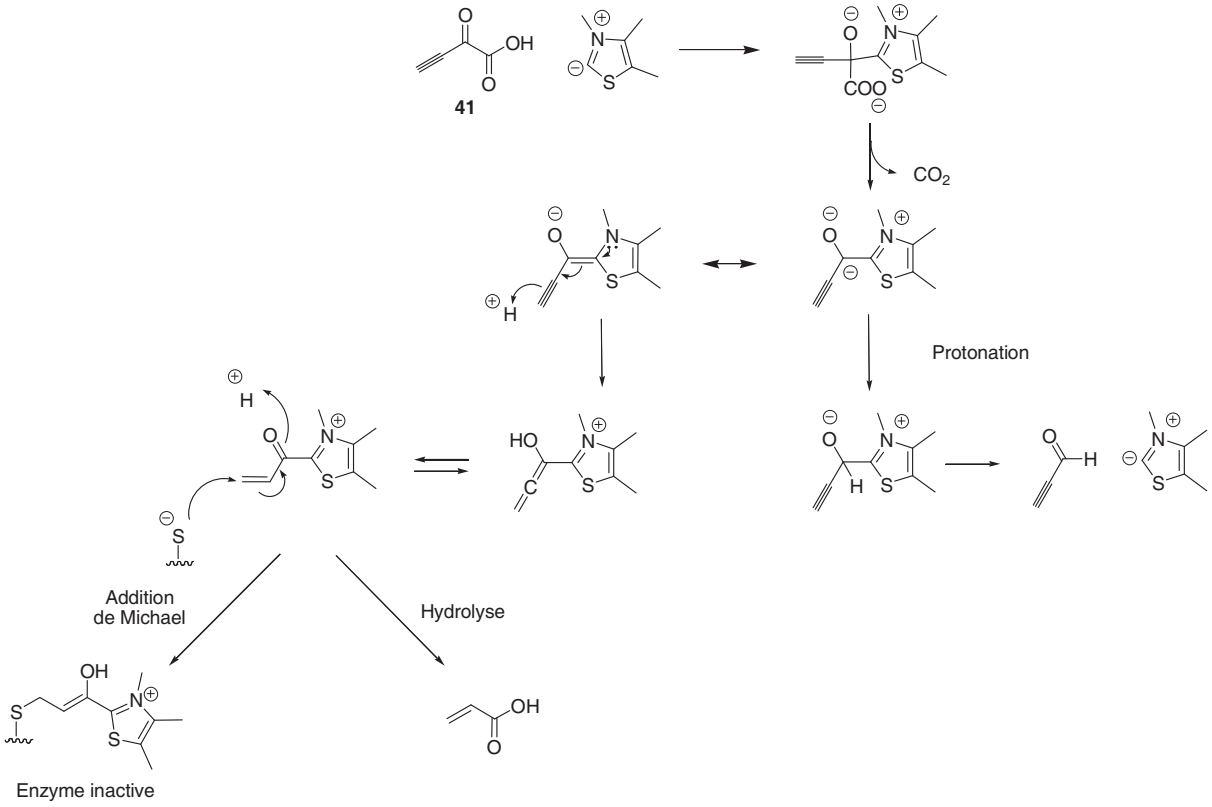


Figure 15 : Mécanisme hypothétique d'inhibition de la DXS par l'acide 2-oxo-3-butynoïque.

b) Synthèse de l'acide 2-oxo-3-butynoïque

La synthèse de l'acide 2-oxo-3-butynoïque **41** a déjà été étudiée lors des essais de ce produit sur la pyruvate déshydrogénase.[10] Nous partons pour cette synthèse de la *N,O*-diméthylhydroxylamine, de chlorure d'éthyloxalyle et de la triéthylamine, qui vont donner l'amide de Weinreb **39**, le 2-(éthyl(méthyl)amino)-2-oxoacétate d'éthyle. Sur cet amide est additionné le bromure d'éthynylmagnésium conduisant au 2-oxo-3-butynoate d'éthyle **40**. L'acide est ensuite déprotégé à l'aide de soude menant ainsi au produit attendu **41** (Figure 16).

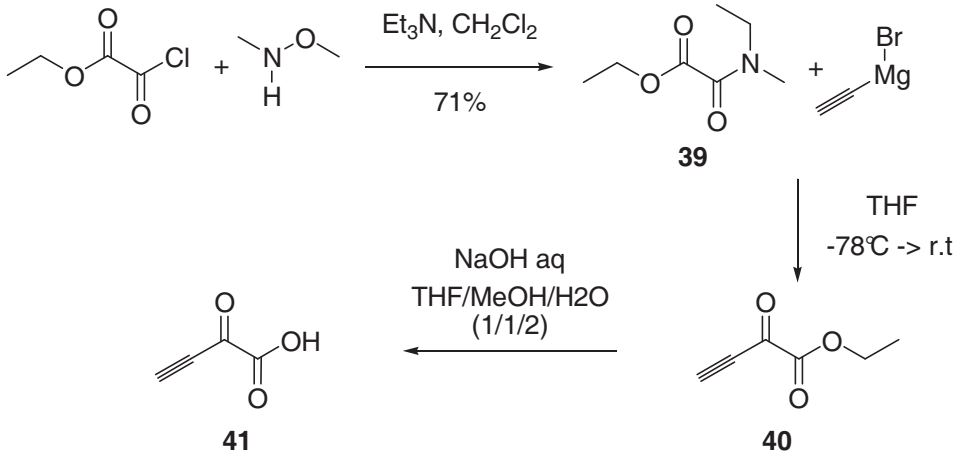


Figure 16 : Synthèse de l'acide 2-oxo-3-butynoïque **41** décrite par la littérature.[29]

En suivant la méthode décrite dans la littérature, nous avons synthétisé l'amide avec un rendement de 71%. La seconde étape n'a pu être réalisée : elle était aussi décrite, mais sans rendement. Nous ne constatons aucune condensation du magnésien sur l'amide. Il a donc été décidé d'utiliser un produit plus réactif qui sera additionné sur l'amide. Notre choix s'est porté sur un organolithien : le triméthylsilyléthynyl lithium. Ce composé pouvant s'additionner sur l'amide comme sur le chlorure d'éthyloxalyle, nous avons choisi d'éliminer l'étape de synthèse de l'amide. Celle-ci sera suivie de l'hydrolyse du triméthylsilyle du composé **42**, puis de l'ester **43**.

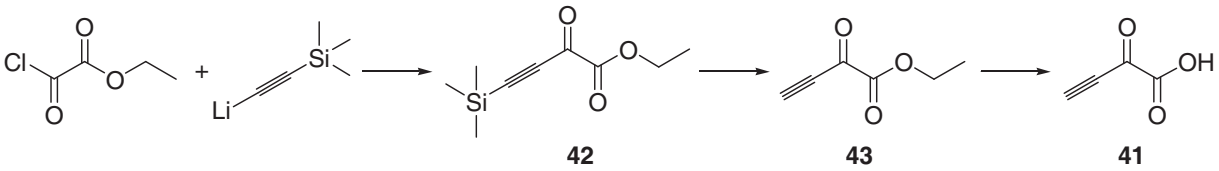


Figure 17 : Proposition de synthèse du composé **41**.

La condensation du lithien sur le chlorure d'acyle se fait avec un rendement de 35%. Le produit **42** contient quelques impuretés. Les essais de purification sur colonne chromatographique de silice ont entraîné la dégradation du produit : la différence entre le brut et le produit obtenu après chromatographie était visible par RMN. Il est probable que l'acidité de la silice a déprotégé la fonction éthynyle du composé et peut être aussi dégradé ce dernier. Le brut réactionnel est utilisé pour l'étape suivante sans purification.

L'étape suivante, l'hydrolyse du groupement TMS ne peut pas se faire en conditions acides à cause de la triple liaison qui pourrait être protonée et réduite en une double liaison. De plus, après l'hydrolyse du groupement TMS, le produit sera moins stable, nous souhaitons donc trouver une méthode de déprotection totale, ne faisant intervenir aucune purification. Ainsi plusieurs conditions ont donc été testées. (Tableau 1).

Réactif	Solvant	Temps	Conversion
K_2CO_3	MeOH	5 j	incomplète
$AgNO_3$	$CH_2Cl_2/H_2O/MeOH$	2 j	incomplète
TBAF	THF	2 h	totale
TBAF supporté sur silice	THF	30 min	totale
Résine Amberlite IRA 900 F^-	THF	3 h	totale

Tableau 1 : Résumé des différentes méthodes de déprotection de la triple liaison, testées.

L'utilisation de K_2CO_3 [30] ou $AgNO_3$ [31] ne permet pas d'obtenir une conversion totale, même après un temps long (Tableau 1). L'utilisation du TBAF et du TBAF supporté sur silice donne une réaction totale, mais il reste du réactif dans le produit final. Le TBAF est visible sur le spectre RMN du produit. Il n'est pas possible de les séparer. L'utilisation de l'ion F^- étant efficace pour retirer le groupement TMS, nous avons choisi une résine Amberlite IRA 900 F^-. Cette dernière donne une conversion totale et peut être éliminée simplement par filtration. Nous avons donc pu synthétiser le 2-oxo-4-butynoate de méthyle **43** avec un rendement de 97%, à l'aide de la résine Amberlite IRA 900 F^-.

Nous voulions réaliser l'étape d'hydrolyse de l'ester en conditions basiques afin d'éviter toute dégradation éventuelle du produit par protonation de la triple liaison. De même que pour l'étape précédente, il est intéressant de trouver un moyen de déprotéger le produit quantitativement, pour n'avoir à faire aucune purification et le garder sous forme de sel dans l'eau. Pour cela le produit a été mis en solution avec de la soude (0,5 M, 1 éq) et nous avons obtenu le sel de sodium **41** avec un rendement quantitatif (déterminé par RMN) (Figure 18).

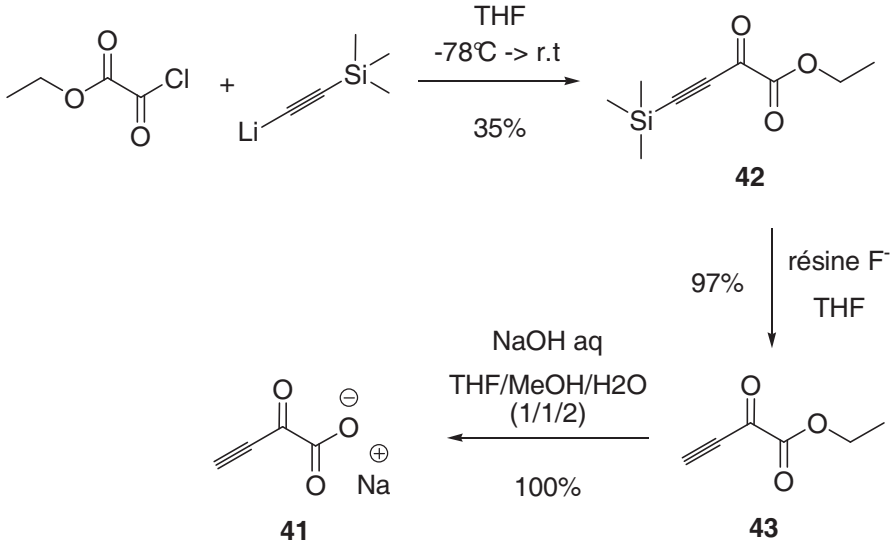


Figure 18 : Synthèse du 2-oxo-4-butynoate de sodium **41.**

c) Conclusion

Le 2-oxo-4-butynoate de sodium **41** a pu être obtenu par une voie de synthèse différente de celle de la littérature avec un rendement global de 42%. Ce produit n'est pas stable[28] et n'a donc pas pu subir de purification lors des différentes étapes de synthèse. Pour des raisons de stabilité, il n'a pas été isolé, mais gardé en solution aqueuse sous forme de sel.

3) L'acide 2-oxo-3-buténoïque

a) Introduction

Le substrat naturel de la DXS étant le pyruvate, nous cherchons un accepteur de Michael, moins rigide que le composé précédent. Pour cela, nous avons pensé à synthétiser l'acide 2-oxo-3-buténoïque **45**. Ce dernier possède une double liaison à la place de la triple liaison, ce qui lui permet de balayer un angle solide plus important et peut-être de rentrer et interagir plus facilement dans le site actif (Figure 19). Ce composé est naturellement un accepteur de Michael et n'a pas besoin de l'enzyme pour être activé. Il pourra au mieux être un marqueur d'affinité.

Ce composé n'est pas décrit dans la littérature et n'est pas connu pour avoir des propriétés inhibitrices ou biologiques.

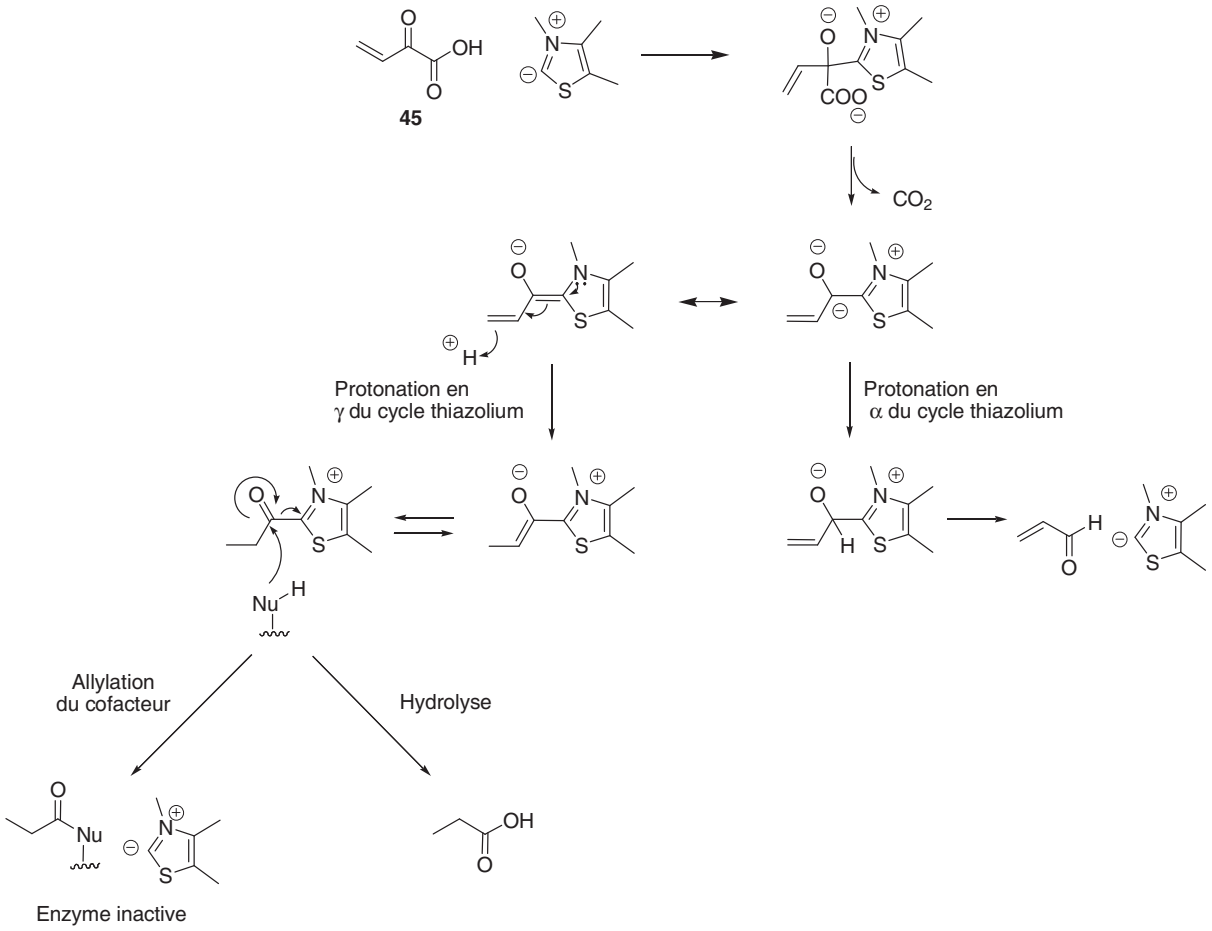


Figure 19 : Mécanisme hypothétique pour l'inhibition de la DXS par l'acide 2-oxo-3-buténoïque.

b) Synthèse de l'acide 2-oxo-3-buténoïque

Pour cette synthèse nous sommes partis du produit commercial le plus proche du produit souhaité : le 2-hydroxy-3-buténoate de méthyle. Pour obtenir le produit souhaité, l'alcool secondaire sera oxydé en cétone et l'ester hydrolysé.

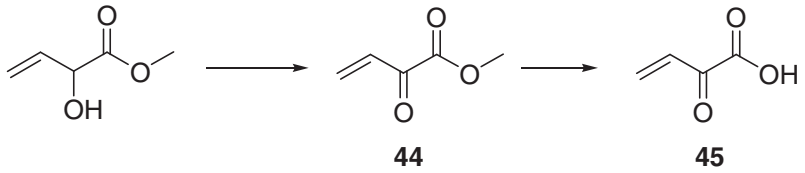


Figure 20 : Synthèse de l'acide 2-oxo-3-buténoïque **45.**

En première intention, nous avons utilisé du MnO_2 pour l'oxydation de l'alcool ; ce réactif étant spécifique de l'oxydation d'alcool allylique. L'utilisation de MnO_2 dans différents solvants n'a pas permis l'oxydation de l'alcool.[32,33] N'étant pas sûr de l'efficacité du MnO_2 commercial, nous avons décidé de synthétiser fraîchement MnO_2.[34] Celui-ci n'a pas eu plus d'effet sur cette molécule. Nous avons donc décidé de tester d'autres méthodes d'oxydations (Tableau 2).

Réactifs	Solvants	Temps	Température	Rendement
MnO_2	THF	30 min	t.a.	0%
MnO_2	THF	12 h	t.a.	0%
MnO_2	Et_2O	3 h	t.a	0%
MnO_2	CH_2Cl_2	24 h	t.a.	0%
MnO_2 synth.	CH_2Cl_2	48 h	t.a.	0%
Swern	CH_2Cl_2	2 h	-78°C/t.a	dégradation
Dess-Martin	CH_2Cl_2	10 h	t.a.	0%
IBX	AcOEt	4 h	reflux	90%

Tableau 2 : Résumé des différentes méthodes d'oxydation de l'alcool du 2-hydroxy-3-buténoate testées.

Après l'échec de l'oxydation par MnO_2, nous pensions utiliser une méthode plus forte pour oxyder l'alcool. La réaction de Swern[35] a conduit à la dégradation du produit. L'utilisation du réactif de Dess-Martin[15,17,36] n'a pas permis la transformation de l'alcool. Seul l'IBX[37,38] à reflux dans l'acétate d'éthyle a donné la cétone avec un rendement de 90%. De plus l'IBX n'étant pas soluble dans l'AcOEt, cette réaction ne nécessite aucun work-up. Il suffit de filtrer le réactif. Après rinçage et évaporation du filtrat, nous obtenons la cétone désirée **44** (Figure 21).

Ce produit n'est pas totalement pur, le spectre RMN indique qu'il contient environ 15% d'impuretés. Les essais de purification par chromatographie sur silice n'ont pas permis de retirer toutes les impuretés et ont conduit à la dégradation partielle du produit. L'ester sera donc hydrolysé directement.

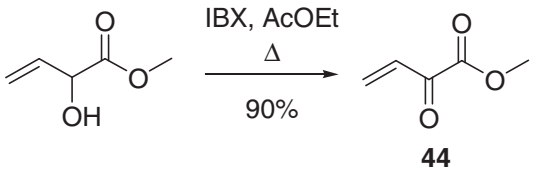


Figure 21 : Oxydation de l'alcool allylique **44.**

La déprotection de l'acide est conduite préférablement en milieu basique. Pour cela, nous utilisons la même méthode que celle mise en œuvre pour l'obtention du 2-oxo-3-butynoate de sodium **41**. Le composé a été mis en solution en présence de soude et nous avons observé la dégradation du composé de départ. Une deuxième déprotection en milieu acide, à l'aide d'HCl (2 M) à 40°C pendant 12 h, conduit également à la dégradation du produit. En effet, nous observons en RMN ^{1}H la disparition du signal de la double liaison. Une troisième méthode plus douce, basée sur de la biocatalyse, a été testée. Il s'agit de mettre en présence l'ester et une lipase supportée sur résine. Après avoir ajusté le pH à 8 à l'aide de $NaHCO_3$, la réaction est laissée sous agitation au « shaker » à 37°C pendant une nuit. Nous avons observé que l'hydrolyse de l'ester n'a pas été totale et qu'une partie de l'acide formé s'était dégradée.

Lors de ces différents essais, nous avons pu constater que le produit **44** était instable et ne se conservait que très peu de temps sous argon au congélateur. Cela est probablement dû au fait que c'est un accepteur de Michael très réactif. Le projet sur l'acide 2-oxo-3-buténoïque **45** a donc été abandonné.

c) Conclusion

La synthèse de l'acide 2-oxo-3-buténoïque **45** n'a pas pu être menée jusqu'au bout. Il paraissait être un accepteur de Michael très intéressant ce qui explique peut être sa forte instabilité. Il ne sera donc pas testé sur la DXS, mais c'est l'acide **46** correspondant à l'alcool de départ qui sera testé. Cet acide a pu être déprotégé avec la méthode utilisant la lipase.

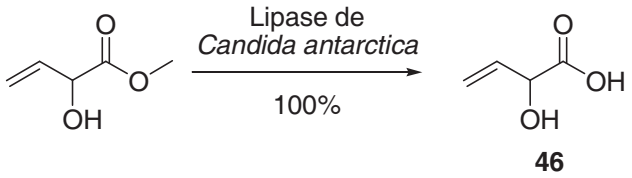


Figure 22 : Synthèse de l'acide 2-hydroxy-3-buténoïque **46**.

III) Analogues phosphorés du pyruvate

1) Introduction

L'acétylphosphinate **47** est l'analogue phosphoré du pyruvate ayant la structure la plus proche. Ce composé est déjà décrit comme étant un bon inhibiteur de la pyruvate déshydrogénase de plante (K_i = 0,33 µM),[39,40] d'*E. coli*[41,26] (K_i = 0,76 µM) et d'homme[42] (K_i = 0,014 µM). En revanche, il paraît être un mauvais inhibiteur de la pyruvate décarboxylase, car son K_i (2,7 mM) est du même ordre que le K_m du pyruvate (4 mM) pour cette enzyme.[43] De plus une étude mentionne dans un brevet, que le dérivé méthylé de ce phosphinate, l'acétylméthylphosphinate possède des propriétés inhibitrices de la DXS d'*E. coli.*[44]

2) Synthèse de l'acétylphosphinate

Le produit est synthétisé à partir de triéthylorthoacétate et d'acide phosphinique. La condensation de l'acide sur le triéthylorthoacétate en présence de quantité catalytique de $BF_3.Et_2O$ donne quantitativement le composé **47**. L'ester va être hydrolysé avec de la soude conduisant au composé **48** et la cétone sera ensuite déprotégée. Dans la synthèse décrite par Baillie,[37] l'hydrolyse de l'acétal **49** se fait avec de l'acide acétique. Cette déprotection n'a pas été efficace. D'autres essais de déprotection ont donc été menés afin d'obtenir le produit voulu sans purification (Tableau 3).

Réactifs	Température	Temps	Rendement
Acide acétique	t.a.	16 h	15%
Acide acétique	40°C	40 h	n.d Conversion totale
Acide acétique / TFA (cat)	40°C	7 h	n.d. Conversion totale
TFA	40°C	7 h	Dégradation
HCl (6 M)	40°C	10 h	Dégradation
HCl (2 M)	40°C	15 h	Dégradation
Dowex 50	t.a.	24 h	Dégradation
Amberlyst 15A	40°C	18 h	100%
HCl (2 M) (cat), H_2O	t.a	30 min	100%

Tableau 3 : Résumé des essais de déprotection du 2,2-diéthoxyéthylphosphinate de sodium **48.**
n.d. : non déterminé

Nous souhaitons obtenir le produit **49** pur, et aucune purification n'est possible, car il n'est soluble que dans l'eau. L'utilisation d'acide acétique a donné de bons rendements après 40 h à 40°C, mais il reste de l'acide acétique avec le produit. Cela n'est pas tolérable pour les tests biologiques, car sa structure est proche de celle du pyruvate et il pourrait interférer lors de ces tests. Le TFA et l'HCl concentré sont plus volatils, mais sont des acides trop forts pour notre molécule et conduisent à sa dégradation. Le HCl (2 M) ne permet pas d'obtenir le produit. On observe en RMN le signal correspondant à l'acide phosphinique, ce qui confirme la dégradation du produit. L'emploi de résine échangeuse de cations (H^+) permet d'éliminer du produit final tout réactif. Malheureusement, la résine Dowex 50 n'a pas permis l'obtention du phosphinate **49** et l'Amberlyst 15A a laissé des impuretés avec le produit. Finalement l'utilisation de HCl (2 M) en quantité catalytique dans l'eau donne quantitativement le produit attendu **49** (Figure 23).

Nous avons donc choisi de déprotéger le groupement cétone avec HCl (2 M) en quantité catalytique et de laisser le produit final en solution dans l'eau pour des raisons de stabilité. La concentration de la solution a pu être déterminée par un dosage du phosphore.[45]

On obtient ainsi une solution aqueuse à 172 mM.

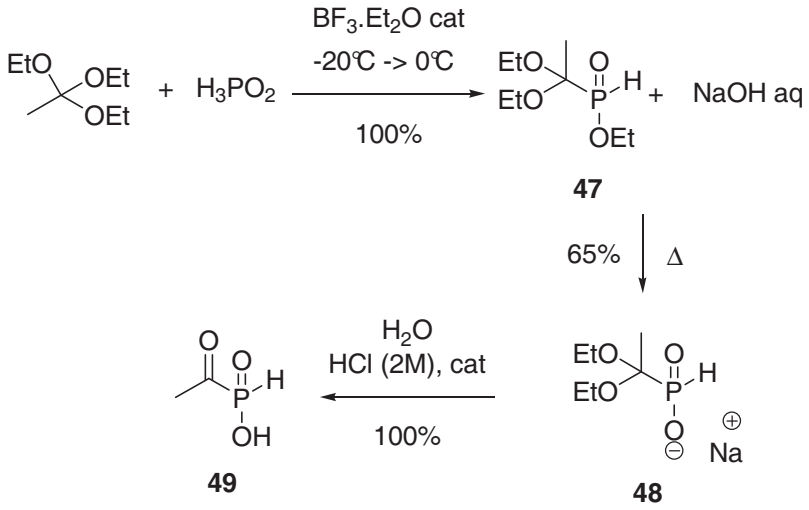


Figure 23 : Synthèse de l'acétylphosphinate **49.**

3) Tentative de synthèse de l'acétylméthylphosphinate

La synthèse de ce composé, qui est décrite dans la littérature,[39] utilise de la dichlorométhylphosphine et du triméthylorthoacétate. Cette condensation a conduit au composé **50**. L'ester est ensuite déprotégé avec de l'iodure de sodium dans la butanone pour conduire au composé **51**, et la cétone déprotégée à l'aide de l'acide acétique donnant ainsi le composé **52** (Figure 24). Cette synthèse est décrite en trois étapes et a un rendement global de 46%

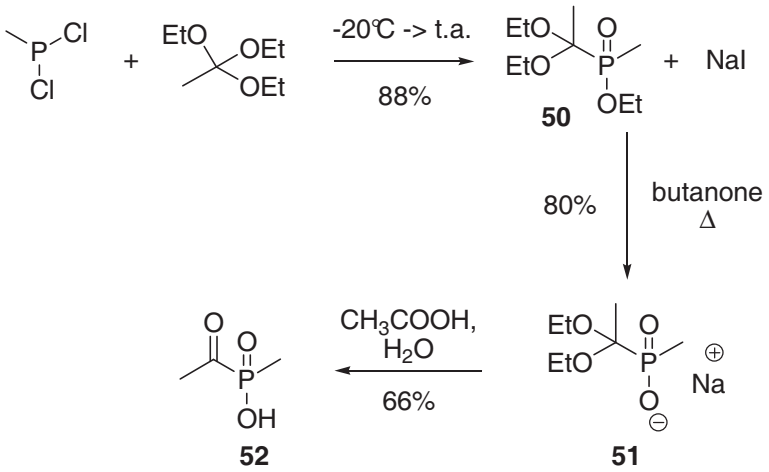


Figure 24 : Synthèse du composé **52** décrite dans la littérature.[39]

Le composé **50** a été synthétisé sans purification, avec un rendement de 95%. La déprotection à l'aide d'iodure de sodium, n'a pas mené au composé **51**. Nous n'avons observé aucune réaction. Divers essais de déprotection ont été réalisés (Tableau 4).

Réactifs	Solvant	Température	Temps	Rendements
NaI	Acétone	60°C	14 h	0%
NaI	Butanone	85°C	6 h	0%
NaOH (2 M)	H_2O	100°C	2 h	0%
TMSBr	Pyridine	t.a.	2 h	Dégradation
TMSBr (MW)	CH_3CN	40°C	10 min	Dégradation

Tableau 4 : Résumé des essais de déprotection du 2,2-diéthoxyéthylméthylphosphinate **50.**

L'utilisation d'iodure de sodium dans l'acétone ou dans la butanone n'a donné aucune conversion du produit de départ. Il en est de même pour l'utilisation d'une solution de soude à reflux dans l'eau. Le TMSBr à température ambiante a conduit à la dégradation du produit et l'essai avec les micro-ondes ont conduit à la dégradation du produit en acétylphosphinate **49**. Le composé **51** n'a pu être obtenu.

4) Conclusion

La synthèse de l'acétylphosphinate **49** a pu être réalisée avec un rendement global de 65% sur trois étapes. Ce produit est gardé en solution et sera testé par la suite sur la DXS. En ce qui concerne le composé **52**, il reste encore à réaliser les deux étapes de déprotection et les tests d'activité biologique.

IV) Analogues di- et trihalogénés du pyruvate

1) Introduction

Le fluoropyruvate est connu pour être un inhibiteur de la DXS.[15] Il paraissait intéressant de synthétiser d'autres composés halogénés, dont certains se sont révélés être des inhibiteurs irréversibles de la pyruvate déshydrogénase (Figure 25).[46] En effet, le bromopyruvate est un inhibiteur compétitif de la pyruvate déshydrogénase *d'E. coli* et possède un K_i compris entre 75 et 105 µM. Si un nucléophile placé dans l'enzyme attaque le complexe acétaldéhyde-TPP, il est possible que le TPP soit libéré et permette à l'enzyme de continuer à fonctionner.

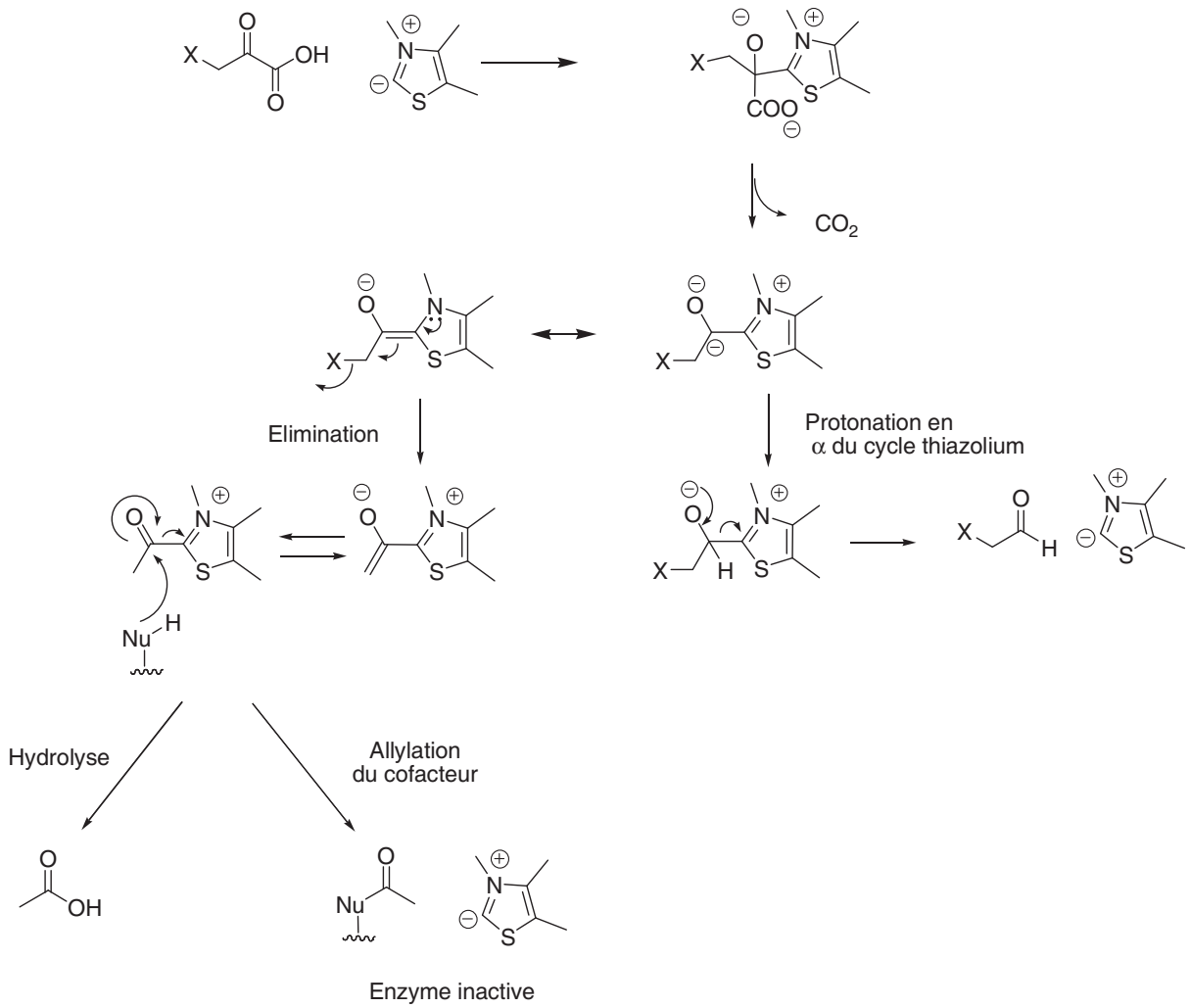


Figure 25 : Mécanisme d'inactivation de la DXS par un monohalogénopyruvate.

Afin d'éviter la libération du produit (Figure 25), nous nous sommes tournés vers la synthèse d'analogues dihalogénés du pyruvate[47], tels que le dibromopyruvate **53** et le dichloropyruvate **54**. Il paraissait aussi intéressant de synthétiser le trifluoropyruvate **55** pour voir l'influence du nombre d'halogènes sur la molécule (Figure 26).

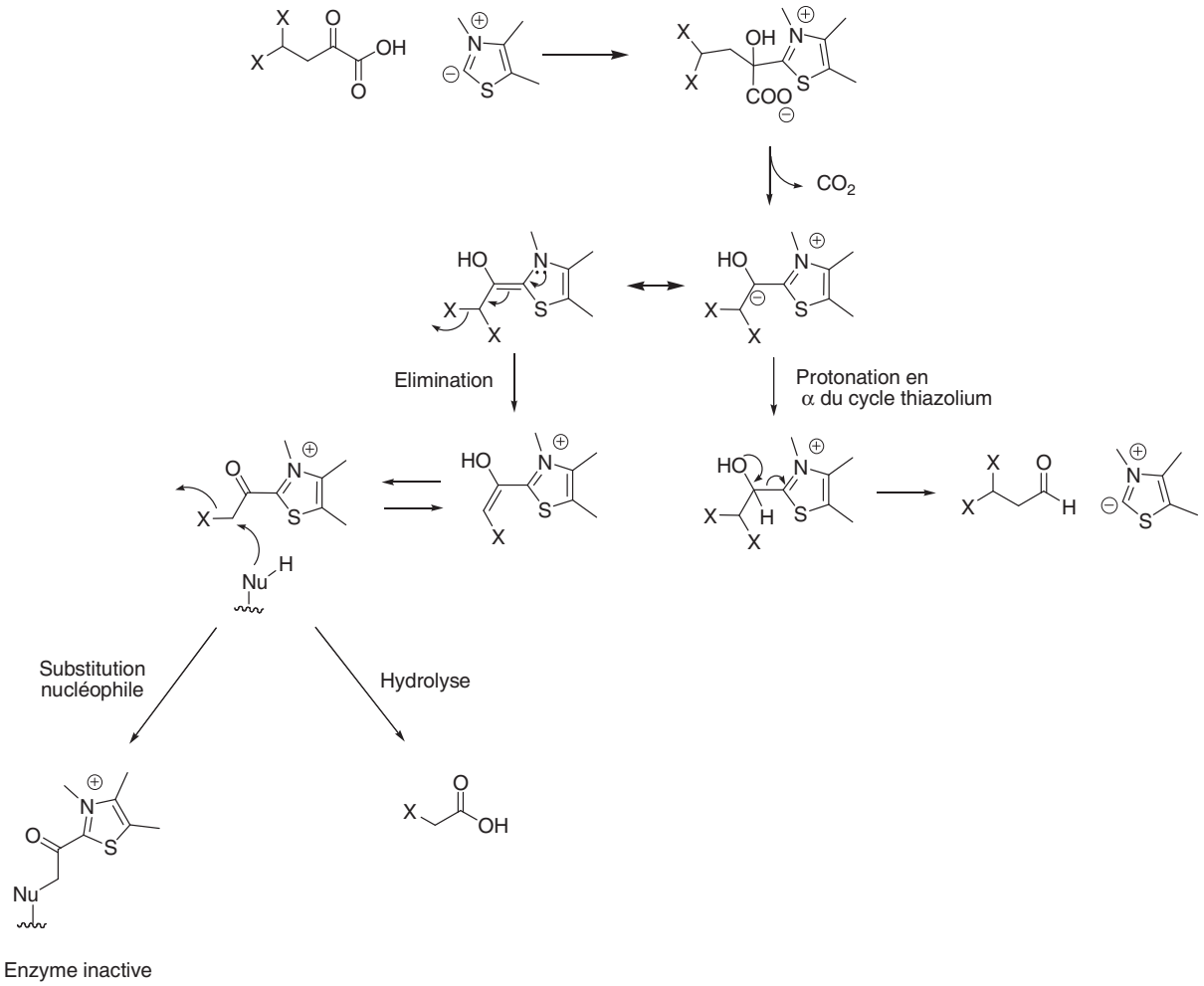


Figure 26 : Mécanisme hypothétique pour l'inhibition de la DXS avec un dihalogénopyruvate.

2) Synthèses

L'acide dibromopyruvique[48] **53** est synthétisé par ajout de dibrome sur l'acide pyruvique. Le solide obtenu a été purifié par sublimation et l'analyse RMN ne montre la présence que de l'acide dibromopyruvique. Cette synthèse en une étape permet d'obtenir l'acide dibromopyruvique **53** avec un rendement de 82%.

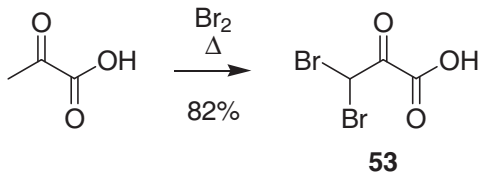


Figure 27 : Synthèse de l'acide dibromopyruvique **53.**

La synthèse[49] du dichloropyruvate **54** a été réalisée à partir du pyruvate d'éthyle et du chlorure de sulfuryle. Deux atomes de chlore vont être introduits sur la molécule par le chlorure de sulfuryle en présence d'acide *p*-toluènesulfonique et conduire à l'ester **56**. Ce dernier a été purifié par flash-chromatographie sur silice. Il est nécessaire d'avoir un produit pur après cette étape, car après déprotection il sera très difficile de purifier l'acide. L'analyse RMN, après purification, révèle l'absence de contaminants. L'ester a ensuite été hydrolysé à l'aide d'une solution de soude (0,5 M) dans un mélange THF, méthanol, eau.

Nous obtenons le composé **54** souhaité avec un rendement global de 82%.

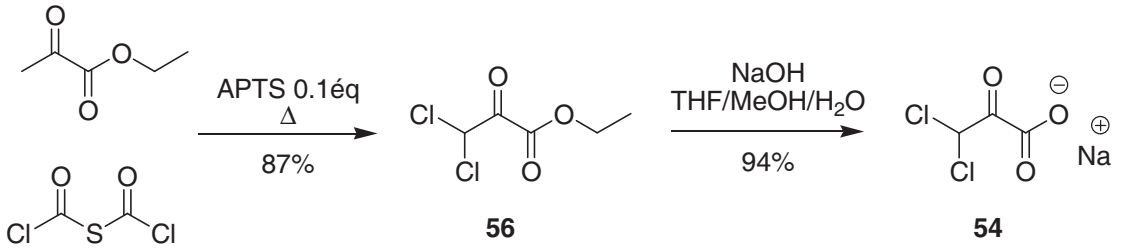


Figure 28 : Synthèse du dichloropyruvate de sodium **54.**

Enfin la déprotection du trifluoropyruvate de méthyle commercial à l'aide d'une solution de soude (0,5 M) a permis d'obtenir quantitativement le trifluoropyruvate de sodium **55**.

,

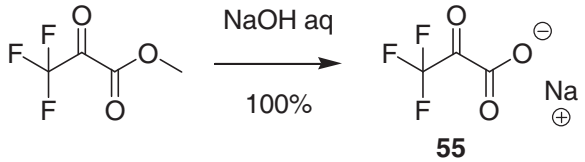


Figure 29 : Synthèse du trifluoropyruvate de sodium **55.**

3) Conclusion

Nous avons donc pu synthétiser les dérivés dihalogénés du pyruvate avec des rendements globaux de 82% pour le composé dibromé **53** et 82% pour le composé dichloré **54**. Le trifluoropyruvate **55** a été obtenu avec un rendement quantitatif à partir de l'ester méthylique correspondant. Ces composés seront testés par la suite sur la DXS.

V) Bilan

Une série de dix inhibiteurs potentiels de la DXS ont pu être synthétisés : des accepteurs de Michael ayant une structure proche de celle du pyruvate, dont certains sont connus pour être des inhibiteurs de la pyruvate décarboxylase et de la pyruvate déshydrogénase, un analogue phosphoré du pyruvate qui a déjà été testé sur la pyruvate déshydrogénase, et enfin les analogues di- et trihalogéné du pyruvate, qui sont connus pour être des inhibiteurs suicides.

Ces composés ont été testés par le Dr D. Tritsch sur la DXS d'*E. coli.*

Partie Expérimentale

Partie expérimentale générale

Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur plaques de gel de silice. Les plaques analytiques sont des plaques commerciales Merck en aluminium de 0,25 mm d'épaisseur, $60F_{254}$. Les plaques préparatives sont des plaques commerciales Merck en verre d'une épaisseur de silice de 0,5, 1 ou 2 mm, $60F_{254}$. Les composés ont été révélés par UV ou après pulvérisation d'un réactif à base de *p*-anisaldéhyde [*p*-anisaldéhyde (2,5%), H_2SO_4 (3,5%), AcOH (1,6%), EtOH (92,4%)], d'une solution d'acide phosphomolybdique [acide phosphomolybdique (25 g), $Ce(SO_4)_2.7H_2O$ (10 g), H_2SO_4 concentré (60 mL), H_2O (900 mL)], ou bien d'une solution de $KMNO_4$ à 1 % dans l'acétone, suivie de chauffage à plus de 100°C.

Chromatographie sur colonne :

Les chromatographies sur colonne de silice ont été effectuées avec du gel de silice Merck 60 de granulométrie 40-63 µm sous pression d'azote. Le diamètre de la colonne a été choisi en fonction de la quantité de produit à purifier. La hauteur de silice standard est de 15 cm et le débit de l'éluant est de 8 ml/min.[50]

Solvants :

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

Spectrométrie RMN :

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton, du carbone, du fluor et du phosphore ont été enregistrés à 298 K, soit sur un appareil BRUKER Avance 300 (RMN ^{1}H : 300MHz ; RMN ^{13}C : 75MHz ; RMN ^{31}P : 121.5MHz ; RMN ^{19}F : 282MHz), soit sur un

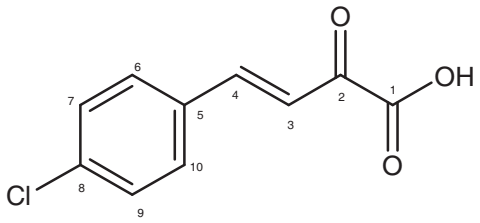
appareil BRUKER Avance 400 (RMN ^{1}H : 400MHz ; RMN ^{13}C : 100MHz), soit sur un appareil BRUKER Avance 500 (RMN ^{1}H : 500MHz ; RMN ^{13}C : 100MHz), soit sur un appareil BRUKER Avance 600 (RMN ^{1}H : 600MHz ; RMN ^{13}C : 150MHz) en utilisant des solutions dans le chloroforme deutérié, l'eau lourde ou le méthanol deutérié. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm en prenant comme référence le signal du $CHCl_3$ (δ = 7,26 ppm) en RMN ^{1}H et celui du $CDCl_3$ (δ = 77,030 ppm) en RMN ^{13}C pour des spectres enregistrés en solution dans $CDCl_3$, le signal de DHO (δ = 4,56 ppm) en RMN ^{1}H pour des spectres enregistrés en solution dans D_2O, le signal du MeOH (δ =3,30 ppm) en RMN ^{1}H et celui du CD_3OD (δ = 49,00 ppm) en RMN ^{13}C pour des spectres enregistrés dans CD_3OD, le signal du CH_3CN (δ =1,94 ppm) en RMN ^{1}H et celui du CD_3CN (δ = 1,32 ppm et 118,26 ppm) en RMN ^{13}C pour des spectres enregistrés dans CD_3CN , le signal du DMSO (δ = 2,50 ppm) en RMN ^{1}H et celui du d6-DMSO (δ = 39,52 ppm) en RMN ^{13}C pour des spectres enregistrés le d6-DMSO.

Les abréviations s, d, t, q et m désignent respectivement la multiplicité du signal : singulet, doublet, triplet, quadruplet et multiplet. Les constantes de couplages sont exprimées en Hz. La pureté des produits est évaluée grâce aux spectres RMN ^{1}H, ^{13}C et ^{31}P. Seuls certains spectres de RMN des produits synthétisés sont décrits dans la littérature.

Spectrométrie de masse :

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

Acide 4-chlorobenzylidènepyruvique ***33***



$C_{10}H_7O_3Cl$
210,61 g/mol

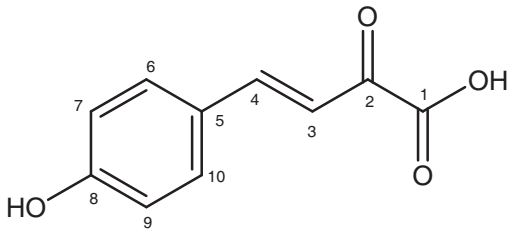
Dans un ballon de 50 mL, on introduit le 4-chlorobenzaldéhyde (1,17 g ; 8,32 mmol ; 1,05 éq) et H_2O (4,8 mL). A ce mélange, est additionnée une solution aqueuse de pyruvate de sodium (4 M ; 2 mL ; 8,0 mmol ; 1 éq). Le mélange est ensuite refroidi à 0°C. Une solution de NaOH (18% m/v) dans un mélange MeOH/H_2O (1 :1 ; 2,4 mL) est ajoutée lentement au mélange. La réaction est ensuite laissée à réagir pendant 15 h à température ambiante. (CCM)

Le précipité jaune formé est filtré sur verre fritté et lavé avec du MeOH (5x20 mL). Le produit brut est ensuite dissous dans H_2O (250 mL). La solution est acidifiée par addition d'HCl concentré, jusqu'à totale précipitation de l'acide. Le précipité est filtré et lavé avec H_2O (20 mL).

On obtient une poudre jaune (654 mg, 39%).

- Solide jaune
- R_f (butanol/eau/ammoniaque/éthanol :4/1/1/1, UV) = 0,56
- **RMN ^{1}H-300 MHz (CD_3CN)** : δ 7,43 (d, 16,3 Hz, 1H-3) ; 7,48 (d, 8,8 Hz, 2H arom) ; 7,73 (d, 8,7 Hz, 2H arom) ; 7,88 (d, 16,3 Hz, 1H-4).
- **RMN ^{13}C-75 MHz (CD_3CN)**: δ 120,5 (C-3) ; 129,24 (2C arom) ; 130,59 (2C arom) ; 132,88 (C-5) ; 136,98 (C-8) ; 146,68 (C-4) ; 161,98 (C-1) ; 183,39 (C-2).
- **ES$^-$ [M-H$^+$] :** 208,946 (valeur calculée : 209,000)
- λ_{max}= 308 nm (mesuré dans tampon TEA 50 mM/pH 7,7)

Acide 4-hydroxybenzylidènepyruvique ***34***



$C_{10}H_8O_4$
192,17 g/mol

Dans un ballon de 50 mL, on introduit le 4-hydroxybenzaldéhyde (3 g ; 24,6 mmol ; 1,05 éq). On additionne une solution aqueuse de pyruvate de sodium (4 M ; 5,8 mL ; 23,4 mmol ; 1 éq). Une solution de NaOH (4,5 M) dans un mélange MeOH/H_2O (1 :1 ; 7,3 mL) est ajoutée lentement au mélange. La réaction est ensuite laissée à réagir pendant 10 h à température ambiante.

La solution orangée obtenue est acidifiée avec de l'HCl concentré, jusqu'à ce que tout l'acide ait précipité. Le précipité est filtré et lavé avec H_2O (30 mL) et séché deux jours au dessiccateur sur P_2O_5.

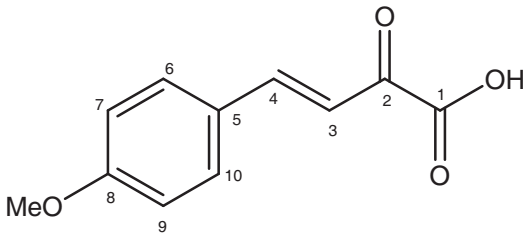
On obtient un produit brut (675 mg, 15%).

Le produit est lavé ensuite plusieurs fois avec Et_2O (5x5 mL), filtré, séché sous vide.

On obtient une poudre jaune (80 mg, 2%).

- Solide jaune
- **RMN ^{1}H-300 MHz (CD_3CN)** : δ 6,89 (d, 8,5 Hz, 2H arom) ; 7,27 (d, 16,2 Hz, 1H-3) ; 7,65 (d, 8,5 Hz, 2H arom) ; 7,87 (d, 16,1 Hz, 1H-4).
- **RMN ^{13}C-75 MHz (CD_3CN)** : δ 117,39 (C-7 et C-9) ; 118,15 (C-3) ; 127,44 (C-5) ; 132,91 (C-6 et C-10) ; 150,09 (C-4) ; 162,03 (C-8) ; 163,87 (C-1) ; 184,67 (C-2).
- **ES^- [M-H^+] :** 191,038 (valeur calculée : 191,034)
- λ_{max} = 330 nm et épaulement 290 nm (mesuré dans tampon TEA 50 mM/pH 7,7)

Acide 4-méthoxybenzylidènepyruvique ***35***



$C_{11}H_{10}O_4$
206,19 g/mol

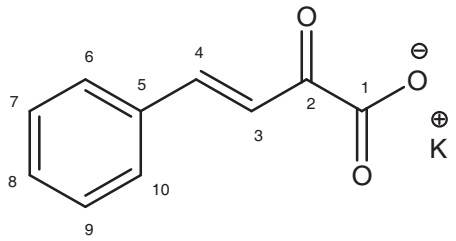
Dans un ballon de 50 mL, on introduit le *p*-anisaldéhyde (1,02 g ; 8,4 mmol ; 1,05 éq) et H_2O (4,8 mL). A ce mélange, est ajoutée une solution aqueuse de pyruvate de sodium (4 M ; 2 mL ; 8,0 mmol ; 1 éq). Le mélange est ensuite refroidi à 0°C. Une solution de NaOH (18% m/v) dans un mélange MeOH/H_2O (1 :1 ; 2,4 mL) est additionnée lentement au mélange. La réaction est ensuite laissée à réagir pendant 15h à t.a.(CCM)

Le précipité jaune est filtré sur fritté et lavé avec du MeOH (3x20 mL) et de l'EtOH (2x20 mL). Le produit brut est ensuite dissous dans H_2O (150 mL) et le *p*-anisaldéhyde restant est éliminé à l'aide d'une ampoule à décanter. A cette solution, est ajouté de l'HCl concentré, jusqu'à ce que tout l'acide ait précipité. Le précipité est filtré et lavé avec H_2O (20 mL) puis séché deux jours dans un dessiccateur sur P_2O_5.

On obtient une poudre jaune (561 mg, 34%).

- Solide jaune
- R_f (butanol/eau/ammoniaque/éthanol : 4/1/1/1, UV) = 0,56
- **RMN ^{1}H-300 MHz (CD_3CN)** : δ 3,84 (s, 3H, OMe) ; 7,0 (d, 8,9 Hz, 1H-3 et 1H-11) ; 7,29 (d, 16,1 Hz, 1H-3) ; 7,71 (d, 8,8 Hz, 1H-6 et 1H-10) ; 7,88 (d, 16,1 Hz, 1H-4).
- **RMN ^{13}C-75 MHz (CD_3CN)**: δ 54,65 (OMe) ; 116,65 (C-9 et C-7) ; 126,06 (C-5) ; 130,62 (C-3, C-6, C-10) ; 147,81 (C-4) ; 161,74 (C-8) ; 162,18 (C-1) ; 182,62 (C-2).
- **ES$^-$ [M-H$^+$] :** 205,055 (valeur calculée : 205,050)
- λ_{max} = 330 nm (mesuré dans tampon TEA 50 mM/pH 7,7)

2-Oxo-4-phénylbut-3-énoate de potassium ***36***



$C_{10}H_7O_3K$
214,29 g/mol

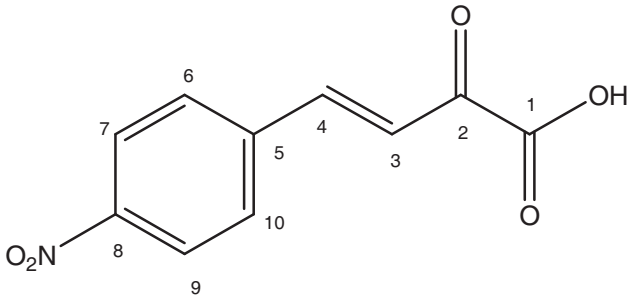
Dans un ballon de 10 mL, on introduit l'acide pyruvique (730 µL ; 7,2 mmol ; 1 éq) et le benzaldéhyde (500 µL ; 7,2 mmol ; 1 éq). Le mélange est refroidi à 0°C et une solution de KOH dans MeOH (4,3 M ; 2 mL, 8,64 mmol, 1,2 éq) est ajoutée goutte à goutte. On laisse ensuite agiter à t.a. pendant 12 h.

Le précipité est récupéré par filtration puis est lavé avec du MeOH (5 mL) et de l'Et_2O (2x5 mL). Le solide est ensuite séché sous vide.

On obtient un solide jaune (150 mg, 90%).

- Solide jaune
- **RMN ^{1}H-300 MHz (D_2O)** : δ 6,78 (d, 16,4 Hz, 1H-3) ; 7,32-7,45 (m, 3H arom) ; 7,55-7,66 (m, 2H arom) ; 7,6 (d, 16,1 Hz, 1H-4),
- **RMN ^{13}C-75 MHz (D_2O):** δ 122,38 (C-3) ; 128,90 (C-6, C-10) ; 129,13 (C-7, C-9) ; 131,70 (C-8) ; 133,82 (C-5) ; 150,42 (C-4) ; 172,12 (C-1) ; 197,53 (C-2).
- **ES^- [M-H^+] :** 175,043 (valeur calculée : 175,039)
- λ_{max} = 300 nm (mesuré dans tampon TEA 50 mM/pH 7,7)

Acide 4-nitrobenzylidènepyruvique ***37***



$C_{10}H_7O_5N$
221,17 g/mol

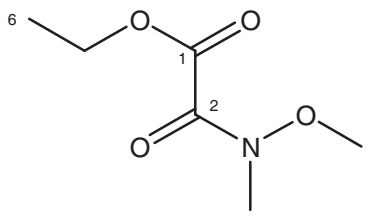
Dans un ballon de 25 mL, on introduit le 4-nitrobenzaldéhyde (500 mg ; 3,31 mmol ; 1 éq) et de l'EtOH (6 mL). L'aldéhyde est solubilisé à chaud (70°C) dans l'éthanol. Après solubilisation complète, la température de la solution est ramenée à t.a. et on ajoute une solution aqueuse de pyruvate de sodium (1,9 M ; 1,8 mL ; 1,05 éq). Le mélange est refroidi à 0°C et une solution de soude (0,5 M ; 3 mL ; 0,5 éq) est ajouté goutte à goutte à cette température. On laisse ensuite agiter 3 h à t.a.

La solution brune obtenue est acidifiée avec HCl (2 M), jusqu'à totale précipitation de l'acide. Celui-ci est récolté par centrifugation et rincé trois fois avec de l'EtOH (300 µL). Le solide est ensuite séché une nuit sur P_2O_5 dans un dessiccateur.

On obtient ainsi une poudre brune (93 mg, 13%).

- Solide brun
- **RMN ^{1}H-300 MHz (DMSO)** : δ 7,49 (d, 16,4 Hz, 1H-3) ; 7,84 (d, 16,3 Hz, 1H-4) ; 8,08 (d, 8,8 Hz, 2H arom) ; 8,26 (d, 8,8 Hz, 2H arom).
- **RMN ^{13}C-75 MHz (DMSO):** δ 124,05 (C-7, C-9) ; 125,18 (C-3) ; 130,09 (C-6, C-10) ; 140,20 (C-5) ; 144,13 (C-8) ; 148,54 (C-4), 163,87 (C-1) ; 185,64 (C-2).
- **ES$^-$ [M-H$^+$] :** 220,023 (valeur calculée : 220,024)
- λ_{max} = 310 nm (mesuré dans tampon TEA 50 mM/pH 7,7)

2-Ethyl(méthyl)amino-2-oxoacétate d'éthyle ***39***



$C_6H_{11}O_4N$
161,16 g/mol

Dans un ballon de 25 mL, surmonté d'une tête à hydrogéner, reliant le montage à une double rampe vide/argon, on introduit la *N-O*-diméthylhydroxylamine (800 mg ; 8,2 mmol ; 1 éq), le chlorure d'éthyloxalyle (1,1 mL ; 9,8 mmol ; 1,2 éq) et CH_2Cl_2 fraîchement distillé (16 mL). Le montage est dégazé, placé sous argon et refroidi à 0°C. La triéthylamine (2,3 mL ; 16,4 mmol ; 2 éq) est ajoutée au goutte à goutte à 0°C. La réaction est ensuite agitée pendant 30 min à t.a.

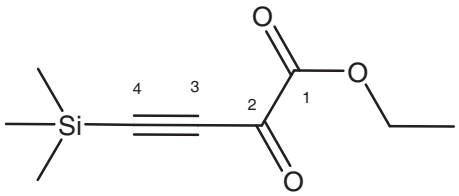
Du méthanol (5 mL) est ajouté pour stopper la réaction. Le mélange réactionnel est concentré à sec à l'évaporateur rotatif et du THF distillé (10mL) est ajouté afin d'induire la précipitation. Le précipité est filtré et lavé avec du THF anhydre (20 mL). Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif, afin d'obtenir une huile orangée (1,42 g, 100%).

Le produit brut est distillé sous pression réduite (t = 75°C ; 10^{-3} mbar).

On obtient ainsi une huile incolore (934 mg, 71%).

- Huile incolore
- R_f(EP/AcOEt :9/1, UV-$KMnO_4$) = 0,65
- **RMN ^{1}H-300 MHz ($CDCl_3$)**: δ 1,28 (t, 7,1 Hz, 3H, -OCH_2**CH_3**) ; 3,14 (s, 3H, -NCH_3); 3,67 (s, 3H, -OMe); 4,26 (q, 7,1 Hz, 2H, -O**CH_2**CH_3).
- **RMN ^{13}C-75 MHz ($CDCl_3$):** δ 13,64 (-OCH_2**CH_3**), 31,36 (-NCH_3), 62,04 (-OMe), 62,23 (-O**CH_2**CH_3), 162,04 (C-2), 162,37 (C-1).

2-Oxo-4-triméthylsilylbut-3-ynoate d'éthyle ***42***



$C_9H_{14}O_3Si$
198,29 g/mol

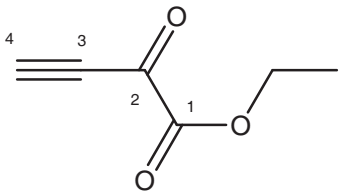
Dans un bicol de 50 mL, muni d'un septum et d'une tête à hydrogéner, reliant le montage à une double rampe vide/argon, on introduit le chlorure d'éthyloxalyle (500 µL ; 4,46 mmol ; 1 éq) et du THF (17 mL). Le montage est dégazé, placé sous argon et refroidi à -78°C. Le triméthylsilyléthynyl lithium (18.5 mL ; 9,31 mmol ; 2 éq) est ajouté goutte à goutte à cette même température. Le mélange est laissé à agiter à -78°C pendant 30 min et à t.a. pendant 2h15. (CCM).

Une solution de NH_4Cl saturée (20 mL) est ajoutée au mélange et on laisse agiter pendant 10 min. Ce mélange est versé dans l'AcOEt (50 mL) et les phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt (3x75 mL). Les phases organiques sont lavées avec de la saumure (3x50 mL), séchées sur Na_2SO_4, filtrées et évaporées à l'évaporateur rotatif.

On obtient ainsi une huile brune (310 mg, 35%).

- Huile brune
- R_f(cyclohexane/AcOEt : 3/2, UV-$KMnO_4$)= 0,81
- **RMN ^{1}H-300 MHz ($CDCl_3$)** : δ 0,18 (s, -Si(CH_3)$_3$) ; 1,37 (t, 7,1 Hz, 3H, -OCH_2**CH_3**) ; 4,35(q, 7,1 Hz, 2H, -O**CH_2**CH_3).
- **RMN ^{13}C-75 MHz ($CDCl_3$):** δ -0,07 (-Si(CH_3)$_3$) ; 13,92 (-OCH_2**CH_3**) ; 22,69 (C_4) ; 31,93 (C_3) ; 63,13 (-O**CH_2**CH_3) ; 113,79 (C-2) ; 157,87 (C-1).
- **ES$^+$ [M+Li$^+$] :**205,086 (valeur calculée : 205,084)

2-Oxobut-3-ynoate d'éthyle ***43***



$C_6H_6O_3$
126,11 g/mol

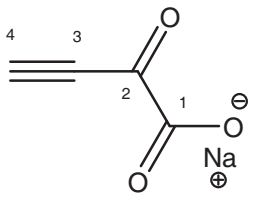
Dans un ballon de 25 mL, on introduit le composé silylé **42** (162 mg ; 0,82 mmol ; 1 éq), du THF (4 mL) et de la résine F^- (Amberlite IRA 900 F^-, Fluka) (980 mg ; 2,45 mmol ; 3 éq). On laisse agiter pendant 3 h. Le mélange est ensuite filtré et la résine est rincée avec du THF (40 mL). Les solvants sont évaporés.

Le produit est remis en solution dans du THF (4 mL) et on ajoute du charbon actif végétal. On laisse agiter 30 min, et le mélange est filtré. Le charbon est rincé avec du THF et le filtrat est évaporé à sec.

On obtient une huile brune (100 mg, 97%).

- Huile brune
- R_f(cyclohexane/AcOEt : 3/2, UV-*p*-anisaldéhyde)= 0,4
- **RMN ^{1}H-300 MHz ($CDCl_3$)** : δ 1,36 (t, 7,2 Hz, 3H, -OCH_2**CH_3**) ; 4,34 (q, 7,2 Hz, 2H, -O**CH_2**CH_3) ; 2,62 (s, 1H-4).
- **RMN ^{13}C-75 MHz ($CDCl_3$):** δ 13,79 (-OCH_2**CH_3**) ; 53,41 (C-3 et C-4) ; 64,49 (-O**CH_2**CH_3) ; 107,92 (C-2) ; 157,87 (C-1)

2-Oxobut-3-ynoate de sodium ***41***



C_4HO_3Na
120,04 g/mol

Dans un ballon de 10 mL, on introduit l'ester **43** (40 mg ; 0,32 mmol ; 1 éq), du THF (450 µL), MeOH (450 µL) et H_2O (905 µL). Une solution de soude (0,5 M ; 635 µL ; 0,32 mmol ; 1 éq) est ajoutée goutte à goutte et on laisse agiter pendant 30 min.

Les solvants sont évaporés à l'évaporateur rotatif, et le produit est gardé sous forme de sel dans H_2O.

- Solution orangée
- **RMN ^{1}H-300 MHz (D_2O)** : δ 3,25 (s, 1H-4).
- **RMN ^{13}C-75 MHz (D_2O)** : δ 50,46, 50,52 (C-3 et C-4) ; 170,15 (C-1) ; 174,11 (C-2).

Dioxyde de manganèse [24]

$$KMnO_4 + MnSO_4.H_2O + NaOH \xrightarrow{H_2O} MnO_2$$

MnO_2
86,94 g/mol

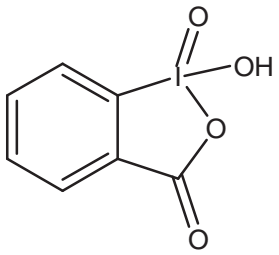
Dans un ballon de 50 mL, muni d'un réfrigérant, on introduit $KMnO_4$ (2 g ; 12,66 mmol ; 1 éq) et de l'eau (12,5 mL). La solution est chauffée à 90°C et on ajoute à chaud au goutte à goutte et simultanément la solution de soude (sol à 40% ; 2,2 mL) et la solution aqueuse de $MnSO_4$ (5 M ; 2,7 mL). Le mélange est laissé à agiter 1 h à 90°C, puis on le laisse revenir à t.a.

MnO_2 est filtré sur Büchner et lavé avec de l'eau jusqu'à que les eaux de lavage soient incolores. Le solide est ensuite séché deux jours dans l'étuve à 120°C.

On obtient un solide brun-noir (1,05 g, 95%)

- Solide brun-noir

Acide 2-iodoxybenzoïque (IBX)



$C_7H_5IO_4$
280,02 g/mol

Dans un ballon de 250 mL, on introduit l'oxone (74 g ; 120,9 mmol ; 3 éq) et de l'H_2O (130 mL). A ce mélange, on additionne en une fois l'acide 2-iodobenzoïque (10 g ; 40,3 mmol ; 1 éq). La solution est chauffée à 73°C et est laissée à agiter 3 h à cette température. La suspension obtenue est refroidie à 5°C et on agite doucement à cette température pendant 1h30.

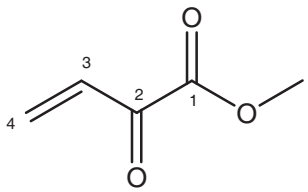
La suspension est filtrée sur verre fritté (porosité 3), et le solide est rincé avec de l'eau (6x20 mL) et de l'acétone (3x20 mL).

Le solide est séché à l'air libre pendant 3 jours.

On obtient une poudre incolore. (9,50 g, 84%)

- Solide incolore
- **RMN ^{1}H-300 MHz (DMSO)** : δ 7,34 (t, 7,3 Hz, 1H) ; 8,0 (t, 7,7 Hz, 1H) ; 8,04 (d, 7,6 Hz, 1H) ; 8,15 (d, 7,7 Hz, 1H).
- **RMN ^{13}C-75MHz (DMSO)**: δ 125,45, 130,55, 131,90, 133,41, 133,85, 147,01, 167,96

*2-Oxobut-3-énoate de méthyle **44***



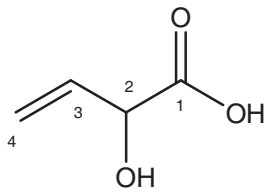
$C_5H_6O_3$
114,10 g/mol

Dans un ballon de 25 mL, surmonté d'un réfrigérant, on introduit le 2-hydroxybut-3-énoate de méthyle (200 mg ; 1,72 mmol ; 1 éq) et de l'AcOEt (12 mL). L'IBX (1,4 g ; 5,17 mmol ; 3 éq) est ajouté au mélange. Le mélange est mis sous agitation à reflux pendant 4 h. On laisse redescendre la température du mélange à t.a. Le mélange est filtré et le solide est rincé avec AcOEt (4x8 mL). Le filtrat est évaporé.

On obtient ainsi une huile jaune (176 mg, 90%).

- Huile jaune
- R_f(EP/AcOEt : 1/1 UV-iode-acide phosphomolybdique)= 0,60
- **RMN ^{1}H-300 MHz ($CDCl_3$) :** δ 3,90 (s, 3H, -OCH_3) ; 6,12 (dd, J_{cis}=10,7 Hz J_{gem}=1,3 Hz, 1H-4) ; 6,57 (dd, J_{trans}=17,5 Hz J_{gem}=1,2 Hz, 1H-4) ; 6,92 (dd, J_{trans}=17,6 Hz, J_{cis}=10,7 Hz, 1H-3),
- **RMN ^{13}C-75 MHz ($CDCl_3$) :** δ 53,29 (-OCH_3) ; 111,66 (C-4) ; 134,75 (C-3) ; 190,92 (C-1).

*Acide 2-hydroxybut-3-énoïque **46***



$C_4H_6O_3$
102,09 g/mol

Dans un tube plastique muni d'un bouchon à vice, on introduit le2-hydroxybut-3-énoate d'éthyle (100 mg, 0,88 mmol), du THF (1 mL), H_2O (4 mL) et $NaHCO_3$ (50 mg), pour ajuster le pH à environ pH=8. La lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435, Novozymes Danemark) supportée sur polymère (50 mg) est ajoutée au mélange.
La suspension est agitée sur une table d'agitation à 37°C pendant 20 h avec un suivi régulier du pH. A 10h, une solution de soude (3 M ; 20 µl) est ajoutée au mélange, afin de réajuster le pH à 8.

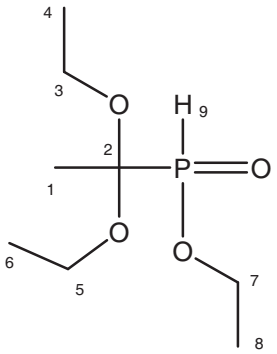
Le mélange est filtré et les billes supportant l'enzyme sont rincées avec H_2O (3x2 mL). Le produit est concentré à l'évaporateur rotatif et le produit est gardé sous forme de solution dans l'eau

On obtient une solution (18,1 mL) du produit recherché (87 mg, 100%, suivi de la disparition du signal –OMe et détermination de la conversion par RMN ^{13}C)

- Solution incolore

- **RMN ^{1}H-300MHz (D_2O+H_2O)** : δ 4,5 (d, 6,2 Hz, 1H-2) ; 5,25 (dt, J_{cis}=10,4 Hz, J_{gem}=1,5 Hz, 1H-4) ; 5,39 (dt, J_{trans}=17,1 Hz, J_{gem}=1,5 Hz, 1H-4) ; 5,99 (ddd, J_{trans}=17,2 Hz, J_{cis}=10,4 Hz, J=6,2 Hz, 1H-3).
- **RMN ^{13}C-75MHz (D_2O+H_2O)** : δ 74,38 (C-2) ; 117,34 (C-4) ; 137,06 (C-3) ; 179,25 (C-1).
- **ES$^-$ [M-H$^+$] :** 101,023 (valeur calculée : 101,023)

*2,2-diéthoxyéthylphosphinate d'éthyle **47***



$C_8H_{19}O_4P$
210,21 g/mol

L'acide phosphinique commercial est à 50% aqueux ; il est concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'une solution contenant au maximum 10% d'eau.

Dans un bicol de 25 mL, muni d'un septum et d'une tête à hydrogéner reliant le montage à une double rampe vide/argon, on introduit l'éthylorthoacétate (5,64 mL ; 30,75 mmol ; 4,7 éq). Le montage est dégazé et placé sous argon. $BF_3.Et_2O$ (130 µL, 0,98 mmol, 0,15 éq) est ajouté goutte à goutte et le mélange est refroidi à 0°C. L'acide phosphinique (340 µL ; 6,54 mmol ; 1 éq) est ajouté goutte à goutte à 0°C et le mélange est ensuite agité à t.a. pendant 3 h (CCM).

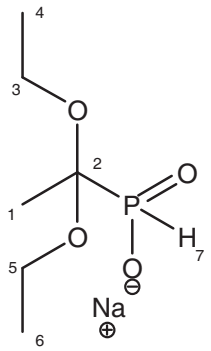
Lorsque la réaction est terminée, une solution de NaH_2PO_4 (0,4 M ; 5mL) et du CH_2Cl_2 (10 mL) sont versés dans le mélange réactionnel. Les phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (3x15 mL). Les phases organiques sont lavées avec de la saumure (3x10 mL), séchées sur Na_2SO_4, filtrées et concentrées à l'évaporateur rotatif.

On obtient ainsi une huile incolore (1,40 g, 100%).

- Huile incolore
- R_f (acétone/toluène : 2/3, acide phosphomolybdique) = 0,52

- **RMN ^{1}H-300 MHz (Acétone d6)** : δ 1,18 (t, 7,5 Hz, 3H-6 et 3H-4); 1,35 (t, 6,7 Hz, 3H-8); 1,45 (d, 12,6 Hz, 3H-1); 3,77 (m, 2H-6 et 2H-3); 4,22 (m, 2H-7) ; 6,89 (d, 540 Hz, H-9).
- **RMN ^{13}C-75 MHz (Acétone d6)** : δ 14,75 (s, C-1) ; 15,76 (s, C-4) ; 15,84 (s, C-6) ; 18,32 (d, J_{CCOP}=13,03 Hz, C-8) ; 57,11 (d, J_{COCP}=8,06 Hz, C-3) ; 57,55 (d, J_{COCP}=8,06 Hz, C-5) ; 62,24 (d, J_{COP}=7,4 Hz, C-7) ; 99,95 (d, J_{CP}=150,7 Hz, C-2).
- **RMN ^{31}P-121 MHz (Acétone d6)** : 30,9 ppm.

2,2-Diéthoxyéthylphosphinate de sodium ***48***



$C_6H_{11}O_4PNa$
204,14 g/mol

De la soude (1,06 g ; 26,59 mmol ; 1,5 éq) est solubilisée dans de l'H_2O (17 mL). Cette solution est dégazée avec de l'argon. Dans un ballon de 25 mL surmonté d'un réfrigérant et d'une tête à hydrogéner reliant le montage à une double rampe vide/argon, on introduit le phosphinate (3,69 g ; 17,73 mmol ; 1 éq) et la solution de soude dégazée. Le montage est dégazé et placé sous argon. Le mélange est agité et mis à reflux pendant 2 h. La réaction terminée, on laisse refroidir le mélange réactionnel à t.a.

Le pH est ensuite ajusté à pH 8 à l'aide d'HCl concentré. Ce mélange est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif et le résidu est dissous dans EtOH (25 mL) bouillant, puis filtré à chaud. Le filtrat est évaporé à sec,

On obtient ainsi un produit brut.(3,32 g, 91%)

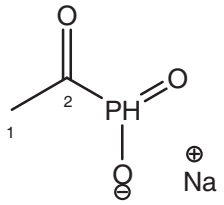
Le produit est ensuite recristallisé dans l'éthanol (23 mL).

On obtient ainsi un solide incolore (2,35 g, 65%)

- Solide incolore
- **RMN ^{1}H-300MHz (D_2O)** : δ 1,12 (t, 7,1 Hz, 3H-4 et 3H-6) ; 1,32 (d, 11 Hz, 3H-1) ; 3,64 (q, 7,7Hz, 2H-3 et 2H-5) ; 6,87 (d, 516 Hz, H-7).

- **RMN ^{13}C-75MHz (D_2O)** : δ 14,32 (s, C-1); 17,36 (s,C-4); 17,51 (s, C-6); 57,84 (d, J_{PCOC}=8,06 Hz, C-3 et C-5); 100,77 (d, J_{PC}=143,3Hz, C-2).
- **RMN ^{31}P-121MHz (D_2O)** : δ 22,60 ppm

*Acétylphosphinate **49***



$C_2H_4O_3PNa$
130,01 g/mol

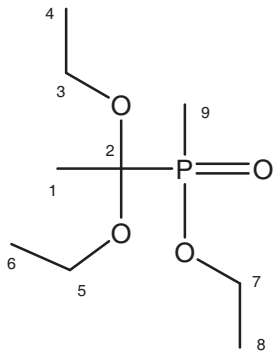
Dans un ballon de 10 mL, muni d'une tête à hydrogéner, reliant le montage à une double rampe vide/argon, on introduit le phosphinate **48** (109 mg ; 1,51 mmol ; 1 éq) de l'eau (1 mL) et de l'HCl (2 M ; 100 µL ; 0,2 mmol ; 0,13 éq). Le montage est dégazé, placé sous argon et la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 30 min.

L'acide est évaporé à l'évaporateur rotatif.

On obtient une solution de phosphinate (73 mg dans H_2O (1 mL); 100%, réaction totale, suivie par RMN)

- Solide incolore
- R_f(butanol/H_2O/ammoniaque/EtOH : 4/1/1/1, acide phosphomolybdique)= 0,32
- **RMN ^{1}H-300MHz (D_2O) :** δ 2,36 (d, 4,3 Hz, 3H-1) ; 6,70 (d, 549 Hz, P-H)
- **RMN ^{13}C-75MHz (D_2O) :** δ 21,69 (14,5 Hz, C-1) ; 223,08 (109 Hz, C-2),
- **RMN ^{31}P-121MHz (D_2O) :** δ 29,14 ppm
- **ES$^-$ [M-H$^+$] :** 112,985 (valeur calculée : 112,998)

2,2-diéthoxyéthyméthyllphosphinate d'éthyle ***50***



$C_9H_{21}O_4P$
224, 23 g/mol

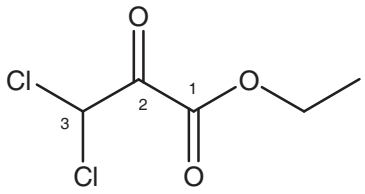
Dans un ballon de 10 mL muni d'une tête à hydrogéner, reliant le montage à une double rampe vide/argon, on introduit le triéthylorthoacétate (1,9 mL ; 10,40 mmol ; 2,3 éq). Le montage est dégazé, placé sous argon et refroidi à -20°C. La dichlorométhylphosphine (400 µL ; 4,52 mmol ; 1 éq) est ajoutée goutte à goutte à cette température. Le mélange est agité 2 h à -20°C puis 1 nuit à t.a.

L'excès de réactif est évaporé à l'évaporateur rotatif.

On obtient ainsi une huile incolore (950 mg ; 95%).

- Huile incolore
- R_f (acétone/toluène : 2/3, acide phosphomolybdique) = 0,34
- **RMN ^{1}H-300 MHz ($CDCl_3$)** : δ 1,21 (t, 7 Hz, 3H-6 et 3H-4); 1,32 (t, 7 Hz, 3H-8); 1,46 (d, 10,5 Hz, 3H-1); 1,5 (d, 5 Hz, 3H-9) ; 3,70 (m, 2H-6 et 2H-3); 4,19 (m, 2H-7).
- **RMN ^{13}C-75 MHz ($CDCl_3$)** : δ 11,41 (d, J_{CP}=89 Hz, C-9) ; 15,22 (d, J_{CCOP}=14,5 Hz, C-8) 14,75 (s, C-1) ; 16,42 (s, C-4) ; 16,47 (s, C-6) ; 20,21 (d, J_{CCP}=12,5 Hz, C-1) ; 57,52 (d, J_{COCP}=7 Hz, C-3) ; 57,80 (d, J_{COCP}=5,5 Hz, C-5) ; 61,27 (d, J_{COP}=6,5 Hz, C-7) ; 100,70 (d, J_{CP}=142,5 Hz, C-2).
- **RMN ^{31}P-121 MHz ($CDCl_3$)** : 48,2 ppm.

3,3-Dichloropyruvate d'éthyle ***56***



$C_5H_6O_3Cl_2$
185,00 g/mol

Dans un ballon de 10 mL, muni d'un réfrigérant surmonté d'une tête à hydrogéner reliant le montage à une double rampe vide/argon, on introduit l'éthylpyruvate (480 µL ; 4,32 mmol ; 1 éq) et l'acide *p*-toluènesulfonique (82 mg ; 0,43 mmol ; 0,1 éq). Le mélange est dégazé et placé sous argon. Une première fraction de SO_2Cl_2 (390 µl ; 4,88 mmol ; 1,1 éq) est ajoutée goutte à goutte et le mélange est placé à reflux (70°C). Après 4 h, 6 h et 22 h de réaction, sont ajoutées des doses supplémentaires de SO_2Cl_2 (510 µL ; 6,38 mmol ; 1,45 éq) au mélange réactionnel. Il est laissé à reflux pendant 45 h au total.

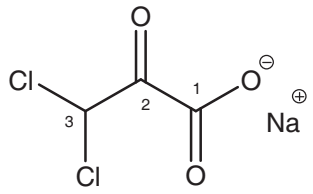
Le mélange est ramené à t.a. et il est passé à l'évaporateur rotatif ($T°_{bain}$=50°C) pour enlever l'excès de SO_2Cl_2. Le mélange est ensuite versé dans de l'Et_2O (15 mL) et de l'H_2O (10 mL). Les phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec de l'Et_2O (3x10 mL). Les phases organiques sont lavées avec H_2O (10 mL) et de la saumure (2x8 mL), séchées sur Na_2SO_4, filtrées et évaporées.

L'huile obtenue est purifiée par flash chromatographie sur colonne de silice (EP/AcOEt : 1/1).

On obtient une huile incolore (700 mg, 87%).

- Huile incolore
- R_f(EP/AcOEt : 1/1, UV-acide phosphomolybdique)= 0,57
- **RMN ^{1}H-300MHz ($CDCl_3$)** : δ 1,35 (t, 7,0 Hz, 3H, -OCH_2**CH_3**) ; 4,39 (q, 7,1 Hz, 2H, -O**CH_2**CH_3); 5,97 (s, 1H-3),
- **RMN ^{13}C-75MHz ($CDCl_3$):** δ 13,81 (-OCH_2**CH_3**) ; 63,91 (-O**CH_2**CH_3) ; 73,61 (C-3) ; 94,06 (C-2) ; 168,29 (C-1).

3,3-Dichloropyruvate de sodium ***54***



$C_3HO_3Cl_2Na$
178,93 g/mol

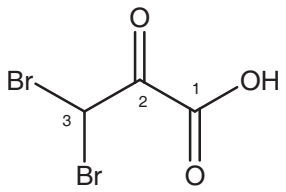
Dans un ballon de 10 mL, on introduit l'ester **56** (50 mg ; 0,27 mmol ; 1 éq), du THF (385 µL), du MeOH (385 µL) et de l'H_2O (770 µL). Une solution de soude (0,5M ; 540 µL ; 0,27 mmol ; 1 éq) est ajoutée goutte à goutte et on laisse agiter le mélange 3 h à t.a. Les solvants et l'eau sont évaporés à l'évaporateur rotatif.

Le solide obtenu est rincé avec AcOEt (3x2 mL) et Et_2O (8x2 mL), puis séché sous vide.

On obtient un solide incolore (45 mg, 94%)

- Solide incolore
- **RMN ^{1}H-300MHz (D_2O)** : δ 6,11 (s, 1H-3)
- **RMN ^{13}C-75MHz ($CDCl_3$):** δ 75,06 (C-3) ; 171,0 (C-1) ; 190,26 (C-2).
- **ES$^-$ [M-H$^+$] :**154,936 (valeur calculée : 154,930)

Acide 3,3-dibromopyruvique ***53***



$C_2H_2O_3Br_2$
245,85 g/mol

Dans un bicol de 25 mL, muni d'un septum et d'un réfrigérant surmonté d'une tête à hydrogéner, reliant le montage à une double rampe vide/argon, on introduit l'acide pyruvique (660 mg ; 6,81 mmol ; 1 éq). Le montage est dégazé, placé sous argon et est chauffé à 50°C.

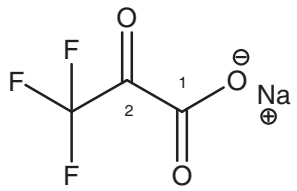
Du dibrome (703 µL ; 13.63 mmol ; 2 éq) est ajouté goutte à goutte à 50°C puis on chauffe à 100°C pendant 24 h. On laisse redescendre à t.a.

HBr est enlevé en mettant le montage sous vide à l'aide d'une trompe à eau. Le produit obtenu est sublimé sous vide (T=120°C, 10^{-3}mbar). On obtient une poudre blanche/orangée qui est mise à sécher sur NaOH dans un dessiccateur.

On obtient ainsi un solide incolore (1,18 g, 82%).

- Solide incolore
- **RMN ^{1}H-300MHz (D_2O) :** δ 6,06 (s, 1H-3)
- **RMN ^{13}C-75MHz (D_2O) :** δ 48.57 (C-3) ; 94,06 (C-2 hydrate) ; 170,89 (C-1).
- **ES$^-$ [M-H$^+$] :** 244,836 et 262,847 (hydrate) (valeur calculée : 244,827 et 262,838 hydrate)

Trifluoropyruvate ***55***



$C_3O_3F_3Na$
164,01 g/mol

Dans un ballon de 10 mL, on introduit le trifluoropyruvate de méthyle (150 mg ; 0,96 mmol ; 1 éq). Une solution de soude (0,5 M ; 1,9 mL ; 0,96 mmol ; 1 éq) est ajoutée goutte à goutte. On laisse agiter 3h30 à t.a.

L'eau est évaporée à l'évaporateur rotatif et le produit séché sous vide.

On obtient ainsi un solide incolore (135 mg, 100%).

- Solide incolore
- **RMN ^{1}H-300MHz (D_2O) : /**
- **RMN ^{13}C-75MHz (D_2O) :** 173,65 (C-2) ; 137,83 (C-1) ; 124,93 (q, J_{CF}=286,6 Hz, CF_3) ; 93,55 (q, J_{FCC}= 33,4 Hz, C-2 hydrate)
- **RMN ^{19}F-282MHz (D_2O) :** δ -83,73 (s, 3F)
- **ES$^-$ [M-H$^+$] :** 140,977 (valeur calculée : 140,979)

[1] Rohmer, M. ; Knani, M. ; Simonin, P. ; Sutter, B. ; Sahm, H. *Biochem. J.* (1993), *295*, 517-524.
[2] Schwarz, M.K. Thèse, ETH Zürich, Suisse (1994)
[3] Settembre, E. ; Begley, T.P. ; Ealick, S.E. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2003), *13*, 739-747.
[4] Hill, R.E. ; Himmerlick, K. ; Kennedy, I.A. ; Pauloski, R.M. ; Sayer, B.G. ; Wolf, E. ; Spenser, I.D. *J. Biol. Chem.* (1996), *271*, 30426-30435.
[5] Querol, J. ; Grosdemange-Billiard, C. ; Rohmer, M. ; Boronat, A. ; Imperial, S. *Tetrahedron Lett.* (2002), *43*, 8265-8268.
[6] Brammer, L.A. ; Meyers, C.F. *Org. Lett.* (2010), *71*, 918-922.
[7] Hebinger, G. Thèse université de Strasbourg, France (2010).
[8] Schürmann, M.; Schürmann, M. ; Sprenger, G.A. *J. Mol. Cat. B* (2002), *19-20*, 247-252.
[9] Lois, L.M. ; Campos, N. ; Putra, S.R. ; Danielsen, K. ; Rohmer, M. ; Boronat, A. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* (1998), *95*, 2105-2110.
[10] Lange, B.M. ; Wildung, M.R. ; McCaskill, D. ; Croteau, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998), *95*, 2100-2104.
[11] Xiang, S. ; Usunow, G. ; Lange, G. ; Busch, M. ; Tong, L. *J. Biol. Chem.* (2007), *282*, 2676-2682.
[12] Nilsson, U. ; Meshalkina, L. ; Lindqvist, Y. ; Schneider, G. *J. Biol. Chem.* (1997), *272*, 1864-1869.
[13] Matsue, Y. ; Mizuno, H. ; Tomita, T. ; Asami, T. ; Nishiyama, M. ; Kuzuyama, T. *J. Antibiotics* (2010), *63*, 583-588.
[14] Zeidler,J. ; Schwender, J. ; Mueller, C. ; Lichtenthaler, H.K. *Biochem. Soc. Trans.* (2000), *28*, 796-798.
[15] Ferhatoglu, Y. ; Barrett, M. *Pesticide Biochem. Physiol.* (2005), *85*,7-14.
[16] Eubanks, L.M. ; Poulter, C.D. *Biochemistry* (2003), *42*, 1140-1149
[17] Altincicek, B. ; Hintz, M. ; Sanderbrand, S. ; Wiesner, J. ; Beck, E. ; Jomaa, H. *FEMS Microbiol. Lett.* (2000), *190*, 329-333.
[18] Mao, J. ; Eoh, H. ; He, R. ; Wang, Y. ; Wan, B. ; Franzblau, S. ; Crick, D.C. ; Kozikowski, A.P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2008), *18*, 5320-5323.
[19] Kuo, D.J. ; Jordan, F. *J. Biol. Chem.* (1983), *258*, 13415-13417.
[20] Kuo, D.J. ; Jordan, F. *Biochemistry* (1983), *22*, 3735-3740.
[21] Annan, N. ; Paris, R. ; Jordan, F. *J. Am. Chem. Soc.* (1989), *111*, 8895-8901.
[22] Zeng, X. ; Chung, A. ; Haran, M. ; Jordan, F. *J. Am. Chem. Soc.* (1991), *113*, 5842-5849.
[23] Bannach, G. ; Schnitzler, E. ; Treu Filho, O. ; Utuni, V.H.S. ; Ionashiro, M. *J. Therm. Anal. Cal.* (2006), *83*, 233-240.
[24] Reimer, M. *J. Am. Chem. Soc.* (1924), *46*, 783-790.
[25] Stecher, E.D. ; Incorvia, M.J. ; Kerben, B. ; Lavine, D. ; Oen, M. ; Suel, E. *J. Org. Chem.* (1973), 4453-4457.
[26] Reimer, M. *J. Am. Chem. Soc.* (1931), *53*, 3147-3149.
[27] Johansson, O. ; Borgström, . ; Lomoth, R. ; Palmblad, M ; Bergquist, J. ; Hammarström, L. ; sun, L. ; Akermark, B. *Inorg. Chem.* (2003), *42*, 2908-2918.
[28] Chiu, C.C. ; Jordan, F. *J. Org. Chem.* (1994), *59*, 5763-5766.
[29] Brown, A. ; Nemerai, N. ; Yi, J. ; Zhang, D. ; Jordan, W.B. ; Machado, R.S. ; Guest, J.R. ; Jordan, F. *Biochemistry* (1997), *36*, 8071-8081.
[30] Crouch, R.D. *Tetrahedron* (2004), *60*, 5833-5871.
[31] Orsini, A. ; Vitérisi, A. ; Bodlenner, A. ; Weibel, J-M. ; Pale, P. *Tetrahedron Lett.* (2005), *46*, 2259-2262.

[32] Sharma, V. ; Kelly, G.T. ; Watanabe, C.M.H. *Org. Lett.* (2008), *10*, 4815-4818.
[33] Liang, G. ; Gradl, S.N. ; Trauner, D. *Org .Lett.* (2003), *5*, 4931-4934.
[34] Mancera,O. ; Rosenkranz, G. ; Sonsheimer, F. *J. Chem. Soc.* (1953), 2189-2191.
[35] Watson, I.D.G. ; Ritter, S. ; Toste, F.D. *J. Am. Chem. Soc.* (2009), *131*, 2056-2057.
[36] Dess, D.B. ; Martin, J.C. *J. Org. Chem.* (1983), *48*, 4155-4156
[37] Frigero, M. ; Santagostino, M. ; Sputore, S. *J. Org. Chem.* (1999), *64*, 4537-4538.
[38] More, J.D. ; Finney, N.S. *Org. Lett.* (2002), *4,* 3001-3003.
[39] Baillie, A.C. ; Wright, K., Wright, B.J. ; Earnshaw, G. *Pest. Biochem. Phys.* (1988), *30*, 103-112.
[40] Laber,B. ; Amrhein, N. *Biochem. J.* (1987), *248*, 351-358.
[41] Schönnbrunn-Hanebeck H. ; Laber, B. Amrhein, N. *Biochemistry* (1990), *29*, 4880-4885.
[42] Nemeria, N.S. ; Korotchkina, L.G. ; Chakraborty, S. ; Patel, M.S. ; Jordan, F. *Bioorg. Chem.* (2006), *34*, 362-379.
[43] Laber, B. ; Amrhein, N. *Biochem. J.* (1987), *248*, 351-358.
[44] Hoechst Schering AgrEvo Gmbh, DE patent, No 19752700 (A1) (1997)
[45] Lowry; O.H.; Lopez, J.A. *Meth. Enzym.* III, 845-846.
[46] Lowe, P.N. ; Perham, R.N. *Biochemistry* (1984), *23*, 91-97
[47] Rando, R.R. *Science* (1974), *185*, 320-324.
[48] Busch, H. ; Nair, V.P. ; Frank, M. ; Martin, W.R. *J. Pharm. Exp. Ther.* (1958), *123*, 48-53.
[49] Smith, B.R. ; Chan, T-H. ; Leyland-Jones, B. WO Patent, Appl. 000871.(2000)
[50] Still, W. C. ; Kahn, M. ; Miltra, A. *J. Org. Chem.* (1978), *43*, 2923-2925.

Chapitre II

Evaluation des propriétés inhibitrices des composés synthétisés sur la DXS

I) Les différents types d'inhibitions

Il existe deux grandes catégories d'inhibition de réaction enzymatique : les inhibitions réversibles et les inhibitions irréversibles. Lors d'une inhibition réversible, l'inhibiteur se lie au site actif de manière non covalente (liaisons Van der Waals, liaisons hydrogènes, liaisons ioniques). L'inhibition est irréversible lorsque l'inhibiteur se lie de façon covalente au site actif. De ce fait, l'activité n'est pas récupérée après élimination de l'inhibiteur (dialyse).

L'inhibition réversible peut être :

- Compétitive lorsque l'inhibiteur se fixe dans le site actif de l'enzyme et empêche ainsi le substrat de s'y lier (Figure 1). Le substrat et l'inhibiteur sont en compétition. Ceci se voit souvent lorsque l'inhibiteur possède une structure proche de celle du substrat.

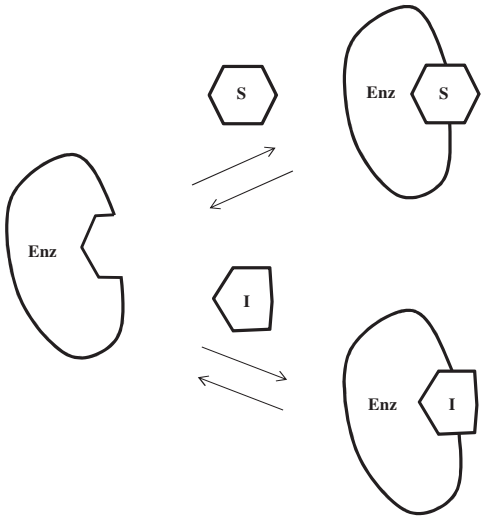


Figure 1 : Représentation schématique de l'inhibition compétitive d'une enzyme.
S : substrat ;I : inhibiteur.

- Incompétitive lorsque l'inhibiteur se lie au complexe enzyme/substrat, mais non à l'enzyme libre (Figure 2).

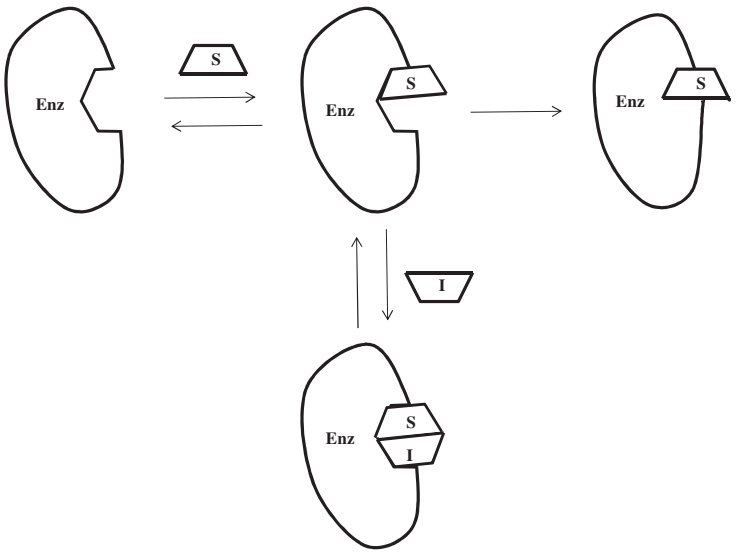


Figure 2 : Représentation schématique de l'inhibition incompétitive d'une enzyme.
S : substrat, I : inhibiteur.

- Non compétitive quand l'inhibiteur se lie soit à l'enzyme libre, soit au complexe enzyme/substrat, sur un autre site que le site actif (Figure 3).

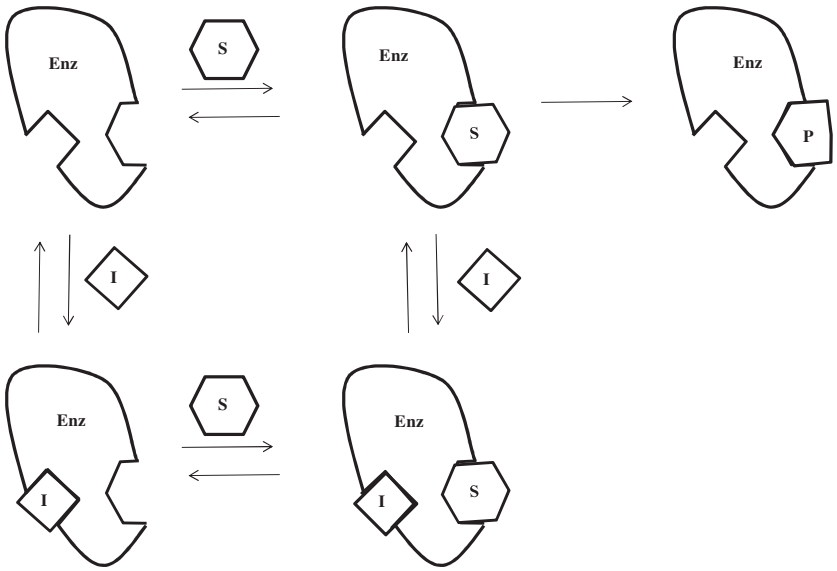


Figure 3 : Représentation schématique de l'inhibition non compétitive d'une enzyme.
S : substrat ;I : inhibiteur.

L'efficacité d'un inhibiteur réversible est évaluée par l'IC_{50} (concentration en inhibiteur qui diminue de 50 % l'activité de l'enzyme). Cette dernière est déterminée graphiquement après tracé de la droite du pourcentage d'activité résiduelle de l'enzyme en

fonction du logarithme de la concentration en inhibiteur (Figure 4). Les valeurs d'IC_{50} dépendent des conditions expérimentales, notamment de la concentration en substrat. Les IC_{50} peuvent être comparés uniquement pour des conditions expérimentales similaires.

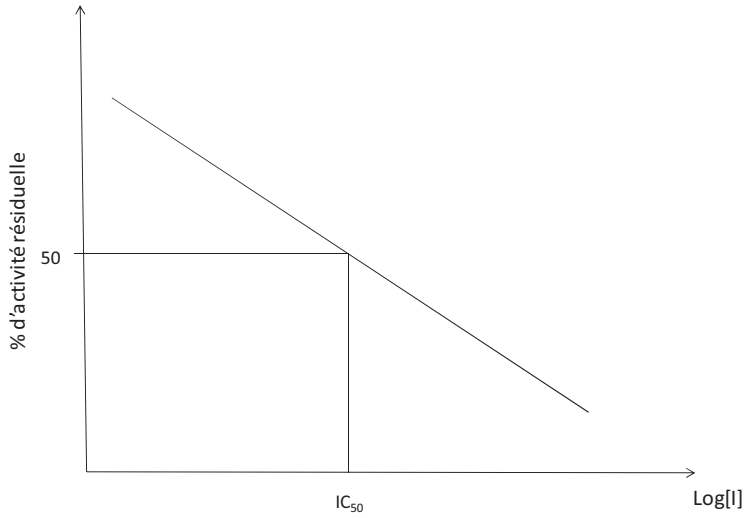


Figure 4 : Détermination graphique de l'IC_{50}.

La mesure du K_i (constante d'inhibition) permet de déterminer le pouvoir inhibiteur d'un composé, mais aussi son mécanisme d'inhibition (Figure 5). Cette constante est intrinsèque et ne dépend que de l'enzyme et de l'inhibiteur.

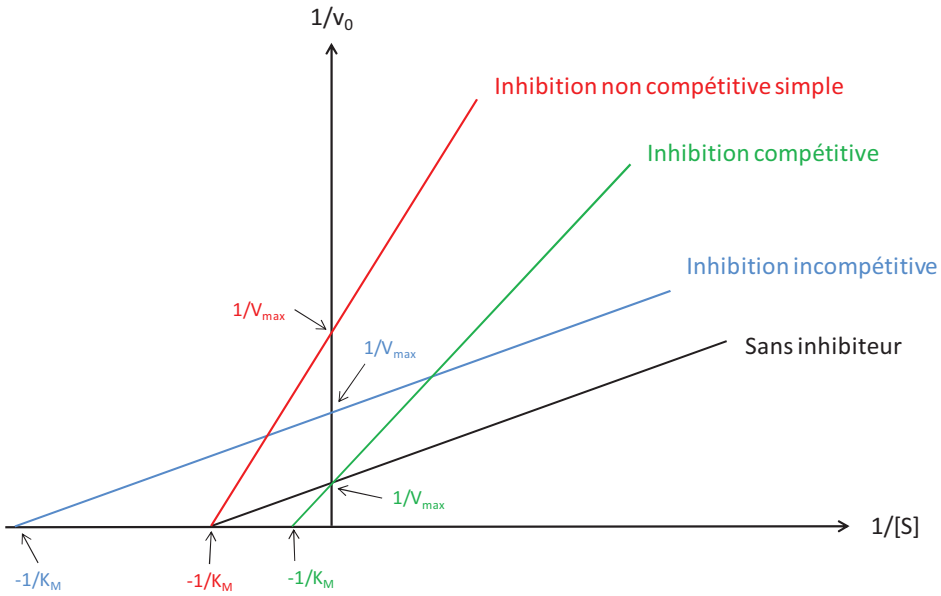


Figure 5 : Représentation de Lineweaver et Burk.

Différences entre inhibition compétitive, incompétitive et non-compétitive.

Il est possible, en utilisant la représentation de Lineweaver et Burk, de déterminer K_m et la V_{max}. Cette représentation est tracée en reportant l'inverse la vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction de l'inverse de la concentration en substrat. Le K_m est la concentration en substrat donnant une vitesse de $V_{max}/2$ et il permet d'évaluer l'affinité de l'enzyme pour le substrat. La V_{max} correspond à la vitesse pour une concentration en substrat infinie. En présence d'un inhibiteur, cette représentation permet de déterminer graphiquement le mécanisme d'inhibition (Figure 5) ainsi que la valeur de la constante d'inhibition K_i (Tableau 1).

Inhibition	Pente	Intersection avec les ordonnées
Sans inhibiteur	$\frac{K_m}{V_{max}}$	$\frac{1}{V_{max}}$
Compétitive	$\frac{K_m}{V_{max}}(1+\frac{[I]}{K_i})$	$\frac{1}{V_{max}}$
Incompétitive	$\frac{K_m}{V_{max}}$	$\frac{1}{V_{max}}(1+\frac{[I]}{K_i})$
Non compétitive simple	$\frac{K_m}{V_{max}}(1+\frac{[I]}{K_i})$	$\frac{1}{V_{max}}(1+\frac{[I]}{K_i})$

Tableau 1 : Détermination du K_i pour les différents mécanismes d'inhibition.

L'inhibition irréversible peut être dite :

- par marquage d'affinité, quand l'inhibiteur réagit avec une partie du site actif, en donnant ainsi une liaison covalente stable entre l'inhibiteur et un acide aminé ou le cofacteur de l'enzyme.

$$E + I \underset{}{\overset{K_i}{\rightleftharpoons}} E \bullet I \xrightarrow{k_{inact}} E — I$$

- par inhibition suicide. Elle est fondée sur le mécanisme enzymatique. En effet, l'inhibiteur possède une fonction réactive masquée, qui nécessite l'action catalytique de l'enzyme pour être dévoilée. La réaction de l'espèce réactive, engendrée par l'enzyme, avec un groupe de l'enzyme conduit à la formation d'une liaison covalente stable.

$$E + I \underset{}{\overset{K_i}{\rightleftharpoons}} E \bullet I \xrightarrow{k_{inact}} E \bullet I^* \xrightarrow{rapide} E — I$$

Les inhibiteurs irréversibles sont souvent des analogues de substrat avec un groupement réactif (acétylène, alcène, groupement halogéné, cyclopropane, quinone…). L'efficacité de l'inhibition irréversible est mesurée par le k_{inact} (constante de vitesse maximale d'inactivation). Cette valeur peut être déterminée expérimentalement en mesurant tout d'abord la perte d'activité de l'enzyme en fonction du temps à différentes concentrations d'inhibiteur. La constante d'inactivation (k_{obs}) est déterminée pour chaque concentration d'inhibiteur (Figure 6)[1].

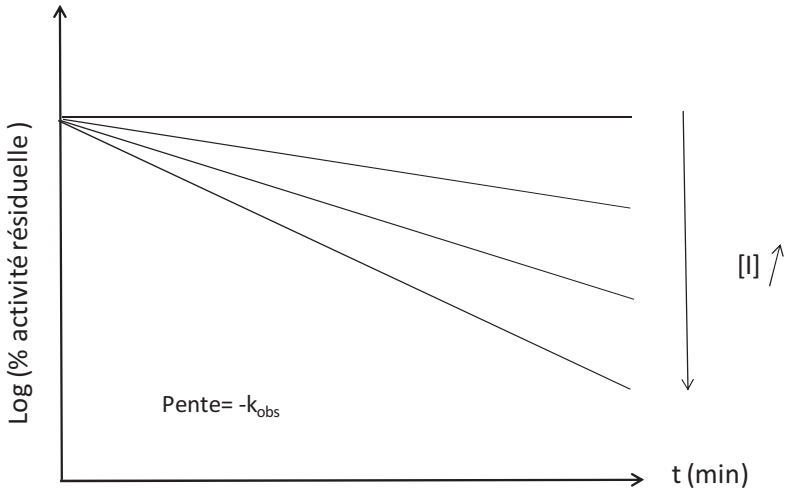


Figure 6 : Représentation de l'activité de l'enzyme en fonction du temps pour différentes concentrations d'un inhibiteur irréversible.

La droite représentant l'inverse des k_{obs} calculés en fonction de l'inverse de la concentration en inhibiteur, permet la détermination du k_{inact} et du K_i (constante de dissociation) (Figure 7).

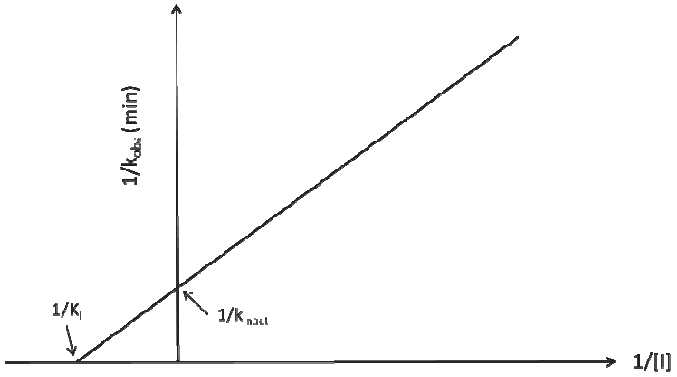


Figure 7 : Détermination graphique des constantes d'inactivation (K_i ; k_{inact}) d'un inhibiteur irréversible.

II) Tests d'activité de la DXS

L'activité enzymatique est mesurée en suivant la disparition du substrat ou l'apparition du produit de la réaction en fonction du temps. En ce qui concerne la DXS, différentes méthodes ont été décrites afin de déterminer la vitesse initiale.

L'utilisation de [2-^{14}C]pyruvate et de GAP comme substrats donne lieu à la formation de [2-^{14}C]DXP dont la quantification permet de déterminer la vitesse de la réaction enzymatique.[2] Pour ce faire, la réaction est stoppée à différents temps d'incubation et les deux produits radioactifs présents dans le milieu réactionnel à savoir le pyruvate et le DXP sont séparés par chromatographie sur couche mince (CCM). Après localisation par autoradiographie, ils sont extraits de la silice et quantifiés à l'aide d'un compteur de radioactivité à scintillation liquide. Une variante de cette méthode consiste à déphosphoryler le [2-^{14}C]DXP formé lors de la réaction enzymatique en [2-^{14}C]DX avec une phosphatase alcaline. Le DX radioactif est quantifié après purification par chromatographie sur une petite colonne de silice.[3]

Le [1-^{14}C]pyruvate a aussi été utilisé comme substrat. Dans ce cas, la vitesse de la réaction a été mesurée en dosant le $^{14}CO_2$ libéré.[2]

Si l'on veut éviter l'emploi de produits radioactifs pour tester l'activité de la DXS, le DX formé au cours de la réaction, soit directement avec du D-glycéraldéhyde comme substrat, soit après déphosphorylation du DXP peut être quantifié par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en utilisant un détecteur d'indice de réfraction.[4]

Une autre méthode décrite est fondée sur la mesure d'un rapport isotopique par spectroscopie de masse (IRMS). C'est la quantité de $^{13}CO_2$ émis lors de la formation du DXP à partir de [1-^{13}C]pyruvate qui est mesurée. Cette quantité est équivalente à celle de DXP produite, ce qui permet d'évaluer l'activité de la DXS.[5]

L'équipe de Meyers a mesuré la quantité de DXP formé après réaction avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine. Les hydrazones correspondantes au pyruvate, GAP et DXP, sont séparées et quantifiées par HPLC.[6]

La production de DX ou de DXP peut être quantifiée par fluorescence après réaction avec de l'acide 3,5-diaminobenzoïque[7] Le produit de réaction possède une fluorescence maximale à 502 nm (pour le DX) et 510 nm (pour le DXP) pour une excitation à 396 nm.

Enfin, il est possible de suivre l'activité enzymatique de la DXS en dosant le pyruvate qui n'a pas réagi lors de la réaction avec la DXS, à l'aide de la L-lactate déshydrogénase (LDH). Cette enzyme ayant pour cofacteur le NADH réduit l'acide pyruvique en acide L-lactique. La quantité de pyruvate présent dans le milieu réactionnel est mesurée en déterminant la différence d'absorbance à 340 nm (ou de fluorescence à 460 nm avec excitation à 340 nm) observée suite à l'oxydation du NADH en NAD^+.[8]

Toutes les méthodes décrites nécessitent un arrêt de la réaction enzymatique à différents temps pour mesurer la quantité de DX(P) formée. La vitesse de la réaction enzymatique est déterminée en reportant la quantité de DX(P) formé en fonction du temps. Il existe une méthode permettant, grâce à un test couplé, de la mesurer directement. En effet, le DXP produit par la DXS est transformé en MEP à l'aide de la DXR présente dans le milieu réactionnel.[9,10] Cette enzyme utilise le DXP comme substrat et le NADPH comme cofacteur de réduction. La consommation de NADPH en $NADP^+$ peut être suivie à 340 nm. La consommation de NADPH est directement reliée à la quantité de DXP présent dans le milieu donc à la vitesse de production de DXP et par conséquent à l'activité de la DXS.

III) Tests enzymatiques de la DXS

1) Méthode utilisée

Après avoir réalisé les synthèses des différents composés, inhibiteurs potentiels de la DXS, nous avons souhaité évaluer leurs activités biologiques sur la DXS. Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec le Dr. D. Tritsch.

Nous avons cherché une méthode de mesure de l'activité de la DXS rapide à mettre en œuvre et permettant de déterminer le pouvoir inhibiteur des composés synthétisés. Parmi les méthodes décrites dans la littérature, celle utilisant la LDH pour doser le pyruvate non consommé par la DXS semblait la plus adéquate. En effet, le test couplé DXS-DXR qui représente certainement la méthode la plus rapide et la moins fastidieuse, n'est pas utilisable pour la plupart de nos composés qui sont des accepteurs de Michael. Ces derniers sont sensibles aux thiols tels que le mercaptoéthanol ou le dithiothréitol, qui sont indispensables pour la préservation de l'activité de la DXR. Par ailleurs, pour la mise en œuvre de ce test couplé, il est également nécessaire de tester l'influence des différents composés et des substrats de la DXS sur l'activité de la DXR.

Le test radiométrique avec du pyruvate radioactif est beaucoup trop long car il nécessite une séparation du pyruvate et du DXP par chromatographie sur couche mince (environ 8 h) avant la mesure de la radioactivité par scintillation liquide.

Par contre, les méthodes de mesure de la vitesse enzymatique fondées sur la disparition du substrat présentes l'inconvénient d'une faible différence relative de concentration, d'où une incertitude sur les mesures pouvant être élevée. Les conditions expérimentales ont dû être optimisées afin d'obtenir des résultats fiables et reproductibles.

La vitesse de la réaction enzymatique est déterminée en calculant la concentration du pyruvate consommé par la DXS en fonction du temps. Après arrêt de la réaction, on détermine enzymatiquement la concentration en pyruvate résiduelle par la LDH, qui catalyse la réduction du pyruvate en L-lactate en présence de NADH.

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{lactate déshydrogénase}} \text{Lactate} + \text{NAD}^+$$

Celle-là est déduite à partir de la différence totale d'absorbance à 340 nm due à l'oxydation du NADH en NAD^+ (ε_{340nm} = 6220 $M^{-1}cm^{-1}$). La densité optique au départ est mesurée en réalisant un témoin sans enzyme. La quantité de NAD^+ formé équivaut à la quantité de pyruvate non consommé par la DXS. La quantité initiale de pyruvate étant connue, il est facile de déterminer la quantité de pyruvate consommé par la DXS. La représentation de la partie linéaire de la quantité de pyruvate consommé en fonction du temps permet de calculer la vitesse de réaction de la DXS (Figure 8).

Les mesures de la concentration en pyruvate résiduel ont été réalisées après arrêt de la réaction enzymatique par dilution du milieu réactionnel (12,5 fois) et transformation du pyruvate non consommé en L-lactate par la LDH. Dans les conditions utilisées, près de 90% du pyruvate ont été transformés par la LDH en moins de 30 s.

La représentation des résultats a montré l'existence de deux phases d'activité de la DXS. Une phase de consommation rapide de pyruvate d'environ 1 min (« burst »), suivie d'une phase linéaire. (Figure 8).

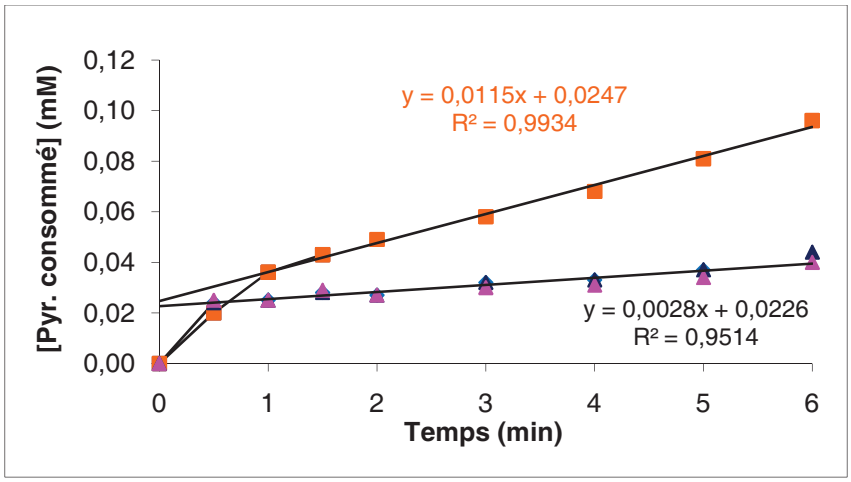


Figure 8 : Evolution de la consommation de pyruvate par la DXS en fonction du temps.
■ : avec GAP, ▲ : sans GAP, ▲ : sans enzyme.

L'observation de ce « burst » ou phase préstationnaire peut être artéfactuelle (concentration locale en enzyme plus importante avant homogénéisation, présence d'enzymes contaminantes utilisant également du pyruvate comme substrat telles que la pyruvate déshydrogénase ou la pyruvate décarboxylase) ou bien représenter une particularité de la DXS

(phénomène de régulation par inhibition par le produit de la réaction, mécanisme ping-pong...). La DXS catalyse la formation du DXP selon un mécanisme ping-pong (Figure 9).[10]

Figure 9 : Mécanisme ping-pong. A, B : substrats ; P,Q : produits de réaction ; E :enzyme ; F : enzyme modifiée.

Pour la DXS il y a fixation du premier substrat, le pyruvate. Après réaction, le premier produit (CO_2) est libéré, et la DXS se retrouve sous une forme modifiée (hydroxyéthylidènethiamine/DXS). Puis il y a fixation du deuxième substrat, le GAP et formation d'un deuxième produit de la réaction enzymatique à savoir le DXP. Pour un tel mécanisme, on peut observer un « burst » si la deuxième étape est nettement moins rapide que la première. Dans ce cas, l'amplitude du « burst » permet de quantifier la concentration en DXS puisqu'il est dû à un seul turn-over de celle-là. En ce qui concerne l'expérience décrite, l'amplitude observée (0,02 à 0,03 mM) est nettement plus importante que la concentration en enzyme présente dans le test soit environ 7×10^{-4} mM.

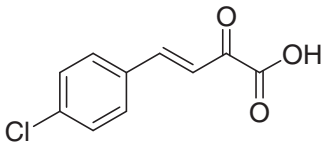
En omettant le GAP du milieu réactionnel, le « burst » subsiste toujours mais la réaction enzymatique s'arrête. Une présence d'une enzyme contaminante utilisant également du pyruvate peut être exclue. La partie linéaire semble bien représenter la phase stationnaire de l'activité de la DXS.

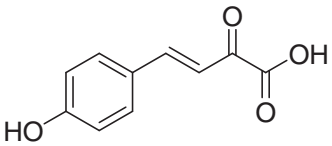
En absence d'enzyme, le « burst » est toujours visible de sorte que nous pouvons attribuer celui-là à un artéfact de manipulation (Figure 8).

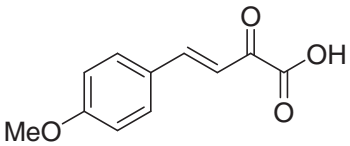
La vitesse de la réaction enzymatique a été calculée à partir de la deuxième phase linéaire

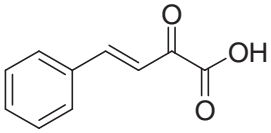
2) Tests d'inhibition de la DXS

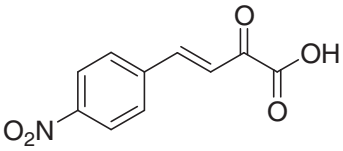
Nous avons testé les molécules synthétisées dans le chapitre 1.

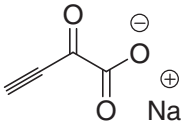

33

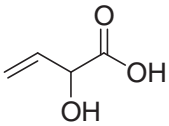

34

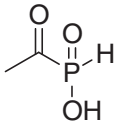

35

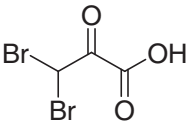

36

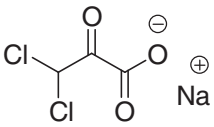

37

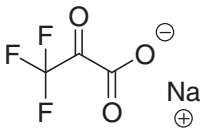

41


46


49


53


54


55

a) Cinétique de la DXS

Dans un premier temps, nous avons recherché si les composés que nous voulions tester sur la DXS étaient substrats de la LDH (Tableau 2). Seul le fluoropyruvate est réduit de manière conséquente par la LDH. Ce composé ne peut être testé sur la DXS en utilisant notre test enzymatique avec la LDH. Une faible vitesse de réduction du dibromopyruvate **53** a été observée mais elle est essentiellement due à la présence de pyruvate contaminant (environ 0,5%), composé utilisé comme synthon pour sa synthèse. Les composés **34** et **35** absorbant fortement à 340 nm, leur concentration a dû être limitée à 0,01 mM.

Composés	Concentration (mM)	Vitesse relative (%)
pyruvate	1	100
fluoropyruvate	1	61
53	1	0,2
54	1	0.04
acide phénylpyruvique	1	0,06
55	1	< 0,01
34	0.01	< 0,01
35	0.01	< 0,01

Tableau 2 : Activité de la LDH avec différents substrats.

b) Détermination du K_m du pyruvate vis-à-vis de la DXS

Pour tester la méthode, nous avons mesuré le K_m de la DXS d'*Escherichia* coli vis-à-vis du pyruvate (Figure 10). Il a été établi en utilisant la représentation graphique de Lineweaver et Burk ($1/v_0$ en fonction de 1/[pyr]). Les vitesses ont été mesurées pour des concentrations en pyruvate variant de 0,625 à 3 mM. Nous avons obtenu un $K_m = 2$ mM. Cette valeur est valable si la concentration en *D/L*-GAP est saturante. Ne connaissant pas le K_m du *D/L*-GAP de notre enzyme, nous ne pouvons pas savoir si nous sommes dans ce cas. Dans la littérature, les valeurs de K_m sont de l'ordre de 200 à 400 µM pour le *D*-GAP.[4,6,10] Nous devrions donc être proches de la saturation.

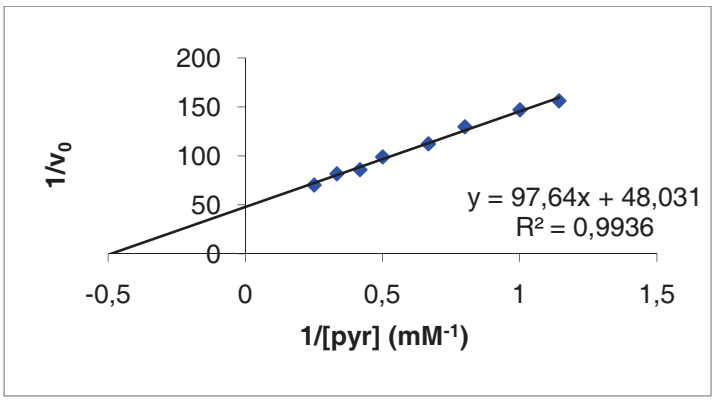


Figure 10 : Diagramme de Lineweaver et Burk pour une concentration en pyruvate variant de 0,625 à 3 mM et une concentration en *D/L* GAP de 5 mM.

Des valeurs de K_m de la DXS pour le pyruvate sont disponibles dans la littérature pour différents organismes (Tableau 2).

Organismes	K_m mesuré (mM)
Populus x canescens [5]	0,158
Haemophilus influenzae[10]	0,190
Rhodobacter capsulatus[3]	0,44
Rhodobacter capsulatus[11]	A : 0,61 B : 3,0
Streptomyces sp.[4]	0,065
Escherichia coli [4]	0,096
Escherichia coli[6]	1,1
Escherichia coli [10]	0,048
Escherichia coli[7]	2,9

Tableau 3 : K_m du pyruvate pour la DXS d'une plante et de bactéries.

En ce qui concerne *E. coli,* nous constatons qu'il existe de grandes différences, qui pourraient être liées à l'utilisation de méthodes différentes pour mesurer l'activité de la DXS.

3) Inhibition de la DXS

Pour tester la capacité des composés synthétisés à inhiber la DXS, nous avons comparé les vitesses enzymatiques en présence et en absence de ces composés. Ce sont des analogues du pyruvate et nous nous attendons à ce qu'ils se fixent au niveau du site actif.

Dans ce cas, on devrait observer une diminution de la consommation du pyruvate. Grâce aux informations acquises lors de nos essais de détermination du K_m, nous avons pu définir les conditions expérimentales adéquates pour analyser la pouvoir inhibiteur des composés de manière rapide et fiable. Nous avons choisi d'utiliser une concentration en pyruvate de 0,625 mM et de *D/L*-GAP de 5 mM. Des aliquotes de 40 µL ont été prélevées pour mesurer la quantité en pyruvate consommé par la DXS. Dans ces conditions, la vitesse du témoin, c'est à dire sans inhibiteur, est suffisamment grande pour qu'un pourcentage d'inhibition soit perceptible. Nous nous sommes limités à des concentrations inférieures ou égales à 1 mM, afin de pouvoir considérer que l'inhibition soit bien due aux dits composés et non aux contaminants, non détectables en RMN.

a) Test des accepteurs de Michael

(i) Dérivés de l'acide benzylidènepyruvique

Les propriétés inhibitrices des dérivés de l'acide benzylidènepyruvique ont été évaluées. Les tests ont été réalisés sans préincubation de la DXS avec les inhibiteurs potentiels. La réaction enzymatique a été initiée par addition de la DXS. Les concentrations en inhibiteurs étaient de 0,5 et 1 mM. Pour le composé **34**, une valeur à 0,25 mM a été mesurée. Les pourcentages d'inhibition sont présentés dans le tableau 4.

Composés	% inhibition à 0,25 mM	% inhibition à 0,5 mM	% inhibition à 1 mM
33	ND	0	0
34	25	55	61
35	ND	34	ND
36	ND	~ 0	~ 0
37	ND	15	39

Tableau 4 : Evaluation de l'inhibition des dérivés d'acide benzylidènepyruvique sur la DXS *d'E. coli* à différentes concentrations. ND : non déterminé

Ces pourcentages d'inhibition ont été calculés à partir de la vitesse de consommation du pyruvate par la DXS en présence d'inhibiteur à différentes concentrations (Figure 9).

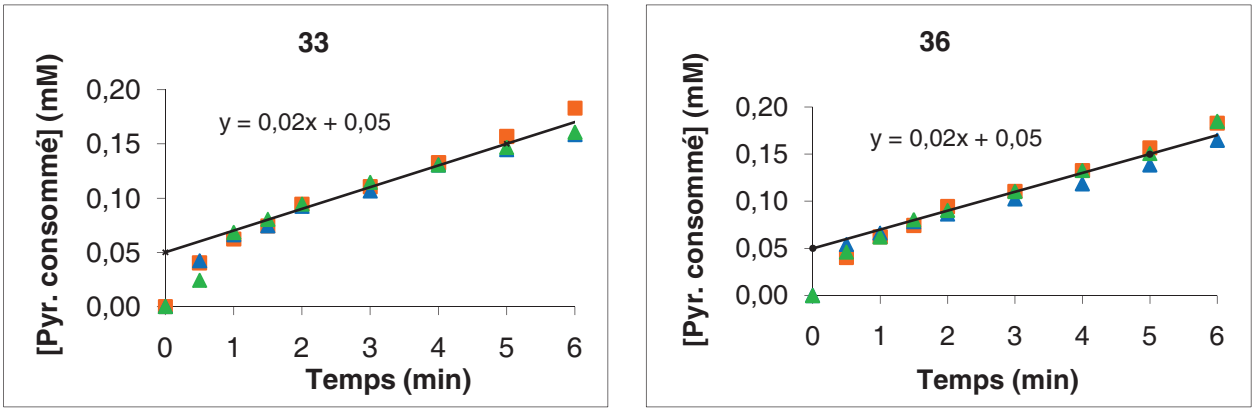


Figure 11 : Influence des composés **33** et **36** sur la vitesse de réaction de la DXS**.**

■ : témoin, ▲ : inhibiteur 0,5 mM ; ▲ : inhibiteur 1 mM

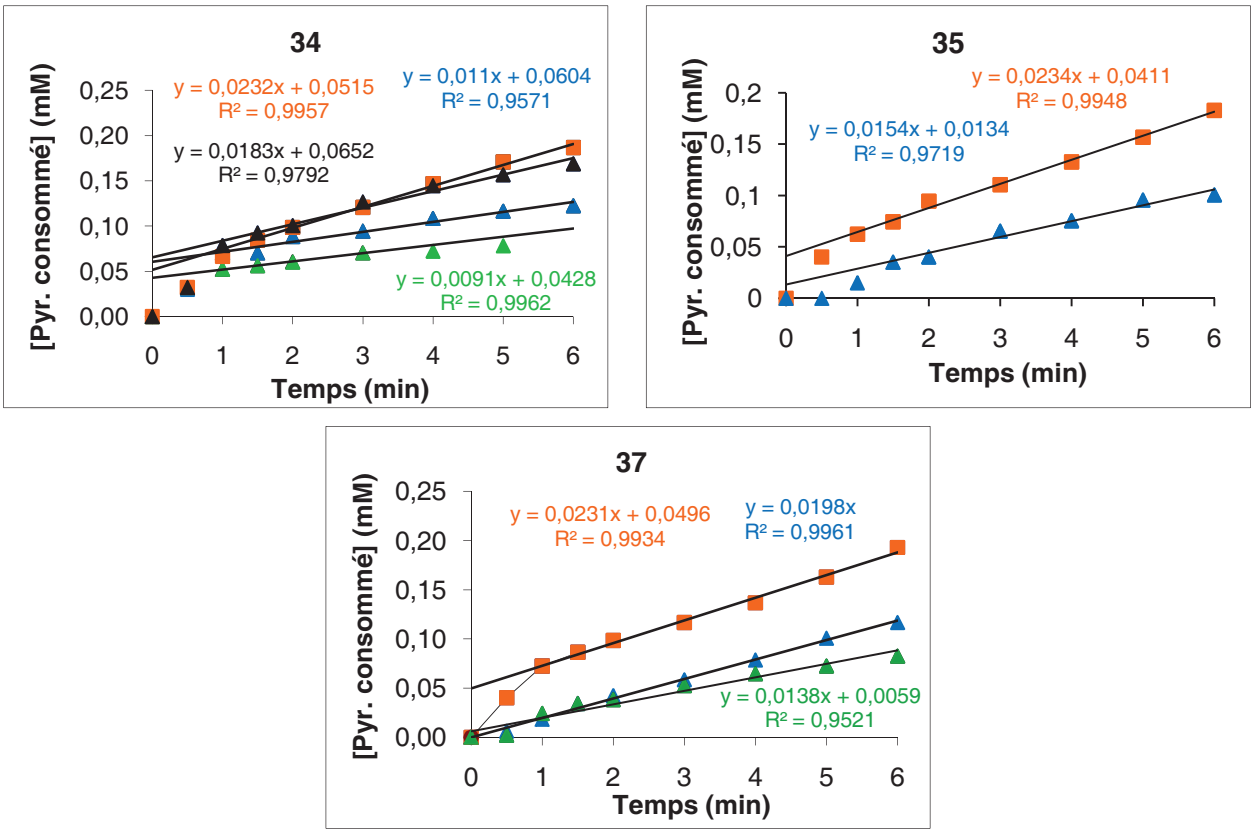


Figure 12 : Influence des composés **34**, **35** et **37** sur la vitesse de réaction de la DXS**.**

■ : témoin, ▲ : inhibiteur 0,25 mM, ▲ : inhibiteur 0,5 mM ; ▲ : inhibiteur 1 mM.

Le problème réside en la forte absorbance de ces composés à 340 nm, notamment pour le composé **35** qui a nécessité une dilution (2,5 fois) avant les mesures d'absorbance, entraînant une diminution d'autant de la pente. Les résultats obtenus avec une concentration de 1 mM étaient incohérents. Les composés **33** et **36** ne présentent aucune activité inhibitrice de la DXS, donc ils ne sont apparemment pas reconnus par l'enzyme. Les composés **34**, **35** et **37** inhibent visiblement la DXS et le composé **34** avec 66% d'inhibition à 1 mM semble être le plus efficace. Comme ce sont des analogues du pyruvate, nous pouvons envisager qu'ils se lient au niveau du site actif de l'enzyme. Ce sont des accepteurs de Michael pouvant subir des attaques nucléophiles d'éléments du site actif. Dans ce cas la DXS pourrait être inhibée irréversiblement. Les tests d'inactivation devraient nous donner de plus amples informations.

(ii) Acide 2-oxo-3-butynoïque et acide 2-hydroxy-3-buténoïque

Le 2-oxo-4-butynoate de sodium **41** et l'acide 2-hydroxy-3-buténoïque **46** ont été testés à une concentration de 1 mM. Nous n'avons observé aucune inhibition pour ces composés (Figure 12).

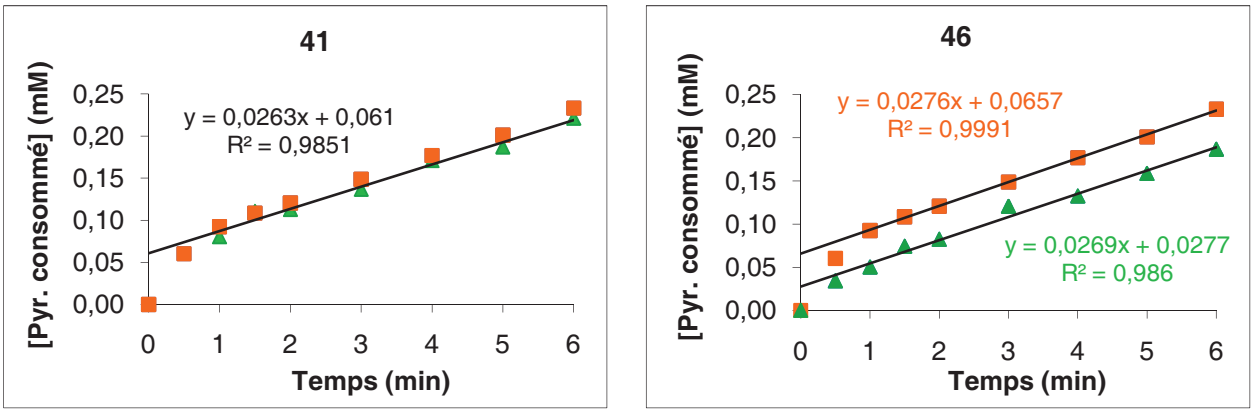


Figure 13 : Influence des composés **41** et **46** sur la vitesse de réaction de la DXS**.**

■ : témoin, ▲ : inhibiteur 1 mM.

b) Analogue phosphoré du pyruvate

L'acétylphosphinate **49** a été testé aux concentrations de 1 mM et 0,5 mM. L'évaluation du pourcentage d'inhibition (Tableau 5) a pu être réalisée à partir des vitesses de

consommation du pyruvate en présence d'acétylphosphinate à deux concentrations (0,5 mM et 1 mM, Figure 14).

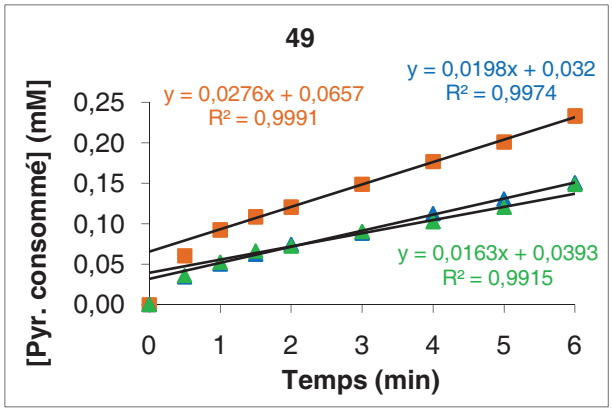


Figure 14 : Influence du composé **49** sur la vitesse de réaction de la DXS.

■ : témoin, ▲ : inhibiteur 0,5 mM ; ▲ : inhibiteur 1 mM

Composé	% inhibition à 0,5 mM	% inhibition à 1 mM
49	28	41

Tableau 5 : Evaluation de l'inhibition de la DXS par l'acétylphosphinate **49** à 0,5 mM et 1 mM.

L'acétylphosphinate, analogue phosphoré du pyruvate, pourrait être un inhibiteur de la DXS. Dans la littérature il est décrit comme inhibiteur réversible de la pyruvate déshydrogénase de levure,[12] et comme inhibiteur irréversible la pyruvate déshydrogénase de cœur de bœuf et d' *E. coli.*[13] Ce composé a également été testé pour déterminer s'il est capable d'inhiber irréversiblement la DXS.

Il a été montré que son analogue méthylé est aussi un inhibiteur de la DXS. Il inhibe 94% de l'enzyme pour une concentration 10 mM.[14]

c) Analogues tri- et dihalogénés du pyruvate

Le dibromopyruvate **53**, le dichloropyruvate **54** et le trifluoropyruvate **55** ont été testés aux concentrations de 1 mM et 0,5 mM. Les pourcentages d'inhibition pour ces composés sont résumés dans le tableau 6.

Composés	% inhibition à 0,5 mM	% inhibition à 1 mM
53	31	43
54	15	34
55	35	46

Tableau 6 : Evaluation de l'inhibition des dérivés tri- et dihalogéné du pyruvate sur la DXS à deux concentrations (0,5 mM et 1 mM).

Ces pourcentages d'inhibition ont été calculés à partir de la vitesse de consommation de pyruvate en présence d'inhibiteur à diverses concentrations (Figure 15).

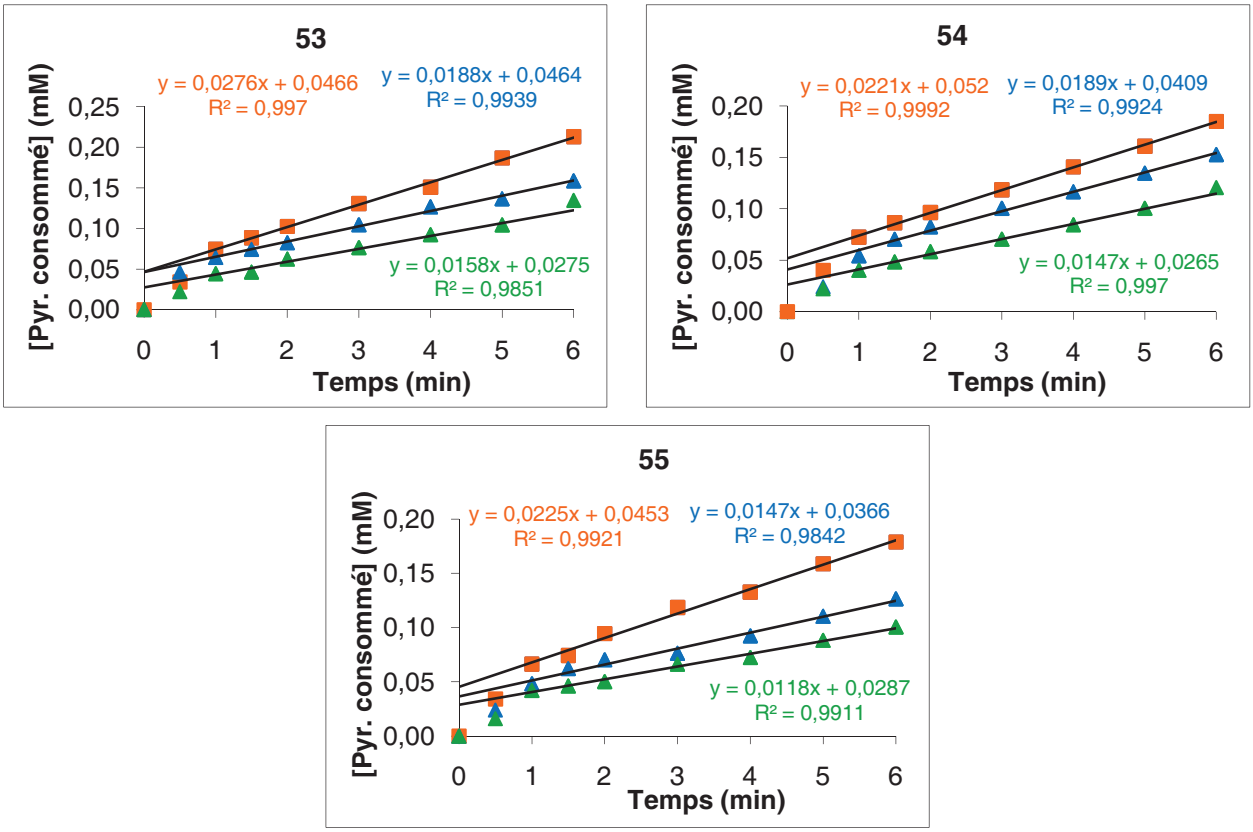


Figure 15 : Evolution de la consommation de pyruvate par la DXS en fonction du temps en présence des acides pyruviques halogénés **53**, **54** et **55.**

■ : témoin, ▲ : inhibiteur 0,5 mM ; ▲ : inhibiteur 1 mM

C'est la première fois que l'activité inhibitrice des ces trois composés a été mise en évidence. Le dibromopyruvate et le trifluoropyruvate paraissent les plus efficaces. Concernant

les dérivés monohalogénés du pyruvate, le fluoropyruvate a été testé en tant qu'inhibiteur irréversible sur la DXS de *Rhodobacter capsulatus*.[3] Nous n'avons pas pu tester le fluoropyruvate, car il est substrat de la LDH. Le bromopyruvate a été testé sur la pyruvate déshydrogénase *d'E. coli* et il agit, dans un premier temps comme un inhibiteur réversible, puis après une incubation prolongée comme un inhibiteur irréversible.[15]
Nos composés ont aussi été testés pour savoir si leurs incubations avec l'enzyme conduisent également à une inhibition irréversible.

4) Inactivation

Nous avons testé si les composés inhibant la DXS sont capables d'inactiver l'enzyme. Pour une étude préliminaire, ils ont été incubés à une concentration de 1 mM pendant 5 et 15 min en présence de DXS avant de mesurer l'activité résiduelle de l'enzyme. Dans le milieu de test, l'inhibiteur s'est retrouvé dilué 32 fois (0,03 mM). A cette concentration, aux vues des résultats des tests d'inhibition, l'influence sur la vitesse devrait être quasi nulle. La perte d'activité a été comparée à un témoin incubé dans les mêmes conditions en absence d'inhibiteur. Nous avons admis que l'absence de perte d'activité supplémentaire à 15 min d'incubation par rapport à 5 min démontre que ces composés sont incapables d'inactiver efficacement la DXS.

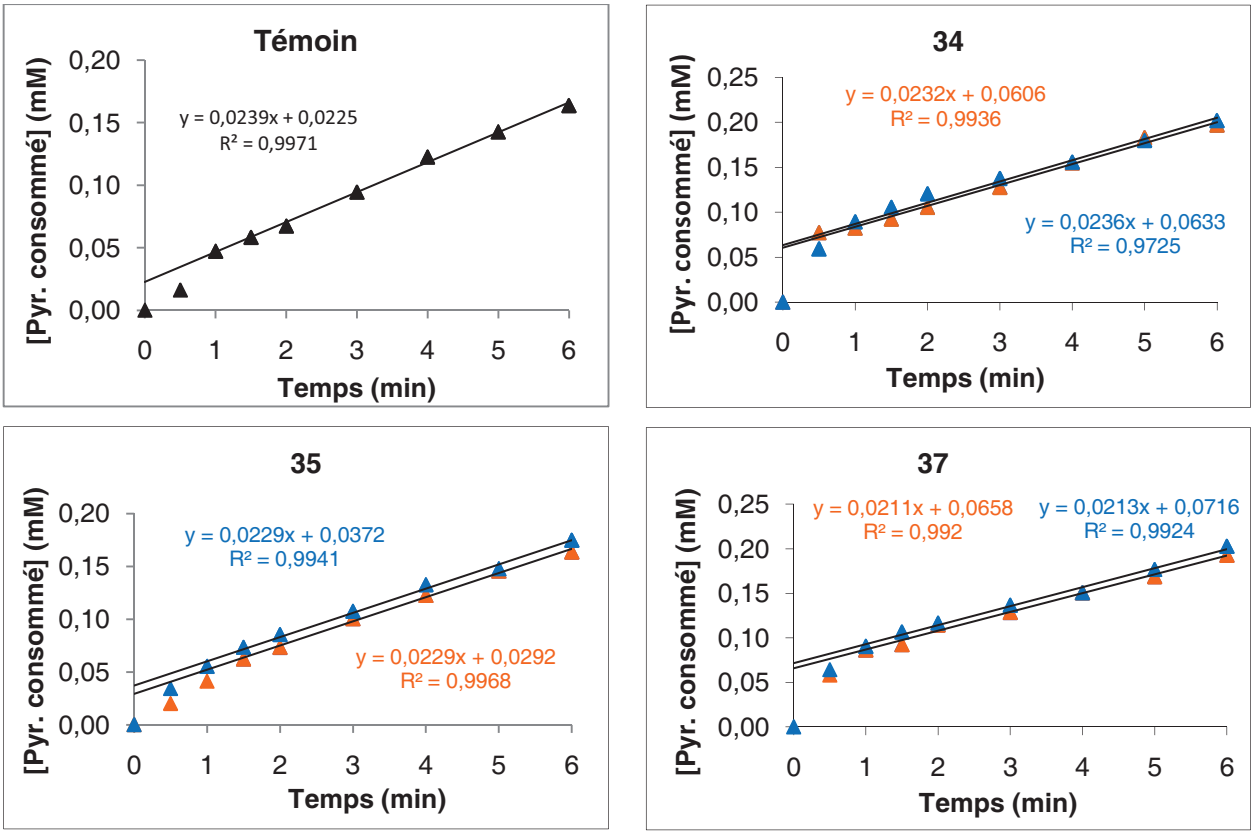


Figure 16 : Evolution de la consommation du pyruvate par la DXS en fonction du temps en présence des analogues d'acide benzylidènepyruvique (1 mM).

▲ : après 5 min d'incubation ; ▲ : après 15 min d'incubation du composé testé.

En ce qui concerne les analogues d'acide benzylidènepyruvique, nous ne constatons ni diminution significative de l'activité enzymatique par rapport au témoin, ni influence du temps d'incubation de l'enzyme avec les inhibiteurs, sur son activité. Ces composés n'inhibent pas irréversiblement la DXS (Figure 16, Tableau 7).

Composés	Vitesse à 5 min (mM/min)	Vitesse à 15 min (mM/min)
Témoin	0,0239	0,0239
34	0,0232	0,0236
35	0,0229	0,0229
37	0,0211	0,0213

Tableau 7 : Influence du temps d'incubation sur la vitesse de consommation du pyruvate par la DXS en présence des composés **34**, **35** et **37.**

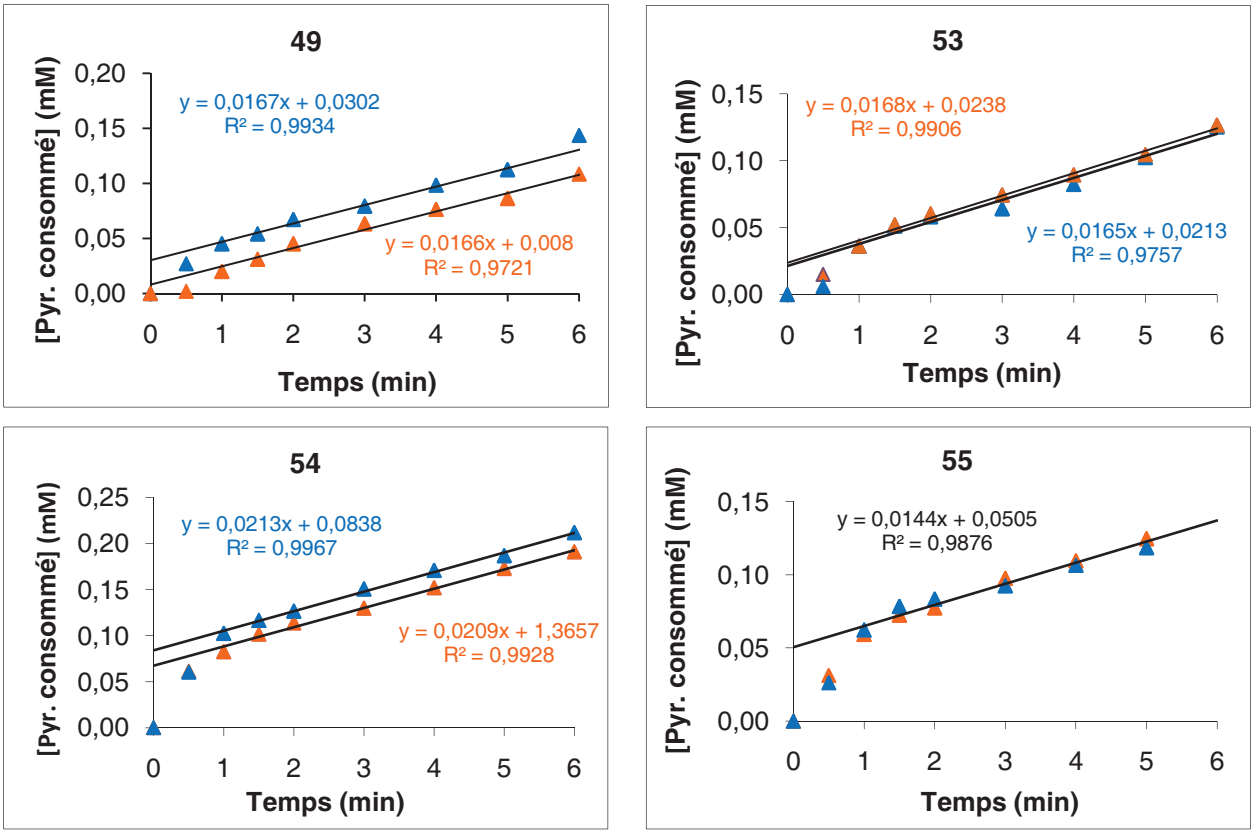


Figure 17 : Evolution de la consommation du pyruvate par la DXS en fonction du temps en présence des différents inhibiteurs.

▲ : après 5 min d'incubation ; ▲ : après 15 min d'incubation du composé testé.

L'acétylphosphinate **49**, après incubation de la DXS, monte une diminution de l'activité enzymatique par rapport au témoin. La perte d'activité n'augmente pas lorsque l'incubation passe de 5 à 15 min (Figure 17, Tableau 8).

Pour le dibromopyruvate **53** et le trifluoropyruvate **55**, nous observons une diminution de la vitesse par rapport au témoin, mais pas d'inhibition supplémentaire quand le temps d'incubation passe de 5 à 15 min. L'incubation du dichloropyruvate **54** avec la DXS n'entraine pas de modification significative de l'activité de l'enzyme (Figure 17, Tableau 8).

Composés	Vitesse à 5 min (mM/min)	Vitesse à 15 min (mM/min)
Témoin	0,0239	0,0239
49	0,0166	0,0167
53	0,0168	0,0165
54	0,0209	0,0213
55	0,0144	0,0144

Tableau 8 : Influence du temps d'incubation sur la vitesse de consommation du pyruvate par la DXS en présence des composés **49**, **53**, **54** et **55.**

Le fait de ne pas voir d'évolution de la diminution de la vitesse de réaction avec l'augmentation du temps d'incubation indiquerait qu'il n'y a probablement pas d'inactivation de la part des composés. Cette diminution serait plutôt due à un phénomène d'inhibition induit par l'incubation de l'enzyme avec l'inhibiteur. Donc comme dans le cas des inhibitions de type « slow-binding », ces composés pourraient soit se fixer lentement à l'enzyme, soit le complexe enzyme/inhibiteur pourrait évoluer pour donner un complexe plus stable. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des tests d'inhibition dans lesquels l'enzyme est incubée avec l'inhibiteur pendant 5 min. La réaction enzymatique est alors initiée par l'addition de pyruvate. Dans le cas du composé **49**, la préincubation avec l'enzyme ne conduit pas à une augmentation de l'inhibition. En ce qui concerne le dibromopyruvate **53**, l'augmentation de l'inhibition pour une concentration de 0,5 mM est très faible (4%). Par contre, pour le trifluoropyruvate **55**, l'inhibition passe de 35 à 47% .à une concentration de 0,5 mM. L'inhibition passe de 46 à 67% pour une concentration de 1 mM. La préincubation du composé **55** avec l'enzyme conduit clairement à une augmentation de l'inhibition. Cela pourrait expliquer l'inhibition observée lors des tests d'inactivation.

IV) Conclusion

Le test enzymatique mis au point nous a permis de tester avec succès les composés synthétisés. Il permet d'obtenir rapidement des résultats reproductibles et cohérents. Il a demandé une mise au point des conditions expérimentales, à savoir la concentration en pyruvate, la quantité d'enzymes (DXS et LDH)… L'existence du « burst » de nature artéfactuelle a nécessité le suivi de la réaction enzymatique sur plusieurs minutes, afin de déterminer la partie linéaire permettant l'évaluation de la vitesse de réaction. Le principal problème fut l'absorption des dérivés de l'acide benzylidènepyruvique à 340 nm. Nous avons dû en tenir compte pour calculer la quantité de pyruvate consommé par la DXS. Le fait que nous ayons utilisé des analogues du pyruvate nous a obligé à tester nos composés sur la LDH, afin de voir s'ils étaient substrats. Il a fallu ajuster la quantité de LDH pour éviter que la réduction de ces composés par la LDH n'influence le dosage du pyruvate.

Nous avons entrepris la synthèse de dérivés d'acide benzylidènepyruvique pour les tester sur la DXS, car l'acide 4-chlorobenzylidènepyruvique **33** était décrit comme inhibiteur irréversible de la pyruvate décarboxylase de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*E. coli.*[16,17] Comme la DXS, c'est une enzyme à TPP, dont le substrat est le pyruvate. Parmi ces dérivés, seuls les composés **34**, **35** et **37** ont montré une activité inhibitrice, mais ils ne sont pas capables d'inactiver la DXS. Ils ne forment pas de liaisons covalentes avec le TPP ou un acide aminé du site actif. Pour le composé **33**, il a été montré qu'une liaison covalente se formait entre la cystéine 221 du site régulateur de la pyruvate décarboxylase et le composé par une addition de Michael.[17] Dans le cas de la DXS, il n'existe probablement pas de nucléophile susceptible de réagir d'une telle manière après formation des complexes enzyme/inhibiteur. Le dérivé **32** actif sur la pyruvate décarboxylase ainsi que le dérivé **35** n'ont aucun effet sur la DXS.

Bien que le composé **41** soit un inhibiteur irréversible de la pyruvate déshydrogénase *d'E. coli,* probablement par une réaction avec une cystéine du site actif,[13,18] celui-là n'a aucun effet sur l'activité de la DXS. Il n'est donc pas reconnu par l'enzyme tout comme le composé **46**.

L'analogue phosphoré du pyruvate **49** possède une activité inhibitrice envers la DXS. Il est également inhibiteur réversible de la pyruvate déshydrogénase d'*E. coli*. L'affinité de

cette enzyme pour ce composé est très forte (K_i = 0,15 µM),[13] mais ce n'est pas le cas pour la DXS.

Nous avons montré pour la première fois que les analogues tri- et dihalogénés du pyruvate inhibent la DXS. Parmi ces trois composés, le trifluoropyruvate **55** est le plus efficace. La préincubation de l'enzyme avec ce composé augmente fortement son activité inhibitrice. Cette molécule pourrait ainsi être un inhibiteur de type « slow-binding ». N'étant pas sensible aux thiols, comme les composés accepteurs de Michael, nous envisageons une étude plus poussée de l'activité inhibitrice des analogues halogénés du pyruvate, en utilisant le test couplé DXS-DXR. Ainsi nous pourrons également tester le fluoropyruvate, inhibiteur irréversible de la DXS de *Rhodobacter capsulatus*[3] et comparer son activité inhibitrice à celle de nos composés.

Partie Expérimentale

Matériels

Préparation du glycéraldéhyde 3-phosphate à partir du diéthylacétal *D/L*-glycéraldéhyde-3-phosphate, sel de monobarium (Sigma)

De la résine échangeuse de protons Dowex 50 (1,4 g) est mise en suspension dans de l'eau (3 mL). A cette suspension est ajouté le diéthylacétal *D/L*-glycéraldéhyde-3-phosphate, sel de monobarium (120 mg). Le tube est placé dans un bain marie bouillant (environ 3 min) et est agité de façon intermittente jusqu'à dissolution totale de la poudre. Le mélange est ramené à t.a., puis est centrifugé. Le surnageant est prélevé et la résine est rincée deux fois avec de l'eau. Le volume est ajusté afin d'obtenir une solution à 60 mM. La solution est conservée au congélateur. Avant utilisation, elle est neutralisée à l'aide de soude (2 M) et le volume est ajusté pour avoir une solution à 50 mM.

Les milieux de culture LB et LB/agar, le TPP sont des produits Sigma.
L'ampicilline, l'isopropyl β-D-thiogalactoside, le DTT sont des produits Euromedex.

Les mesures d'absorbance sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon 933.

Surexpression et purification de la DXS d'*E. coli*

Transformation des bactéries *E. coli* XL1 blue par le plasmide pTAC-ORF2

Les bactéries *E. coli* XL1 blue rendues compétentes par traitement au chlorure de calcium sont transformées par le plasmide pTAC-ORF2, contenant le gène codant pour la DXS d'*E. coli*.[1] Les bactéries et la solution de plasmide (1µL) sont mélangées et placées à 4°C pendant 30 min. On fait subir à la suspension un choc thermique à 37°C pendant 5 min. A celle-ci est ajoutée du milieu LB (150 µL). Après incubation à 37°C pendant 30 min, une partie de cette culture (100 µL) est étalée sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB/agar et de l'ampicilline (100 µg/mL). On laisse la culture pendant un jour à 37°C. Seules poussent les bactéries ayant intégré le plasmide, qui leur confère une résistance à l'ampicilline.
Six colonies de bactéries sont prélevées et replacées sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB et de l'ampicilline. Cette boîte est mise à incuber un jour à 37°C, puis elle est conservée au réfrigérateur.

Surexpression de la DXS

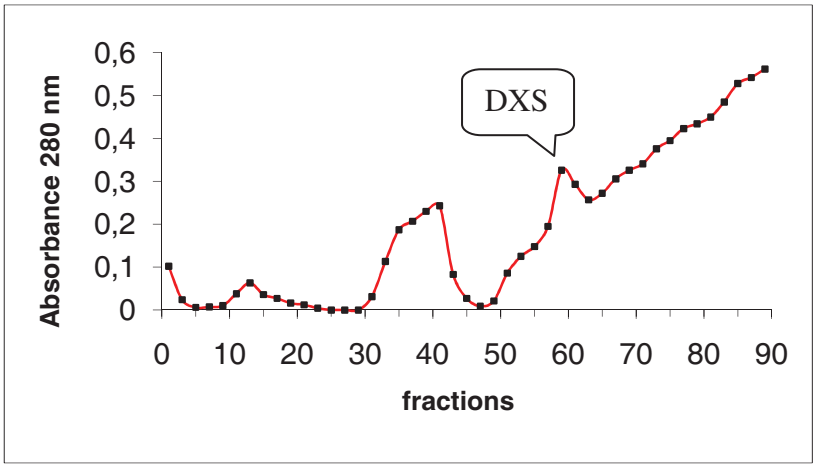
Quatre précultures de 6 mL dans du milieu LB liquide contenant de l'ampicilline sont préparées à partir d'une colonie de cette boîte. Ces bactéries sont mises à croître sous agitation à 37°C dans un « shaker » pendant 12 h.
Quatre erlenmeyers de 2 L contenant 500 mL de LB et de l'ampicilline sont ensemencés avec les précultures (6 mL). Ces erlenmeyers sont mis sous agitation à 37°C dans un « shaker », jusqu'à ce que la densité optique (600 nm) soit environ de 0,6 à 0,8.
L'induction de la surexpression se fait à l'aide d'isopropyl β-D-thiogalactoside (0,4 mM) et on laisse ensuite incuber sous agitation pendant 4 h à 30°C.
Les bactéries sont ensuite récoltées par centrifugation (7000 tr/min; 20 min; 4°C) et congelées.

Purification de la DXS

Le culot bactérien est remis en suspension avec du tampon Tris/HCl (4 mL ; 50 mM pH 7,5) contenant du TPP (0,5 mM), du $MgCl_2$ (2 mM), du fluorure de phénylméthanesulfonyle (PMSF) (1 mM) et du DTT (2 mM). Les bactéries sont transférées dans un mortier refroidi avec de l'azote liquide et broyées. La poudre obtenue est placée dans un tube à centrifuger. Après décongélation la suspension est centrifugée à 14000 tr/min pendant 25 min à 4 °C pour éliminer les parois bactériennes et les cellules non broyées.
Le surnageant ou extrait brut est récupéré et soumis à un préfractionnement par précipitation au sulfate d'ammonium à 50% de saturation (290 g/L). A cette concentration en sel, près de 90 % de la DXS précipite après 2 h à 4°C. Les protéines précipitées sont récoltées par centrifugation (14000 tr/min ; 25 min ; 4°C). Le culot est repris dans le tampon (2 mL).

La solution enzymatique est dialysée pendant une nuit contre du tampon Tris/HCl (1,8 L ; 50 mM ; pH 7,5) contenant du TPP (0,1 mM), du $MgCl_2$ (1 mM), du PMSF (0,2 mM) et du DTT (2 mM).

Le dialysat est déposé sur une colonne de Sepharose Q (GE Healthcare) (1,4 x 10 cm) équilibrée avec du tampon (Tris/HCl 50 mM ; pH 7,5) contenant du DTT (2 mM). Le débit est de 15 mL/h. A ce pH, la DXS est chargée négativement et est retenue sur la résine échangeuse d'anions.
La colonne est lavée avec le même tampon pour éliminer les protéines non retenues sur la colonne. La DXS est ensuite éluée en appliquant un gradient (2 x 40 mL) de NaCl (0 à 0,4 M) dans du tampon (Tris/HCl 50 mM ; pH 7,5) contenant du DTT (2 mM), du TPP (0,1 mM) et du $MgCl_2$ (0,5 mM).
Les fractions (1,5 mL) recueillies sont analysées par mesure de l'absorbance à 280 nm pour détecter la présence de protéine. La DXS est repérée par test enzymatique analytique.



Les fractions contenant la DXS sont concentrées et dialysées contre du tampon triéthanolamine (TEA) (50 mM ; pH 7,7) contenant du TPP (0,1 mM) et du $MgCl_2$ (0,5 mM) par centrifugation à l'aide d'unité de filtration Amicon Ultra-4 (seuil de coupure 10 KDa) de Millipore.

Détermination de la concentration en protéines

La concentration en protéine est déterminée à l'aide de la méthode de Bradford en utilisant la solution de coloration commercialisée par Bio-Rad. La courbe d'étalonnage est établie avec de l'albumine sérique de boeuf.[19]

Mesure de l'activité enzymatique de la DXS

Méthode qualitative

Cette méthode est essentiellement utilisée lors de la purification de la DXS. Les tests sont réalisés dans un tampon Tris/HCl (50 mM ; pH 7,5) contenant du TPP (2 mM), du $MgCl_2$ (5 mM) et du DTT (2 M). Les concentrations en *D*-glycéraldéhyde et en pyruvate sont de 50 mM. Le volume réactionnel est de 40 µL. La réaction enzymatique est initiée par l'addition de solution enzymatique (1 à 5 µL). Le milieu est incubé à 37°C pendant 1 h. La formation de DX est établie par CCM en utilisant le mélange *n*-propanol/H_2O/AcOEt (6/3/1) comme éluant et révélation avec le *p*-anisaldéhyde/H_2SO_4. Le DX donne une coloration bleu-vert.

Méthode quantitative

Les tests sont réalisés à 37°C dans un tampon TEA (50 mM ; pH 7,7) contenant du TPP (2 mM) et du $MgCl_2$ (5 mM). Les concentrations en pyruvate et en *D/L*-glycéraldéhyde 3-phosphate sont respectivement de 0,625 mM et de 5 mM. Le volume réactionnel est de 320 µL. L'activité enzymatique est initiée par l'addition de DXS (15 µg).
Une aliquote de 40 µL est prélevée aux temps 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5 et 6 min et ajoutée à du tampon TEA (460 µL; 50 mM pH ; 7,7) contenant du NADH (0,2 mM) et 1,4 unité enzymatique (UE) de *L*-lactate déshydrogénase (LDH de muscle de lapin, Sigma). Les absorbances sont mesurées à 340 nm, 10 min après incubation à température ambiante.
Pour déterminer l'absorbance au temps 0, un témoin en absence de DXS est réalisé. Une aliquote de 40 µL est ajoutée à du tampon TEA (460 µL ; 50 mM ; pH 7,7) contenant du NADH (0,2 mM). La LDH est additionnée après mesure de l'absorbance à 340 nm. La différence d'absorbance avant et après l'addition de la LDH permet de déterminer la concentration en pyruvate.

Détermination du K_m du pyruvate

Les tests sont réalisés à 37°C dans un tampon TEA (50 mM ; pH 7,7) contenant du TPP (2 mM) et du $MgCl_2$ (5 mM). Les concentrations en acide pyruvique varient de 0,625 à 3 mM. La concentration en *D/L*-glycéraldéhyde 3-phosphate est de 5 mM. Le volume réactionnel est de 320 µL. L'activité enzymatique est initiée par l'addition de DXS (15 µg).
Des aliquotes de 10 ou 20 µL sont prélevés aux temps 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4,5 et 6 min pour mesurer la concentration en pyruvate non consommé par la DXS selon la méthode décrite auparavant.
Le K_m est déterminé selon la méthode graphique de Lineweaver et Burk.

Tests d'inhibition de la DXS

Les solutions stocks des inhibiteurs sont à une concentration de 10 mM. Les inhibiteurs, si nécessaire, sont d'abord dissous dans l'acétonitrile à une concentration de 100 mM. Ces solutions sont ensuite diluées dix fois dans du tampon TEA (50 mM ; pH 7,7).
Les tests d'inhibition ont été réalisés selon le procédé décrit précédemment pour des concentrations de 0,5 et 1 mM.
Plusieurs composés absorbant à 340 nm, ils ont été rajoutés dans le témoin Pour le composé **34**, du fait de sa forte absorbance à 340 nm, une dilution (2,5 fois) dans le tampon TEA (50 mM ; pH 7,7) a été nécessaire.

Tests d'inactivation

La DXS (30 µg) est incubée à 37°C en présence de l'inhibiteur dans un tampon TEA (50 mM ; pH 7,7) contenant du TPP (2 mM) et du $MgCl_2$ (5 mM). La concentration en inhibiteur est de 1 mM. Le volume réactionnel est de 24 µL.
Au bout de 5 et 15 min d'incubation, une aliquote de 10 µL est prélevée afin de tester l'activité enzymatique résiduelle selon la méthode décrite précédemment.

[1] Kitzand, R. ; Wilson, I.B. *J. Biol. Chem.* (1962), *237*, 3245-3249.
[2] Lois, L.M. ; Campos, N. ; Rosa-Putra, S. ; Danielsen, K. ; Rohmer, M. ; Boronat, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998), *95*, 2105-2110.
[3] Eubanks, L.M. ; Poulter, C.D *Biochemestry.* (2003), *42*, 1140-1149.
[4] Kuzuyama, T. ; Takagi, M. ; Takahashi, S. ; Seto, H. *J. Bacteriol.* (2000), *182*, 891-897.
[5] Ghirardo, A. ; Zimmer, I. ; Brüggemann, N. ; Schnitzler, J-P. *Phytochemistry* (2010), *71*, 918-922.
[6] Brammer, L.A. ; Meyers, C.F. *Org. Lett.* (2010), *71*, 918-922.
[7] Querol, J. ; Besumbes, O. ; Lois, L.M. ; Boronat, A. ; Imperial, S *Anal. Biochem.* (2001), *296*, 101-105.
[8] Rice, J.W. ; Kloti, A.S. ; Crawford, J.M. ; Lanning, B ; Stewart, S.J. US patent No 20020168743A1
[9] Altinciek, B. ; Hintz, M. ; Sanderbrand, S. ; Wiesner, J. ; Beck, E. ; Jomaa, H. *FEMS Microbiol. Lett.* (2000), *190*, 329-333.
[10] Matsue, Y ; Mizuno, H. ; Tomita, T. ; Asami, T. ; Nishiyama, M. ; Kuzuyama, T. *J. Antiobiotics.* (2010), *63*, 583-588.
[11] Hahn, F.M. ; Eubanks, L.M. ; Testa, C.A. ; Blagg, B.S.J. ; Baker, J.A. ; Poulter, C.D. *J. Baceriolt.* (2001), *183*, 1-11.
[12] Laber, B. ; Amrhein, N. *Biochem. J.* (1987), *248*, 351-358.
[13] Nemeria, N.S. ; Korotchkina, L.G. ; Chakraborty, S. ; Patel, M.S. ; Jordan, F. *Bioorg. Chem.* (2006), *34*, 362-379.
[14] Hoechst Schering AgrEvo Gmbh, DE patent, No 19752700 (A1) (1997)
[15] Lowe, P.N. ; Perham, R.N. *Biochemistry* (1984), *23*, 91-97.
[16] Baburina, I. ; Dikdan, G. ; Guo, F. ; Tous, G.I. ; Root, B. ; Jordan, F. *Biochemistry* (1998), *37*, 1245-1255.
[17] Kuo, D.J. ; Jordan, F. *Biochemistry* (1983), *22*, 3735-3740.
[18] Brown, A. ; Nemeria, N. Yi, J. ; Zhang, D. ; Jordan, W.B. ; Machado, R.S. ; Guest, J.R. ; Jordan, F. *Biochemistry* (1997), *36*, 8071-8081.
[19] Bradford, M.M. *Anal. Biochem.* (1976), *72*, 248-254.

Chapitre III

Caractérisation des étapes de réduction de la biosynthèse des hopanoïdes chez *Zymomonas mobilis*

I) Introduction

L'incorporation de divers isotopomères du glucose marqué au ^{13}C dans les isoprénoïdes de *Zymomonas mobilis*, *Methylobacterium fujisawaense* et *Escherichia coli* a permis de déterminer l'origine des atomes de carbone du diphosphate d'isopentényle et du diphosphate de diméthylallyle synthétisés par la voie du MEP.[1,2,3] Par la suite, des incorporations d'isotopomères marqués au deutérium dans les chaînes prényle de l'ubiquinone et de la ménaquinone d' *E.coli* ont montré que les atomes d'hydrogène en C-1, C-4 et C-5 du MEP se retrouvent intégralement dans l'IPP et le DMAPP. Deux problèmes sont restés en suspens : le devenir de l'hydrogène en C-3 du MEP et l'origine de l'hydrogène supplémentaire introduit en C-2 de l'IPP ou C-4 du DMAPP, lors d'une étape de réduction. La biosynthèse de l'IPP et du DMAPP à partir du DXP nécessite deux étapes de réduction introduisant chacune un atome d'hydrogène. Ce sont les réactions catalysées par la désoxyxylulose phosphate isoméro-réductase (DXR), dont on sait qu'elle implique une réduction d'un intermédiaire aldéhyde par le NADPH et l'hydroxyméthylbutényl diphosphate réductase (LytB), dont le mécanisme est encore obscur (Figure 1).

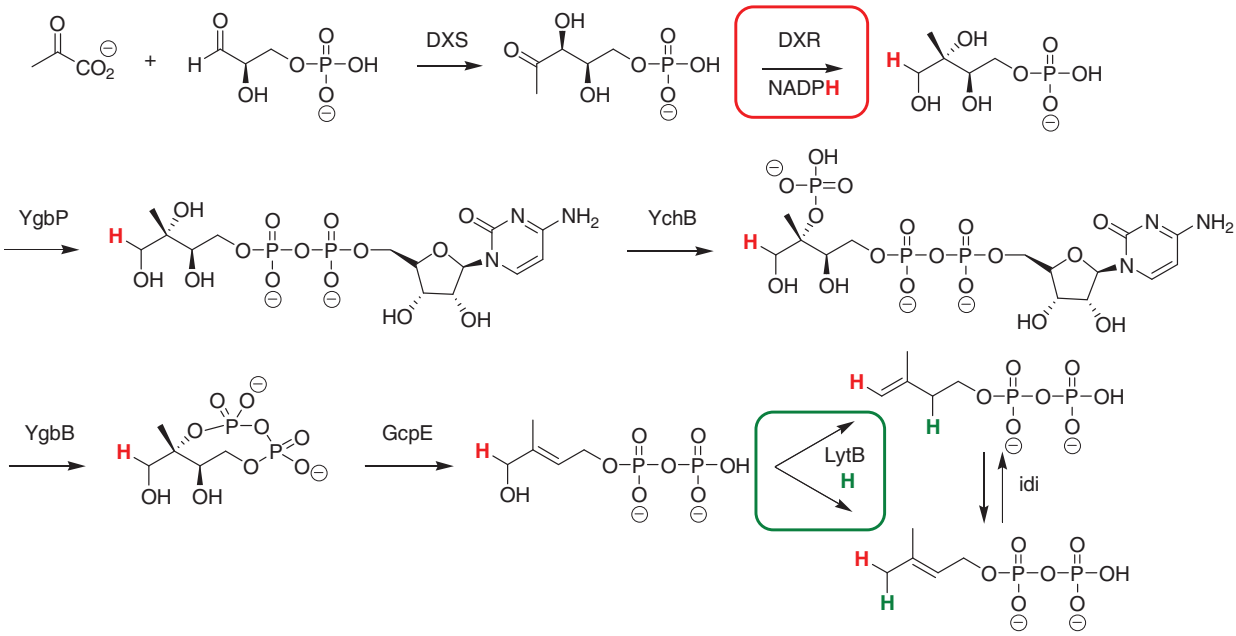


Figure 1 : Voie du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate.

La réduction catalysée par la DXR utilise le NADPH comme cofacteur de réduction. L'hydrure pro-*S* en C-4 du NADPH est introduit sur la face *Re* de l'aldéhyde intermédiaire, le 2-*C*-méthyl-D-érythrose 4-phosphate, obtenu après l'isomérisation du désoxyxylulose 5-phosphate (Figure 2).[4]

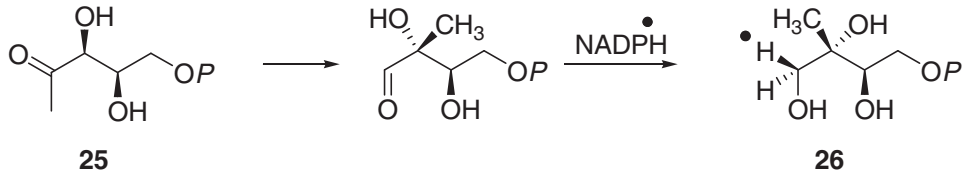


Figure 2 : Réduction catalysée par la DXR.

Dans la réduction catalysée par LytB, les électrons proviennent de la forme réduite d'un cluster Fe_4S_4, et l'hydrogène est introduit dans le cas de la formation de l'IPP chez *E. coli*, par protonation d'un anion allylique.[5] Cela a été montré en effectuant un test enzymatique de LytB d'*E. coli* dans l'eau lourde. Cette expérience a montré qu'un proton est introduit en position C-2 de l'IPP **11** (Figure 3). De plus, il a été montré que la protonation de cet anion allylique, se fait sur la face *Si*.[4] Aucun résultat n'a été obtenu pour la formation du DMAPP qui devrait provenir d'une protonation en C-4 de l'anion allylique intermédiaire (Figure 3). La réaction catalysée par LytB conduit à la formation de deux produits distincts, l'IPP **11** et le DMAPP **10**, à partir d'un précurseur unique l'HMBPP **30**. Elle constitue par conséquent une ramification de la voie du MEP qui se divise en deux branches qui seront nommées dans la suite de l'exposé « branche IPP » ou « branche DMAPP », selon la nature du produit de réaction formé.

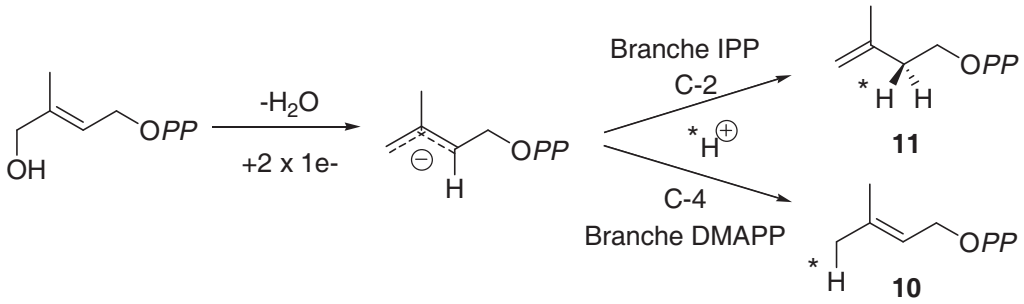


Figure 3 : Mécanisme simplifié hypothétique pour la formation de l'IPP **11** et du DMAPP **10** par LytB.

Les isoprénoïdes de *Zymomonas mobilis* sont des triterpénoïdes pentacycliques de série hopane ayant un squelette soit en C_{30} (diploptène, diploptérol), soit en C_{35}

(bactériohopanetétrol **63**, glycoside de bactériohopanetétrol **64** et éther de bactériohopanetétrol **65**).[6,7] Les hopanoïdes majeurs chez *Zymomonas mobilis* sont, comme chez toutes les bactéries productrices de hopanoïdes, ceux ayant un squelette en C_{35} (Figure 4).

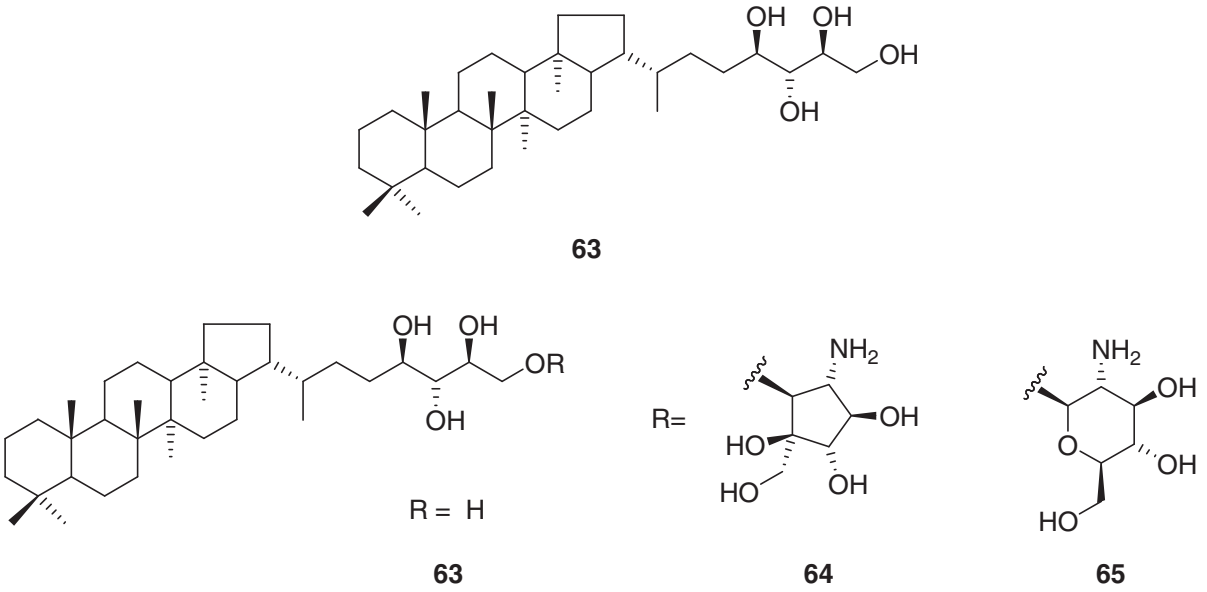


Figure 4 : Les principaux hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* :
63 bactériohopanetétrol ; **64** éther de bactériohopanetétrol ; **65** glycoside de bactériohopanetétrol.

Leur biosynthèse démarre par la condensation d'une unité de diphosphate d'isopentényle **11** (IPP) sur le diphosphate de diméthylallyle **10** (DMAPP) pour donner le diphosphate de géranyle **56**. Une condensation supplémentaire d'IPP sur le diphosphate de géranyle mène au diphosphate de farnésyle **57**, composé en C_{15} (Figure 5). Ces réactions sont respectivement catalysées par la géranyl diphosphate synthase et la farnésyl diphosphate synthase.[8]

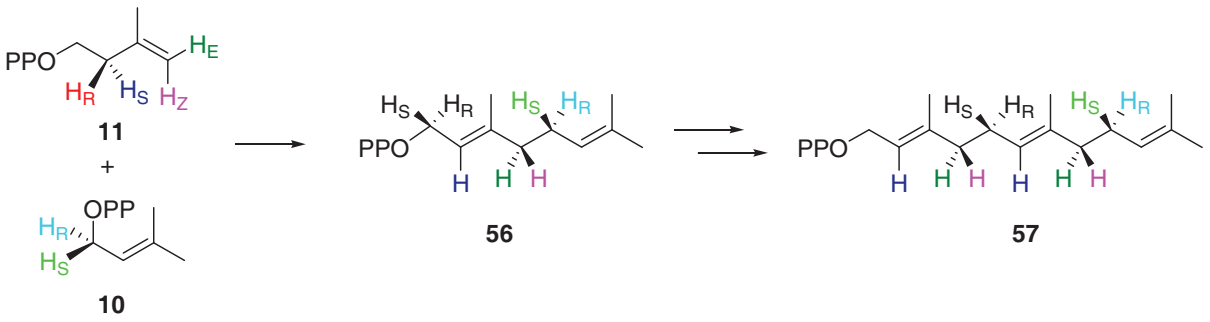


Figure 5 : Biosynthèse du diphosphate de farnésyle **57** à partir de l'IPP **11** et du DMAPP **10.**[8,10]

Le mécanisme de cette élongation de chaîne est de type ionisation-condensation-élimination avec des caractéristiques bien identifiées sur le plan de la stéréochimie (Figure 6).[8,9] Le DMAPP **10** libère son diphosphate pour donner un carbocation intermédiaire. La formation d'une liaison entre C-1 du substrat allylique et C-4 de l'IPP se fait avec inversion de configuration en C-1. C-1 du substrat allylique s'additionne sur la face *Si* de la double liaison de l'IPP. La nouvelle double liaison de configuration *E* entre C-2 et C-3 de l'IPP se forme par élimination de l'hydrogène pro-*R* en C-2 de l'IPP. Le mécanisme pour atteindre le diphosphate de farnésyle **57** à partir du diphosphate de géranyle **56** et de l'IPP **11** est similaire à celui impliqué dans la formation du diphosphate de géranyle.

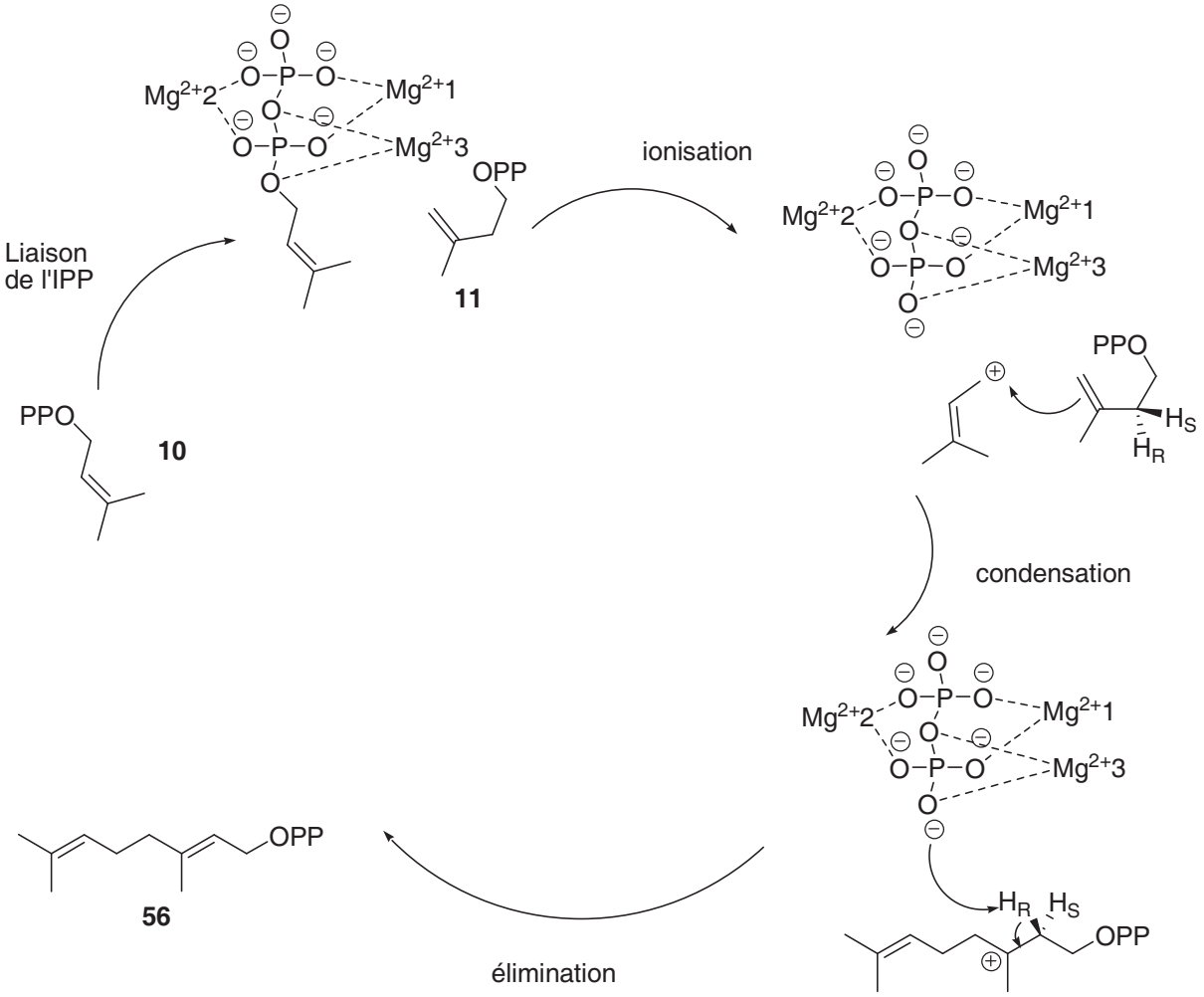


Figure 6 : Mécanisme de formation du diphosphate de géranyle **56.** [3]

La condensation tête à tête de deux molécules de diphosphate de farnésyle permet d'obtenir le squalène. La première étape correspond à la formation de la liaison entre le C-1'

d'un des substrats allyliques et les carbone C-2 et C-3 de la double liaison de l'autre substrat. Cela va conduire à un diphosphate de cyclopropylcarbinyle : le présqualène diphosphate **58**, qui subit un réarrangement, suivi d'une réduction à l'aide du NADPH pour donner le squalène **59** (Figure 7).[10,11] Comme le squalène **59** possède un axe de symétrie C_2 les deux double liaisons terminales du squalène sont équivalentes lors de la cyclisation, de même que les atomes de carbone C-12 et C-13 qui peuvent se retrouver avec la même probabilité soit en C-11, soit en C-12 du squelette hopane. L'hydrogène du NADPH introduit par la squalène synthase peut par conséquent se retrouver avec la même probabilité soit en C-11β, soit en C-12α sur le squelette hopane.

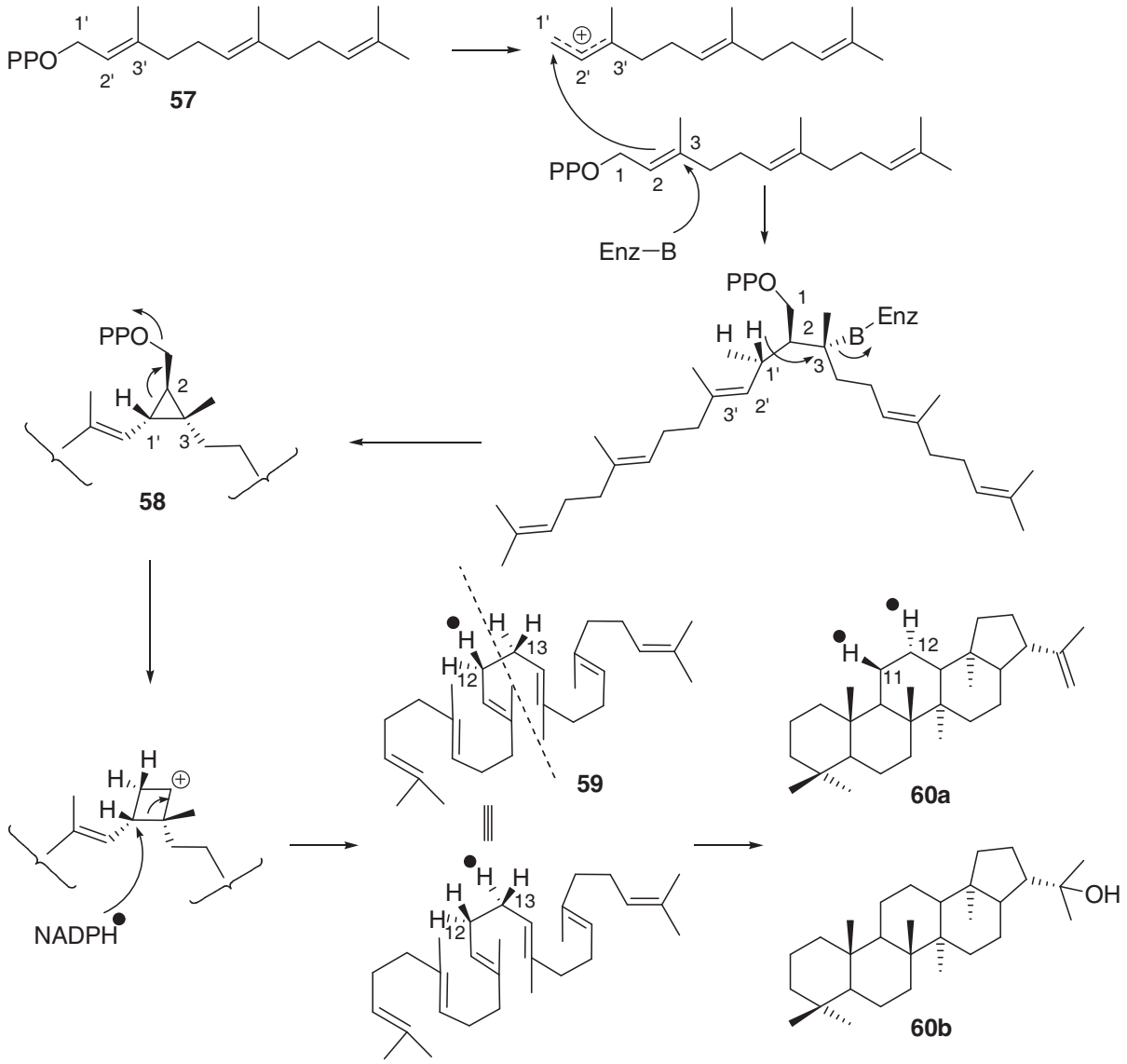


Figure 7 : Mécanisme de réaction catalysée par la squalène synthase à partir du diphosphate de farnésyle **57.**

Le squalène est cyclisé par la squalène cyclase pour aboutir au diploptène **60a** et au diploptérol **60b**, squelette hopane en C_{30}.[12] La réaction de couplage entre un précurseur à squelette triterpénique en C_{30}, comme par exemple le diploptène **60** et le carbone C-5 d'un dérivé du D-ribose est inconnue (Figure 8). Outre la formation d'une nouvelle liaison carbone/carbone, le passage du précurseur triterpénique en C_{30} (squalène et diploptène sont au même degré d'oxydation) en squelette en C_{35} du bactériohopanetétrol **62**, s'accompagne d'une étape de réduction matérialisée par l'introduction d'un hydrogène en C-22 dont l'origine est à déterminer (Figure 8).

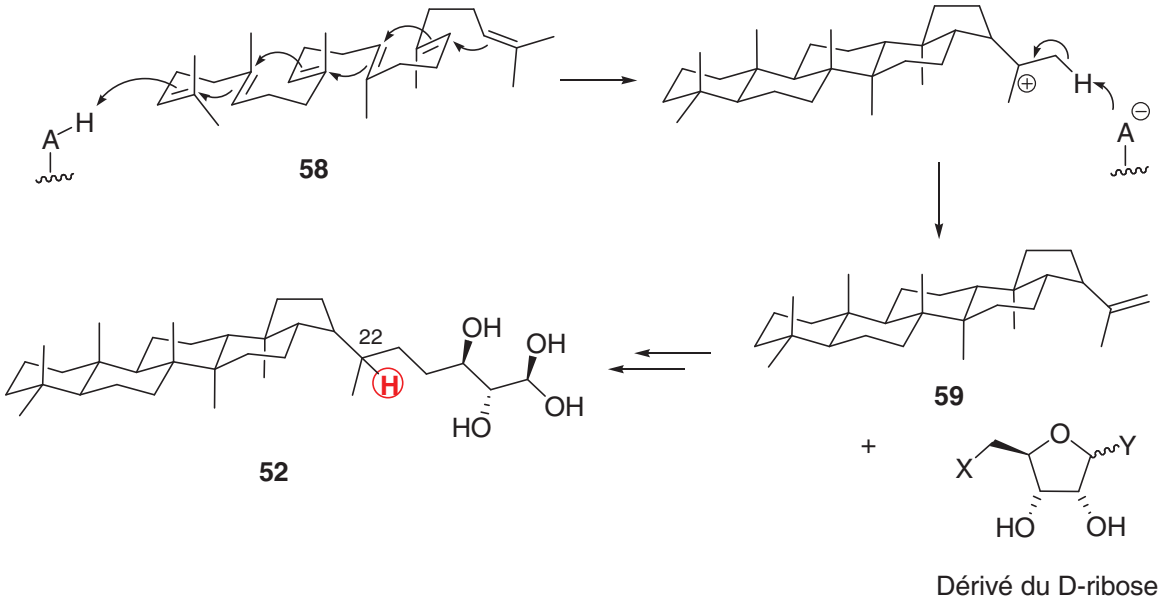


Figure 8 : Cyclisation du squalène et et schéma biogénétique pour la biosynthèse du bactériohopanetétrol **63.**

L'origine de la chaîne latérale des dérivés du bactériohopanetétrol a été déterminée en cultivant *Methylobacterium organophilum, Rhodopseudomonas palustris* et *Rhodopseudomonas acidophila* en présence d'acétate enrichi en ^{13}C et *Zymomonas mobilis* avec du glucose enrichi en ^{13}C.[13,14] Ces incubations ont montré que cette unité C_5 est un dérivé du D-ribose provenant de la voie non oxydative des phosphates de pentoses (Figure 9) et lié par le carbone C-5 du pentose au squelette triterpénique.

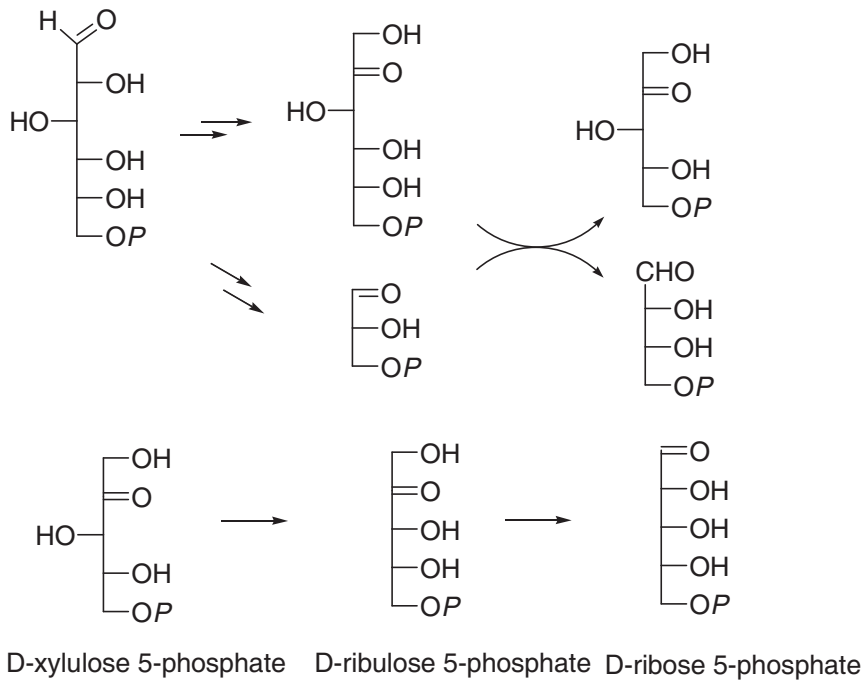


Figure 9 : Voie non oxydative des phosphates de pentose.

Afin de rendre possible le suivi des hydrogènes introduits lors des étapes de réduction de la voie du MEP et lors de la formation du squelette bactériohopane en C_{35}, il paraissait intéressant d'utiliser un marquage au deutérium. Pour mettre en évidence la signature de ces étapes de réduction, *Zymomonas mobilis* a été utilisé, car son métabolisme permet la formation *in vivo* de NADPH deutérié en incubant du [1-^{2}H]glucose. En effet, *Zymomonas mobilis* transforme l'essentiel du glucose du milieu de culture en éthanol par fermentation anaérobie. Cette bactérie métabolise le glucose *via* la voie d'Entner-Doudoroff (Figure 10), le métabolisme des phosphates de trioses et la biosynthèse de l'éthanol (figure 11),[15] dont les étapes impliquant des déshydrogénases permettent la formation *in vivo* d'un mélange équimolaire de (4*S*)-[4-^{2}H]NADP^{2}H et de (4*R*)-[4-^{2}H]NADP^{2}H (Figure 12).[16] Quelle que soit la diastéréosélectivité au niveau du NADPH, il pourra y avoir transfert de ^{2}H, le bon isotopomère deutérié étant toujours présent.

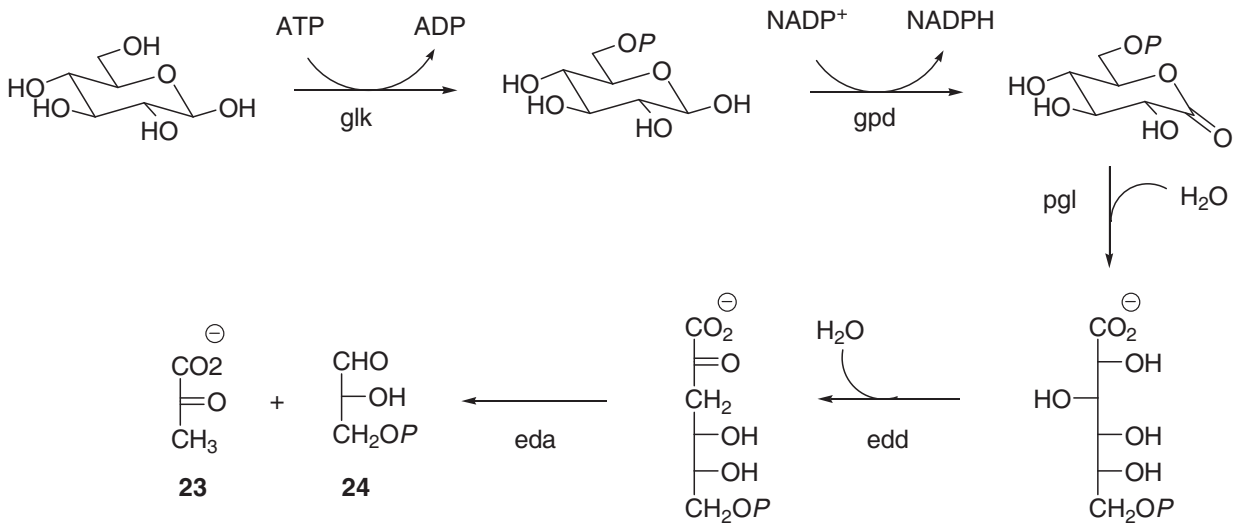


Figure 10 : Voie d'Entner-Doudoroff

glk : glucokinase ; gpd : glucose 6-phosphate déshydrogénase ; pgl : phosphogluconolactonase ; pgd : phosphogluconate déshydratase ; kdga : 2-oxo-3-désoxygluconate aldolase.

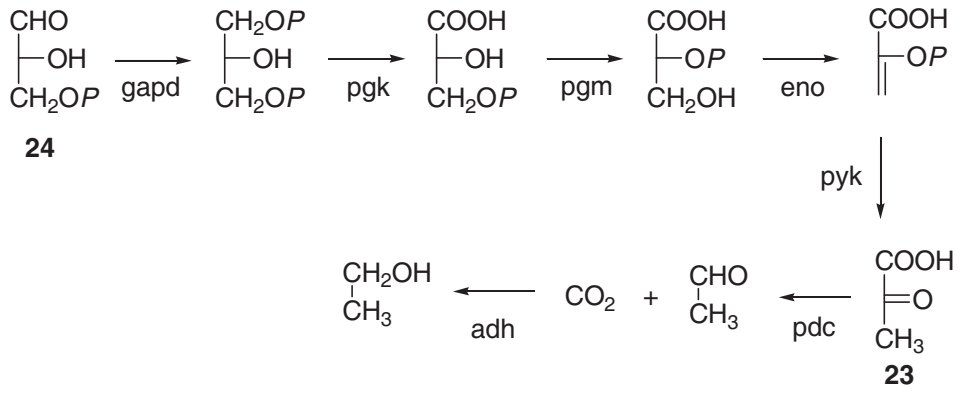


Figure 11 : Métabolisme des phosphates de trioses et biosynthèse de l'éthanol

gapd : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ; pgk : phosphoglycérate kinase ; pgm : phosphoglycéromutase ; eno : énolase ; pyk : pyruvate kinase ; pdc : pyruvate décarboxylase ; adh : alcool déshydrogénase.

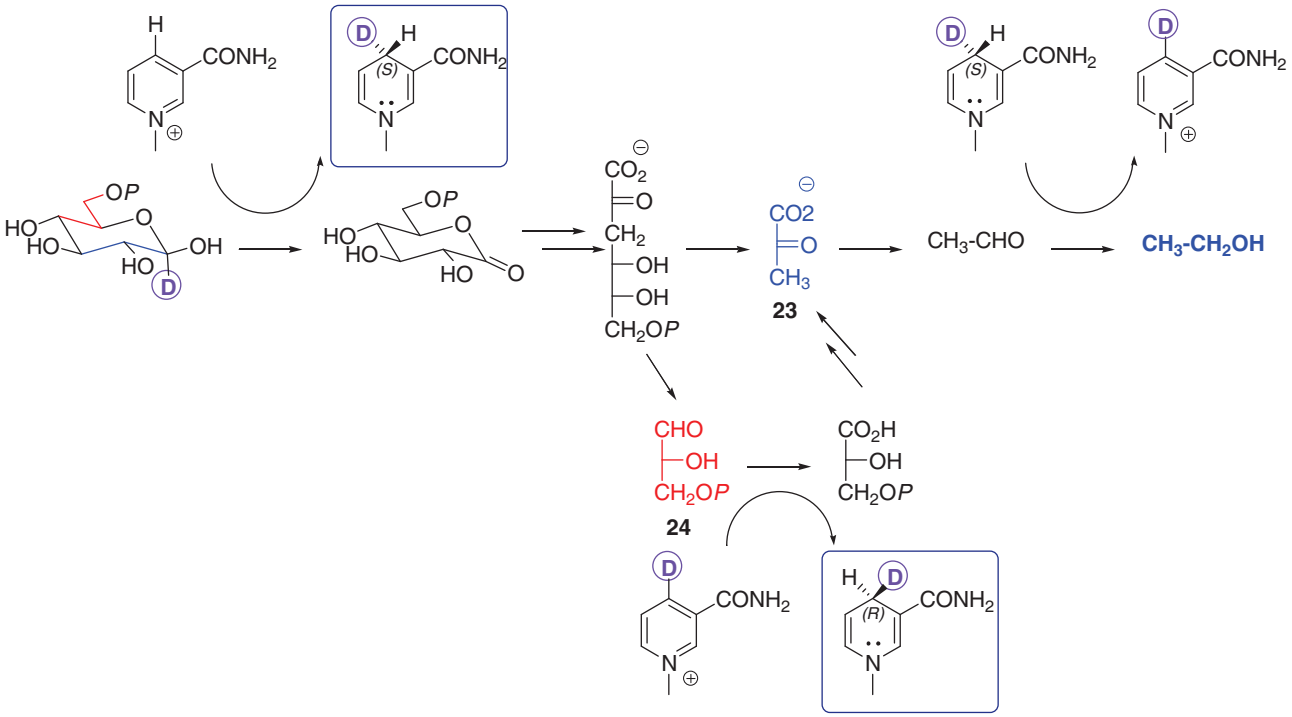


Figure 12 : Conversion du [1-^{2}H]glucose en éthanol par *Zymomonas mobilis* :
Incorporation du ^{2}H dans les pools de cofacteurs NAD(P)H/NAD(P)$^+$.[16]

Ce métabolisme va permettre le transfert du marquage au deutérium, de la position C-1 du glucose sur le cofacteur oxydé NAD(P)$^+$ pour donner le cofacteur réduit marqué au deutérium NAD(P)^{2}H. Les diastéréosélectivités des trois réactions d'oxydo-réduction impliquées sont toutes connues (Figure 12).[16] L'oxydation du glucose phosphate en gluconolactone 6-phosphate s'accompagne d'une réduction du cofacteur et donc d'un transfert d'hydrure marqué au deutérium pour donner le (4*S*)-[4-^{2}H]NADPH. En parallèle, la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol s'accompagne de l'oxydation du (4*S*)-[4-^{2}H]NADPH donnant du [4-^{2}H]NADP$^+$ deutérié. Ce dernier peut être utilisé pour l'oxydation du glycéraldéhyde 3-phosphate en phosphoglycérate pour donner du (4*R*)-[4-^{2}H]NADPH. Un mélange équimolaire de 4(*S*)- et 4(*R*)-[4-^{2}H]NADP²H *in vivo* est finalement synthétisé.

De plus, ce même glucose conduit par la voie d'Entner-Doudoroff à la formation du pyruvate **23** et du glycéraldéhyde 3-phosphate **24**, qui sont les deux premiers précurseurs de la voie du MEP (Figure 12).

Si le glucose est la seule source de carbone dans le milieu de culture, tous les atomes de carbone du glucose se retrouveront dans le pyruvate et le glycéraldéhyde 3-phosphate. Pour cela, nous avons cultivé *Zymomonas mobilis* dans un milieu où le glucose est l'unique source

de carbone et d'énergie. L'analyse de la position du deutérium se fera par RMN du ^{13}C en analysant les déplacements vers les champs forts des signaux du ^{13}C (shift du signal) induit par le deutérium.

Un travail préliminaire a déjà été réalisé au laboratoire.[17] *Zymomonas mobilis* a été cultivée en présence de [1-^{2}H]glucose comme seule source de carbone et les hopanoïdes ont été analysés par RMN du ^{13}C pour mettre en évidence la présence d'éventuels atomes de deutérium. Cette première incubation a permis de mettre en évidence des signatures au deutérium provenant de la réduction effectuée par la DXR attendue, ainsi que de quelques sites correspondant à la protonation effectuée par LytB sur les unités dérivées de l'IPP. Cette dernière observation est surprenante, car elle implique la conversion d'un deutérium issu du [1-^{2}H]glucose et provenant vraisemblablement du NAD(P)^{2}H, et donc transféré habituellement sous forme de deutériure $^{2}H^{-}$, ou d'un radical deutérium $^{2}H^{\bullet}$. Aucun indice n'a cependant pu être obtenu sur la protonation effectuée par LytB pour conduire au DMAPP ou sur l'origine de l'hydrogène en C-22 introduit lors de la formation du squelette bactériohopane. Un mécanisme hypothétique a été proposé pour la conversion de l'hydrogène transféré du NADPH en proton. Il fait intervenir la système NADPH/flavodoxine/flavodoxine réductase, qui est couplé à la réduction des clusters [4Fe-4S]. Ce mécanisme suggère que la flavodoxine soit non seulement un donneur de deux électrons, mais serve aussi à la protonation de l'anion allylique intermédiaire dans la réaction catalysée par LytB (Figure 13).[18,19]

Comme l'abondance en ^{13}C lors de cette expérience était l'abondance naturelle, la sensibilité n'était pas toujours suffisante, et de nombreux signaux n'étaient pas ou peu visibles.

Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, nous avons réalisé une nouvelle série d'incubations en utilisant du [1-^{2}H]glucose (abondance isotopique 98%) à hauteur de 10 à 20% avec du glucose enrichi en C-2, C-3, C-4, C-5 et C-6 (abondance isotopique 99%). De cette façon nous espérons obtenir des informations sur la protonation en C-4 de l'unité isoprénique.

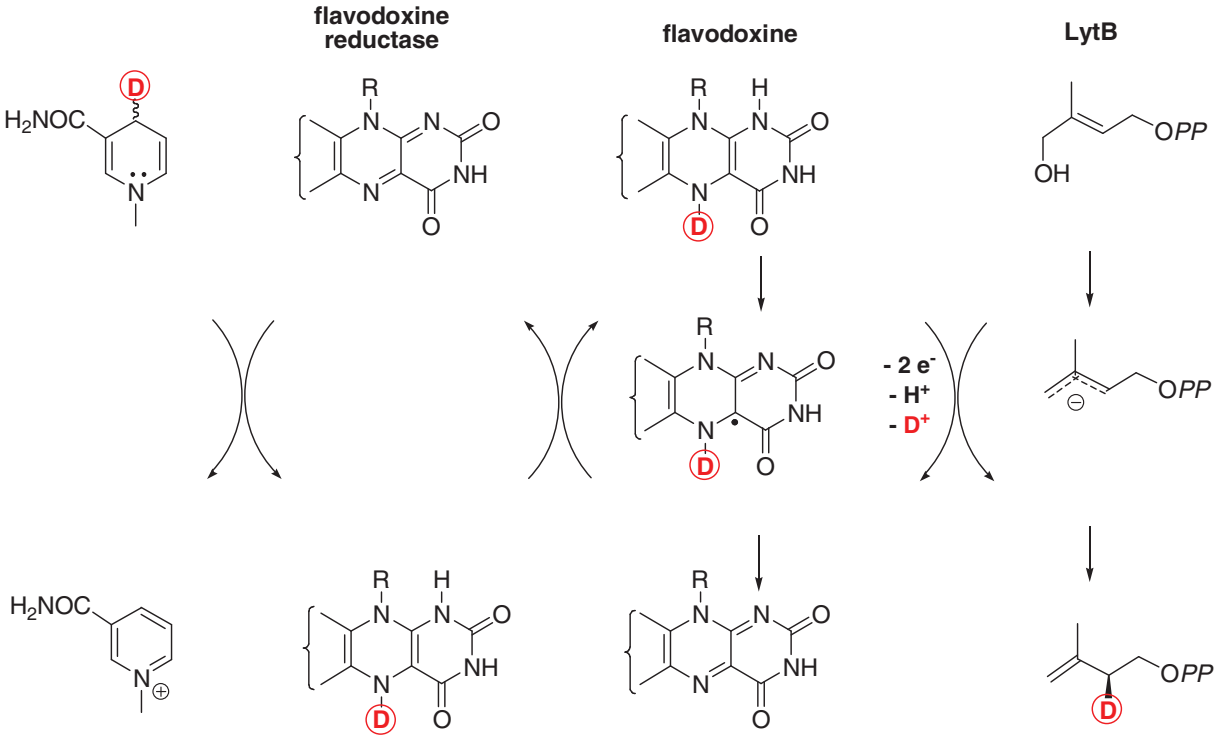


Figure 13 : Mécanisme hypothétique pour le transfert du deutérium du NAD(P)^{2}H sur l'IPP.[20]

II) Incorporation de [1-^{2}H]glucose dans les hopanoïdes de *Zymomonas mobilis*

1) Marquage au deutérium attendu : hypothèses

Les condensations successives de l'IPP et du DMAPP marqués avec du deutérium vont conduire aux hopanoïdes dérivés du bactériohopanetétrol. Seule l'étude du squelette hopane nous intéresse. Les deux hopanoïdes principaux **64** et **65** de *Zymomonas mobilis* ont donc été extraits, purifiés et leurs chaînes latérales coupées afin d'obtenir d'une manière presque quantitative l'alcool en C_{32} qui a ensuite été acétylé **66** (Figure 14).

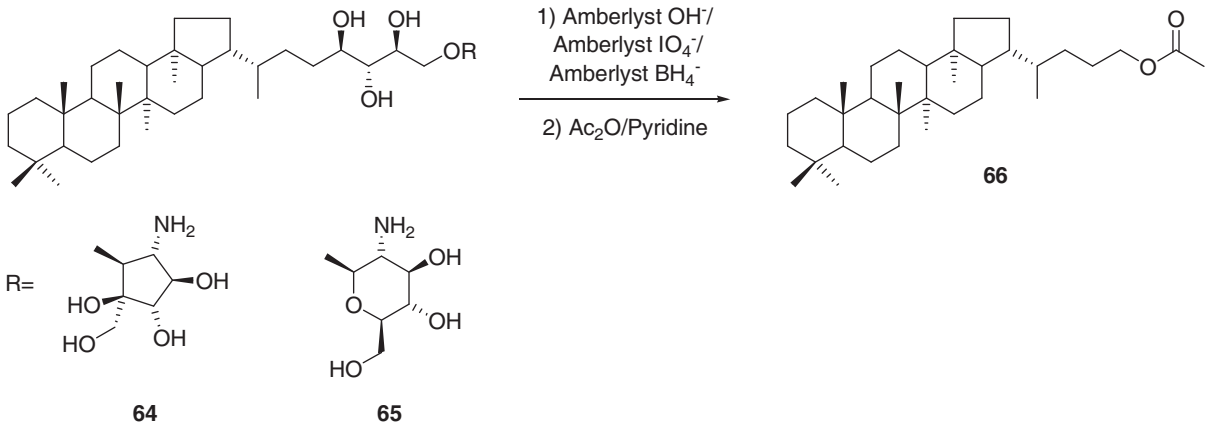


Figure 14 : La coupure de la chaîne latérale est une réaction one-pot qui utilise trois résines Amberlyst activées avec OH^-, IO_4^-, ou BH_4^-. Cette coupure est suivie d'une acétylation à l'aide d'un mélange anhydride acétique/pyridine.

L'incubation de *Zymomonas mobilis* avec du [1-^{2}H]glucose conduit à la synthèse *in vivo* d'un pool de NADP^{2}H deutérié, qui va introduire du deutérium lors des étapes de réduction lors de la biosynthèse des hopanoïdes. Un premier deutérium est introduit lors de la réduction catalysée par la DXR. Lors de cette réduction l'attaque de l'hydrure provenant du NADPH a lieu sur le carbone C-4 de l'aldéhyde intermédiaire (2-*C*-méthyl-D-érythrose 4-phosphate). Le proton *pro*-S en C-4 du NADPH est transféré, indiquant que cette enzyme fait partie de la famille des déshydrogénases de classe B.[4] Un second deutérium peut être introduit lors de la réduction catalysée par LytB. Ce deutérium provient de la protonation d'un anion allylique. Il peut être introduit en position C-2 conduisant à l'IPP. Si l'introduction du deutérium se fait en position C-4, on obtient du DMAPP avec deux deutériums en C-4 (Figure 15 a). Lors de l'isomérisation de l'IPP en DMAPP, c'est toujours l'hydrogène pro *R* en C-2 qui est éliminé. Il est possible que lors de l'isomérisation entre le DMAPP et l'IPP, il y ait une isomérisation de la double liaison de l'IPP (Figure 15 b) ou une perte du marquage au deutérium. Un troisième deutérium est introduit lors de la réaction catalysée par la squalène synthase (Figure 7). Le composé étant symétrique avant cyclisation, le deutérium se retrouve avec la même probabilité en position C-11 ou C-12 du squelette hopane.

Un dernier deutérium pourrait être introduit en C-22 du squelette hopane lors de la réduction accompagnant la formation du squelette en C_{35}.

Théoriquement, il est donc possible d'obtenir les marquages au deutérium pour la molécule **66** représentés sur la figure 16.

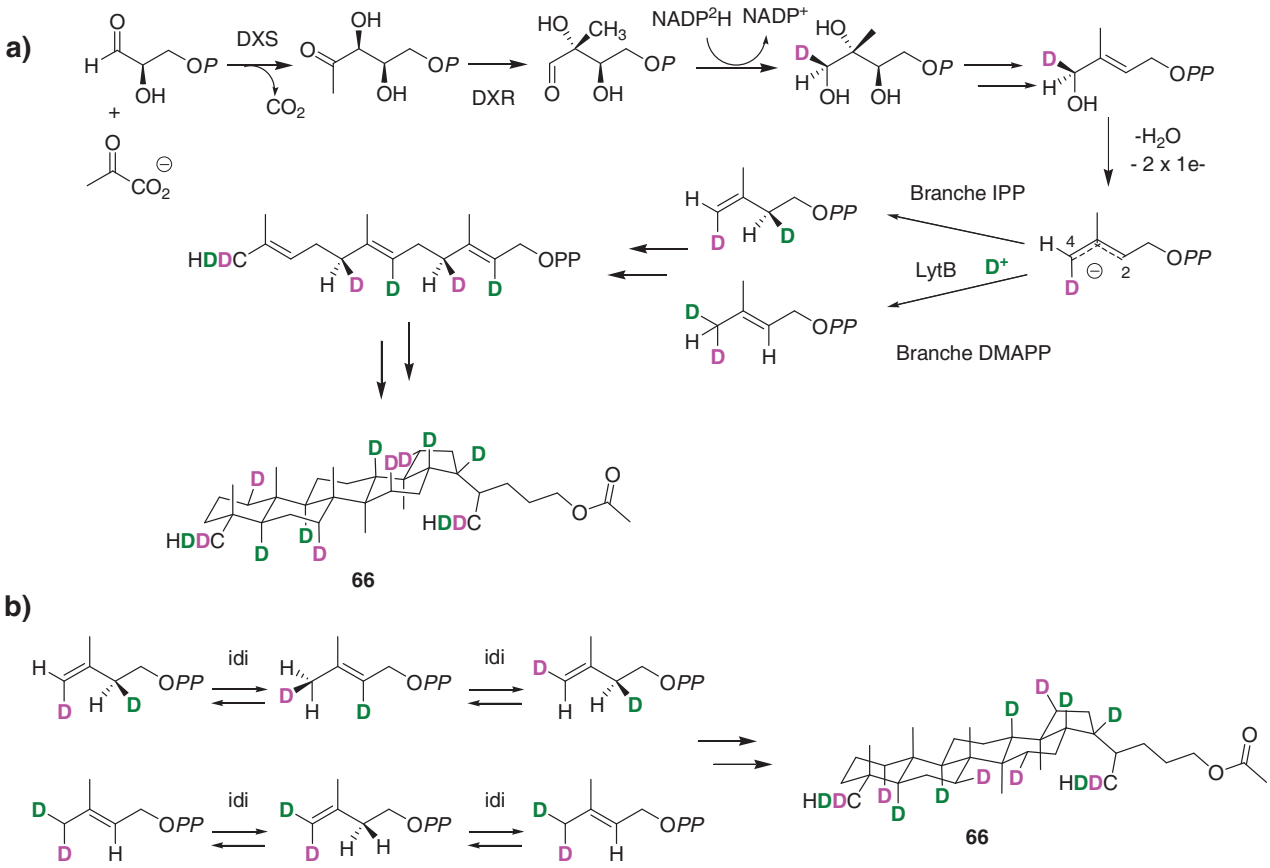


Figure 15 : Transfert du deutérium du NADP^{2}H au *bis*-homohopan 32-ol.

a) Transfert du deutérium du NADP^{2}H à l'IPP et au DMAPP et marquage au deutérium du bactériohopane.

b) Isomérisation de l'IPP et du DMAPP et conséquence sur le marquage du bactériohopane.

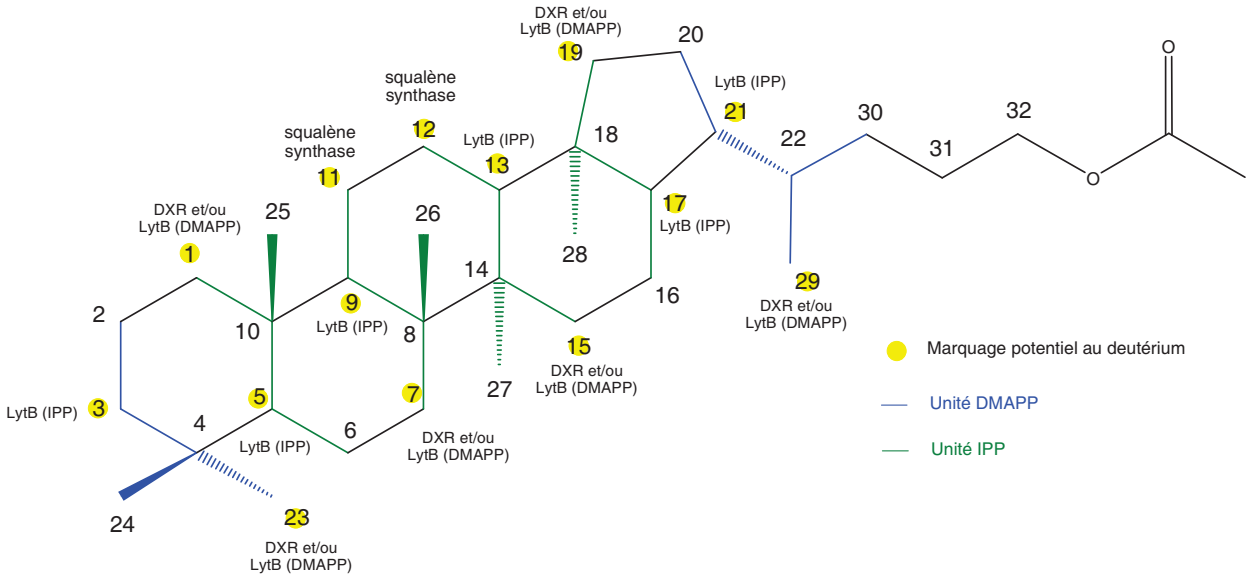


Figure 16 : Marquages au deutérium attendus après incubation de *Zymomonas mobilis* avec du [1-^{2}H]glucose.

L'échantillon obtenu après incorporation de [1-^{2}H]glucose est un mélange d'isotopomères. Chaque atome de carbone impliqué dans une réaction de réduction peut être porteur d'un hydrogène ou d'un deutérium. En effet, comme il y a un pool en quantité équimolaire de (4*R*)-[4-^{2}H]NADPH et de (4*S*)-[4-^{2}H]NADPH, chaque isotopomère du cofacteur réduit peut participer à la réduction en fournissant soit un hydrogène, soit un deutérium suivant la stéréochimie de la réaction vis-à-vis du cofacteur. Si l'effet isotopique primaire dû au deutérium est négligeable, l'abondance isotopique maximale en deutérium sur chaque carbone impliqué dans une réaction de réduction est de l'ordre de 45%, la source de carbone fournie étant habituellement composé d'un mélange de [1-^{2}H]glucose (90%) et de [^{13}C]glucose (10%). Un carbone n'ayant pas de deutérium directement lié ou aucun voisin proche portant un deutérium apparaitra comme un singulet correspondant au signal non shifté. Un carbone portant un deutérium sera caractérisé par un triplet shifté d'environ 300 ppb (α-shift). Pour un carbone positionné en β d'un ^{2}H, on observe un singulet shifté vers les champs forts (30 à100 ppb, β-shift). Pour un carbone en position γ du ^{2}H, on observe un singulet déplacé avec un shift d'une intensité plus faible que celle d'un β-shift (7 à 30 ppb, γ-shift).

Les spectres ^{13}C et les spectres en deux dimensions ont tous été réalisés avec un spectromètre Bruker 600 MHz. Seul l'enregistrement du spectre ^{13}C de l'échantillon obtenu après incorporation de [4-^{13}C]glucose a été réalisé sur un spectromètre Bruker 700 MHz. Pour tous les spectres, le TMS a été pris comme référence interne. Dans la suite de l'expérience, seuls les signaux des atomes de carbone enrichis en ^{13}C seront discutés en détails. L'interprétation des signaux des atomes de carbones en abondance naturelle en ^{13}C proposées dans les tableaux 1 à 5 sont en accord avec les observations obtenus sur les signaux des atomes correspondants enrichis en ^{13}C.

2) Incorporation du [4-^{13}C]glucose

Zymomonas mobilis a été cultivé dans un milieu contenant 90% de [1-^{2}H]glucose et 10% de [4-^{13}C]glucose. Le marquage au ^{13}C après passage par la voie d'Entner-Doudoroff et le métabolisme des phosphates de trioses (Figures 10 et 11) va se retrouver sur le C-1 du glycéraldéhyde 3-phosphate **24** avec la même abondance isotopique que celle du précurseur (10%) et sur le C-1 du pyruvate **23** avec une abondance isotopique de moitié de celle du précurseur (5%). Ce dernier marquage va ensuite disparaître lors de la décarboxylation du

pyruvate dans la première étape de la voie du MEP. Le marquage se retrouvera donc uniquement sur le C-4 de l'IPP **11** et du DMAPP **10** (Figure 21 a), ce qui correspond à un marquage au ^{13}C attendu du squelette hopane représenté sur la figure 21 b.

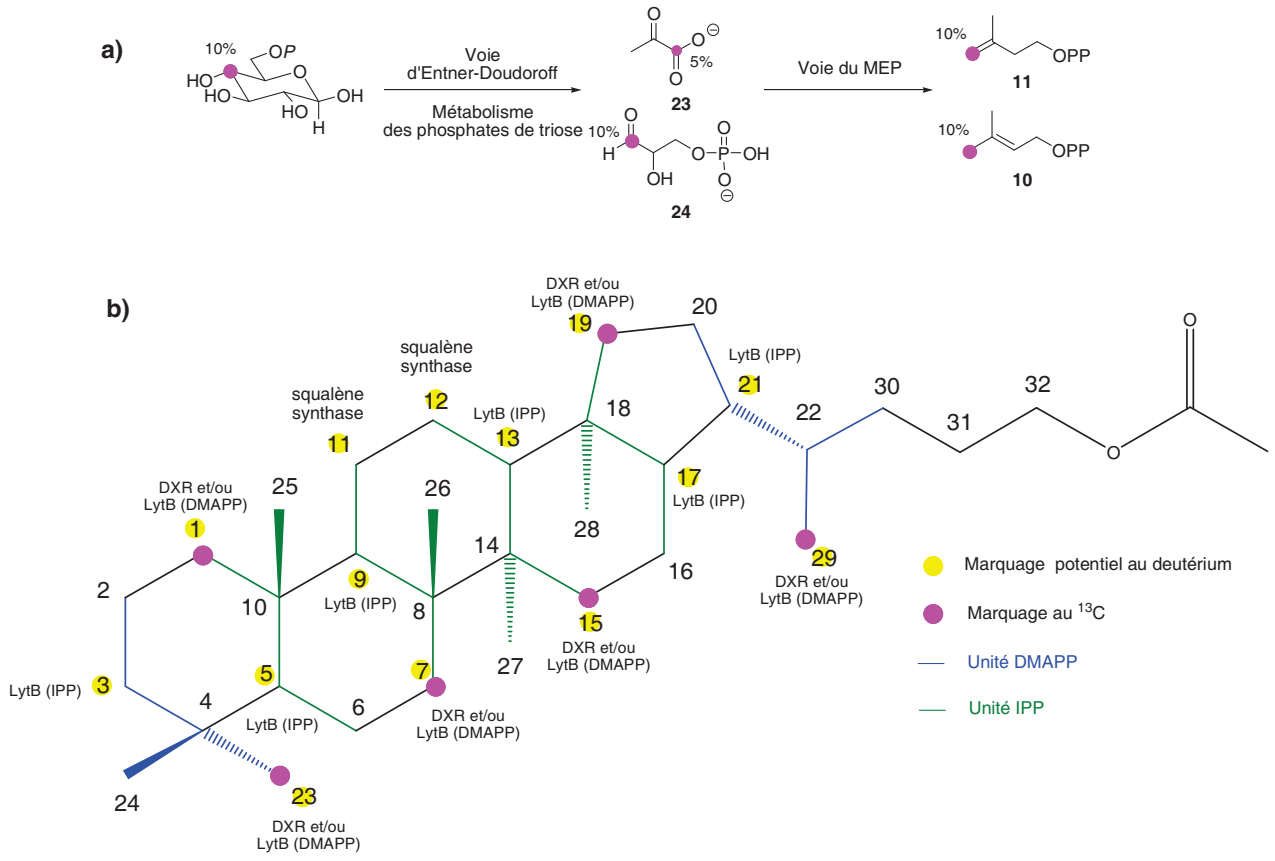


Figure 17 : a) Marquage de l'IPP **11** et du DMAPP **10** à partir de [4-^{13}C]glucose chez *Zymomonas mobilis.*
b) Marquage attendu après incubation de *Z. mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [4-^{13}C]glucose.

a) Analyse du spectre de RMN du ^{13}C

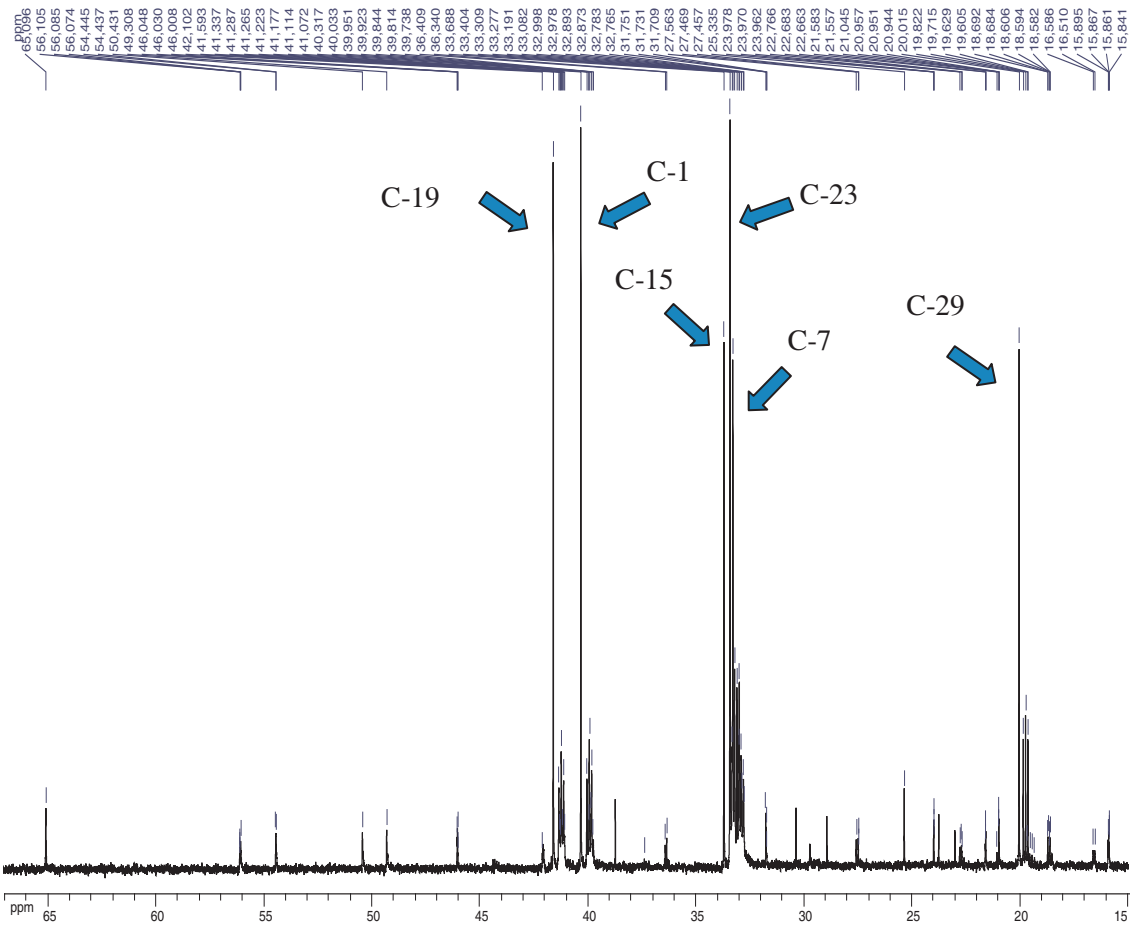


Figure 18 : Spectre de RMN du ^{13}C de l'acétate de *bis*-homohopanyle obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* avec du [1-^{2}H]glucose (90%) et du [4-^{13}C]glucose (10%).

➡ Signaux des carbones enrichis en ^{13}C.

Sur le spectre obtenu par RMN du ^{13}C, nous constatons que les signaux des carbones marqués au ^{13}C ressortent très nettement (Figure 18, Annexe 3).

Le carbone C-29 est caractérisé par un singulet (20,015 ppm) et un triplet (19,715 ppm, J = 19 Hz), correspondant à un α-shift (301 ppb) dû à la présence d'un deutérium directement lié à ce carbone.[19] Ce deutérium a été introduit par la DXR ou éventuellement par LytB (DMAPP). De plus, nous observons quatre petits signaux (19,629 ppm, 19,522 ppm, 19,415 ppm et 19,303 ppm) shifté de 493 ppb, qui pourrait correspondre à la trace d'un quintuplet. Ce dernier viendrait d'un double marquage au deutérium sur le C-29. Ces deux deutériums

seraient introduits l'un par la DXR et l'autre par LytB (DMAPP). La présence de ce signal est à confirmer (Figure 19). Un spectre HSQC a permis de mettre en évidence la présence de ce quintuplet (cf. p. 137).

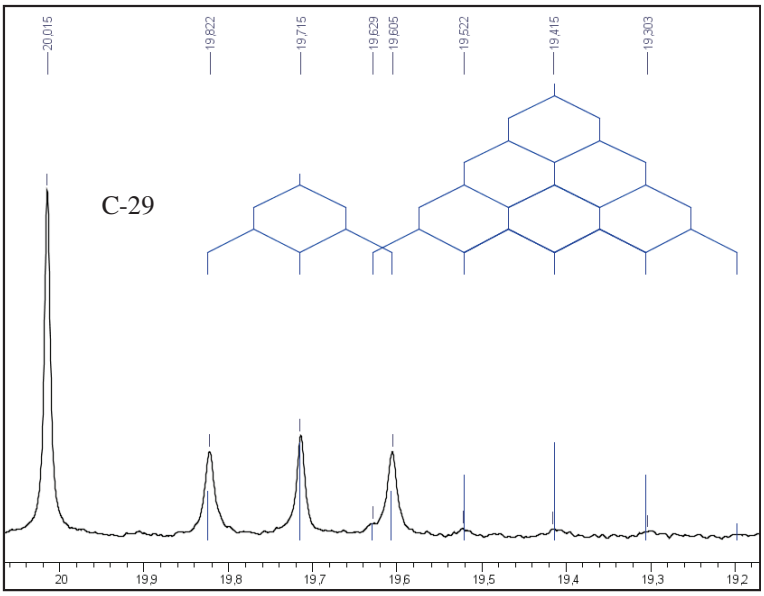


Figure 19 : Signaux observés pour C-29 sur le spectre de RMN du ^{13}C de l'acétate de *bis*-homohopanyle obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* avec du [1-^{2}H]glucose (90%) et du [4-^{13}C]glucose (10%).

Le carbone C-7 est caractérisé par deux signaux un singulet au déplacement chimique normal (33,277 ppm) et un triplet (32,893 ppm ; J= 19 Hz), correspondant à un signal shifté caractéristique d'un α-shift (384 ppb) dû à la présence d'un deutérium directement lié (Figure 20).

Le signal de C-23 montre aussi un singulet non shifté (33,404 ppm) et un triplet (33,082 ppm ; J= 19 Hz), correspondant à un α-shift (322 ppb) dû à la présence d'un deutérium sur ce carbone (Figure 20).

Pour C-15, on observe de même un singulet non shifté (33,688 ppm) et un triplet (33,309 ppm ; J= 19 Hz) correspondant à un α-shift (379 ppb) dû à la présence d'un deutérium sur ce carbone (Figure 20).

Le deutérium positionné en α de ces carbones a été introduit certainement par la DXR et éventuellement par LytB (DMAPP).

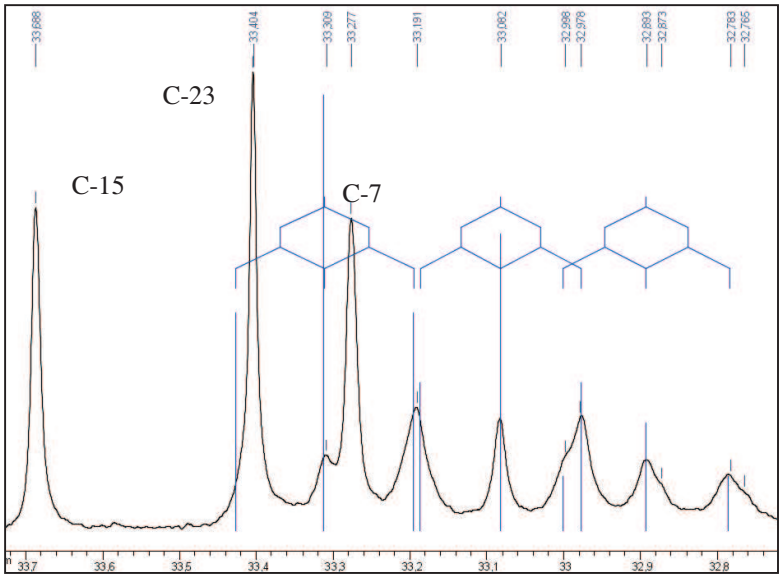


Figure 20 : Signaux observés pour C-7, C-23 et C-15 sur le spectre de RMN du ^{13}C de l'acétate de *bis*-homohopanyle obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* avec du [1-^{2}H]glucose (90%) et du [4-^{13}C]glucose (10%).

C-1 se présente sous forme de trois signaux : un singulet (40,317 ppm) correspondant au signal non shifté, un premier triplet (39,923 ppm ; J= 19 Hz) correspondant à un α-shift (394 ppb), et un second triplet visible (29,844 ppm, J = 19 Hz), correspondant à un autre α-shift (474 ppb) (Figure 21).

De même, C-19 est caractérisé par trois signaux : un singulet (41,593 ppm) pour le signal non shifté, un premier triplet (41,223 ppm ; J= 19 Hz) indiquant un α-shift (370 ppb), et un second triplet visible (41,177 ppm, J = 19 Hz), correspondant à un autre α-shift (Figure 21).

Ces observations indiquent la présence de deux isotopomères deutériés 1-H_α et 1-H_β. Le deutérium en α de ces atomes de carbone est introduit par la DXR ou peut être par LytB (DMAPP). De plus C-1 et C-19, C-7 et C-15, C-23 et C-29 sont biogénétiquement équivalents et la similitude de leurs signaux est tout à fait satisfaisante.

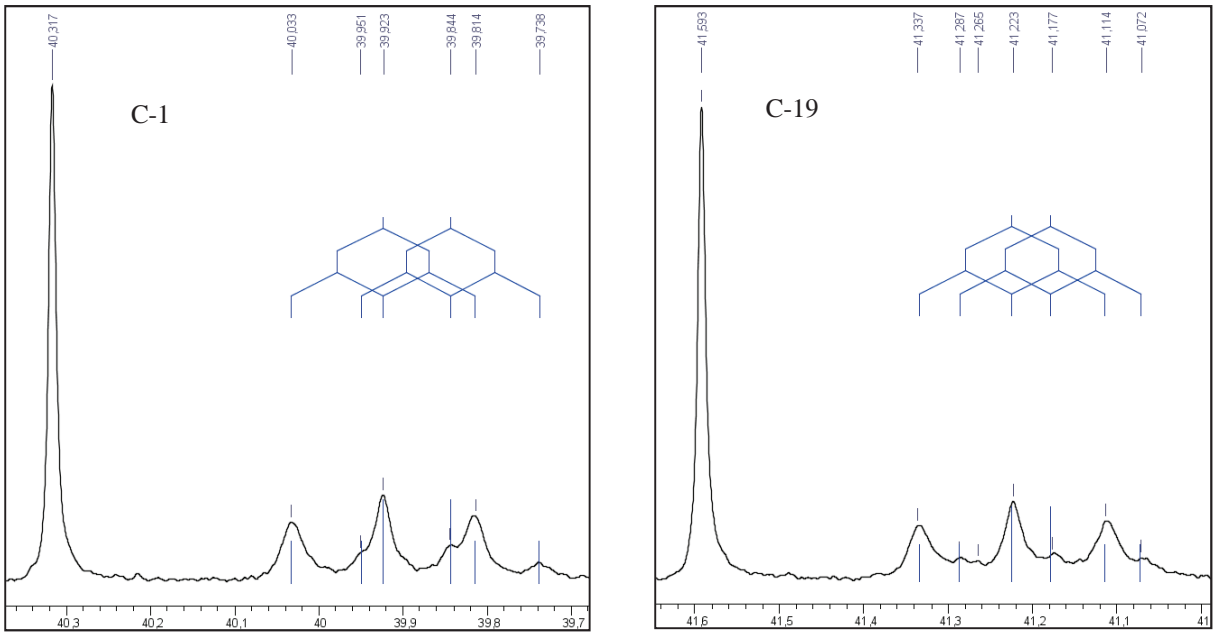


Figure 21 : Signaux obtenus pour C-1 (à gauche) et pour C-19 (à droite) sur le spectre de RMN du ^{13}C de l'acétate de *bis*-homohopanyle obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* avec du [1-^{2}H]glucose (90%) et du [4-^{13}C]glucose (10%).

Atome	Signal ^{13}C non shifté δ (ppm)	Signaux ^{13}C shiftés δ (ppm)	Δδ (ppb)	Shifts	Position deutérium induisant les shifts	Enzyme introduisant le deutérium
C-1	**40,317**	**39,923 J = 19 Hz**	**394**	**1 α**	**C-1**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		39,844 J = 19 Hz	**473**	**1 α**	**C-1**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
C-2	18,684	18,582	102	1 β	C-1 ou C-3	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-3	42,102					
C-4	non visible					
C-5	56,125	56,105		3 γ		
		56,085				
		56,074				
C-6	18,692	18,606	86	1 β	C-5 ou C-7	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		18,594	98	1 β	C-5 ou C-7	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-7	**33,277**	**32,893 J = 19 Hz**	**384**	**1 α**	**C-7**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
C-8	non visible					
C-9	50,431					
C-10	37,378					
C-11	20,957	20,951	6			
		20,944	13			
C-12	23,978	23,970	8			
		23,962	16			
C13	49,308					
C-14	non visible					

C-15	**33,688**	**33,309**	**379**	**1 α**	**C-15**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
C-16	22,766	22,683	86	1 β	C-15 ou C-17	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		22,663	103	1 β	C-15 ou C-17	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-17	54,445	57,437	8	2∗1 γ	C-19 ou C-13	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-18	non visible					
C-19	**41,593**	**41,223 J = 19 Hz**	**370**	**1 α**	**C-19**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		41,177 J = 19 Hz	**416**	**1 α**	**C-19**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
C-20	27,563	27,469	94	2∗1 β	C-19 ou C-21	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		27,457	106	2∗1 β	C-19 ou C-22	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-21	46,048	46,030	18	2∗1 γ	C-19 ou C-29	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		46,008	40	2 γ	C-19 et C-29	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-22	36,409	36,340	89	2∗1 β	C-21 ou C-29	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-23	**33,404**	**33,082**	**322**	**1 α**	**C-23**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
C-24	21,583	21,557	26	3∗1 γ	C-3 ou C-5 ou C-23	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-25	15,861	15,841	20	3∗1 γ	C-1 ou C-5 ou C-9	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-26	16,586					
C-27	16,510					
C-28	15,895	15,867	18	3∗ 1γ	C-13 ou C-17 ou C-19	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-29	**20,015**	**19,715 J= 19 Hz**	**300**	**1 α**	**C-29**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
C-30	31,751	31,731	20	2∗1 γ	C-29 ou C-21	DXR ou LytB DMAPP ou LytB IPP
		31,709	42	2 γ	2*C-29 ou C-29 et C-21	DXR et LytB (DMAPP) ou DXR et LytB (IPP)
C-31	25,335					
C-32	65,096					

Tableau 1 : Analyse du spectre ^{13}C obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [4-^{13}C]glucose.

b) Analyse du spectre HSQC

Une analyse HSQC a été menée afin de rechercher la présence simultanée de deux deutériums sur les atomes de carbone C-23 et C-29. Cela revient à détecter un isotopomère -CHD_2 qui se présenterait sous forme de quintuplet peu visible en RMN du ^{13}C et avec des

déplacements chimiques différents en RMN du ^{1}H et du ^{13}C que ceux des isotopomères $-CH_3$ et $-CH_2D$.

Sur le spectre HSQC, trois signaux sont observés en RMN du proton et en RMN du ^{13}C pour C-29 (Figure 22)

- Un singulet en RMN du ^{13}C (0,93 ppm ; 20,029 ppm) correspond au méthyle C-29 ne possédant pas de deutérium (isotopomère $-CH_3$).
- Un triplet en RMN du ^{13}C (0,90 ppm ; 19,729 ppm ; $J^{2}_{H/^{13}C}$ = 19 Hz) correspond au C-29 portant un deutérium (isotopomère $-CH_2D$).
- Un quintuplet en RMN du ^{13}C (0,89 ppm ; 19,423 ppm ; $J^{2}_{H/^{13}C}$ = 19 Hz) correspond au C-29 portant deux deutériums (isotopomère $-CHD_2$).

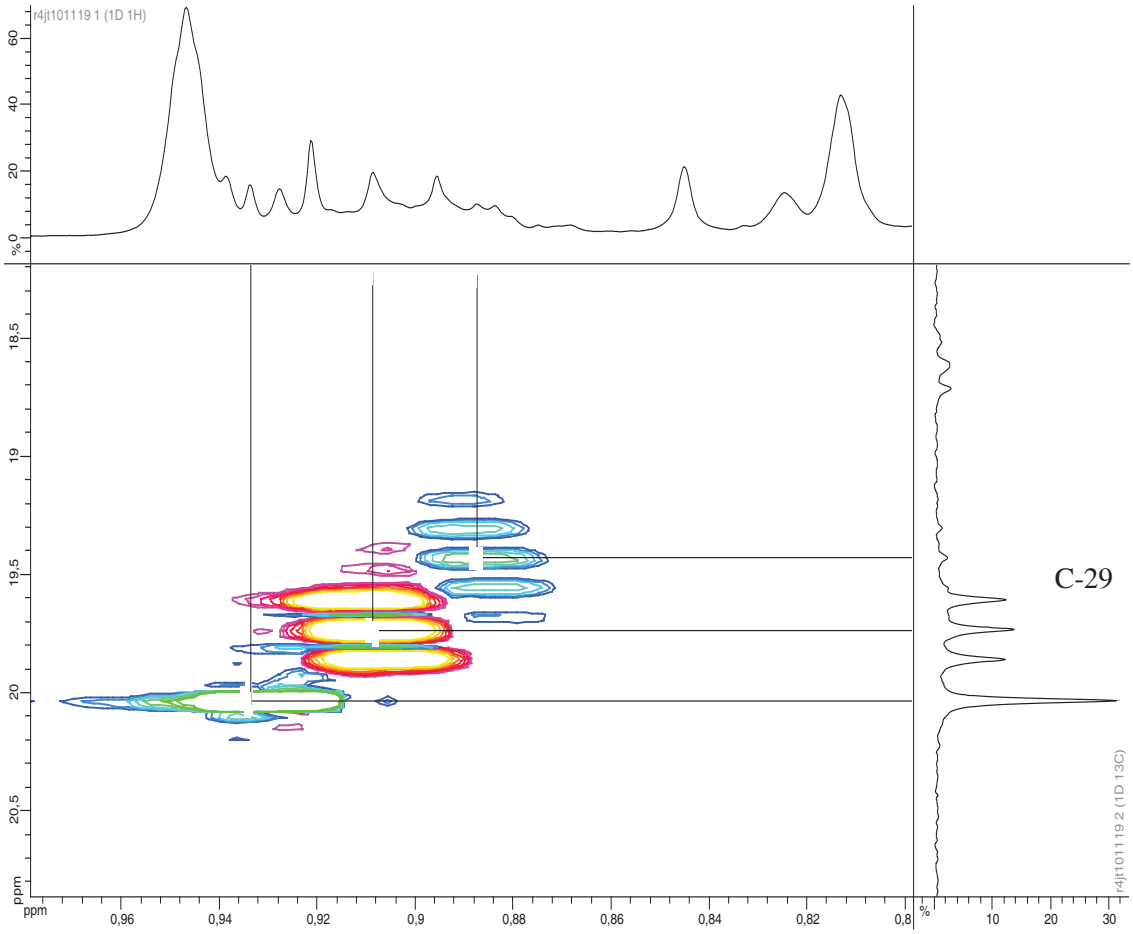


Figure 22 : Signaux de C-29 sur le spectre de RMN (HSQC) de l'acétate de *bis*-homohopanyle obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* avec du [1-^{2}H]glucose (90%) et du [1-^{13}C]glucose (10%).

Le squalène précurseur du squelette triterpénique du hopane étant symétrique, C-23 est l'équivalent biogénétique de C-29. Nous nous attendons à voir le même type de signal pour ces deux atomes de carbone. En effet, nous observons un singulet (0,84 ppm ; 33,417 ppm), un triplet (0,82 ppm ; 33,094 ppm ; $J^2_{H/}{}^{13}_{C}$ = 19 Hz) et un quintuplet (0,80 ppm ; 32,826 ppm ; $J^2_{H/}{}^{13}_{C}$ = 19 Hz) correspondant respectivement aux isotopomères $-CH_3$, $-CH_2D$ et $-CHD_2$ (Figure 23).

Il est aussi possible de voir la présence d'un deutérium directement lié aux atomes de carbone C-7 et C-15, biogénétiquement équivalents.

Les signaux observés pour C-7 correspondent à la présence de trois isotopomères (Figure 27).

- Un singulet en RMN du ^{13}C (33,315 ppm) caractérise l'isotopomère non deutérié $-CH_2-$ avec les deux hydrogènes non équivalents portés par C-7 (1,22 et 1,46 ppm).
- Un triplet en RMN du ^{13}C (32,930 ppm, $J^2_{H/}{}^{13}_{C}$ = 19 Hz) caractérise les deux isotopomères -CHD- qui ont le même déplacement chimique en RMN du ^{13}C. Les signaux des deux protons en C-7 se situent à 1,19 et 1,44 ppm. Le signal à 1,44 ppm, correspondant à l'isotopomère minoritaire, fait apparaitre une constante de couplage $^3J^1_{H/}{}^1_{H}$ = 14 Hz correspondant à un couplage de deux protons H-7α et H-6β du cycle B (Figure 27). Le deutérium en C-7 est donc en position équatoriale H-7β. Le signal à 1,19 ppm qui ne montre pas de $^3J^1_{H/}{}^1_{H}$ diaxial indique la présence en C-7 d'un proton équatorial correspondant à deux couplages $^3J^1_{H/}{}^1_{H}$ équatorial/axial (H-7β/H-6β)et équatorial/équatorial (H-7β/H-6α) faibles et non visibles. Le deutérium en C-7 est en position axiale dans l'isotope majoritaire.

De manière similaire, trois signaux sont observés pour C-15 (Figure 23).

- Un singulet en RMN du ^{13}C (33,725 ppm) caractérisent l'isotopomère non deutérié $-CH_2-$ ayant deux hydrogènes non équivalents en C-15 (1,24 et 1,34 ppm).
- Un triplet en RMN du ^{13}C (33,347 ppm, $J^2_{H/}{}^{13}_{C}$ = 19 Hz), correspond aux deux isotopomères -CHD- qui ont le même déplacement chimique en RMN du ^{13}C. Les deux signaux des protons en C-15 se trouvent à 1,21 et 1,32 ppm. Le signal à 1,32 ppm, correspond à l'isotopomère minoritaire, et fait apparaitre une constante de couplage $^3J^1_{H/}{}^1_{H}$ = 14 Hz correspondant à un couplage diaxial de deux protons H-15β/H-16α (Figure 23). Le signal à 1,21 ppm ne montrant pas de couplage $^3J^1_{H/}{}^1_{H}$ diaxial, indique la présence en C-15 d'un proton en position équatoriale, correspondant à deux couplage $^3J^1_{H/}{}^1_{H}$ équatorial/axial (H-15α/H-16α) et

équatorial/équatorial (H-15α/H-16β) faibles et non visibles. Le deutérium en C-15 se trouve en position équatoriale dans l'isotopomère majoritaire.

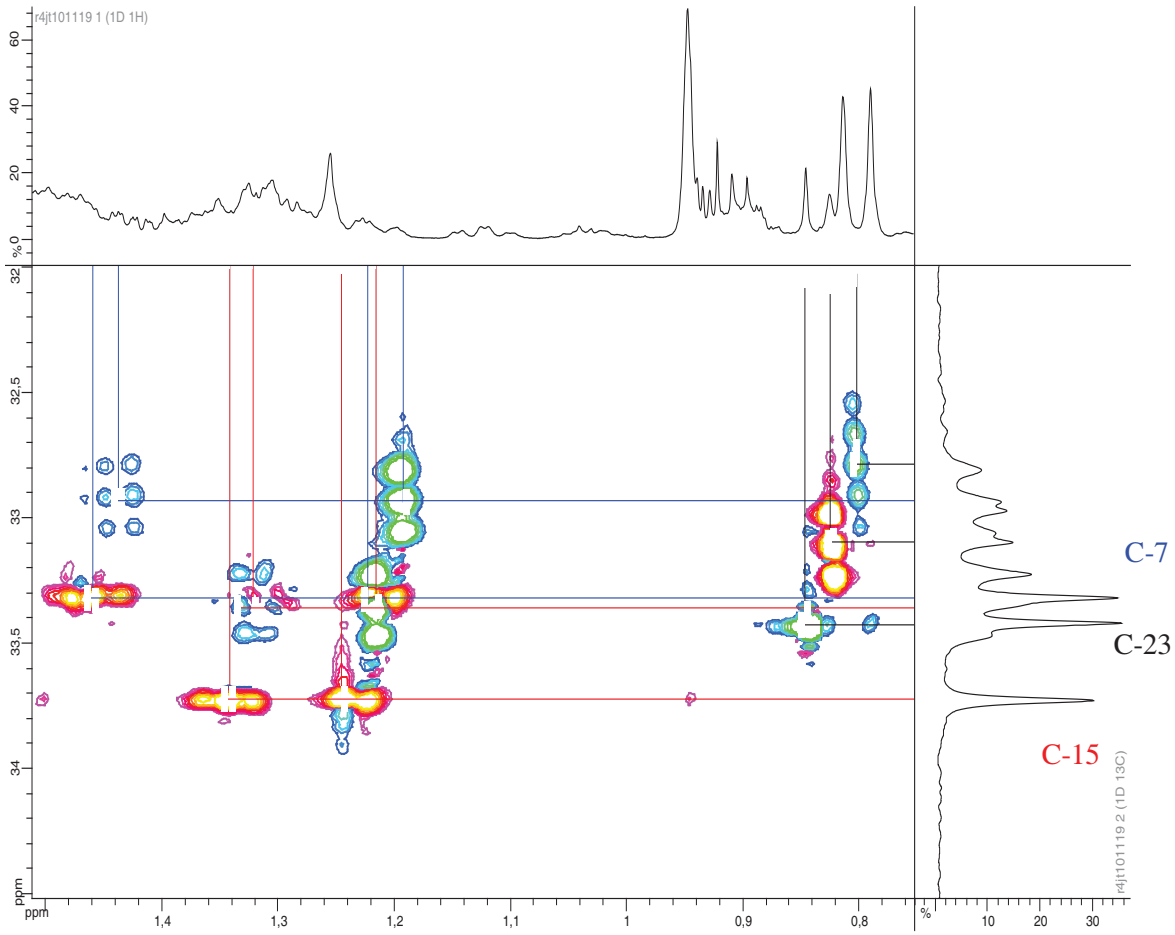


Figure 23 : Signaux de C-7, C-23 et C-15 sur le spectre de RMN (HSQC) de l'acétate de *bis*-homohopanyle obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* avec du [1-^{2}H]glucose (90%) et du [1-^{13}C]glucose (10%).

Des signaux similaires sont aussi visibles pour les atomes C-1 et C-19 (Figure 24). C-1 est caractérisé par trois signaux en RMN du ^{13}C :

- Un singulet en RMN ^{13}C (40,352 ppm) correspond à l'isotopomère non deutérié -CH_2- avec deux protons non équivalents (0,76 et 1,65 ppm.
- Deux triplets en RMN du ^{13}C (39,958 ppm, $J^{2}_{H/^{13}C}$ = 19 Hz et 39,879 ppm, $J^{2}_{H/^{13}C}$ = 19 Hz) indiquent la présence de deux isotopomères -CHD- avec des déplacements chimiques différents. Le triplet en RMN du ^{13}C à 39,879 ppm, correspondant à l'isotopomère majoritaire, est corrélé à un signal en RMN ^{1}H à 0,74 ppm. Ce signal

montre une constante de couplage $^{3}J^{1}_{H/}{}^{1}_{H}$ = 14 Hz correspondant à un couplage axial/axial entre deux protons H-1α/H-2β, ce qui veut dire que le ^{2}H en C-1 est en position équatoriale. Le triplet en RMN du ^{13}C à 39,958 ppm, correspondant à l'isotopomère minoritaire, est corrélé à un signal étroit à 1,62 ppm en RMN ^{1}H, correspondant à un proton H-1β en position équatoriale caractérisé par un couplage H-1β/H-2β équatorial/axial et un couplage H-1β/H-2α équatorial/équatorial faibles et non identifiables. Le deutérium dans cet isotopomère majoritaire est donc en position H-1α axiale (Figure 24).

Le carbone C-19 montre aussi trois signaux en RMN du ^{13}C (Figure 24).

- Un singulet en RMN ^{13}C (41,624 ppm) correspondant à l'isotopomère non deutérié -CH_2- portant deux protons non équivalents (0,88 et 1,49 ppm).
- Deux triplets en RMN du ^{13}C (41,254 ppm, $J^{2}_{H/}{}^{13}_{C}$ = 19 Hz et 41,205 ppm, $J^{2}_{H/}{}^{13}_{C}$ = 19 Hz) caractérisent la présence de deux isotopomères -CHD- ayant des déplacements chimiques différents. Le triplet en RMN du ^{13}C à 41,254 ppm, correspondant à l'isotopomère majoritaire, est corrélé avec un signal en RMN du ^{1}H à 0,88 ppm. Ce signal présente une constante de couplage $^{3}J^{1}_{H/}{}^{1}_{H}$ = 20 Hz correspondant à un couplage pseudo diaxial entre les deux protons H-19α/H-20β, indiquant que le ^{2}H en C-19 est en position pseudo équatoriale. Le triplet en RMN du ^{13}C à 41,205 ppm, correspondant à l'isotopomère minoritaire, est corrélé à un signal à 1,49 ppm en RMN ^{1}H, correspondant à un proton H-19β en position pseudo équatoriale caractérisé par un couplage H-19β/H-20β pseudo équatorial/pseudo axial et un couplage H-19β/H-20α pseudo équatorial/pseudo axial non identifiables. Le deutérium sur cet isotopomère minoritaire est dans en position H-19β pseudo axiale (Figure 24).

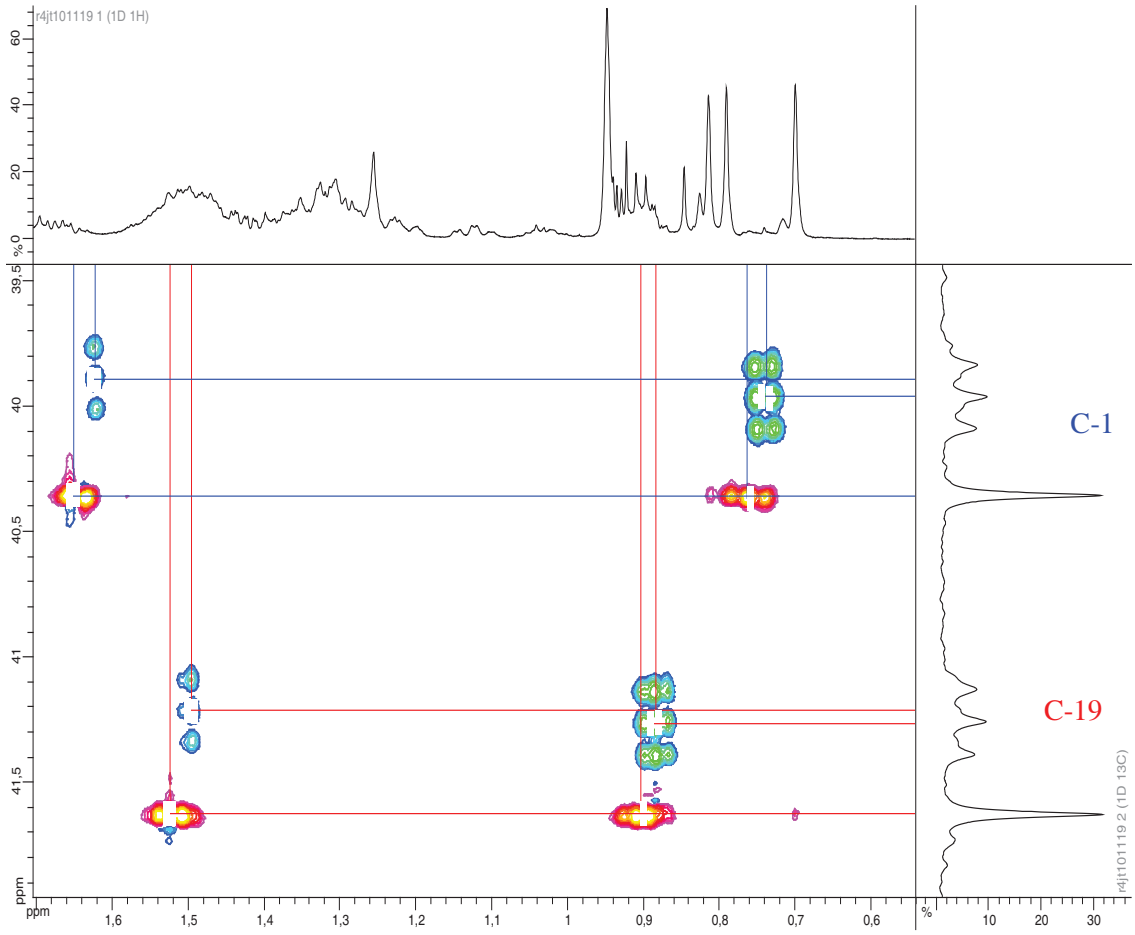


Figure 24 : Signaux de C-1 et C-19 sur le spectre de RMN (HSQC) de l'acétate de *bis*-homohopanyle obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* avec du [1-^{2}H]glucose (90%) et du [1-^{13}C]glucose (10%).

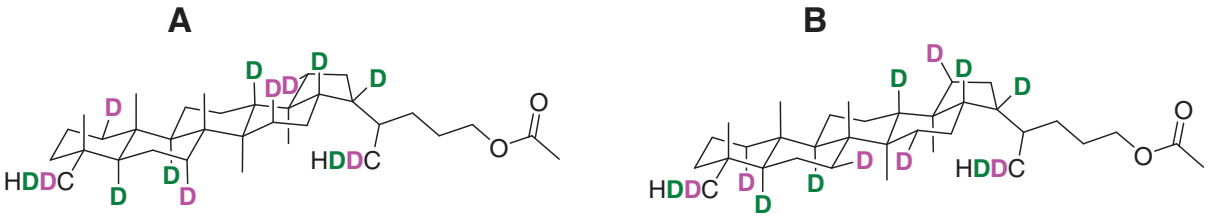


Figure 25 : Localisation du deutérium dans les isotopomères observés après incubation de [1-^{2}H]glucose d'après analyse des spectres de l'incorporation du [4-^{13}C]glucose. **A** : isotopomère majoritaire (H-1β, H-7β, H-15α, H-19α) ; **B** : isotopomère minoritaire (H-1α, H-7α, H-15β, H-19β) ; **D** : deutérium introduit par la DXR ; **D** : deutérium introduit par LytB.

c) Conclusion de l'incorporation du [4-^{13}C]glucose

Les signaux des atomes de carbone marqués au ^{13}C (C-29, C-7, C-23, C-15, C-1,C-19) sont bien lisibles. Tous ces atomes de carbones présentent un signal non shifté et un ou deux signaux déplacés vers les champs forts correspondant à un ou deux α-shifts qui représentent la signature de la présence d'un atome de deutérium sur cet atome de carbone. L'origine de l'atome de deutérium peut être double.

Tous ces atomes de carbone sont le site de la réduction NADPH-dépendante catalysée par la DXR. Le transfert de deutérium à partir du NADP^{2}H se fait efficacement. L'abondance isotopique non chiffrable dans les conditions de mesure des spectres est cependant élevée, ce qui est en accord avec l'absence d'effet isotopique primaire mesurable en cas de réduction du DXP par le (4*S*)-[1-^{2}H]NADPH.[21,22] C'est en effet l'étape de réarrangement du DXP en 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate qui est limitante et non la réduction. Le spectre de RMN ^{13}C suggère la présence d'un quintuplet parmi les signaux des méthyles C-29 et C-23, provenant de deux unités isopréniques biogénétiquement équivalentes et dérivées du DMAPP, qui serait la signature d'un isotopomère -CHD$_2$. La corrélation HSQC a permis de confirmer cette présomption. Quelle est l'origine des deux deutériums dans les isotopomères -CHD$_2$? Un premier deutérium est introduit par la DXR *via* le (4*S*)-[1-^{2}H]NADPH, ce qui est attendu. Le deuxième deutérium est lui introduit par LytB (branche DMAPP) par protonation en C-4 de l'anion allylique intermédiaire (Figure 3, p. 118) pour donner le DMAPP. Il s'agit là de la première preuve expérimentale d'un tel transfert qui a été démontré pour la formation de l'IPP[17], mais uniquement postulé pour la formation du DMAPP.

Les atomes de carbone C-1 et C-19, C-7 et C-15 sont biogénétiquement équivalents et proviennent d'unités isopréniques dérivées de l'IPP. Ils sont tous caractérisés par trois isotopomères : un isotopomère -CH$_2$- au signal non shifté et deux isotopomères -CHD- aux signaux déplacés avec des α-shifts caractéristiques. Le fait d'observer la présence de deux isotopomères dans un rapport (7:3) au niveau de ces groupements méthylènes -CHD- indique que les deux isotopomères monodeutériés en C-4 de l'IPP (**11a/11b** dans un rapport 7 : 3) ont contribué à la formation du squelette triterpénique. Ces deux isotopomères de l'IPP proviennent très probablement de l'isomérisation du [4-^{2}H]DMAPP *via* une IPP isomérase présentant une certaine activité (Figure 26).

De plus, le signal du C-29 ne comportant pas de β-shift, nous pouvons en conclure qu'il n'y a pas de deutérium en C-22.

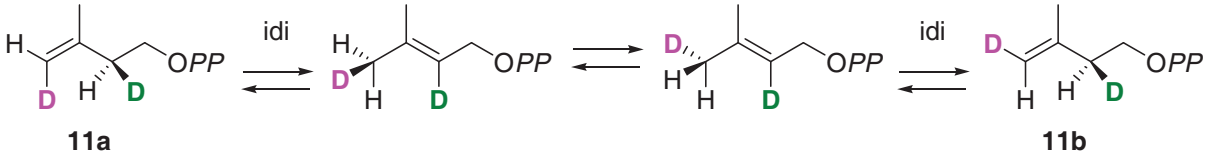


Figure 26 : Isotopomères de l'IPP incorporés dans les biohopanoïdes.

3) Incorporation de [2-^{13}C]glucose

Zymomonas mobilis a été cultivée dans un milieu contenant 90% de [1-^{2}H]glucose et 10% de [2-^{13}C]glucose. Le marquage au ^{13}C après passage par la voie d'Entner-Doudoroff et par le métabolisme des phosphates de trioses (Figures 10 et 11) va se retrouver uniquement sur le C-2 du pyruvate **23** puis sur le C-3 de l'IPP **11** et du DMAPP **10**. (Figure 27 a), ce qui correspond à la distribution des enrichissements en ^{13}C indiquée sur la figure 27 b.

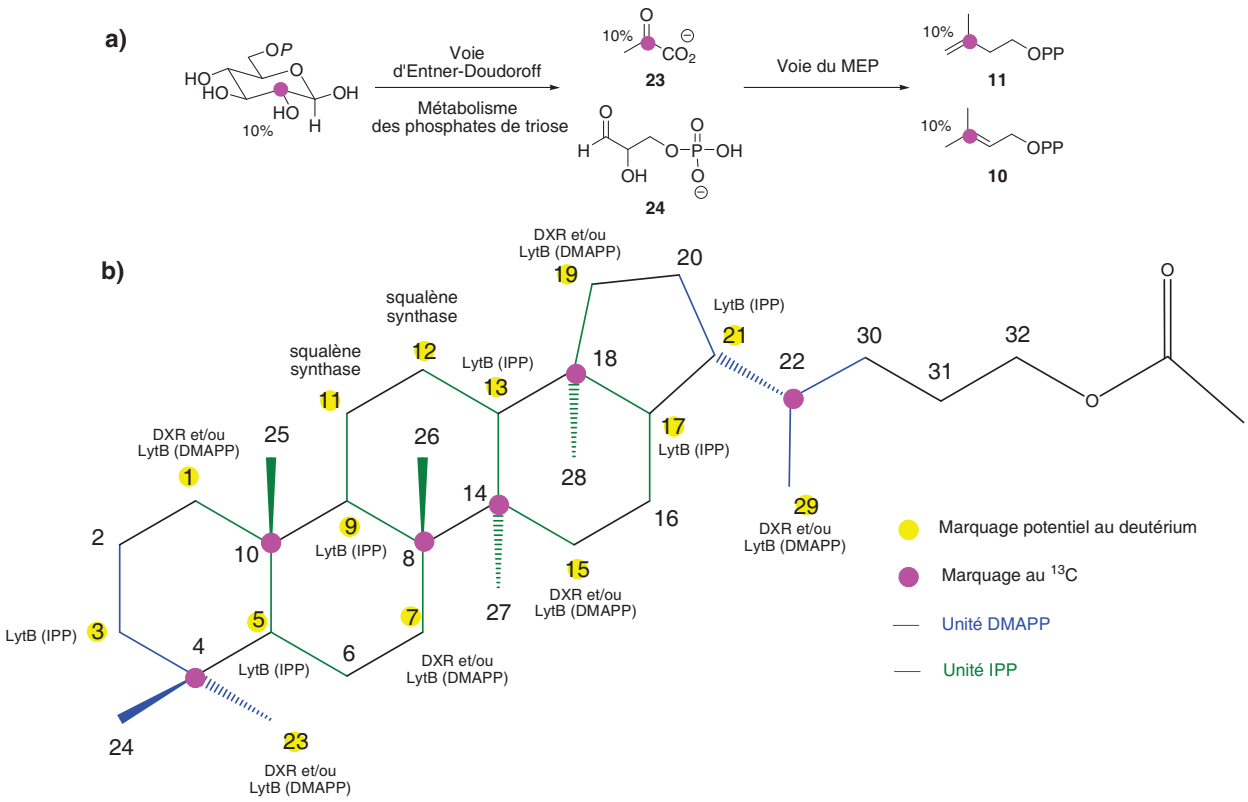


Figure 27 : a) Marquage de l'IPP **11** et du DMAPP **10** à partir de [2-^{13}C]glucose chez *Zymomonas mobilis.*
b) Marquages attendus après incubation de *Z. mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [2-^{13}C]glucose.

a) Analyse du spectre de RMN ^{13}C

Le tableau 2 résume l'analyse RMN du spectre ^{13}C de l'acétate de *bis*-homohopan-32-ol obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [2-^{13}C]glucose (Spectre RMN en Annexe 1).

Atome	Signal ^{13}C non shifté δ (ppm)	Signaux ^{13}C shiftés δ (ppm)	Δδ (ppb)	Shifts	Position deutérium induisant les shifts	Enzyme introduisant le deutérium
C-1	40,341					
C-2	18,700	18,593	107	2∗1 β	C-1 ou C-3	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		18,501	199	2 β	C-1 et C-3	DXRet/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-3	42,120	42,092	28	1γ	C-1 ou C-5 ou C-23	DXR ou LytB (DMAPP)ou LytB (IPP)
		42,061	59	2∗1 γ	C-1 ou C-5 ou C-23	DXR ou LytB (DMAPP)ou LytB (IPP)
		42,038	82	2 γ	C-1 et C-5 ou C-1 et C-23 ou C-23 et C-5	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-4	**33,265**	**33,185**	**80**	**3∗1 β**	**C-3 ou C-5 ou C-23**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
		33,106	**159**	**2 β**	**C-23 et C-3 ou C-5 ou 2*C-23**	**DXRet/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP) ou DXR et LytB (DMAPP)**
C-5	56,134	56,115		3 γ		
		56,102				
		56,079				
C-6	18,711	18,626	85	1 β	C-5	LytB (IPP)
		18,615	96	1 β	C-7	DXR ou LytB (DMAPP)
		18,508	203	2 β	C-5 et C-7	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-7	33,303					
C-8	**41,732**	**41,728**	**4**	**1 γ**	**C-11**	**squalène synthase**
		41,715	**17**	**2∗1 γ**	**C-13 ou C-15**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
		41,710	**22**	**2 γ**	**C-15 et C-11 ou C-13 et C-11**	**Squalène synthase et DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
		41,631	**101**	**1 β**	**C-9**	**LytB (IPP)**
		41,624	**108**	**1 β**	**C-7**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
C-9	50,464					
C-10	**37,409**	**37,316**	**93**	**3∗1 β**	**C-1 ou C-5 ou C-9**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
		37,231	**178**	**2 β**	**C-1 et C-5 ou C-1 et C-9 ou 2*C-1**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-11	20,979	20,974	5			
		20,967	12			
		20,957	22			
C-12	23,997	23,991	6			
		23,983	14			
		23,977	22			

		23,970	27			
C13	49,346	46,339	7	1 γ	C-15 ou C-17 ou C-19	DXR ou LytB (DMAPP)ou LytB (IPP)
C-14	**41,826**	**41,819**	**7**	**1 γ**	**C-12**	**Squalène synthase**
		41,814	**12**	**2∗1 γ**	**C-7 ou C-9**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
C-15	33,713					
C-16	22,777	22,702	75	1 β	C-15 ou C-17	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		22,692	85	1 β	C-15 ou C-17	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-17	54,477	57,471	6	1 γ	C-19 ou C-13	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		57,463	14	1 γ	C-19 ou C-13	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		57,458	19	2 γ	C-19 et C-13	DXR et LytB (IPP)
C-18	**44,401**	**44,323**	**78**	**1 β**	**C-19**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		44,311	**90**	**2∗1 β**	**C-13 ou C-17**	**LytB (IPP)**
		44,231	**170**	**2 β**	**C-19 et C-13 ou C-19 et C-17**	**DXR ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-19	41,630					
C-20	27,576	27,484	92	2∗1 β	C-19 ou C-21	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		27,377	199	2 β	C-19 et C-21	DXR ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-21	46,073	46,051	22	1 γ	C-19 ou C-29	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		46,044	29	1 γ	C-19 ou C-29	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-22	**36,423**	**36,418**	**5**	**1 γ**	**C-17**	**LytB (IPP)**
		36,349	**74**	**2∗1 β**	**C-21 ou C-29**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
		36,278	**145**	**2 β**	**C-21 et C-29 ou 2*C-29**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-23	33,416					
C-24	21,593	21,575	18	2∗1 γ	C-3 ou C-5	LytB (IPP)
		21,570	23	1 γ	C-23	DXR ou LytB (DMAPP)
		21,560	33	2 γ	C-23 et C-3 ou C-5	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-25	15,875	15,857	18	1 γ	C-1	DXR
		15,842	33	2∗1 γ	C-5 ou C-9	LytB (IPP)
C-26	16,618	16,605	13	1 γ	C-7	DXR ou LytB (DMAPP)
		16,589	29	1 γ	C-9	LytB (IPP)
		16,572	46	2 γ	C-7 et C-9	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-27	16,537	16,523	14	1 γ	C-15	DXR ou LytB (DMAPP)
		16,508	28	1 γ	C-13	LytB (IPP)
		16,495	42	2 γ	C-15 et C-13	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-28	15,909	15,895	14	2∗ 1γ	C-13 ou C-17	LytB (IPP)
		15,887	22	1 γ	C-19	DXR ou LytB (DMAPP)
C-29	20,029	19,730 J= 19 Hz	299	1 α	C-29	DXR ou LytB (DMAPP)
C-30	31,770	31,750	20	2∗1 γ	C-29 ou C-21	DXR ou LytB DMAPP ou LytB IPP
		31,731	39	2 γ	2*C-29 ou C-29 et C-21	DXR et LytB (DMAPP) ou DXR et LytB (IPP)

C-31	25,359					
C-32	65,103					

Tableau 2 : Analyse du spectre ^{13}C obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [2-^{13}C]glucose.

b) Conclusion de l'incorporation du [2-^{13}C]glucose

L'analyse des signaux du carbone C-10, nous montre la présence de deux β-shifts différents. L'un très vraisemblablement correspond à un deutérium introduit en C-1 par la DXR et éventuellement par LytB (DMAPP). Le second provient d'un deutérium, qui n'est pas en C-1. Ce deutérium peut donc se trouver en position C-5 et/ou en C-9. Toutes deux sont biogénétiquement équivalentes et correspondent à l'introduction d'un hydrogène par LytB (IPP), d'un deutérium dans le cas de cette incubation. Le carbone C-18 est l'équivalent biogénétique de C-10. Nous avons également observé deux β-shifts différents. L'un est introduit de manière certaine par la DXR et peut être par LytB (DMAPP) en C-19. L'autre est en C-13 et/ou C-17, indiquant ainsi l'introduction d'un hydrogène par LytB (IPP).

L'atome de carbone C-22 est caractérisé par un γ-shift, pouvant être attribué à la présence d'un deutérium en position C-17. De plus, ses signaux montrent la présence de deux β-shifts différents. Le premier correspond à la présence d'un deutérium en C-29 due à l'introduction d'un deutérium par la DXR ou LytB (DMAPP). Le deuxième indique la présence soit de deux deutériums en C-29, soit d'un deutérium en C-29 et un autre en C-21, correspondant respectivement à l'introduction d'un deutérium par la DXR et LytB (DMAPP) ou LytB (IPP). L'atome de carbone C-4 est l'équivalent biogénétique de C-22 et montre également deux β-shifts différents. Le premier serait dû à l'introduction d'un deutérium en position C-23 par la DXR et le second à l'introduction d'un deutérium en C-3 et/ou C/5 par LytB (IPP).

Pour le carbone C-8, deux γ-shifts différents et deux β-shifts différents ont été détectés. Les shifts peuvent provenir de la présence d'un deutérium en position C-11, introduit par la squalène synthase, le second de la présence d'un deutérium en C-13 introduit par LytB (IPP) et C-15 introduit par la DXR ou LytB (DMAPP). Il est toutefois impossible de différencier les apports de ces signaux, donc de déterminer la provenance du deutérium. Les deux β-shifts différents révèlent la présence de deutérium en C-7 et en C-9. Cela indique qu'à

la fois la DXR et LytB (IPP) ont introduit des deutériums lors de la biosynthèse de cette unité isoprénique respectivement en C-7 et C-9. Seuls deux γ-shifts différents sont visibles pour C-14, indiquant l'introduction d'un premier deutérium par la squalène synthase en C-12 et d'un second par la DXR et/ou LytB (IPP) en C-7. Nous attendions à observer des β-shifts, mais la superposition des signaux de C-14 et de C-8 ne nous permet d'observer tous les signaux attendus pour C-14.

De plus, l'atome de carbone C-22 ne présente aucun α-shift, ce qui est en accord avec l'absence de deutérium en position C-22.

4) Incorporation de [3-^{13}C]glucose

Zymomonas mobilis a été cultivée dans un milieu contenant 90% de [1-^{2}H]glucose et 10% de [3-^{13}C]glucose. Le marquage au ^{13}C après passage par la voie d'Entner-Doudoroff et par le métabolisme des phosphates de trioses (Figures 10 et 11) se retrouve sur le C-3 du pyruvate **23** et sur le C-4 de l'IPP **11** et du DMAPP **10**. (Figure 28 a) ce qui correspond à la distribution des enrichissements en ^{13}C indiquée sur la figure 28 b.

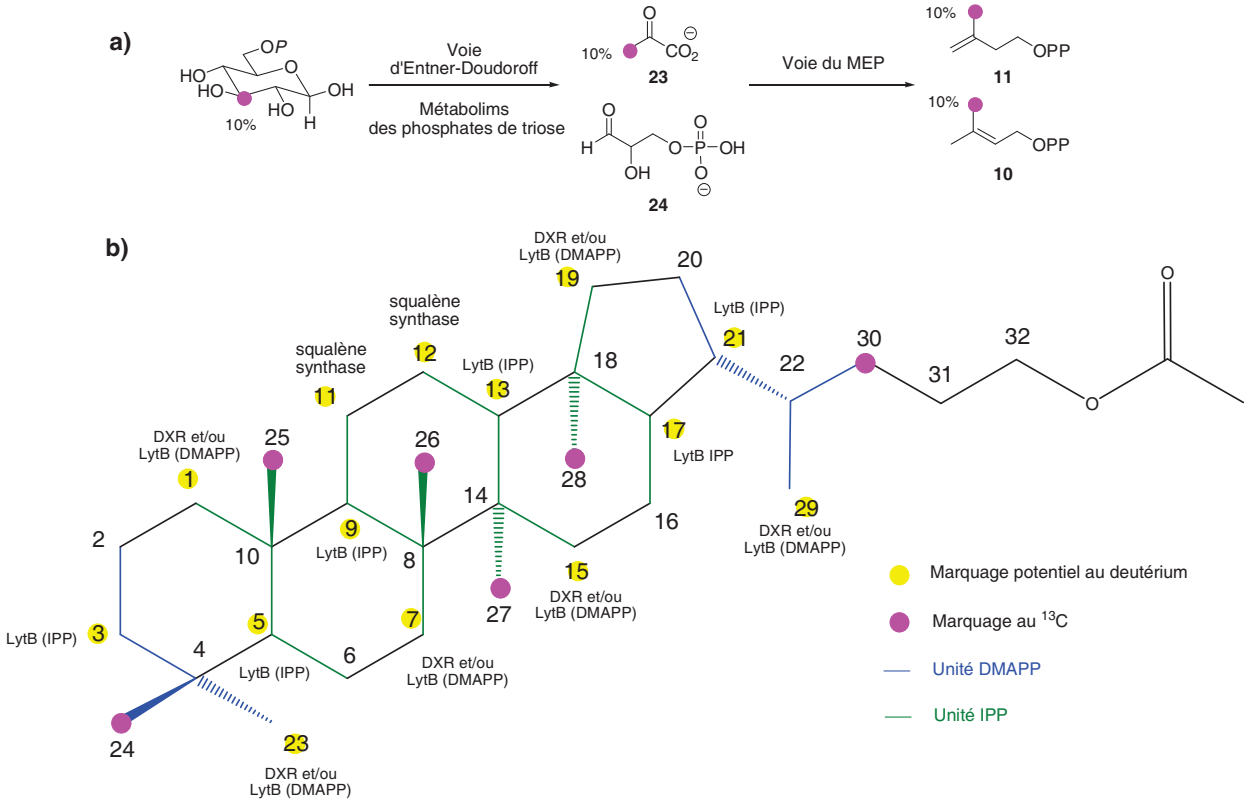


Figure 28 : a) Marquage de l'IPP **11** et du DMAPP **10** à partir de [3-^{13}C]glucose chez *Zymomonas mobilis*
b) Marquages attendus après incubation de *Z. mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [3-^{13}C]glucose.

a) Analyse du spectre de RMN ^{13}C

Le tableau 3 présente l'analyse RMN du spectre ^{13}C de l'acétate de *bis*-homohopan-32-ol obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [3-^{13}C]glucose (Spectre RMN du ^{13}C en Annexe 2).

Atome	Signal ^{13}C non shifté δ (ppm)	Signaux ^{13}C shiftés δ (ppm)	Δδ (ppb)	Shifts	Position deutérium induisant les shifts	Enzyme introduisant le deutérium
C-1	40,343					
C-2	18,701	18,600	101	1 β	C-3	LytB (IPP)
		18,595	106	1 β	C-1	DXR ou LytB (DMAPP)
		18,504	197	2 β	C-1 et C-3	DXRet/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-3	42,125	42,095	30	3∗1γ	C-1 ou C-5 ou C-23	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		42,060	65	2 γ	C-1 et C-5 ou C-23 ou C-23 et C-5	DXR ou LytB (DMAPP)ou LytB (IPP)
C-4	33,262					
C-5	56,137	56,118		3 γ		

		56,101				
		56,084				
C-6	18,717	18,630	87	1 β	C-5	LytB (IPP)
		18,617	100	1 β	C-7	DXR ou LytB (DMAPP)
		18,521	196	2 β	C-5 et C-7	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-7	33,306					
C-8	41,734	41,728	6	1 γ	C-11	squalène synthase
		41,716	18	2*1 γ	C-13 ou C-15	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		41,711	23	2 γ	C-15 et C-11 ou C-13 et C-11	Squalène synthase et DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		41,624	110	1 β	C-7	DXR ou LytB (DMAPP)
		41,617	117	1 β	C-9	LytB (IPP)
C-9	50,469					
C-10	37,411	37,406	5	1 γ	C-11	Squalène synthase
		37,315	94	3*1 β	C-1 ou C-5 ou C-9	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		37,231	178	2 β	C-1 et C-5 ou C-1 et C-9 ou 2*C-1	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-11	20,982	20,976	6			
		20,970	12			
		20,962	20			
C-12	23,999	23,992	7			
		23,986	13			
		23,978	21			
C13	49,348					
C-14	41,824	41,819	5	1 γ	C-12	Squalène synthase
		41,814	10	2*1 γ	C-7 ou C-9	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-15	33,716					
C-16	22,777	22,692	85	2*1 β	C-15 ou C-17	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		22,591	186	2 β	C-15 et C-17	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-17	54,475	57,466	9	3*1 γ	C-13 ou C-15 ou C-19	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-18	44,401	44,323	78	1 β	C-19	DXR ou LytB (DMAPP)
		44,309	92	2*1 β	C-13 ou C-17	LytB (IPP)
		44,230	171	2 β	C-19 et C-13 ou C-19 et C-17	DXR ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-19	41,633					
C-20	27,575	27,482	93	1 β	C-19	DXR ou LytB (DMAPP)
		27,466	109	1 β	C-21	LytB (IPP)
		27,374	201	2 β	C-19 et C-21	DXR ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-21	46,074	46,054	20	2*1 γ	C-19 ou C-29	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		46,033	41	2 γ	C-19 et C-29	DXR et/ou LytB (DMAPP)
C-22	36,421	36,416	5	1 γ	C-17	LytB (IPP)
		36,346	75	2*1 β	C-21 ou C-29	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		32,277	144	2 β	C-21 et C-29 ou 2*C-29	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-23	33,416					
C-24	**21,598**	**21,593**	**5**	**2*1 γ**	**C-3 ou C-5**	**LytB (IPP)**

		21,575	**23**	**1 γ**	**C-23**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		21,569	**29**	**2 γ**	**C-23 et C-3 ou C-5**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
		21,548	**50**	**2 γ**	**2*C-23**	**DXR et LytB (DMAPP)**
C-25	**15,874**	**15,855**	**19**	**1 γ**	**C-1**	**DXR**
		15,843	**31**	**2*1 γ**	**C-5 ou C-9**	**LytB (IPP)**
C-26	**16,617**	**16,604**	**13**	**1 γ**	**C-7**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		16,590	**27**	**1 γ**	**C-9**	**LytB (IPP)**
		16,571	**46**	**2 γ**	**C-7 et C-9**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-27	**16,538**	**16,523**	**15**	**1 γ**	**C-15**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		16,509	**29**	**1 γ**	**C-13**	**LytB (IPP)**
		16,491	**47**	**2 γ**	**C-15 et C-13**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-28	**15,908**	**15,896**	**12**	**2* 1γ**	**C-13 ou C-17**	**LytB (IPP)**
		15,885	**23**	**1 γ**	**C-19**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
C-29	20,029	19,729 J= 19 Hz	300	1 α	C-29	DXR ou LytB (DMAPP)
C-30	**31,770**	**31,751**	**19**	**2*1 γ**	**C-29 ou C-21**	**DXR ou LytB DMAPP ou LytB IPP**
		31,731	**39**	**2 γ**	**2*C-29 ou C-29 et C-21**	**DXR et LytB (DMAPP) ou DXR et LytB (IPP)**
C-31	25,360					
C-32	65,100					

Tableau 3 : Analyse du spectre ^{13}C obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [3-^{13}C]glucose.

b) Conclusion de l'incorporation du [3-^{13}C]glucose

Cinq groupements méthyles et le groupement méthylène C-30 sont enrichis en ^{13}C lors de l'incubation en présence de [3-^{13}C]glucose. Pour le carbone C-24, deux β-shifts différents sont visibles. L'un correspond à l'introduction d'un deutérium par la DXR ou LytB (DMAPP) en C-23 et l'autre se trouve en C-3 et/ou C-5. Ces deux positions biogénétiquement équivalentes correspondent à l'introduction d'un deutérium par LytB (IPP) en C-2 sur l'anion allylique intermédiaire lors de la formation de l'IPP.

Les méthyles C-26 et C-27 sont équivalents biogénétiquement et présentent, tous deux, deux γ-shifts différents. Ces derniers correspondent respectivement à la présence de deutérium en position C-7 et C-9 pour le méthyle C-26 et en position C-15 et C-13 pour le méthyle C-27, ce qui implique l'introduction d'un deutérium par la DXR ou LytB (DMAPP) en C-7 et C-15, et par LytB (IPP) en C-9 et C-13.

L'analyse des signaux de C-25 montre deux γ-shifts distincts. Le premier correspond à un γ-shift induit par la présence de deutérium en C-1, C-5 ou C-9. Le deuxième correspond à la somme de deux γ-shifts provenant de la présence simultanée d'un deutérium sur l'une des trois positions C-1, C-5 et C-9. Cette somme pourrait vraisemblablement provenir d'un deutérium en C-1 et en C-5 ou d'un deutérium en C-1 et en C-9. Cela confirme l'introduction d'un deutérium par la DXR et indiquerait l'introduction d'un deutérium en C-5 ou C-9 par LytB (IPP). C-28 est caractérisé également par deux γ-shifts différents, indiquant ainsi l'introduction d'un deutérium en position C-13 et/ou C-17 par LytB (IPP) et l'introduction d'un second deutérium par la DXR ou LytB (DMAPP) en C-19.

De plus, aucun β-shift n'a été détecté sur les signaux de C-30. Nous pouvons donc en déduire qu'il n'y a pas de deutérium introduit en position C-22. La présence de deux γ-shifts distincts pour les signaux de C-30, indique que non seulement la présence d'un deutérium en C-29 introduit par la DXR ou LytB (DMAPP), mais aussi la présence d'un deutérium en C-21 introduit par l'IPP (IPP). Or il s'agit d'une unité isoprénique dérivée du DMAPP, et la présence d'un deutérium en position C-21 indique que cette unité peut provenir d'une isomérisation de l'IPP en DMAPP.

5) Incorporation du [5-^{13}C]glucose

Zymomonas mobilis a été cultivée dans un milieu contenant 80% de [1-^{2}H]glucose et 20% de [5-^{13}C]glucose. Le marquage au ^{13}C après passage par la voie d'Entner-Doudoroff et par le métabolisme des phosphates de trioses va se retrouver sur le C-2 du pyruvate **23** et sur le C-2 du glycéraldéhyde 3-phosphate **24**. Seul 50% du pyruvate possède un marquage au ^{13}C. Le marquage se retrouvera donc dans les unités isopréniques de l'IPP **11** et du DMAPP **10** en C-2 avec la même abondance isotopique que celle du précurseur (20%) et en C-3 avec une abondance isotopique de moitié de celle du précurseur (10%) (Figure 29 a), ce qui correspond à la distribution des enrichissements ^{13}C indiquée sur la figure 29 b.

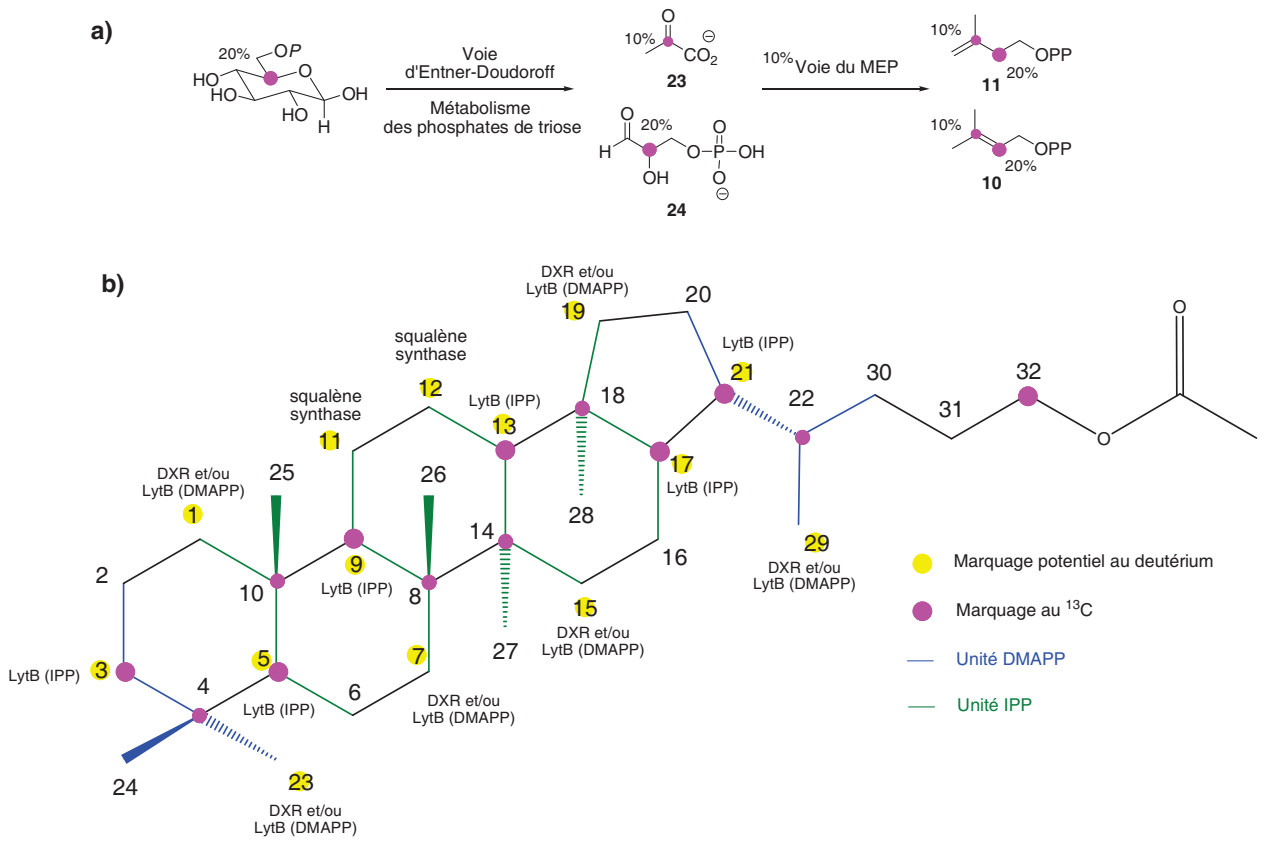


Figure 29 : a) Marquage de l'IPP **11** et du DMAPP **10** à partir de [5-^{13}C]glucose chez *Zymomonas mobilis.*
b) Marquages attendus après incubation de *Z. mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [5-^{13}C]glucose.

Le marquage au ^{13}C du C-5 du glucose se retrouve après passage par la voie non oxydative des phosphates de pentoses sur le C-4 du ribose (Figure 10). Après couplage du dérivé du D-ribose avec le précurseur triterpénique, ce marquage se retrouve en C-32 dans l'acétate de *bis*-homohopan-32-ol (Figure 29 b). La coupure de la chaîne latérale du bactériohopanetétrol se faisant entre C-32 et C-33 des dérivés (Figure 14), le marquage au ^{13}C reste sur la molécule analysée en RMN ^{13}C.

Le tableau 4 présente l'analyse RMN du spectre ^{13}C de l'acétate de *bis*-homohopan-32-ol obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [5-^{13}C]glucose (Spectre RMN du ^{13}C en Annexe 4).

a) Analyse du spectre de RMN ^{13}C

Atome	Signal ^{13}C non shifté δ (ppm)	Signaux ^{13}C shiftés δ (ppm)	Δδ (ppb)	Shifts	Position deutérium induisant les shifts	Enzyme introduisant le deutérium
C-1	40,346					
C-2	18,705	18,595	110	2*1 β	C-1 ou C-3	DXR ou LytB (DMAPP) ou Lytb (IPP)
		18,505	200	2 β	C-1 et C-3	DXRet/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-3	**42,127**	**42,095**	**32**	**2*1γ**	**C-1 ou C-23**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		42,075	**52**	**1 γ**	**C-5**	**LytB (IPP)**
		42,063	**64**	**2 γ**	**C-1 et C-23**	**DXR et/ou LytB (DMAPP)**
		42,044	**83**	**2 γ**	**C-1 et C-5 ou C-23 et C-5**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
		42,015	**112**	**3 γ**	**C-1 et C-5 et C-23**	**DXR et LytB (IPP)**
C-4	**33,262**	**33,183**	**79**	**3*1 β**	**C-3 ou C-5 ou C-23**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
		33,103	**160**	**2 β**	**C-3 et C-23 ou C-23 et C-5 ou 2*C-23**	**DXR et LytB (IPP) ou DXR et LytB (DMAPP)**
C-5	**56,159**	**56,140**	**19**	**5*1 γ**		
		56,121	**38**	**2 γ**		
		56,105	**54**	**3 γ**		
		56,086	**73**	**4 γ**		
		56,067	**92**	**5 γ**		
C-6	18,718	18,633	84	1 β	C-5	LytB (IPP)
		18,621	97	1 β	C-7	DXR ou LytB (DMAPP)
		18,513	205	2 β	C-5 et C-7	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-7	33,308					
C-8	**41,731**	**41,715**	**16**	**2*1 γ**	**C-13 ou C-15**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
		41,627	**101**	**2*1 β**	**C-7 ou C-9**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
C-9	**50,471**	**50,438**	**33**	**1 γ**	**C-5**	**LytB (IPP)**
		50,432	**39**	**2*1 γ**	**C-1 ou C-7**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		50,398	**73**	**2 γ**	**C-1 et C-5 ou C-7 et C-5**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
		50,390	**81**	**2 γ**	**C-1 et C-7 ou 2*C-1 ou 2*C-7**	**DXR et LytB (DMAPP)**
C-10	**37,413**	**37,318**	**95**	**3*1 β**	**C-1 ou C-5 ou C-9**	**DXR ou LytB (DMAP) ou LytB (IPP)**
		37,231	**182**	**2 β**	**C-1 et C-5 ou C-9**	**DXR et LytB (IPP)**
C-11	20,978					
C-12	23,995					
C13	**49,352**	**49,317**	**35**	**1 γ**	**C-15 ou C-19 ou C-17**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
		49,304	**48**	**1 γ**	**C-15 ou C-19 ou C-17**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
C-14	**41,822**	**41,716**	**6**	**2*1 γ**	**C-7 ou C-9**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
C-15	33,718					
C-16	22,778	22,698	80	1 β	C-15	DXR ou LytB (DMAPP)
		22,693	84	1 β	C-17	LytB (IPP)

		22,592	186	2 β	C-15 et C-17	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-17	**54,485**	**57,478**	**7**	**1 γ**	**C-19 ou C-13**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
		57,471	**14**	**2 γ**	**C-19 et C-13**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
		57,468	**26**	**1 γ**	**C-15**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		57,436	**49**	**1 β**	**C-21**	**LytB (IPP)**
C-18	**44,403**	**44,393**	**10**	**1 γ**	**C-21 ou C-12**	**LytB (IPP) ou squalène synthase**
		44,324	**79**	**1 β**	**C-19**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		44,314	**88**	**1 β**	**C-13 ou C-17**	**LytB (IPP)**
		44,232	**170**	**2 β**	**C-19 et C-13 ou C-19 et C-17**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
		44,225	**178**	**2 β**	**2*C-19**	**DXR et LytB (DMAPP)**
C-19	41,629					
C-20	27,575	27,481	94	1 β	C-19	DXR ou LytB (DMAPP)
		27,473	102	1 β	C-21	LytB (IPP)
		27,375	200	2 β	C-19 et C-21	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-21	**46,077**	**46,058**	**19**	**2∗1γ**	**C-19 ou C-29**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		46,038	**39**	**2 γ**	**C-19 et C-29 ou 2*C-29**	**DXR et LytB (DMAPP)**
C-22	**36,417**	**36,347**	**70**	**2∗1 β**	**C-21 ou C-29**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)**
		36,276	**141**	**2 β**	**C-21 ou C-29 ou 2*C-29**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou DXR et LytB (IPP)**
C-23	33,415					
C-24	21,599	21,592	7	2∗1 γ	C-3 ou C-5	LytB (IPP)
		21,576	23	1 γ	C-23	DXR ou LytB (DMAPP)
		21,569	30	2 γ	C-23 et C-3 ou C-5	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-25	15,874	15,857	17	1 γ	C-1	DXR
		15,845	29	2∗1 γ	C-5 ou C-9	LytB (IPP)
C-26	16,619	16,604	15	1 γ	C-7	DXR ou LytB (DMAPP)
		16,592	27	1 γ	C-9	LytB (IPP)
C-27	16,539	16,522	17	1 γ	C-15	DXR ou LytB (DMAPP)
		16,513	26	1 γ	C-13	LytB (IPP)
		16,491	48	2 γ	C-15 et C-13	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-28	15,909	15,887	22	1 γ	C-19	DXR ou LytB (DMAPP)
C-29	20,029	19,728 J= 19 Hz	301	3 α	C-29	DXR ou LytB (DMAPP)
C-30	31,773	31,753	20	2∗1 γ	C-29 ou C-21	DXR ou LytB DMAPP ou LytB IPP
		31,736	37	2 γ	2*C-29 ou C-29 et C-21	DXR et LytB (DMAPP) ou DXR et LytB (IPP)
		31,729	44			
C-31	25,365					
C-32	**65,096**					

Tableau 4 : Analyse du spectre ^{13}C obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [5-^{13}C]glucose.

b) Conclusion de l'incorporation du [5-^{13}C]glucose

Seuls les signaux des carbones marqués sont distincts du bruit de fond. Les signaux de C-4 et C-22, biogénétiquement équivalents, présentent deux β-shifts distincts. Ils sont dus à la présence de deutériums en position C-23, C-3 ou C-5 pour l'atome C-4 et la présence de deutérium en C-21 et C-29 pour l'atome C-22. Les deutériums en C-23 et C-29 sont introduits par la DXR ou LytB (DMAPP), ceux en C-3, C-5 et C-21 sont introduits par LytB (IPP). La présence d'un deutérium introduit en C-21 par LytB (IPP) dans une unité dérivée du DMAPP est en accord avec la présence d'une IPP isomérase active.

C-10, équivalent biogénétique de ces deux premiers atomes de carbone, présente également deux β-shifts, indiquant la présence de deutérium en position C-1, introduit par la DXR ou LytB (DMAPP) et la présence de deutérium en C-5 ou C-9, introduits par LytB (IPP).

C-18 est caractérisé par un γ-shift correspondant à la présence d'un deutérium en C-12 ou en C-21. Ces deutériums sont introduits soit par la squalène synthase en C-12, soit par LytB (IPP) en C-21. La présence de trois β-shifts distincts, montre que des deutériums sont positionnés en C-19, C-13 et C-17 et sont introduits par la DXR ou LytB (DMAPP) en C-19 et par LytB (IPP) en C-13 et C-17.

C-3 présente cinq signaux dus à trois γ-shifts dont deux sont probablement identiques, correspondants à l'incorporation de deutérium en position C-1, C-23 et C-5. Les localisations des deutériums (Tableau 4) ont été tentées en tenant compte de l'intensité des signaux. Ces deutériums ont été introduits par la DXR ou LytB (DMAPP) en C-1 et C-23 et par LytB (IPP) en C-5. L'équivalent biogénétique de C-3, C-21, est caractérisé par deux γ-shifts dus à la présence de deutérium en C-19 et C-29. Ils ont été introduits par la DXR ou LytB (DMAPP). Les signaux de C-17 correspondent à deux γ-shifts et un β-shift. Les trois signaux correspondant à deux valeurs de γ-shifts correspondent à la présence d'un deutérium en C-15 ou C-19 introduit par la DXR et d'un deutérium en C-13 introduit par LytB (IPP). Le signal correspondant au β-shift est la signature de la présence d'un deutérium en C-21 introduit par LytB (IPP). De plus, la présence d'un deutérium en C-21, appartenant à une unité DMAPP, indique que cette unité provient de l'isomérisation d'une unité IPP.

C-9 est caractérisé par un ensemble de signaux qui peut être interprété en supposant deux γ-shifts distincts pour un ensemble de quatre deutériums : deux deutériums introduits en

C-1 ou C-7 par la DXR ou LytB (DMAPP), un deutérium introduit en C-5 par LytB (IPP) et éventuellement un deutérium introduit en C-12 par la squalène synthase. Aucun β-shift dû à la présence d'un deutérium en C-11 introduit par la squalène synthase n'est visible. C-13, équivalent biogénétique de C-9, présente des signaux similaires à ceux de C-9. Ils peuvent être interprétés à l'aide de deux γ-shifts distincts correspondant à la présence de quatre deutériums : deux deutériums en C-15 et C-19 provenant de la DXR et de LytB (DMAPP), un deutérium en C-17 provenant de LytB (IPP) et éventuellement un deutérium en C-11 provenant de la squalène synthase. A nouveau, aucun β-shift dû à la présence d'un deutérium en C-12 introduit par la squalène synthase n'est visible. Pour C-9 et C-13, il n'est pas possible de préciser la position des deutériums induisant les shifts des signaux en RMN du ^{13}C. Les signaux de C-8 sont caractérisés par deux β-shifts et deux γ-shifts. Ils montrent la présence de deutérium en C-13 ou C-15 et C-7 ou C-9. Ces deutériums sont introduits par la DXR ou LytB (DMAPP) en C-15 et C-7 et par LytB (IPP) en C-13 et C-9. L'analyse des signaux de C-14 ne permet pas de conclure sur l'introduction des deutériums et C-5 est caractérisé par une série de raies correspondant à cinq γ-shifts, qui ne peuvent pas être attribués.

De plus, le signal de C-22, marqué à 10% au ^{13}C, ne montre aucun α-shift. C-21 n'a aucun β-shift. Cela est en accord avec l'absence de deutérium en C-22.

Sur ce spectre, nous avons pu observer pour tous les carbones enrichis (10% ou 20%), qui se situent sur l'épine dorsale du squelette triterpénique, des couplages $^{1}J_{C-C}$. Ces couplages ont compliqué l'interprétation de ce spectre et l'attribution des signaux shiftés. Pour améliorer la qualité des spectres, il aurait mieux valu faire une incorporation avec une abondance isotopique plus faibles (5%), mais avec une biomasse plus importante, de façon à éliminer les signaux satellites dus aux couplages $^{1}J_{C-C.}$

6) Incorporation de [6-^{13}C]glucose

Zymomonas mobilis a été cultivée dans un milieu contenant 90% de [1-^{2}H]glucose et 10% de [6-^{13}C]glucose. Le marquage au ^{13}C, après passage par la voie d'Entner-Doudoroff et par le métabolisme des phosphates de trioses, va se retrouver en C-3 du pyruvate **23** et en C-3 du glycéraldéhyde-3-phosphate **24**. Seul 50% du pyruvate possède un marquage au ^{13}C (Figure 10 et 11). Le marquage se retrouvera sur les unités isopréniques en C-1 avec la même abondance isotopique que celle du précurseur (10%) et en C-5 avec une abondance isotopique de moitié celle du précurseur (5%) (IPP **11** et du DMAPP **10**) (Figure 30 a), ce qui correspond à la distribution des enrichissements ^{13}C indiqué sur la figure 30 b.

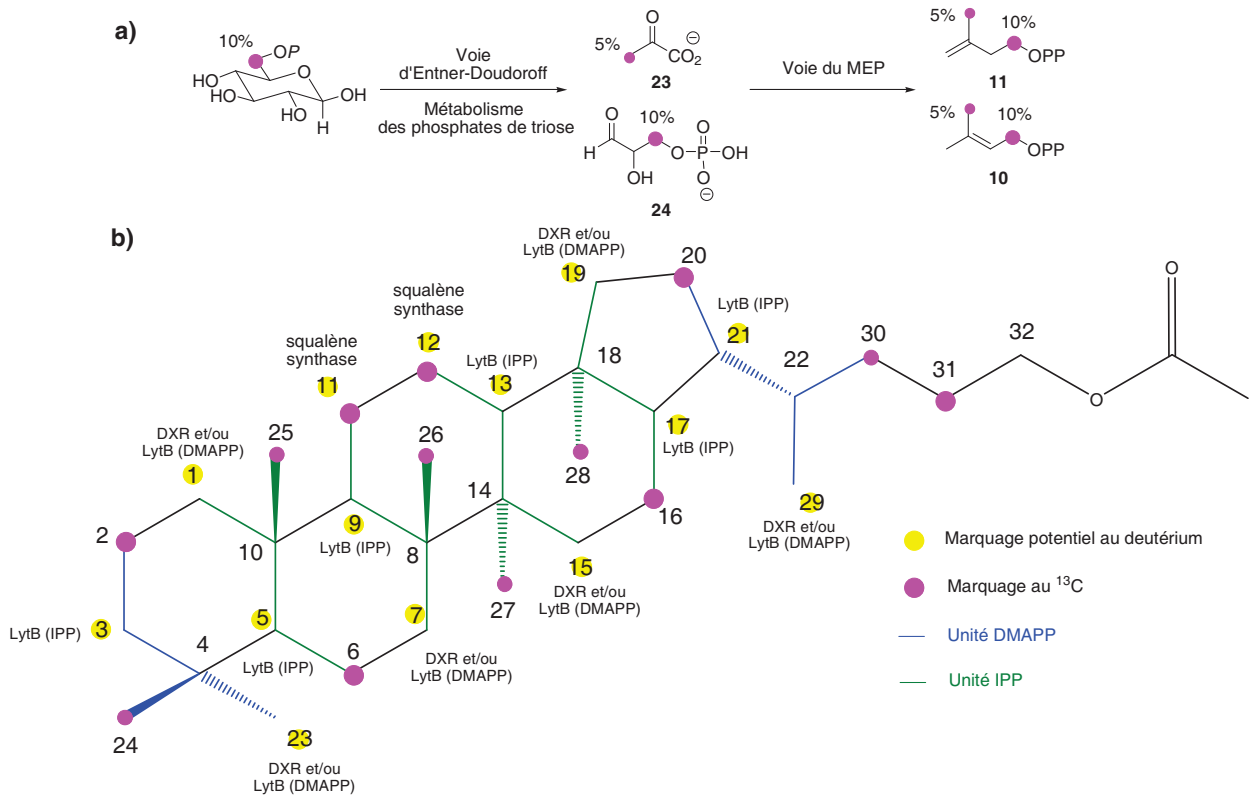


Figure 30 : a) Marquage de l'IPP **11** et du DMAPP **10** à partir de [6-^{13}C]glucose chez *Zymomonas mobilis.*
b) Marquages attendus après incubation de *Z. mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [6-^{13}C]glucose.

Le marquage au ^{13}C du C-6 du glucose, se retrouve après passage par la voie non oxydative des phosphates de pentoses, sur le C-3 du ribose (Figure 8). Après couplage du dérivé du D-ribose avec le précurseur triterpénique, le marquage se retrouve en position C-31 du dérivé du bactériohopanetétrol (Figure 30 b). La coupure de la chaîne latérale se faisant

entre C-32 et C-33 de ce composé (Figure 14), le marquage au ^{13}C se retrouve en C-31 dans l'acétate de *bis*-homohopan-32-ol.

Le tableau 5 présente l'analyse RMN du spectre ^{13}C de l'acétate de *bis*-homohopan-32-ol obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [6-^{13}C]glucose (Spectre RMN du ^{13}C en Annexe 5).

a) Analyse du spectre de RMN ^{13}C

Atome	Signal ^{13}C non shifté δ (ppm)	Signaux ^{13}C shiftés δ (ppm)	Δδ (ppb)	Shifts	Position deutérium induisant les shifts	Enzyme introduisant le deutérium
C-1	40,346					
C-2	**18,702**	**18,596**	**106**	**2*1 β**	**C-1 ou C-3**	**DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB(IPP)**
		18,504	**198**	**2 β**	**C-1 et C-3**	**DXRet/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-3	42,126	42,095	31	3*1γ	C-1 ou C-5 ou C-23	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		42,061	65	2 γ	C-1 et C-5 ou C-1 et C-23 ou C-23 et C-5	DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)
C-4	33,264					
C-5	56,158	56,138		4 γ		
		56,118				
		56,103				
		56,084				
C-6	**18,717**	**18,633**	**84**	**1 β**	**C-5**	**LytB (IPP)**
		18,619	**98**	**1 β**	**C-7**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		18,521	**196**	**2 β**	**C-5 et C-7**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-7	33,308					
C-8	41,733	41,722	11			
		41,712	21			
C-9	50,475	50,467	8	3*1 γ	C-5 ou C-7 ou C-1	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		50,459	16	2 γ	C-5 et C-7 ou C-5 et C-1 ou C-1 et C-7 ou 2*C-1 ou 2*C-7	DXR et LytB (IPP) ou DXR et LytB (DMAPP)
C-10	37,416	37,411	5			
		37,405	11			
C-11	**20,984**	**20,978**	**6**			
		20,972	**12**			
		20,964	**20**			
C-12	**24,000**	**23,994**	**6**			
		23,986	**14**			
		23,978	**22**			
C13	49,351	46,336	15	1 γ	C-19	DXR ou LytB (DMAPP)
C-14	41,829	41,718	11	2*1 γ	C-7 ou C-9	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
C-15	33,718					
C-16	**22,777**	**22,693**	**84**	**1 β**	**C-15**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		22,674	**103**	**1 β**	**C-17**	**LytB (IPP)**

		22,588	**189**	**2 β**	**C-15 et C-17**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-17	54,477	57,471	6	1 γ	C-19 ou C-13	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		57,462	15	1 γ	C-19 ou C-13	DXR ou LytB (DMAPP) ou LytB (IPP)
		57,458	19	2 γ	C-19 et C-13	DXR et LytB (IPP)
C-18	44,408	44,324	84	1 β	C-19	DXR ou LytB (DMAPP)
C-19	41,629	41,618	11	3∗1 γ	C-13 ou C-17 ou C-21	LytB (IPP)
C-20	**27,575**	**27,483**	**92**	**1 β**	**C-19**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		27,469	**106**	**1 β**	**C-21**	**LytB (IPP)**
		27,375	**200**	**2 β**	**C-19 et C-21**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-21	46,077	46,056	21	2∗1γ	C-19 ou C-29	DXR ou LytB (DMAPP)
		46,042	35	2 γ	C-19 et C-29 ou 2*C-29	DXR ou LytB (DMAPP)
C-22	36,424	36,418	6			
C-23	33,416					
C-24	**21,592**	**21,576**	**16**	**2∗1 γ**	**C-3 ou C-5**	**LytB (IPP)**
		21,569	**23**	**1 γ**	**C-23**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		21,547	**45**	**2 γ**	**C-23 et C-3 ou C-5**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-25	**15,875**	**15,857**	**18**	**1 γ**	**C-1**	**DXR**
		15,845	**30**	**2∗1 γ**	**C-5 ou C-9**	**LytB (IPP)**
C-26	**16,619**	**16,609**	**10**	**1 γ**	**C-7**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		16,591	**28**	**1 γ**	**C-9**	**LytB (IPP)**
		16,571	**48**	**2 γ**	**C-7 et C-9**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-27	**16,539**	**16,524**	**15**	**1 γ**	**C-15**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
		16,511	**28**	**1 γ**	**C-13**	**LytB (IPP)**
		16,493	**46**	**2 γ**	**C-15 et C-13**	**DXR et/ou LytB (DMAPP) et LytB (IPP)**
C-28	**15,909**	**15,887**	**22**	**1 γ**	**C-19**	**DXR ou LytB (DMAPP)**
C-29	20,029	19,729 J= 19 Hz	300	3 α	C-29	DXR ou LytB (DMAPP)
C-30	**31,773**	**31,752**	**21**	**2∗1 γ**	**C-29 ou C-21**	**DXR ou LytB DMAPP ou LytB IPP**
		31,733	**40**	**2 γ**	**2*C-29 ou C-29 et C-21**	**DXR et LytB (DMAPP) ou DXR et LytB (IPP)**
C-31	**25,365**					
C-32	65,100					

Tableau 5 : Analyse du spectre ^{13}C obtenu après incubation de *Zymomonas mobilis* en présence de [1-^{2}H]glucose et de [6-^{13}C]glucose.

b) Conclusion de l'incorporation du [6-^{13}C]glucose

Les carbones, C-16 et C-20, biogénétiquement équivalents, sont chacun caractérisés par deux β-shifts différents. Un premier correspond à un deutérium introduit par la DXR respectivement en C-15 pour C-16 et C-19 pour C-20. Un deuxième shift correspond à un

deutérium situé sur d'autres atomes de carbone qui sont C-17 pour C-16 et C-21 pour C-20. Ce deuxième deutérium en β de C-16 et C-20 a été introduit par LytB (IPP). Le deutérium en C-21 se trouve sur une unité DMAPP, ce qui implique qu'il y a eu isomérisation d'une unité IPP en unité DMAPP par une IPP isomérase.

L'analyse des signaux des atomes C-26 et C-27, biogénétiquement équivalents, présente deux γ-shifts distincts. Ils correspondent à l'introduction d'un deutérium par la DXR ou LytB (DMAPP) en position C-7 et C-15. Les seconds deutériums sont en C-9 et C-13 et ont été introduits par LytB (IPP). C-25 est caractérisé par deux γ-shifts, montrant l'introduction d'un deutérium en C-1 par la DXR ou LytB (DMAPP) et en C-5 ou C-9 par LytB (IPP). Les signaux de C-28, équivalent biogénétique de C-25, se superposent en partie avec ceux de C-25. Un seul γ-shift est identifiable et peut être attribué à la présence d'un deutérium en C-19 introduit par la DXR ou LytB (DMAPP).

C-16 et C-6 sont biogénétiquement équivalents et présentent tous les deux, deux β-shifts différents. Cela indique la présence de deutérium en C-15 pour C-16 et C-7 pour C-6, introduit par la DXR ou LytB(DMAPP) et de deutérium en C-17 pour C-16 et C-5 pour C-6, introduit par LytB (IPP). C-2 est aussi caractérisé par deux β-shifts, correspondant à un deutérium en C-1 introduit par la DXR ou LytB (DMAPP) et en C-3 introduit par LytB (IPP).

Les signaux de C-30 présentent deux γ-shifts, correspondant à un deutérium introduit en C-29 par la DXR ou LytB (DMAPP) et un autre en C-21, introduit par LytB (IPP). Ce deutérium est placé sur unité DMAPP, qui provient de l'isomérisation d'une unité IPP. Les signaux de C-11 et C-12 sont complexes et non interprétables.

Finalement, les signaux de C-30 ne montrent pas la présence de β-shift. De même les signaux de C-20 et C-31 n'ont pas de γ-shift. Cela indique l'absence de deutérium en position C-22.

III) Bilan

De même, si les conditions de mesure des spectres RMN du ^{13}C n'ont pas été optimisées pour une étude quantitative, on constate qu'il y a environ 2,7 fois plus d'isotopomères marqués au deutérium que d'isotopomères non marqués. Cela représente une forte incorporation du deutérium dans les hopanoïdes. A cause de l'effet isotopique primaire du deutérium sur une réaction chimique la bactérie utilise plus rapidement le NAD(P)H non

deutérié que le NAD(P)H deutérié. Si l'on admet un découplage des biosynthèses de l'éthanol et des hopanoïdes au cours de la culture, le métabolisme rapide conduisant à l'éthanol démarre dès le début de la culture en utilisant préférentiellement les isotopomères du $NADP^2H$ pour lesquels il y a transfert d'hydrure. La biosynthèse des hopanoïdes, si elle intervient à un stade plus tardif de la culture, utiliserait les isotopomères du NAD(P)H non/moins utilisés par la biosynthèse de l'éthanol. De plus, comme la DXR n'est pas affectée par l'effet isotopique primaire en l'incubant avec du NADPH deutérié,[23] la présence ou l'absence de deutérium n'a pas d'influence notable sur la vitesse de la réaction catalysée par cette enzyme.

Les incubations de *Zymomonas mobilis* avec les différents isotopomères du glucose marqués au ^{13}C en position C-2, C-3, C-4, C-5 et C-6, et du [1-^{2}H]glucose ont permis de caractériser les sites de réduction de la voie du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) pour la biosynthèse des isoprénoïdes.

L'introduction de deutérium en C-1, C-7, C-15 et C-19, positions biogénétiquement équivalentes a pu être montrée par la présence d'α-shifts, lors de l'incorporation de [4-^{13}C]glucose, la présence de β-shifts pour les signaux de C-2, C-6, C-16 et C-20 lors de l'expérience d'incorporation du [6-^{13}C]glucose. Les γ-shifts présents sur les signaux de C-25, C-26, C-27 et C-28 lors des incorporation du [5-^{13}C]glucose et du [6-^{13}C]glucose, confirment ces observations.

La présence d'un ou deux deutériums sur les méthyles C-23 et C-29 a pu être déterminée grâce à l'observation de deux α-shifts lors de l'incorporation du [4-^{13}C]glucose, l'observation de β-shifts pour C-4 et C-22 lors des incorporations de [2-^{13}C]glucose et [5-^{13}C]glucose et par la présence de γ-shifts pour C-24 et C-30 lors de l'incorporation de [3-^{13}C]glucose et [6-^{13}C]glucose.

La présence de deutérium en C-3 et C-21 a pu être caractérisée par les β-shifts de C-2 et C-20 lors de l'incorporation du [6-^{13}C]glucose, de C-4 et C-22 lors de l'incorporation de [2-^{13}C]glucose et [5-^{13}C]glucose. L'observation de γ-shifts en C-24 et C-30 pour l'incorporation de [3-^{13}C] et [6-^{13}C]glucose confirme les déductions précédentes.

La position de deutériums en C-5, C-9 et C-13 a pu être caractérisée par des β-shifts en C-4, C-10, C-8, C-14 et C-18 lors de l'incorporation de [2-^{13}C]glucose et [5-^{13}C]glucose. Le présence de γ-shifts en C-24, C-25, C-26, C-27 lors de l'incorporation de [3-^{13}C]glucose et de [6-^{13}C]glucose, confirme la position de ces deutériums.

Enfin, le deutérium en C-17 a pu être détecté par les β-shifts en C-16 et C-18 lors de l'incorporation du [6-^{13}C]glucose et [5-^{13}C]glucose et par les γ–shifts en C-22 lors de l'incorporation de [2-^{13}C]glucose.

La présence de deutérium en C-11 et C-12 n'a pas été démontrée lors de nos expériences.

La présence de deutériums en C-1, C-7, C-15, C-19, C-23 et C-29 est la signature de l'introduction de deutérium par la DXR. Cela confirme par ailleurs la synthèse *in vivo* de NAD(P)^{2}H à partir de [1-^{2}H]glucose par *Zymomonas mobilis.* Il n'a pas été possible de détecter l'introduction de deutérium en C-11 et C-12 par la squalène synthase qui est pourtant une enzyme NAD(P)H dépendante. La présence de deutérium en C-3, C-5, C-9, C-13, C-17 et C-21 correspond à la signature de LytB lors de l'introduction d'un proton en C-2 de l'anion allylique intermédiaire conduisant à l'IPP. Dans la réaction catalysée par LytB, l'IPP et le DMAPP proviennent respectivement de la protonation d'un anion allylique intermédiaire soit en C-2, soit en C-4. Nos résultats montrent que ce proton provient essentiellemnt du carbone C-1 du glucose et n'est donc pas un proton échangeable provenant du milieu extérieur. Le deutérium en C-1 du [1-^{2}H]glucose est transféré tout d'abord sur le NAD(P)$^+$ pour donner du NAD(P)^{2}H, puis sur les flavines de la flavodoxine réductase et de la flavodoxine. Pour expliquer le transfert de deutérium sur les unités isopréniques, il faut qu'elle soit impliquée dans la réaction catalysée par LytB non seulement dans le transfert d'électrons pour réduire le cluster [4Fe-4S], mais aussi dans la protonation de l'anion allylique intermédiaire.

Les quintuplets observés pour C-23 et C-29 montrent la présence d'un isotopomère -CHD_2 correspondant à l'introduction d'un deutérium par la DXR d'une part et d'une autre par LytB lors de la protonation de l'anion allylique en C-4 d'autre part. Cette dernière observation est inédite et valide le schéma de protonation sur deux sites distincts, C-2 et C-4, du précurseur anionique.

Les carbones C-1, C-7, C-15 et C-19 sont caractérisés sur le spectre en deux dimensions (HSQC) par un triplet corrélé avec deux protons non équivalents. Nous avons pu observer la présence de deutérium sur les deux faces du squelette hopane, avec un isotopomère majoritaire, ce qui suggère qu'il y a isomérisation de l'IPP. De plus, la présence de deutérium en C-3 et C-21 d'une unité DMAPP, indique qu'ils ont été introduits en C-2 de l'anion allylique pour donner de l'IPP qui a ensuite été isomérisé. Toutes ces observations indiquent la présence d'une IPP isomérase active chez *Zymomonas mobilis* (Figure 34).

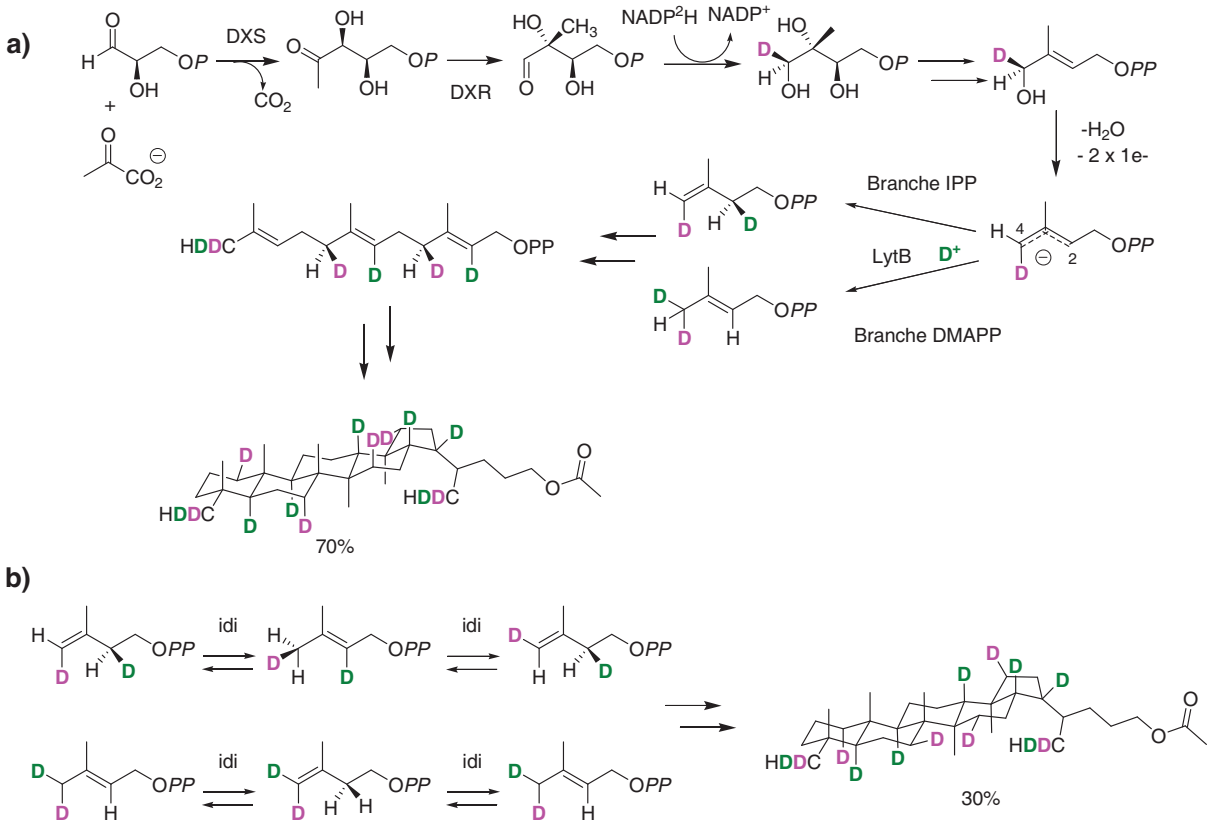


Figure 34: Incorporation du deutérium lors des étapes de réductions de la biosynthèse des dérivés de bactériohopanes.

Il n'a pas été possible de détecter la présence d'un deutérium en position C-22, ce qui ne nous permet pas de conclure sur l'origine de l'hydrogène introduit sur ce carbone.

Le squelette en C_{35} du bactériohopanetétrol est formé de deux entités une partie triterpénique en C_{30} dérivée du squalène et une chaîne latérale polyhydroxylée en C_5. Cette chaîne latérale est en fait un dérivé du D-ribose lié par son carbone C-5 au squelette triterpénique. Le passage d'un précurseur triterpénique en C_{30} (squalène, diploptène) au bactériohopanetétrol en C_{35} implique non seulement la formation d'une nouvelle liaison carbone/carbone, mais aussi une réduction matérialisée par l'introduction d'un hydrogène en C-22. Après incubation de [1-^{2}H]glucose, aucun deutérium n'a été introduit en C-22. Cela montre que l'hydrogène trouvé sur cette position ne provient pas du NADPH mais est fourni par le milieu extérieur. Il s'agit très vraisemblablement d'un proton échangeable.

Quelques données supplémentaires sont disponibles pour la formation du squelette en C_{35} et permettent d'étayer un schéma biogénétique hypothétique (Figure 31).

L'adénosylhopane[24] est un hopanoïde courant, au moins à l'état de traces, chez les bactéries productrices de hopanoïdes. La délétion du gène *hpnH* chez *Methylobacterium extorquens* entraîne l'incapacité du mutant à synthétiser des hopanoïdes en C_{35}.[25] Il ne synthétise plus que des hopanoïdes en C_{30}. Ce gène *hpnH* correspond à un gène codant pour une enzyme à cluster [4Fe-4S] appartenant à la superfamille des enzymes à radical 5'-adénosyle. Le couplage du précurseur C_{30} comme le diploptène avec le radical en C_5 5'-adénosyle provenant de la *S*-adénosyneméthionine conduit au squelette en C_{35} de l'intermédiaire radicalaire **66**.

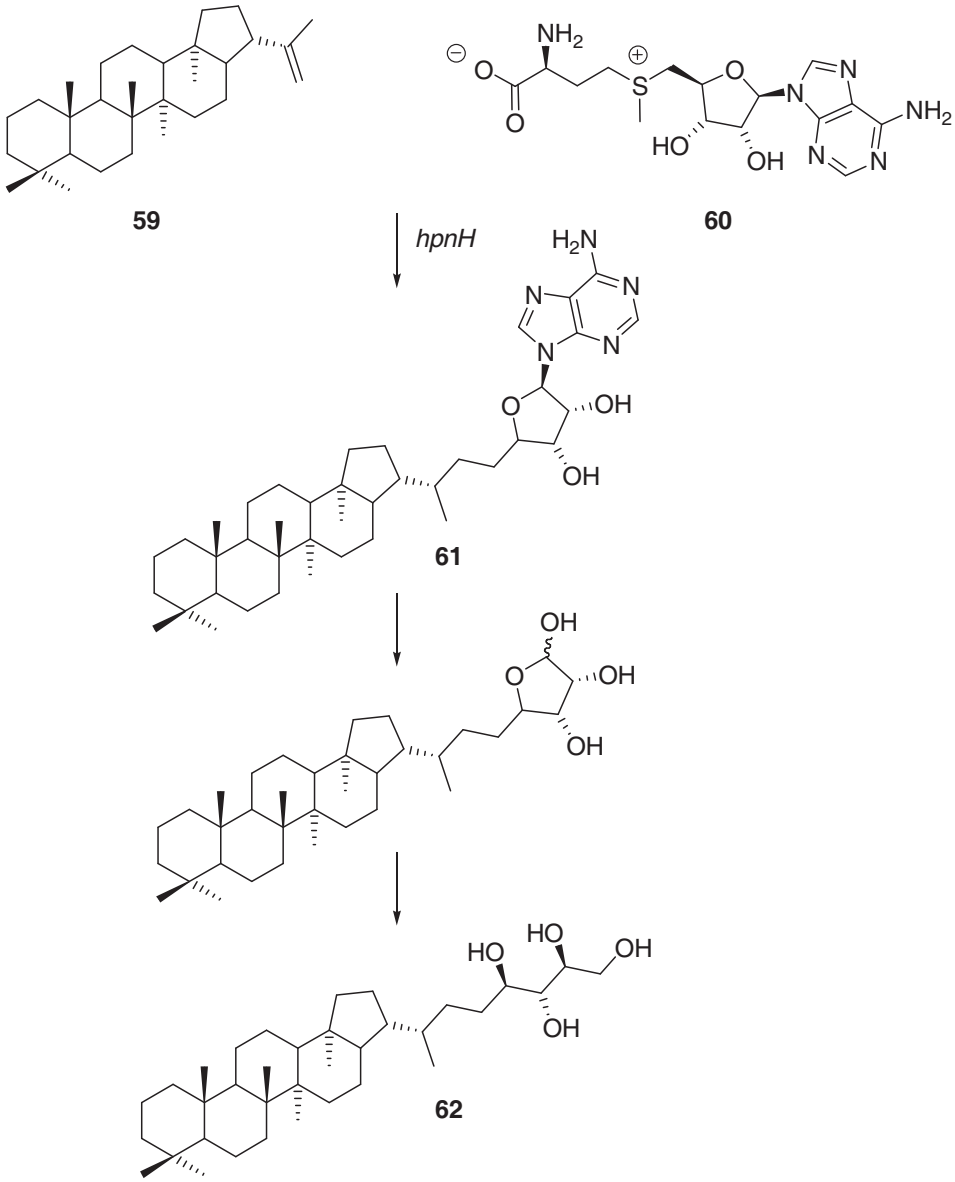


Figure 35 : Schéma biogénétique hypothétique de la synthèse du bactériohopanetétrol à partir du diploptène **60** et de la SAM **61**.[3]

Dans le mécanisme A, le radical **66** peut être réduit par un électron du cluster $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$ réduit, pour donner l'anion en C-22. La protonation de cet anion à partir d'un résidu acide du site actif conduit à l'adénosylhopane **62** (Figure 35).

Un mécanisme alternatif B, met en jeu une cystéine du site actif, donneuse d'un radical $H^{\bullet}$. Le radical cystéine résultant formerait ensuite un pont disulfure en cédant un électron au cluster $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ oxydé. La cystéine de départ peut être régénérée à partir du pont disulfure par réduction, à l'aide d'un hydrure provenant d'un cofacteur de type NADPH. Un tel mécanisme est déjà décrit pour la ribonucléotide réductase.[18]

Ces deux mécanismes hypothétiques tiennent compte des observations faites sur les hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* après incubation en présence de [1-^{2}H]glucose. L'hydrogène introduit en C-22 n'est pas un hydrure provenant du NADPH ou un hydrogène (H^{-}, $H^{\bullet}$ ou H^{+}) d'un autre cofacteur de réduction synthétisé à partir du NADPH, car un transfert de ^{2}H aurait été attendu comme pour la réduction couplée à la DXR ou la protonation effectuée par LytB. Ce proton H-22 provient du milieu. C'est un proton échangeable sous forme de H^{+} à partir d'un site actif (protonation d'un anion) ou sous forme $H^{\bullet}$ donné par un thiol de cystéine (Figure 36).[3,26,27]

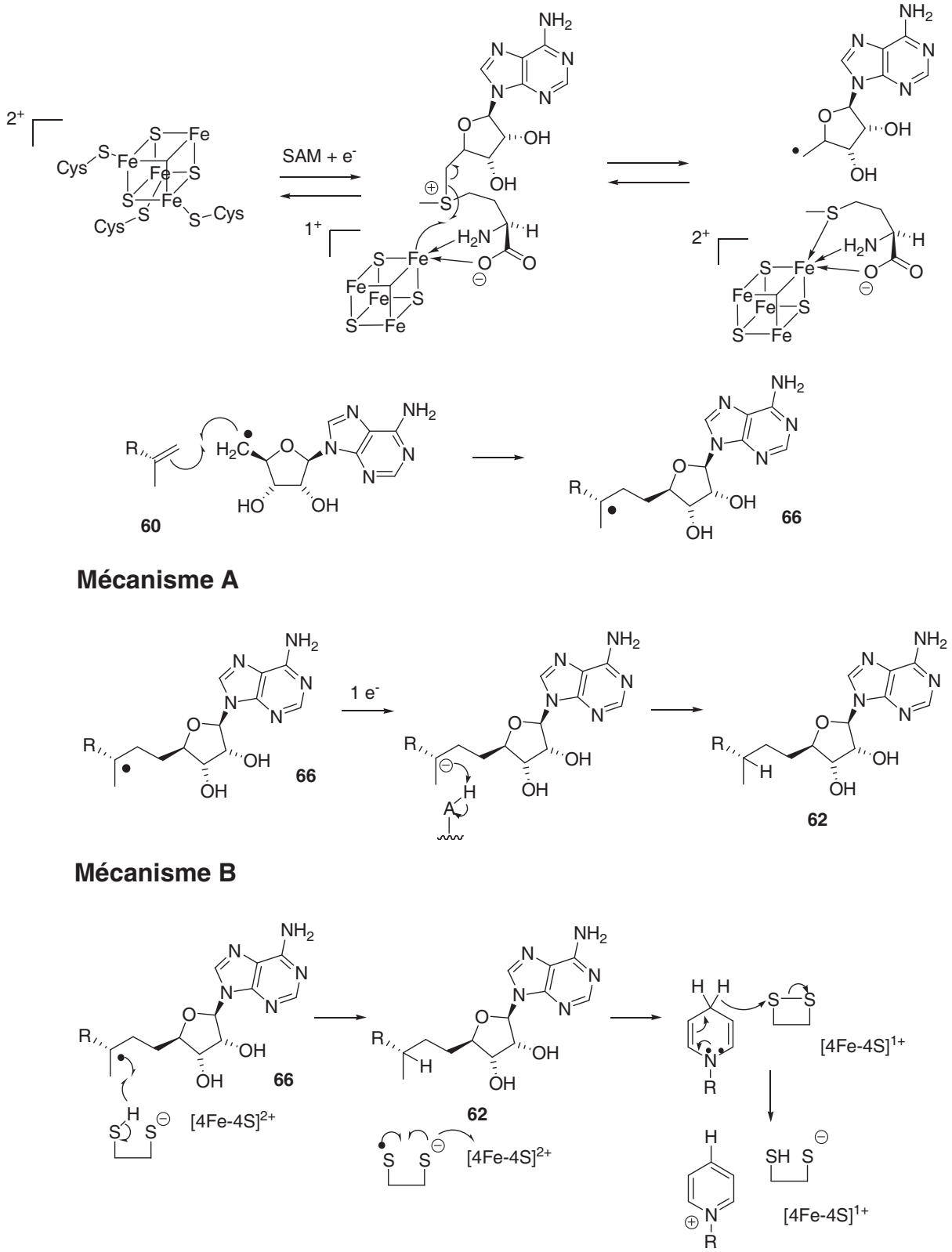


Figure 36 : Mécanisme hypothétique de couplage du diploptène **60** et du dérivé du D-ribose.

Partie Expérimentale

Culture de *Zymomonas mobilis*

La souche utilisée pour ce travail est *Zymomonas mobilis* ZM6 (DSMZ 3580, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, FRG)
Les bactéries sont cultivées à 30°C dans les milieux suivants.

Milieu complexe (DSM medium10)

Extrait de levure	10 g/L
Bactopeptone	10 g/L

Glucose 20 g/L (le glucose est stérilisé séparément)
Stérilisation à 120°C pendant 30 min.

Milieu minimum

KH_2PO_4	3,5 g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g/L
NH_4Cl	1,6 g/L
$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.H_2O$	14 mg/L
acide citrique	0,2 g/L
biotine	1 mg/L
panthoténate de calcium	1 mg L

Glucose 10 g/L (le glucose est stérilisé séparément)
pH initial = 5,0 ± 0,1

Stérilisation à 120°C pendant 30 min.
Le panthoténate de calcium est ajouté après stérilisation des autres constituants sous forme de solution aqueuse à 0,1% stérilisée par filtration (filtre Millipore-Millex-GS 0,22µm).

Conservation de la souche

Les bactéries sont conservées à température ambiante dans des tubes de 20 mL fermés hermétiquement par des bouchons à vis munis de joint en caoutchouc et contenant du milieu de culture minimal (10 mL). Elles sont repiquées une fois tous les deux jours, par transfert d'une culture ancienne (1 mL) dans un tube contenant du milieu frais.

Préculture

Les précultures se font dans des tubes de 20 mL fermés hermétiquement par un bouchon à vis munis d'un joint en caoutchouc. On laisse incuber 24 h à 30°C avant de le transférer stérilement dans le milieu de culture.

Culture

Les cultures sont ensemencées par un volume de préculture correspondant à 1% du volume de milieu frais. Les précultures ne contiennent jamais de précurseurs marqués, ces derniers étant introduits au niveau du dernier récipient de culture. Les cultures de *Zymomonas mobilis* sur glucose marqué au ^{13}C (Omicron, abondance isotopique 99%) et au ^{2}H (Omicron, abondance isotopique 98%) se font dans des réacteurs en verre à fond rond de 2 L contenant 1 L de milieu et se fermant hermétiquement avec deux bouchons en caoutchouc scellés par un capuchon d'aluminium (type flacon à pénicilline). On laisse incuber les cultures 48 h à 30°C sous faible agitation à l'aide d'un barreau magnétique.

Extraction et purification des biohopanoïdes complexes

Les bactéries sont récoltées après 48 h de culture par centrifugation à 4°C, pendant 15min à 7000 rpm, puis lyophilisées (environ 210 mg, cellules lyophilisées). Les biohopanoïdes complexes sont extraits à partir des cellules lyophilisées par un mélange chloroforme/méthanol (2/1, v/v, 90 mL) pendant 1 h à reflux. Cette opération est renouvelée trois fois.
Après évaporation des solvants, l'extrait brut (27 mg) est acétylé pendant une nuit à température ambiante dans un mélange pyridine/anhydride acétique (1/1 ; v/v ; 400 µL). La pyridine et l'anhydride acétique sont évaporés sous courant d'argon ou à l'évaporateur rotatif selon la quantité. On obtient un extrait brut acétylé .

Purification des héptaacétates du glycoside de bactériohopanetétrol et de l'éther de bactériohopanetétrol

L'extrait acétylé est purifié par chromatographie sur couche mince préparative (Merck, 60 F_{254}, 0,25 mm, cyclohexane/AcOEt, 3/7 , 3 migrations). Les héptaacétates de glycoside de bactériohopanetétrol (R_f = 0,42) et de l'éther de bactériohopanetétrol (R_f = 0,29) sont révélés sous lumière UV (356 nm) à l'aide d'une solution de chlorhydrate de berbérine (0,1%) dans l'éthanol. Chaque bande est grattée et extraite avec du chloroforme pendant 10 min. Le mélange est filtré et l'opération est répétée deux fois. Après évaporation du chloroforme, nous obtenons l'heptaacétate de glycoside de bactériohopanetétrol (6 mg) et l'heptaacétate de l'éther de bactériohopanetétrol (2 mg).

Coupure de la chaine latérale des heptaacétate du glycoside de bactériohopanetétrol et de l'éther de bactériohopanetétrol

Le *bis*-homohopan-32-ol est obtenu après coupure de la chaîne latérale du glycoside et de l'éther à l'aide de trois résines Amberlyst IRA 900 (OH^-, IO_4^- ou BH_4^-) activées, qui vont permettre la désacétylation, la coupure et la réduction en une seule réaction.

Préparation résine Amberlyst OH^-

L'Amberlyst IRA-900 (Cl^-) (1 g) est agitée doucement dans une solution aqueuse de NaOH (2 M, 10 mL) pendant 1 h. La résine est ensuite filtrée et rincée avec de l'eau (10 mL), du méthanol (15 mL) et du THF (15 mL).

Préparation résine Amberlyst IO_4^-

L'Amberlyst IRA-900 (Cl^-) (1 g) est agitée doucement dans une solution aqueuse saturée de IO_4^- (10 mL) pendant 1 h. La résine est filtrée, rincée avec de l'eau (10 mL), du méthanol (15 mL) et du THF (15 mL).

Préparation de la résine Amberlyst BH_4^-

L'Amberlyst IRA-900 (Cl^-) est agitée doucement dans une solution aqueuse de $NaBH_4$ (2 M, 10 mL) pendant 2 h. La résine est ensuite filtrée et rincée avec de l'eau (10 mL), du méthanol (15 mL) et du THF (15 mL).

L'heptaacétate du glycoside de bactériohopanetétrol et l'éther de bactériohopanetétrol sont réunis et mis en solution dans un mélange MeOH/THF (1/1, 1 mL). Les trois résines (60 mg chacune) sont ajoutées, et on laisse agiter doucement pendant la nuit. Le mélange est filtré sur verre fritté, et les résines sont rincées avec un mélange MeOH/THF (1/1, 10 mL). Le filtrat est évaporé à l'évaporateur rotatif, et le produit est séché sous vide (3 mg).

Acétylation et purification du *bis*-homohopan-32-ol :

L'alcool obtenu, est acétylé pendant une nuit à température ambiante dans un mélange pyridine/anhydride acétique (1/1 ; v/v ; 250 µL). La pyridine et l'anhydride acétique sont évaporés sous courant d'argon ou à l'évaporateur rotatif selon la quantité de produit. On obtient un extrait brut acétylé (25 mg).

L'extrait acétylé est purifié par chromatographie sur couche mince préparative (Merck, 60 F_{254}, 0,25 mm, cyclohexane/AcOEt, 9/1). L'acétate de *bis*-homohopan-32-ol (R_f = 0.40, réf. Acétate de cholestéryle) est révélé sous lumière UV (356 nm) à l'aide d'une solution de chlorhydrate de berbérine (0,1%) dans l'éthanol. La bande est grattée et extraite avec du dichlorométhane pendant 10 min. La suspension est filtrée, et l'opération est répétée deux fois. Après évaporation du filtrat, nous obtenons l'acétate de *bis*-homohopan-32-ol (1 à 2 mg).

Conditions d'analyse par RMN

RMN ^{13}C:

Fréquence : 150,91 MHz
Fenêtre spectrale : 12820,5 Hz
Nombre de points : 4000
FT : 65536

RMN HSQC :

T1 : 150,91 MHz
Fenêtre spectrale : 7092,67 Hz
Nombre de points : 512

T2 : 600,13 MHz
Fenêtre spectrale : 5411,26 Hz
Nombre de points : 1024

[1] Rohmer, M. ; Knani, M. ; Simonin, P. ; Sutter, B. ; Sahm, H. *Biochem. J.* (1993), *295*, 517-524.
[2] Rohmer, M. *Nat. Prod. Rep.* (1999), *16*, 565-574.
[3] Rohmer, M. *Pure Appl. Chem.* (2003), *75*, 375-387.
[4] Proteau P. J. ; Woo Y. H. ; Williamson T. ; Phaosiri C., *Org. Lett*. (1999), *1*, 921-923.
[5] Laupitz, R. ; Gräwert, T. ; Rieder, C. ; Zepeck, F. ; Bacher, A. ; Arigoni, D. ; Rordich, F. ; Eisenreich, W. *Chem. Biodiv.* (2004), *1*, 1367-1376.
[6] Renoux, J-M. ; Rohmer, M. *Eur. J. Biochem.* (1985), *151*, 405-410.
[7] Flesch, G. ; Rohmer, M. *Biochem. J.* (1989), *262*, 673-675.
[8] Poulter, C.D. *Phytochem. Reviews* (2006), *5*, 17-26.
[9] Liang, P-H. *Biochemistry* (2009), *48*¸6562-6570.
[10] Mookhtiar, K.A. ; Kalinowski, S.S. ; Zhang, D. ; Poulter, C.D. *J. Biol. Chem.* (1994), *269*, 11201-112070
[11] Poulter, C.D. *Acc. Chem. Res.* (1990), *23*, 70-77.
[12] Abe, I. ; Rohmer, M. ; Prestwich, G.D. *Chem. Rev.* (1993), *93*, 2198-2206.
[13] Flesch, G. ; Rohmer, M. *Eur.J. Biochem.* (1988), *175*, 405-411.
[14] Rohmer, M. ; Sutter, B. ; Sahm, H. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1989), 1471-1472.
[15] Swings, J. ; De Ley, J. *Bact. Rev.* (1977), *47*, 1-46.
[16] Barow, K.D. ; Rogers, P.L. ; Smith, G.M. *Eur. J. Biochem.* (1986), *157*, 195-202.
[17] Charon, L. Thèse, Université Louis Pasteur, France (2000)
[18] Radykewicz, T. ; Rohdich, F. ; Wungsintaweekul, J. ; Herz, S. ; Kis, K. ; Eisenreich, W. ; Bacher, A. ; Zenk, M.H. ; Arigoni, D. *FEBS Lett*. (2000), *465*,157-160
[19] Wolff, M. ; Seemann, M. ; Tse Sum Bui, B. ; Frapart, Y. ; Tritsch, D. ; Estrabot, A.G. ; Rodriguez-Conception, M. ; Boronat, A. ; Marquet, A. ; Rohmer, M. *FEBS Lett*. (2003) ; *541*, 115-120
[20] Rohmer, M. *Pure Appl. Chem.* (2007), *19*, 739-751.
[21] Munos, J.W. ; Pu, X. ; Mansoorabadi, S.O. ; Kim, H.J. ; Liu, H-W. *J. Am. Chem. Soc.* (2009), *131*, 2048-2049.
[22] Wong, U. ; Cox, R.J. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2007), *119*, 5014-5017.
[23] Fox, D.T. ; Poulter, C.D. *Biochemistry* (2005), *44*, 8360-8368.
[24] Neunlist, S. ; Rohmer, M. *Biochem.J.* (1985), 228, 769-771.
[25] Brandley, A.S. ; Pearson, A. ; Saenz, J.P. ; Marx, C.J. *Org. Geochem.* (2010), *41*, 1075-1081.
[26] Stampf, P. Thèse, Université de Haute Alsace, Mulhouse, France (1992).
[27] Duvold, T. Thèse, Université Louis Pasteur, France (1997).

Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps, à la recherche d'inhibiteurs de la voie du MEP et plus particulièrement de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS), une cible potentielle pour le développement d'agents antimicrobiens et dans un deuxième temps à la détermination de l'origine des atomes d'hydrogène introduit lors des étapes de réduction de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle (IPP) et du diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) par la voie du MEP ainsi que lors de la formation du squelette bactériohopane des triterpènoïdes bactériens.

La première partie de ce travail est consacrée à la synthèse d'inhibiteurs potentiels de type accepteurs de Michael. Cinq dérivés de l'acide benzylidènepyruvique ont été synthétisés et testés sur la DXS *d'E. coli.* Parmi ces composés, l'acide *p*-hydroxybenzylidènepyruvique **34**, l'acide *p*-méthoxybenzylidènepyruvique **35** et l'acide *p*-nitrobenzylidènepyruvique **37** possèdent une activité inhibitrice modeste (39 à 61% d'inhibition à 1 mM). Contrairement à notre attente, du fait de leur réactivité, ils ne semblent inactiver la DXS. L'acide 2-oxo-3-butynoïque **46** par contre n'a aucun effet sur la DXS. L'acétylphosphinate **49**, analogue phosphoré du pyruvate, inhibe uniquement de manière réversible la DXS (41% d'inhibition à 1 mM). Les analogues tri- et dihalogénés du pyruvate donnent des résultats prometteurs. Parmi ces composés le trifluoropyruvate **55** est le plus efficace. Il pourrait être un inhibiteur de type « slow-binding », car la préincubation de ce composé avec l'enzyme augmente son pouvoir inhibiteur. Ces analogues halogénés du pyruvate ne conduisent pas à une inactivation de l'enzyme. Des tests complémentaires, en utilisant la méthode combinée DXS-DXR devront permettre de confirmer ces résultats.

Le K_m de l'enzyme pour le pyruvate est plutôt élevé (K_m = 2 mM). La DXS semble donc avoir une faible affinité pour le pyruvate. Les composés synthétisés inhibant l'enzyme, qui sont des analogues du pyruvate, paraissent avoir une affinité proche de celle du pyruvate. Pour inhiber efficacement l'enzyme, il est cependant nécessaire d'utiliser des quantités importantes de ces composés. Il est fort probable qu'*in vivo* ce type d'inhibiteur ne soit pas capable d'arrêter la croissance bactérienne, car il faudrait des concentrations considérables.De plus comme accepteurs de Michael, ils sont très certainement peu sélectifs. Il serait donc intéressant de se diriger vers d'autres types d'inhibiteurs. L'oxoclomazone n'a quasiment aucun effet sur la DXS d'*E. coli*, par contre elle inhibe celle de *Catharanthus roseus* à hauteur de 47% pour une concentration de 20 µM. En partant de la structure de l'oxoclomazone, il

serait intéressant de développer de nouvelles molécules susceptibles de se lier efficacement à la DXS de bactérie.

Le 3-(4-chloro-phényl)-5-benzyl-4*H*-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-one **32**, qui a été décrit dans un premier temps comme inhibiteur de transcétolase, est aussi un inhibiteur de la DXS de *Mycobacterium tuberculosis.* Des dérivés de ce composé ont été testés sur la DXS et certains montrent une meilleure activité inhibitrice que le composé **32**. En partant d'autres inhibiteurs de transcétolase, il serait intéressant de développer de nouvelles molécules pouvant être de bons inhibiteurs de la DXS.

La seconde partie de ce travail a été consacrée à l'élucidation de la provenance des atomes d'hydrogène introduit lors des étapes de réduction de la biosynthèse des hopanoïdes bactériens : biosynthèse de l'IPP et du DMAPP par la voie du MEP, formation du squelette bactériohopane. Pour ce travail, nous avons étudié les triterpènes pentacycliques de série hopane de *Zymomonas mobilis* par RMN ^{13}C par addition simultanée dans le milieu de culture de [1-^{2}H]glucose et de différents isotopomères du glucose marqué au ^{13}C en position C-2, C-3, C-4, C-5 ou C-6. Le métabolisme de *Zymomonas mobilis* conduit à la synthèse d'un mélange équimolaire de (*S*)-[4-^{2}H]NADP^{2}H et de (*R*)-[4-^{2}H]NADP^{2}H à partir du [1-^{2}H]glucose. Les atomes de deutérium ont été localisés en analysant les déplacements des signaux du ^{13}C induits par la présence de deutérium sur le carbone α, β, γ. La DXR, catalysant la première étape de réduction, a introduit un deutérium en position C-4 de l'unité isoprénique (Figure 1 a). Par notre étude, nous avons confirmé que LytB, qui catalyse la seconde étape de réduction, introduit un deutérium en C-2 de l'unité isoprénique conduisant ainsi à l'IPP. Nous avons également montré qu'elle introduit un deutéirum en position C-4, donnant ainsi le DMAPP (Figure 1 a). Ces deutériums proviennent de façon indirecte du NADPH marqué. De plus lors des analyses des spectres RMN ^{13}C et deux dimensions, nous avons pu constater que les deutériums introduits ne se retrouvent pas toujours sur la même face du squelette hopane (H_α et H_β) (Figure 1 b). Nous avons pu en déduire qu'il y avait isomérisation de l'IPP en DMAPP, ce qui peut uniquement s'expliquer par la présence d'une IPP isomérase active chez *Zymomonas mobilis*.

La chaîne latérale polyhydroxylée en C5 des dérivés du bactériohopane provient d'un dérivé du D-ribose lié par son carbone C-5 au squelette triterpénique. Cette réaction de couplage entre un précurseur triterpénique et un D-pentose requiert une étape de réduction matérialiséee par l'introduction d'un hydrogène en C-22. Lors des incubations précédentes, en

présence de [1-^{2}H]glucose nous avons montré que C-22 ne portait pas de deutérium, mais un atome d'hydrogène. Cela veut dire que le NADPH n'est pas la source de cet hydrogène échangeable provenant du milieu extérieur, par exemple par protonation d'un anion par un site actif ou par transfert d'un H$^{\bullet}$ radical à partir d'une cystéine.

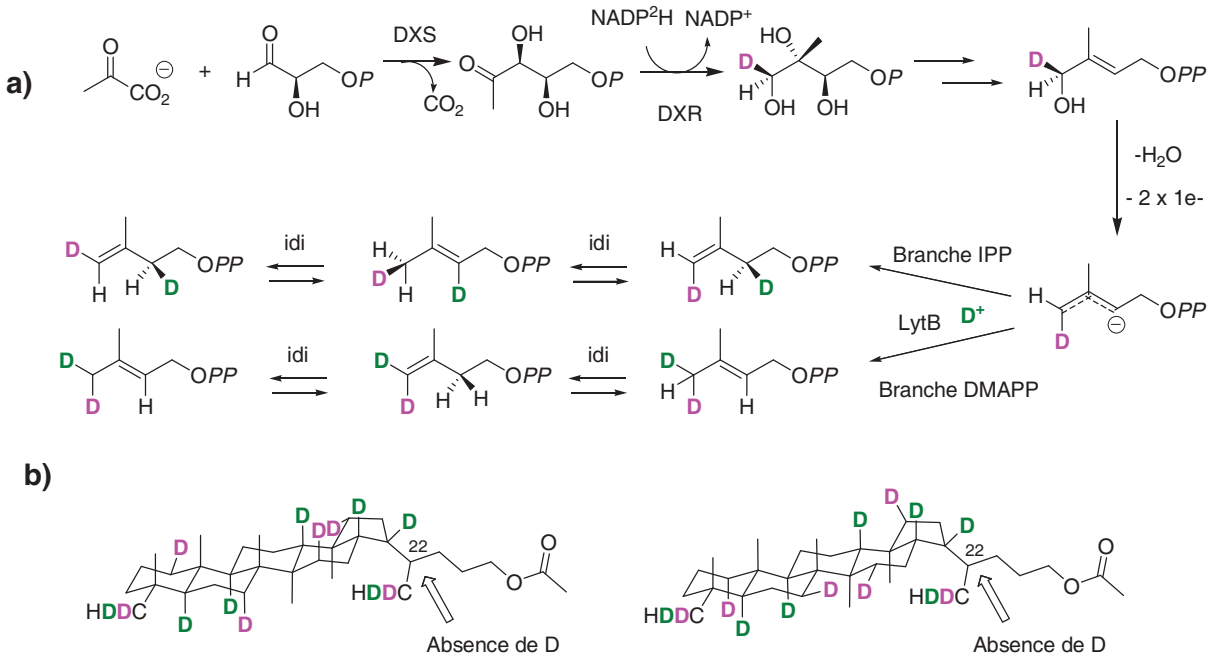
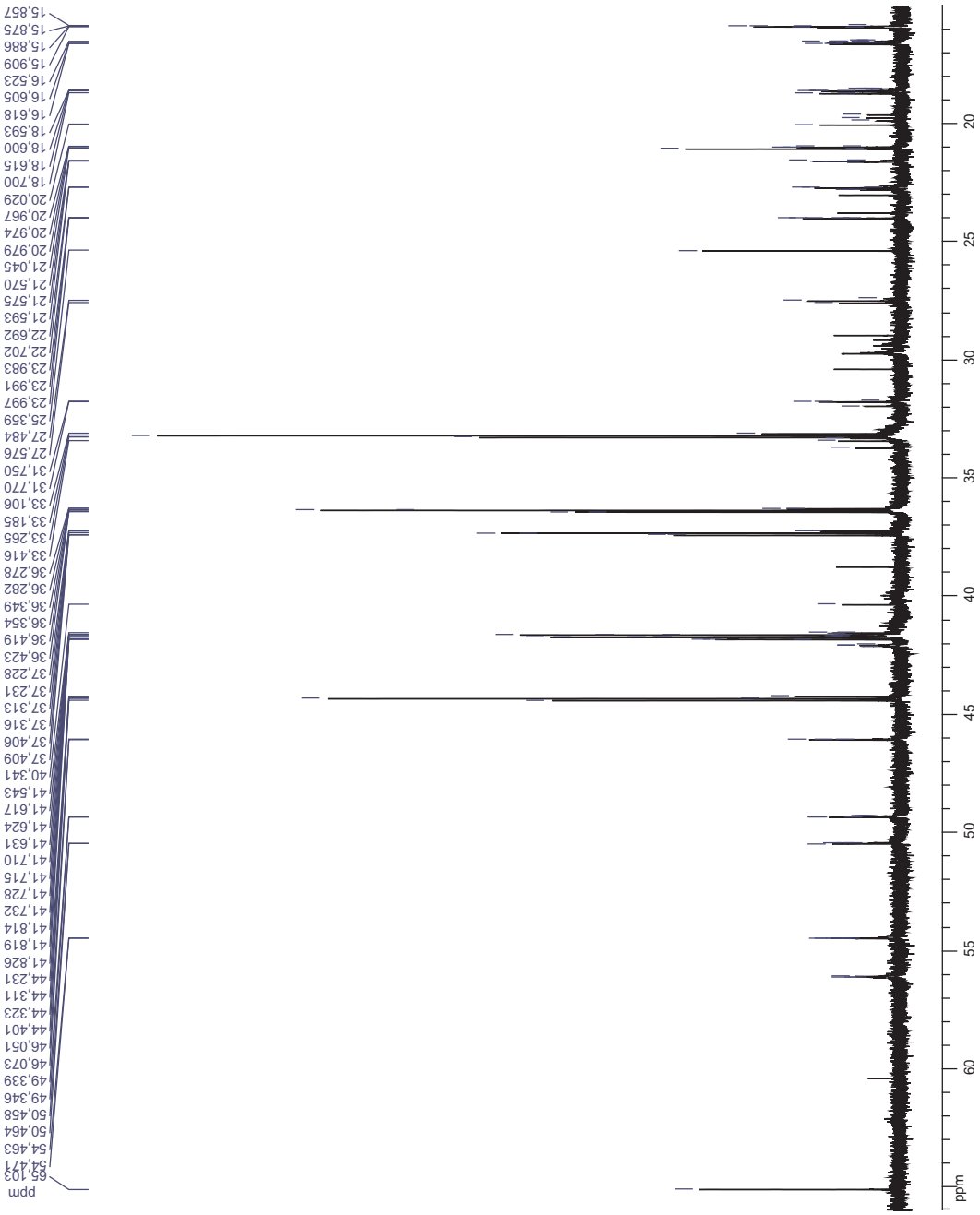


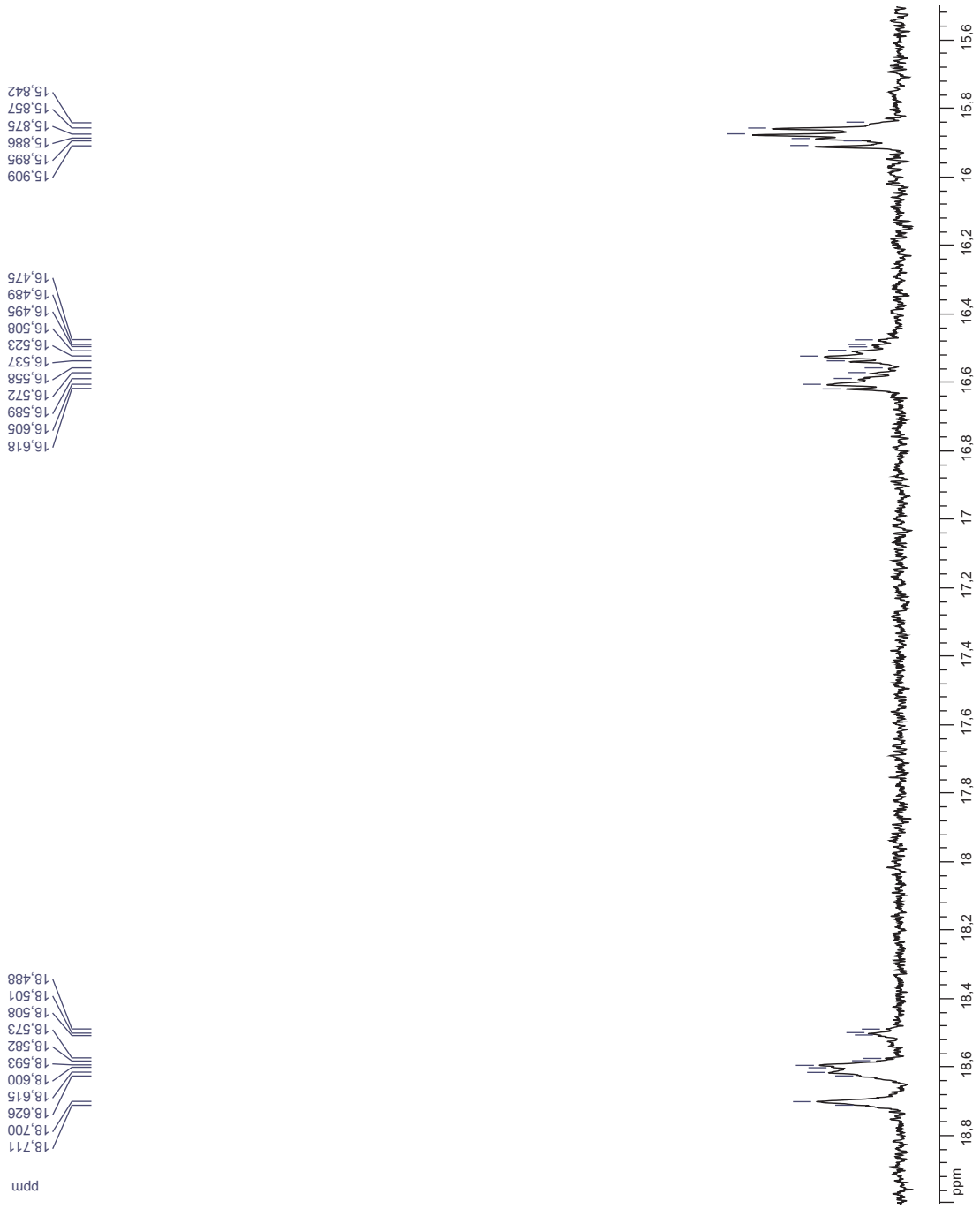
Figure 1 : a)Transfert du deutérium du NADPH à l'IPP et au DMAPP et isomérisation de l'IPP et du DMAPP ; b) Marquages observés sur le bactériohopane.

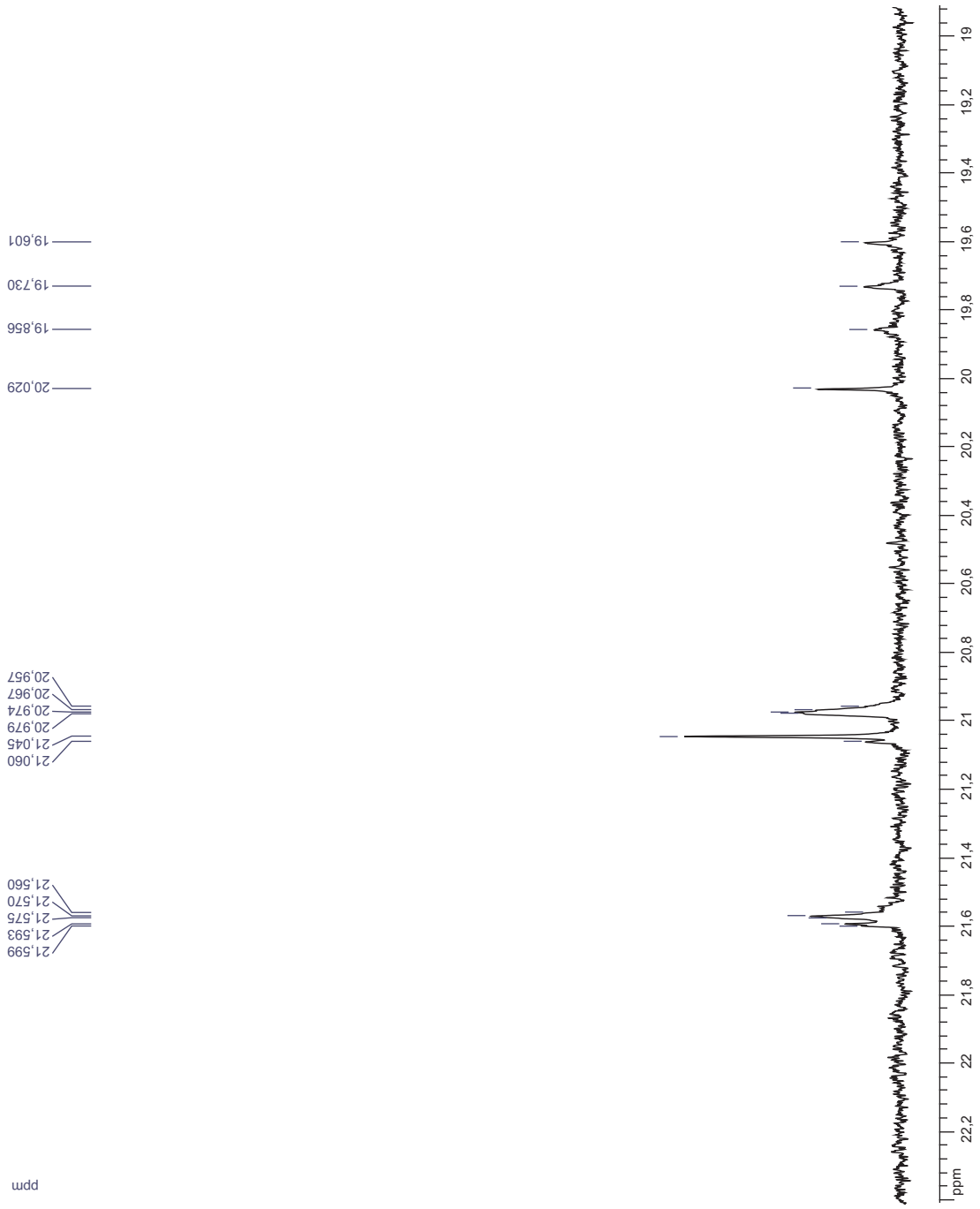
Annexes

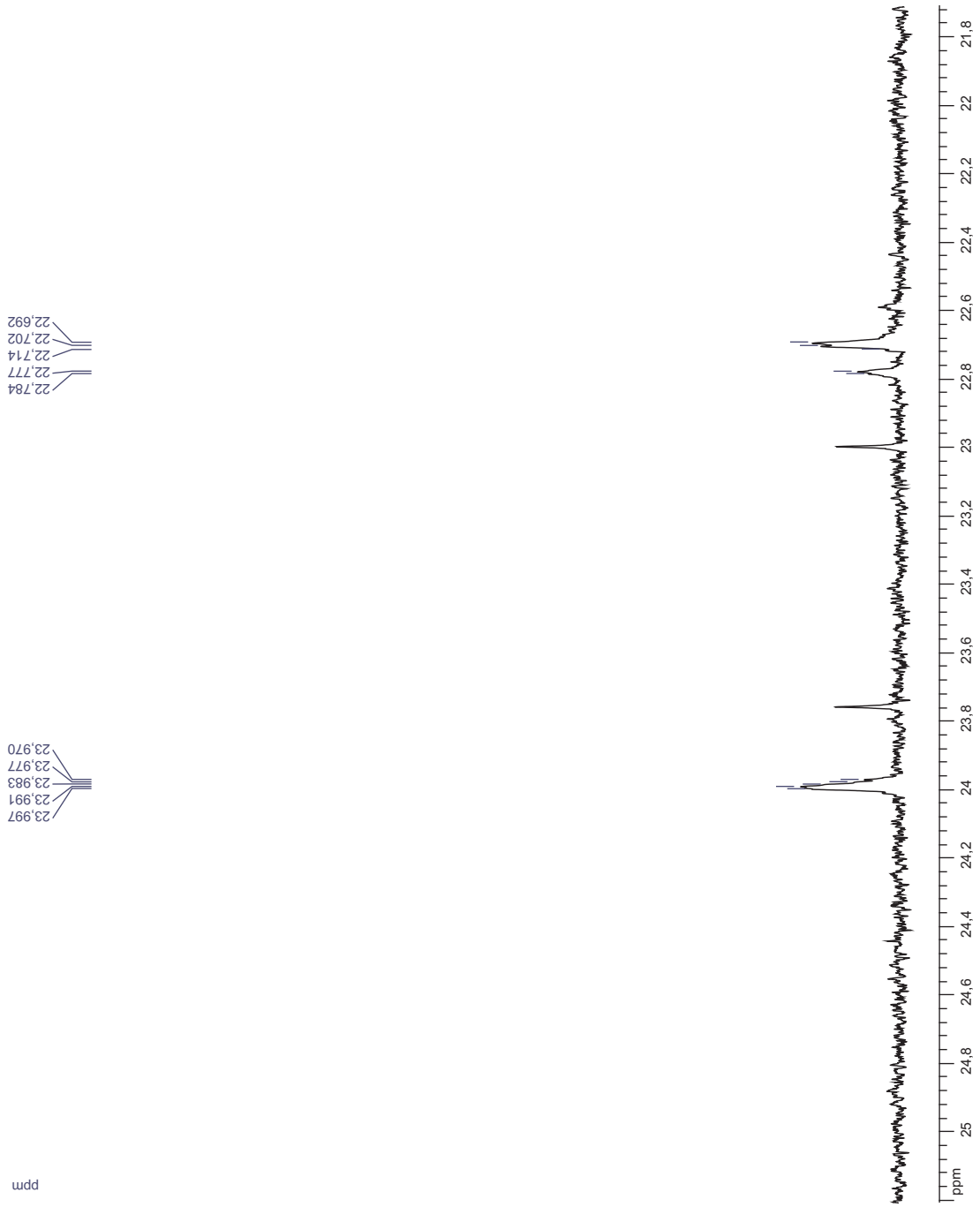
Annexe 1

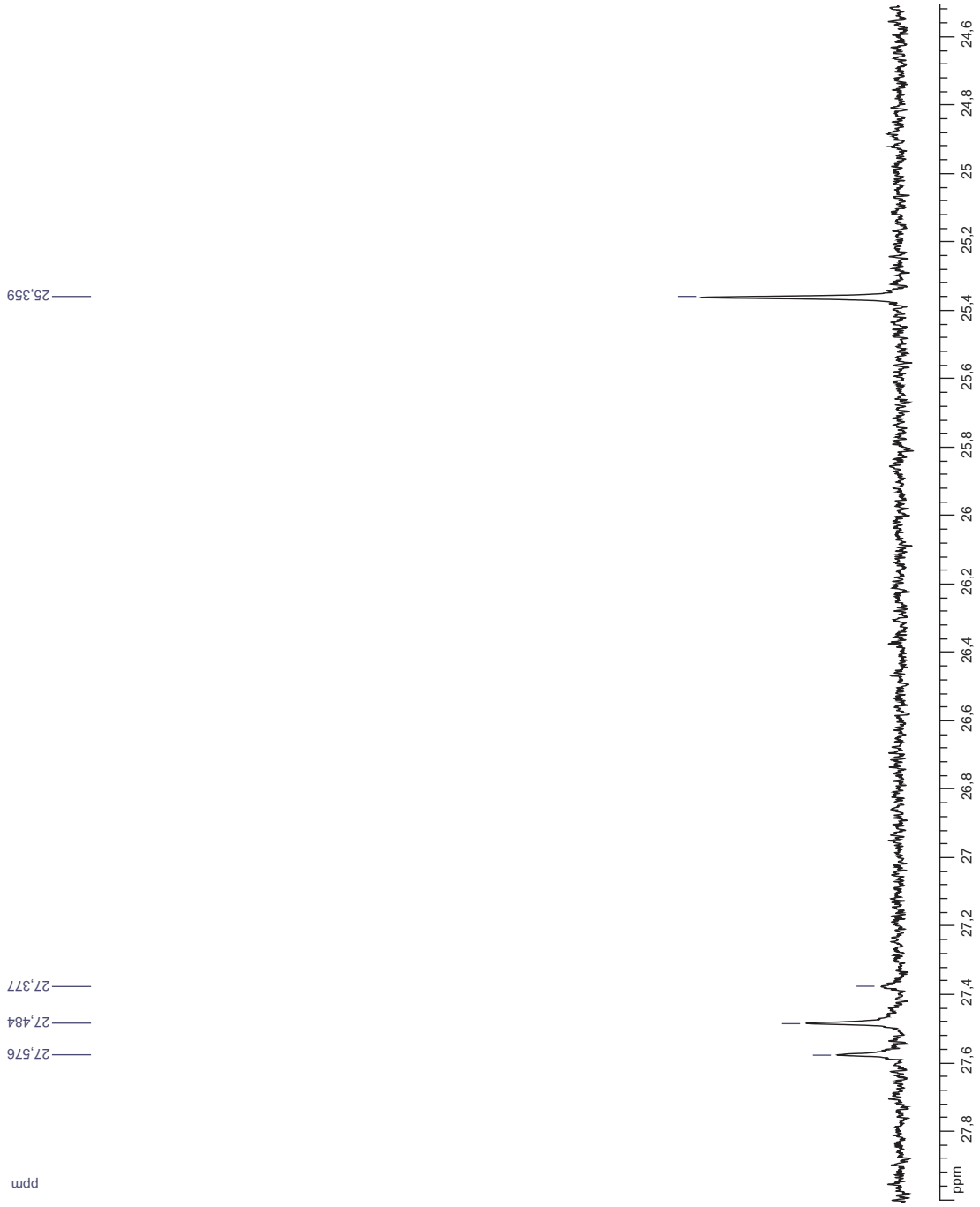
Spectre de RMN ^{13}C de l'acétate de bishomohopanol obtenu à partir des hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* après incorporation du [2-^{13}C]glucose

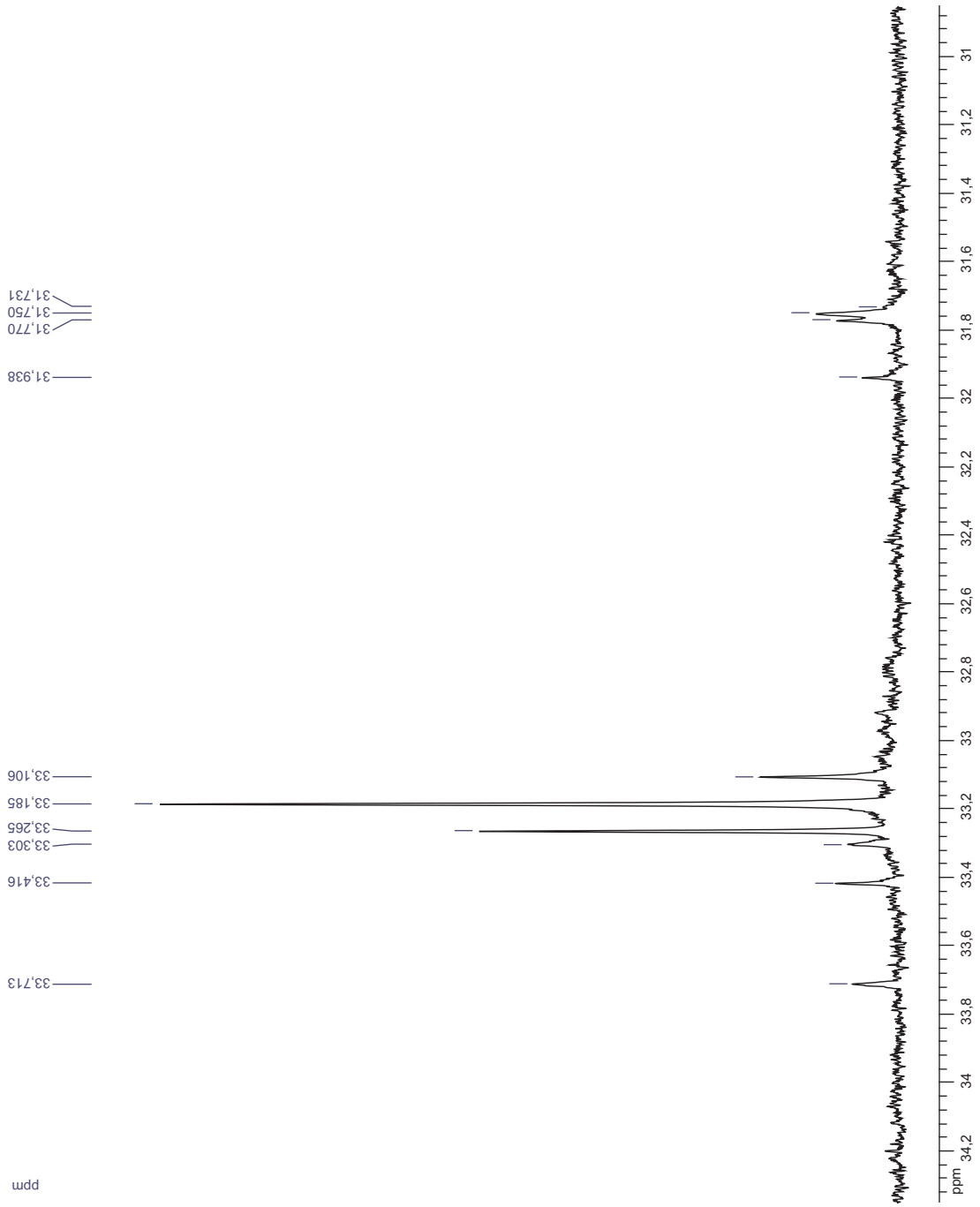

15,857
15,875
15,886
15,909
16,523
16,605
16,618
18,593
18,600
18,615
18,700
20,029
20,967
20,974
20,979
21,045
21,570
21,575
21,593
22,692
22,702
23,983
23,991
23,997
25,359
27,484
27,576
31,750
31,770
33,106
33,185
33,265
33,416
36,278
36,282
36,349
36,354
36,419
36,423
37,228
37,231
37,313
37,316
37,406
37,409
40,341
41,543
41,617
41,624
41,631
41,710
41,715
41,728
41,732
41,814
41,819
41,826
44,231
44,311
44,323
44,401
46,051
46,073
49,339
49,346
50,458
50,464
54,463
54,471
65,103
ppm
20
25
30
35
40
45
50
55
60
ppm

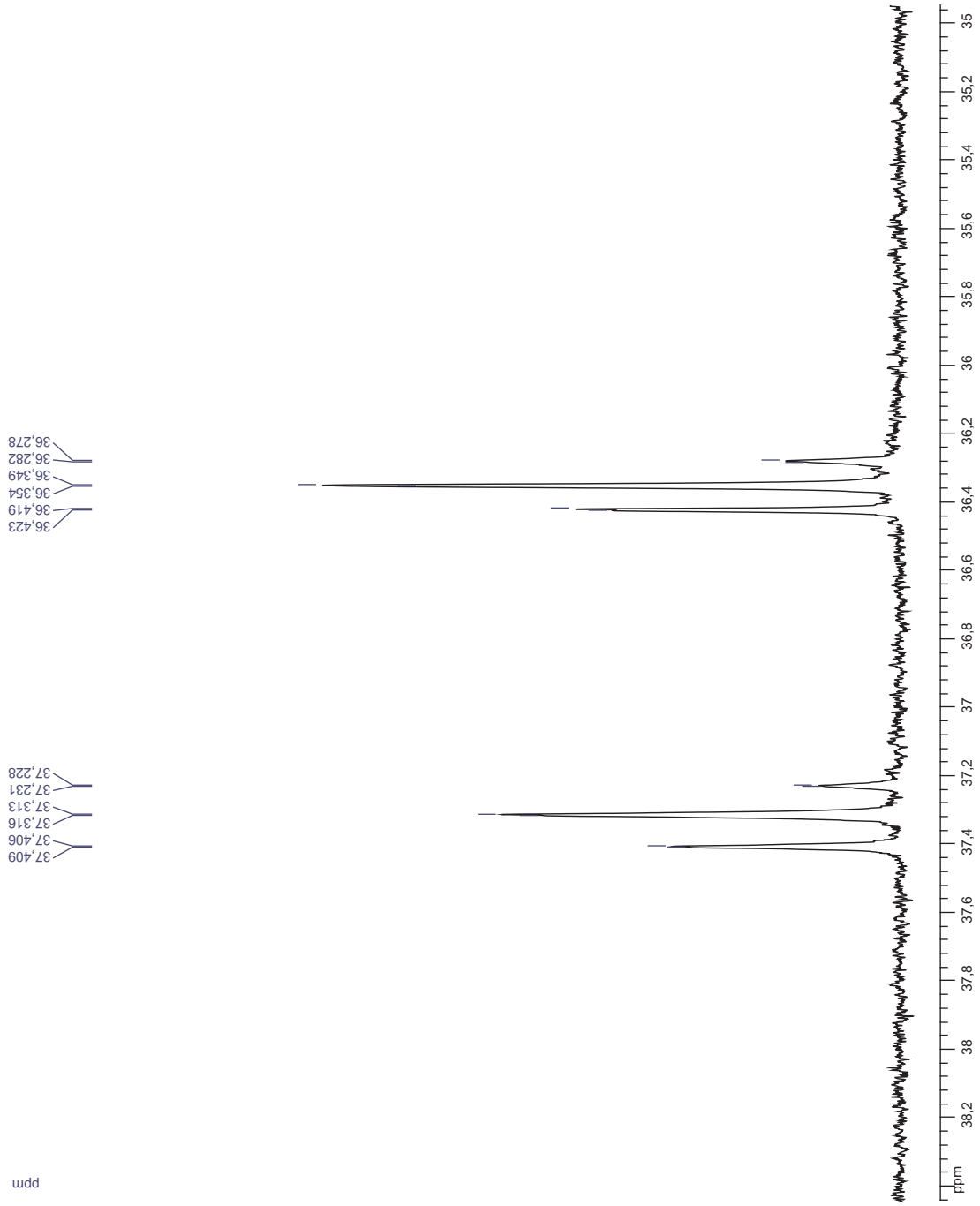

ppm
18,711
18,700
18,626
18,615
18,600
18,593
18,582
18,573
18,508
18,501
18,488
16,618
16,605
16,589
16,572
16,558
16,537
16,523
16,508
16,495
16,489
16,475
15,909
15,895
15,886
15,875
15,857
15,842
ppm
18,8
18,6
18,4
18,2
18
17,8
17,6
17,4
17,2
17
16,8
16,6
16,4
16,2
16
15,8
15,6

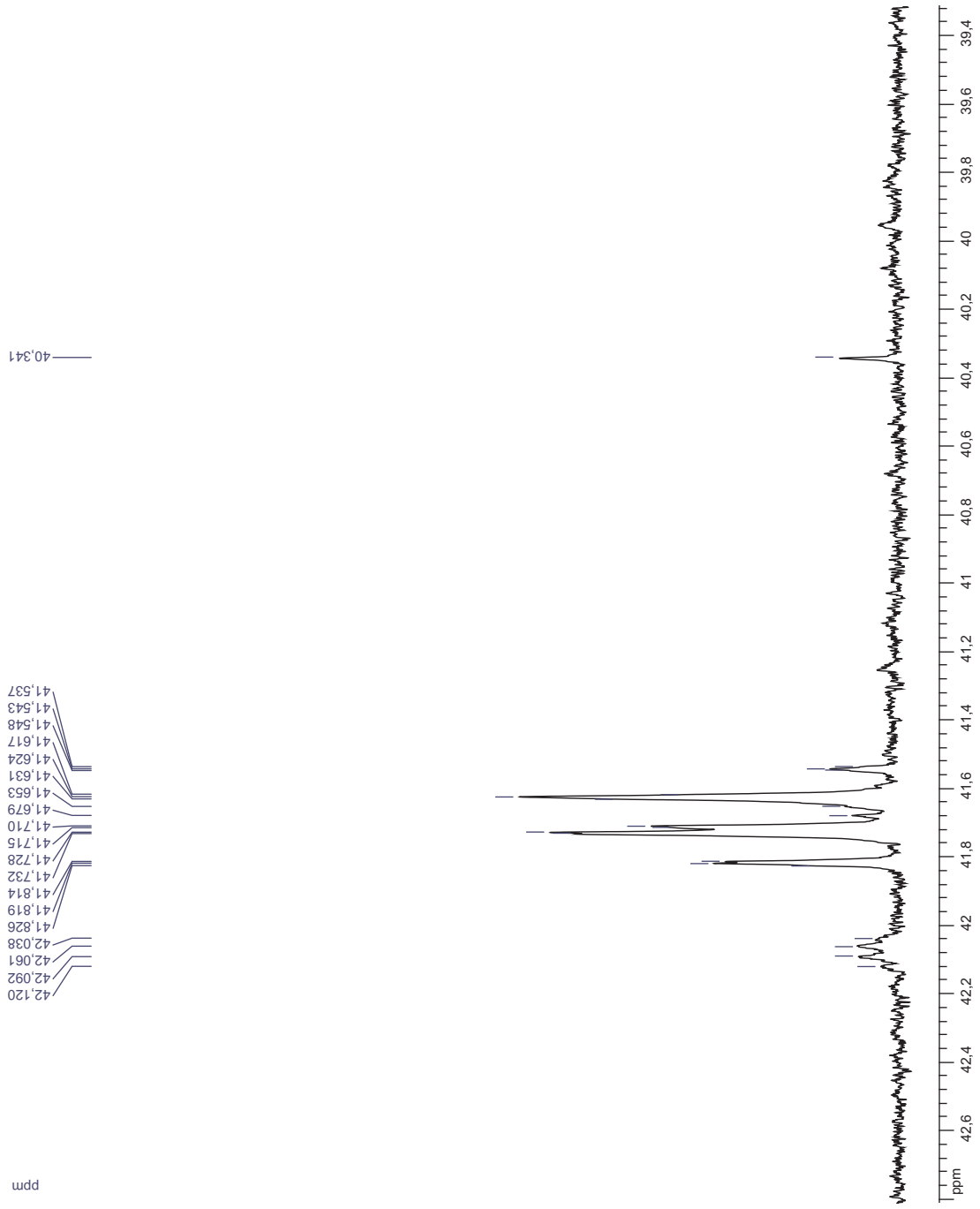

ppm
22,2
22
21,8
21,6
21,4
21,2
21
20,8
20,6
20,4
20,2
20
19,8
19,6
19,4
19,2
19
21,599
21,593
21,575
21,570
21,560
21,060
21,045
20,979
20,974
20,967
20,957
20,029
19,856
19,730
19,601

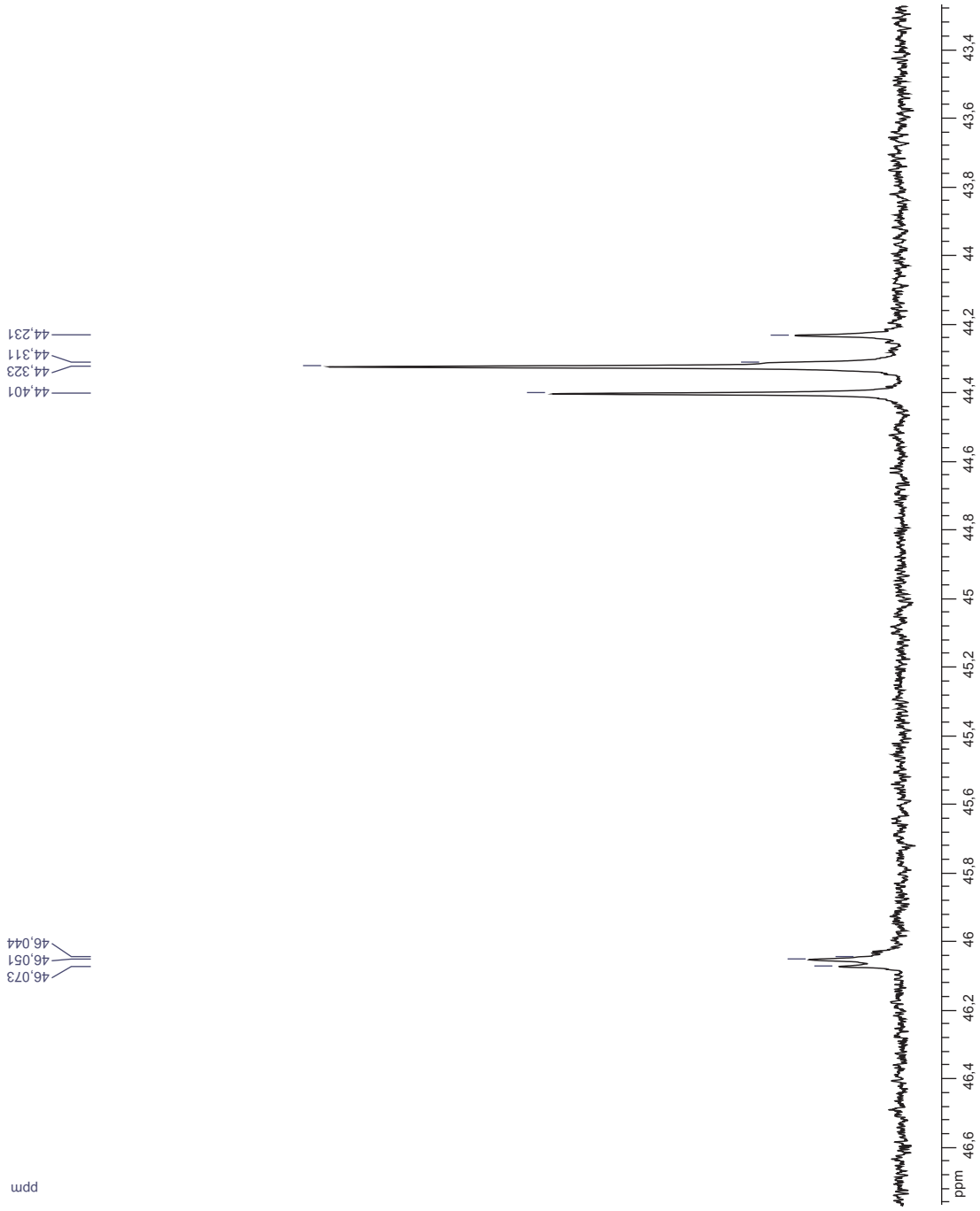

ppm
25
24,8
24,6
24,4
24,2
24
23,8
23,6
23,4
23,2
23
22,8
22,6
22,4
22,2
22
21,8
23,997
23,991
23,983
23,977
23,970
22,784
22,777
22,714
22,702
22,692

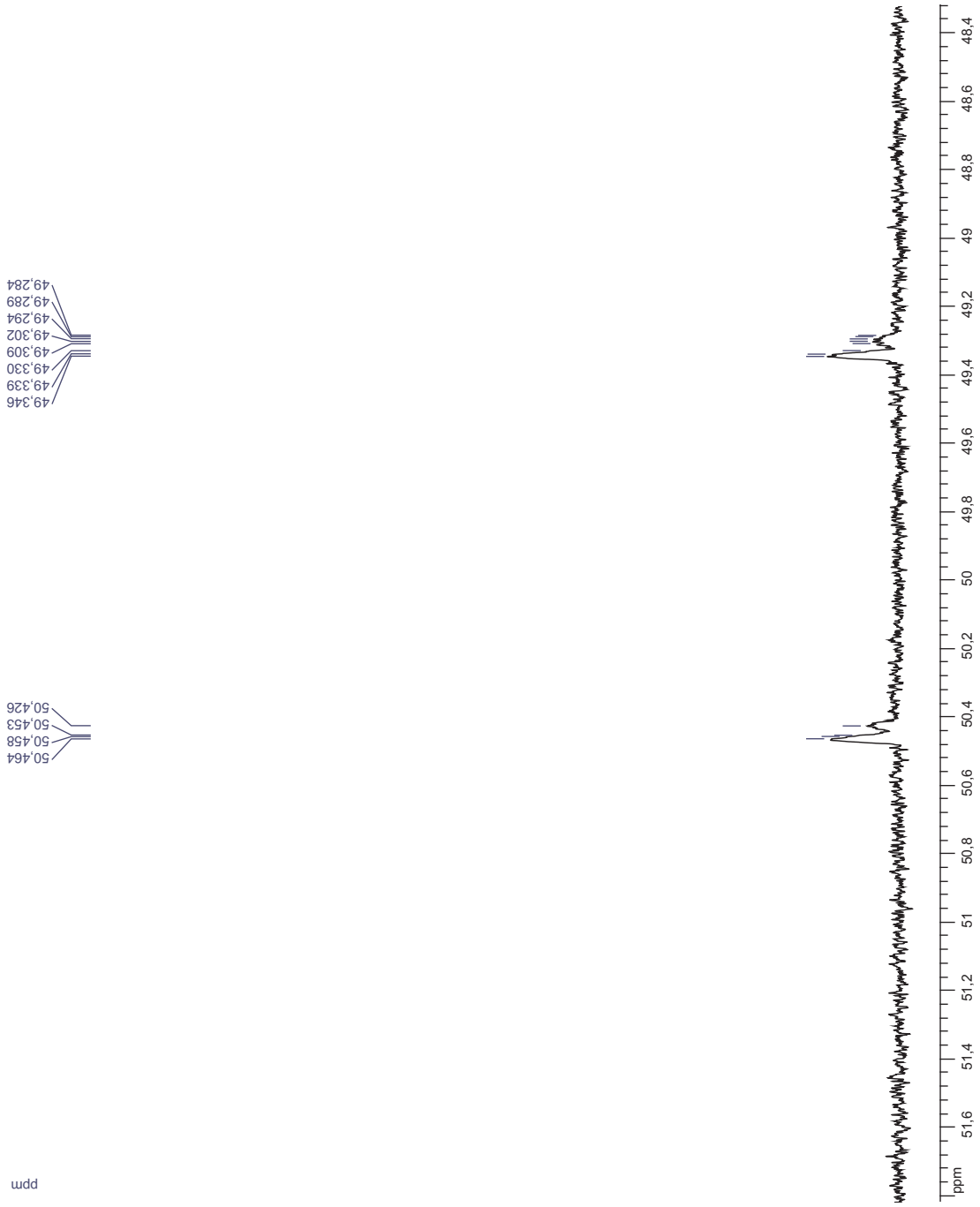

ppm
27,576
27,484
27,377
25,359
27,8
27,6
27,4
27,2
27
26,8
26,6
26,4
26,2
26
25,8
25,6
25,4
25,2
25
24,8
24,6
ppm

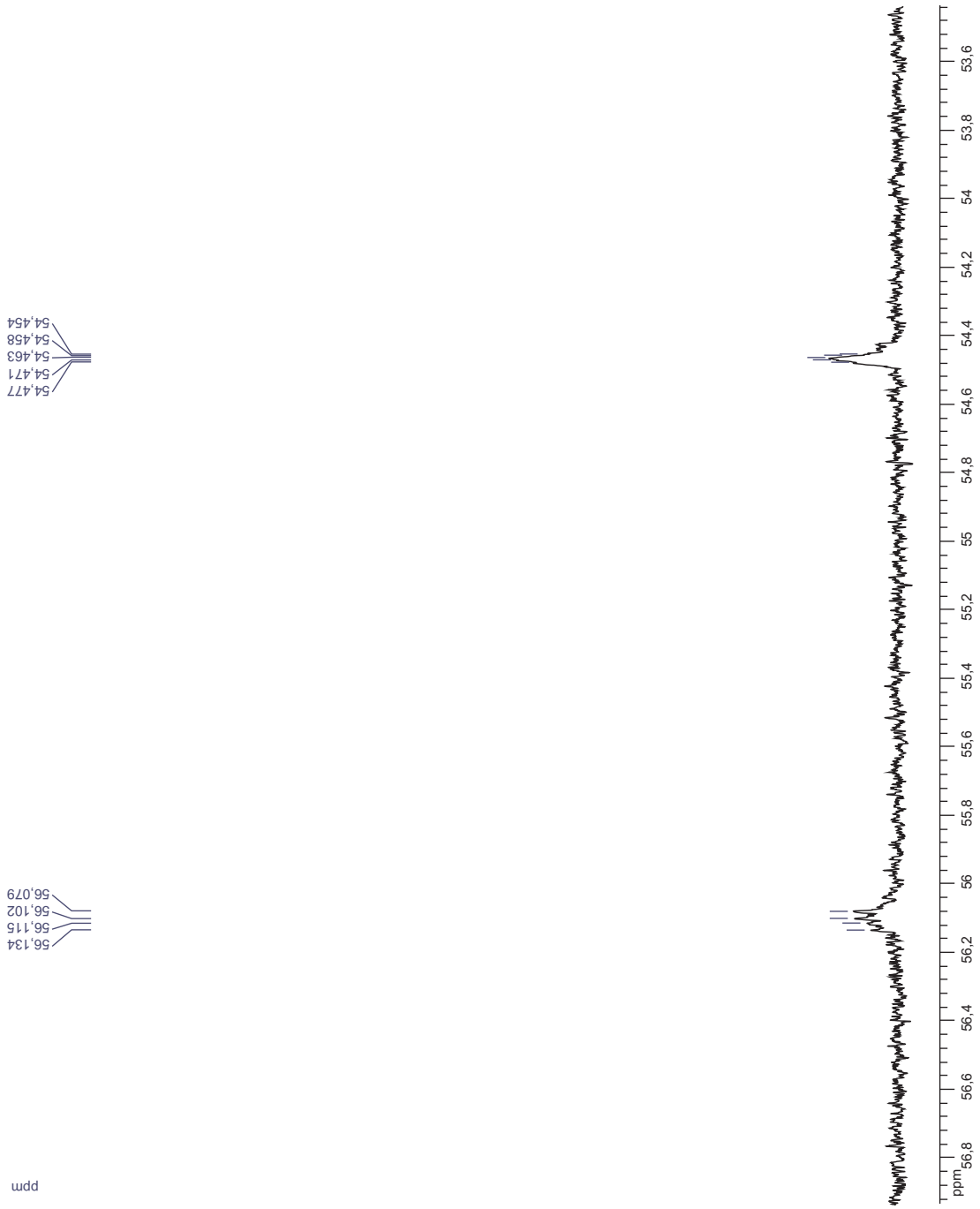

ppm
34,2
34
33,8
33,6
33,4
33,2
33
32,8
32,6
32,4
32,2
32
31,8
31,6
31,4
31,2
31
33,713
33,416
33,303
33,265
33,185
33,106
31,938
31,770
31,750
31,731


ppm
37,409
37,406
37,316
37,313
37,231
37,228
36,423
36,419
36,354
36,349
36,282
36,278
ppm
38,2
38
37,8
37,6
37,4
37,2
37
36,8
36,6
36,4
36,2
36
35,8
35,6
35,4
35,2
35


ppm
42,6
42,4
42,2
42
41,8
41,6
41,4
41,2
41
40,8
40,6
40,4
40,2
40
39,8
39,6
39,4
42,120
42,092
42,061
42,038
41,826
41,819
41,814
41,732
41,728
41,715
41,710
41,679
41,653
41,631
41,624
41,617
41,548
41,543
41,537
40,341


ppm
46,6
46,4
46,2
46
45,8
45,6
45,4
45,2
45
44,8
44,6
44,4
44,2
44
43,8
43,6
43,4
46,073
46,051
46,044
44,401
44,323
44,311
44,231

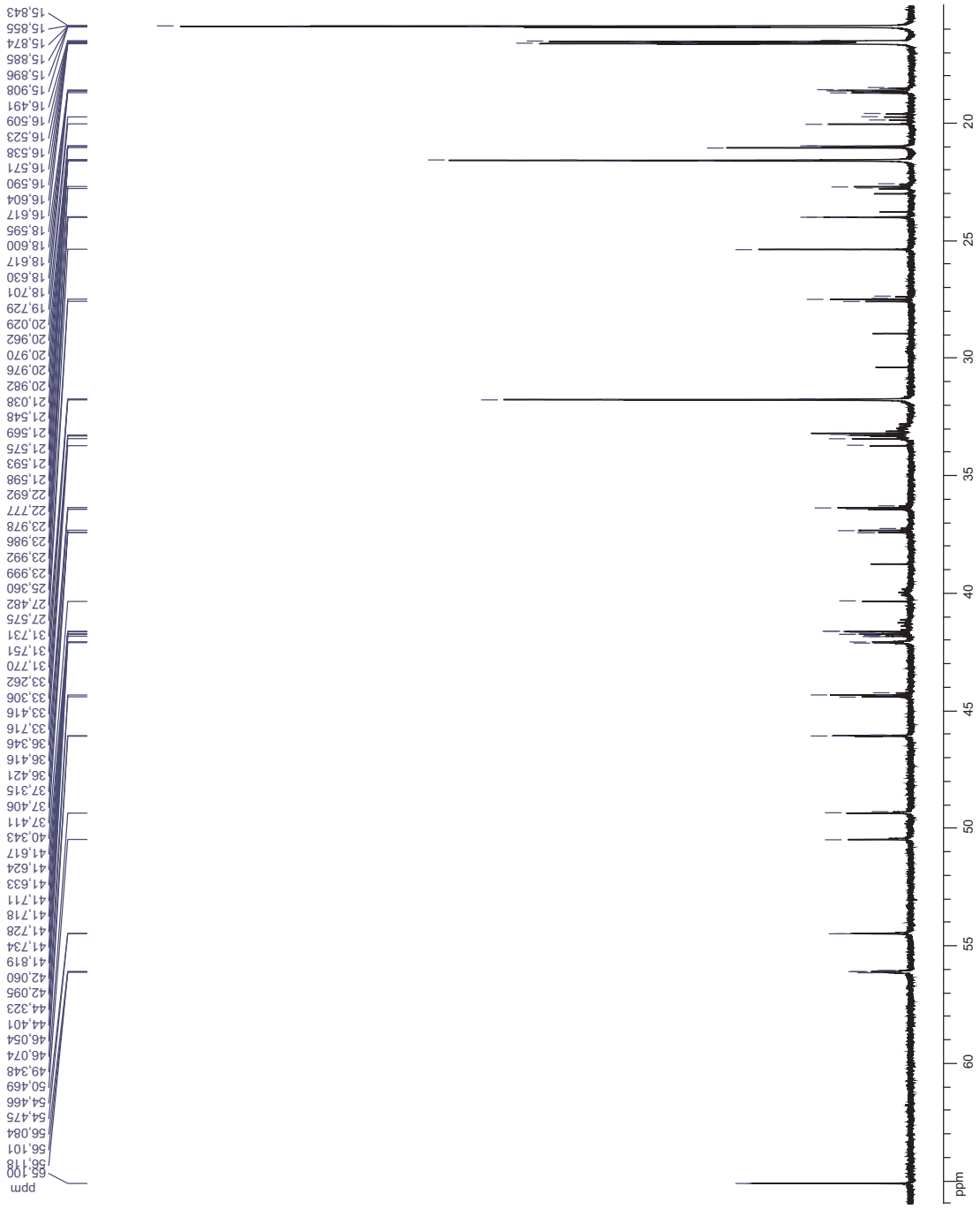

50,464
50,458
50,453
50,426
49,346
49,339
49,330
49,309
49,302
49,294
49,289
49,284
ppm
ppm
51,6
51,4
51,2
51
50,8
50,6
50,4
50,2
50
49,8
49,6
49,4
49,2
49
48,8
48,6
48,4

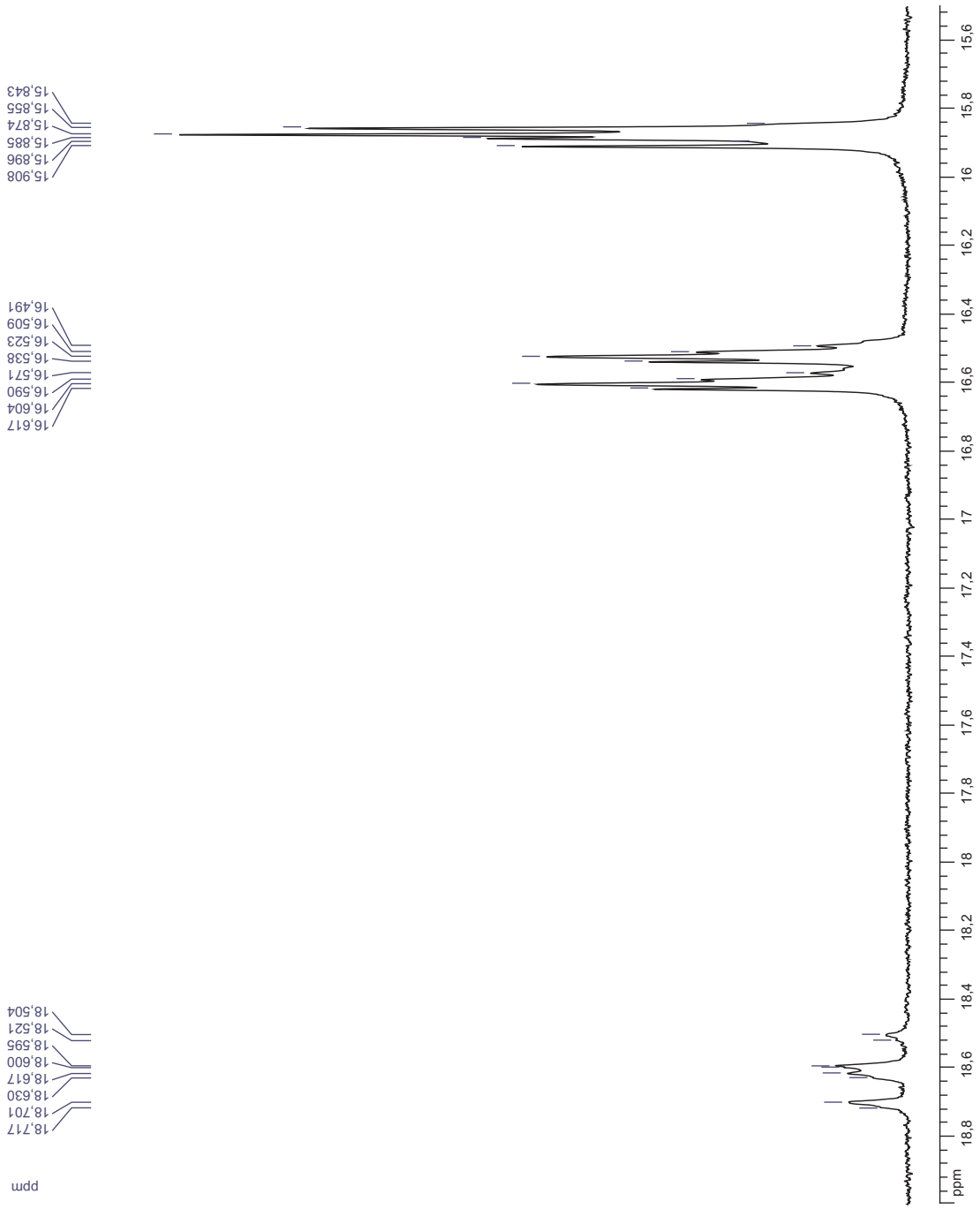

ppm
56,134
56,115
56,102
56,079
54,477
54,471
54,463
54,458
54,454
ppm
56,8
56,6
56,4
56,2
56
55,8
55,6
55,4
55,2
55
54,8
54,6
54,4
54,2
54
53,8
53,6

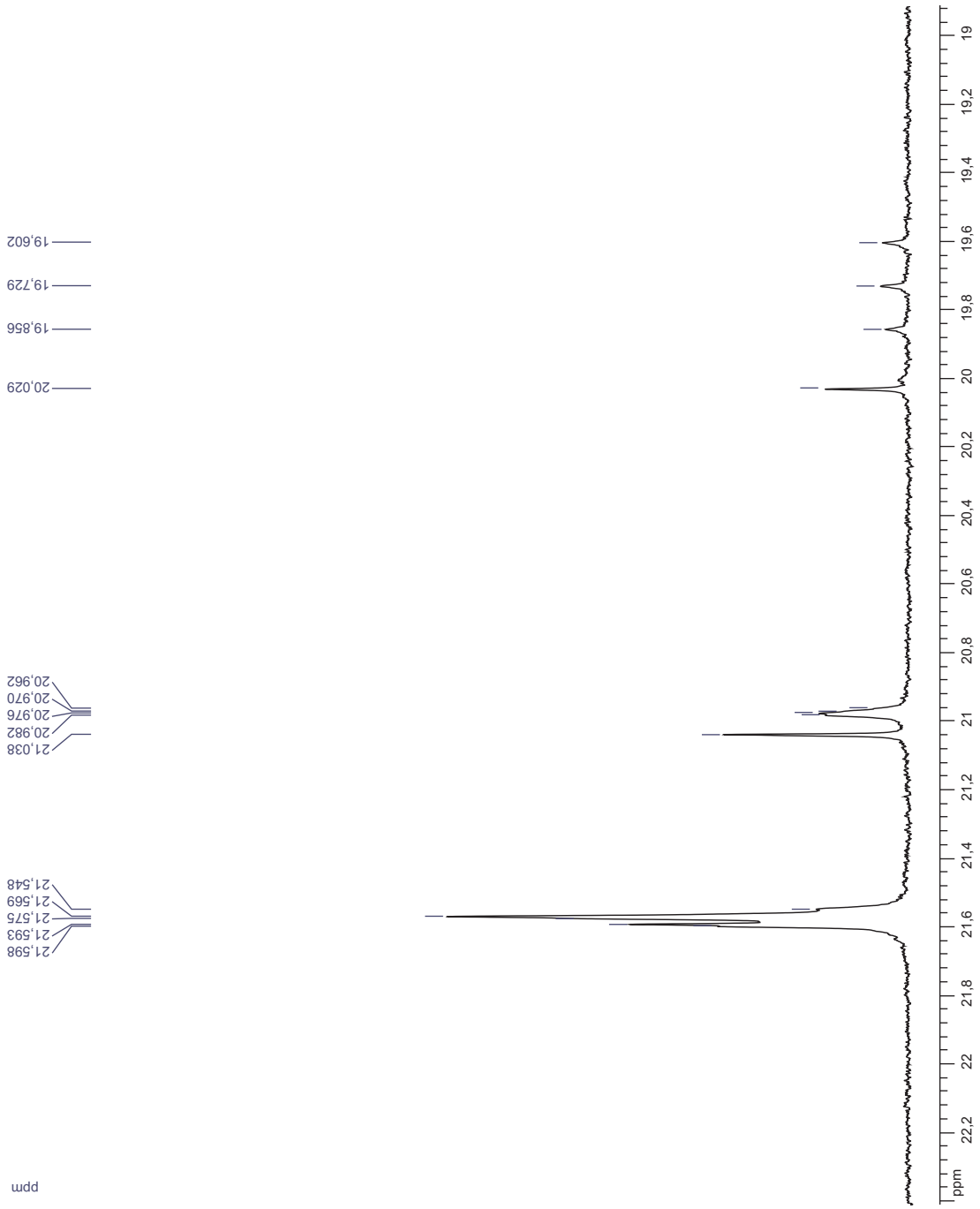
65,103
ppm
66
65,8
65,6
65,4
65,2
65
64,8
64,6
64,4
64,2
64
63,8
63,6
63,4
63,2
63
62,8
ppm

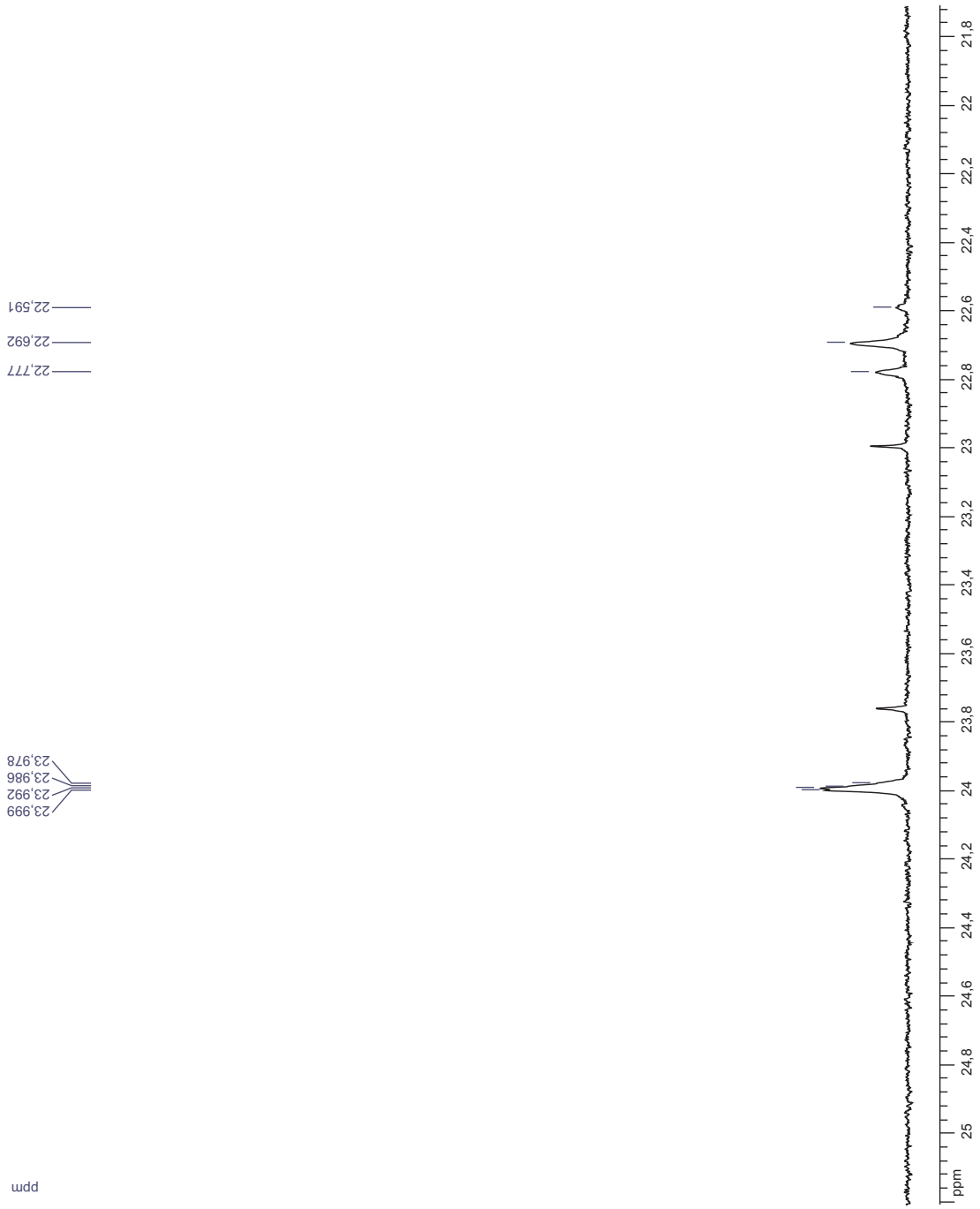
Annexe 2

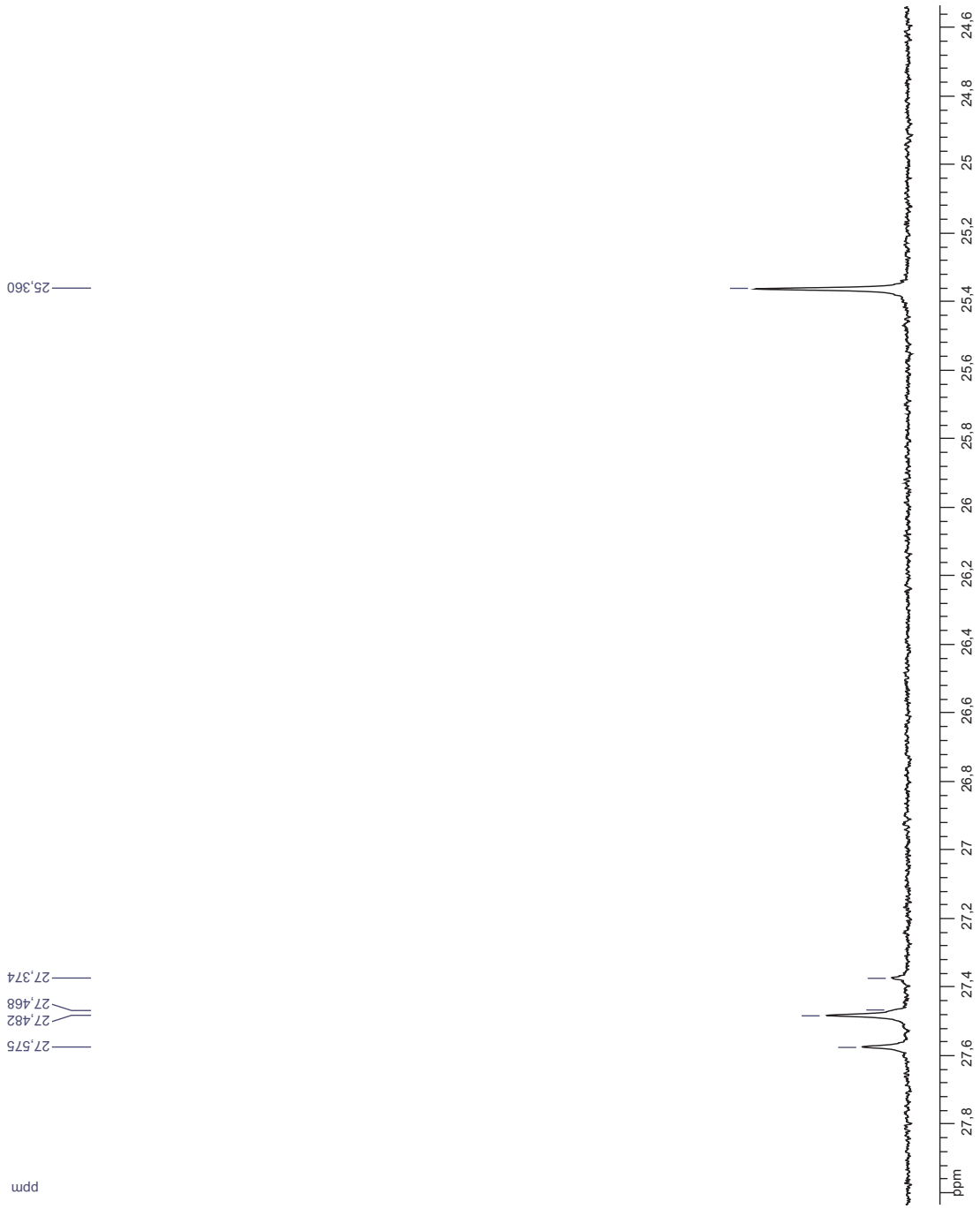
Spectre de RMN ^{13}C de l'acétate de bishomohopanol obtenu à partir des hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* après incorporation du [3-^{13}C]glucose

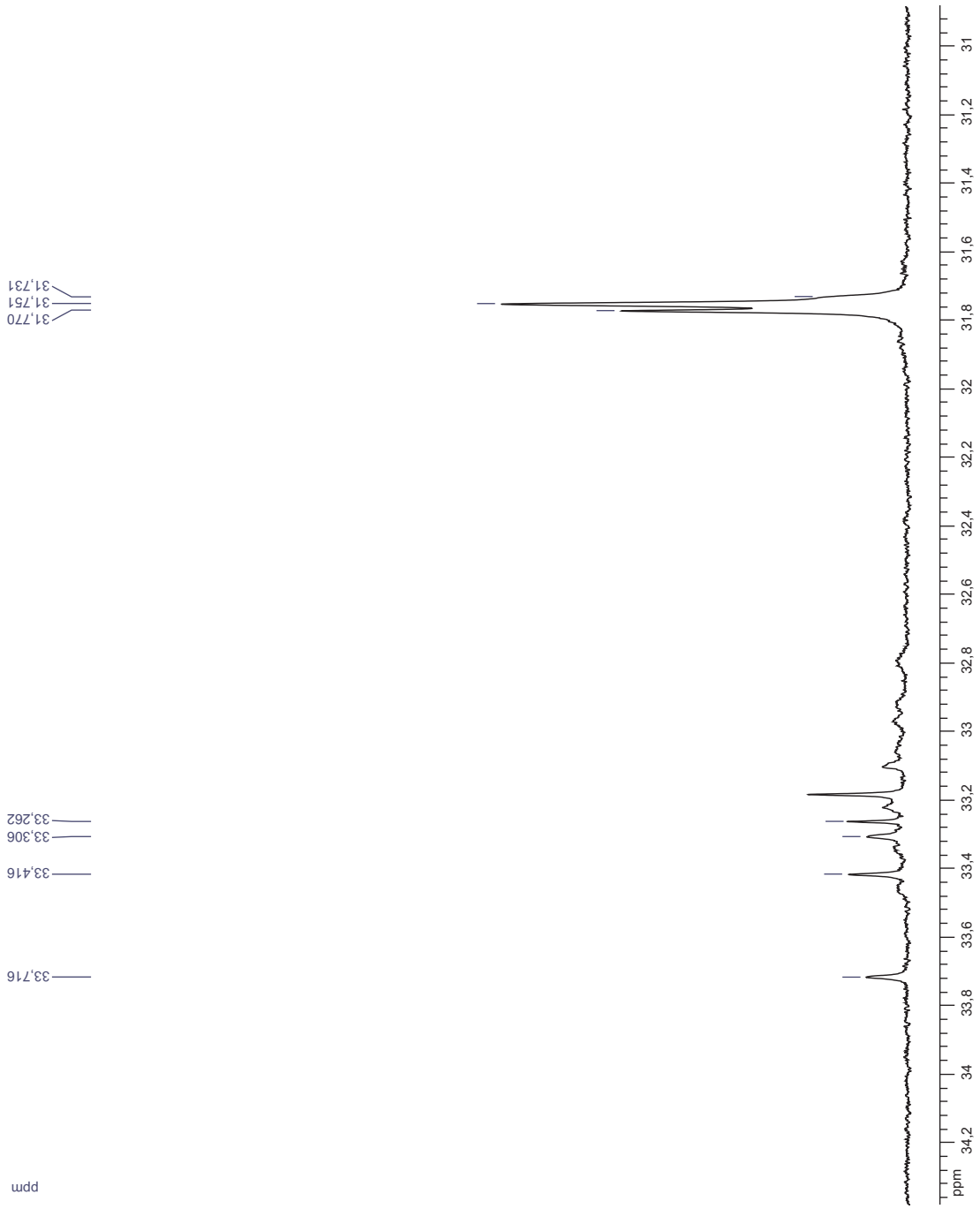

ppm
15,843
15,855
15,874
15,885
15,896
15,908
16,491
16,509
16,523
16,538
16,571
16,590
16,604
16,617
18,595
18,600
18,617
18,630
18,701
19,729
20,029
20,962
20,970
20,976
20,982
21,038
21,548
21,569
21,575
21,593
21,598
22,692
22,777
23,978
23,986
23,992
23,999
25,360
27,482
27,575
31,731
31,751
31,770
33,262
33,306
33,416
33,716
36,346
36,416
36,421
37,315
37,406
37,411
40,343
41,617
41,624
41,633
41,711
41,718
41,728
41,734
41,819
42,060
42,095
44,323
44,401
46,054
46,074
49,348
50,469
54,466
54,475
56,084
56,101
56,118
66,100
ppm
20
25
30
35
40
45
50
55
60

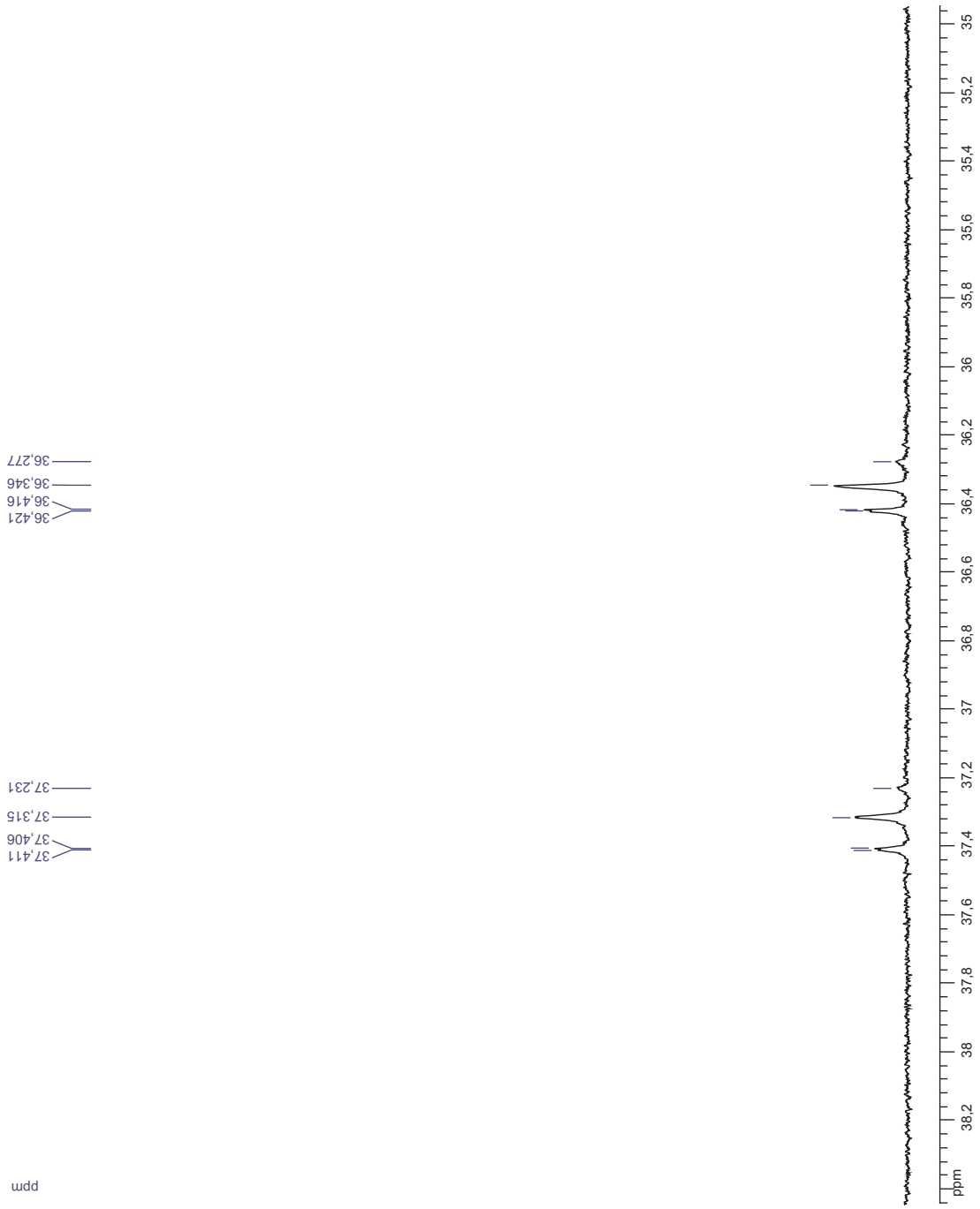

ppm
18,717
18,701
18,630
18,617
18,600
18,595
18,521
18,504
16,617
16,604
16,590
16,571
16,538
16,523
16,509
16,491
15,908
15,896
15,885
15,874
15,855
15,843
ppm
18,8
18,6
18,4
18,2
18
17,8
17,6
17,4
17,2
17
16,8
16,6
16,4
16,2
16
15,8
15,6

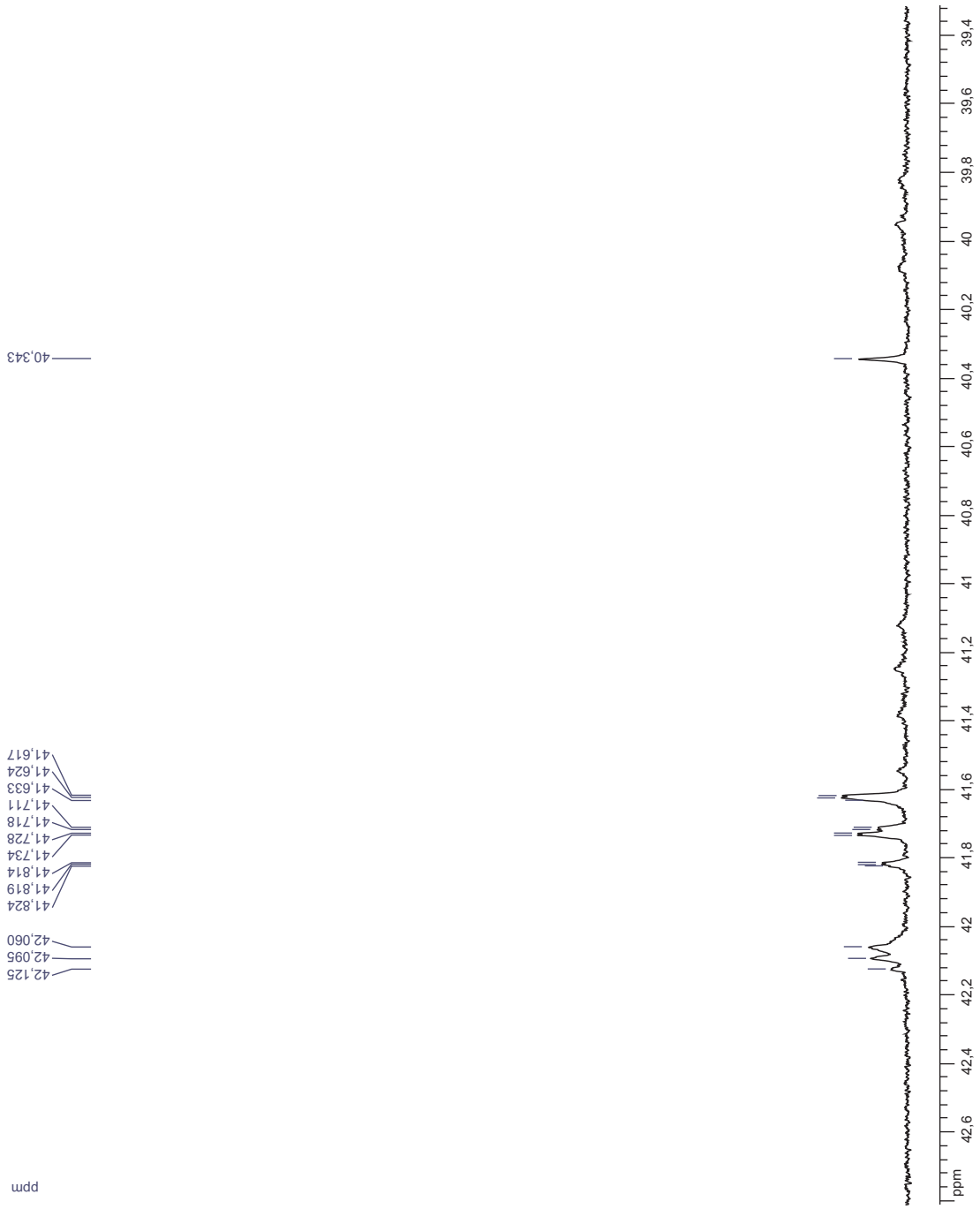

ppm
22,2
22
21,8
21,6
21,4
21,2
21
20,8
20,6
20,4
20,2
20
19,8
19,6
19,4
19,2
19
21,598
21,593
21,575
21,569
21,548
21,038
20,982
20,976
20,970
20,962
20,029
19,856
19,729
19,602

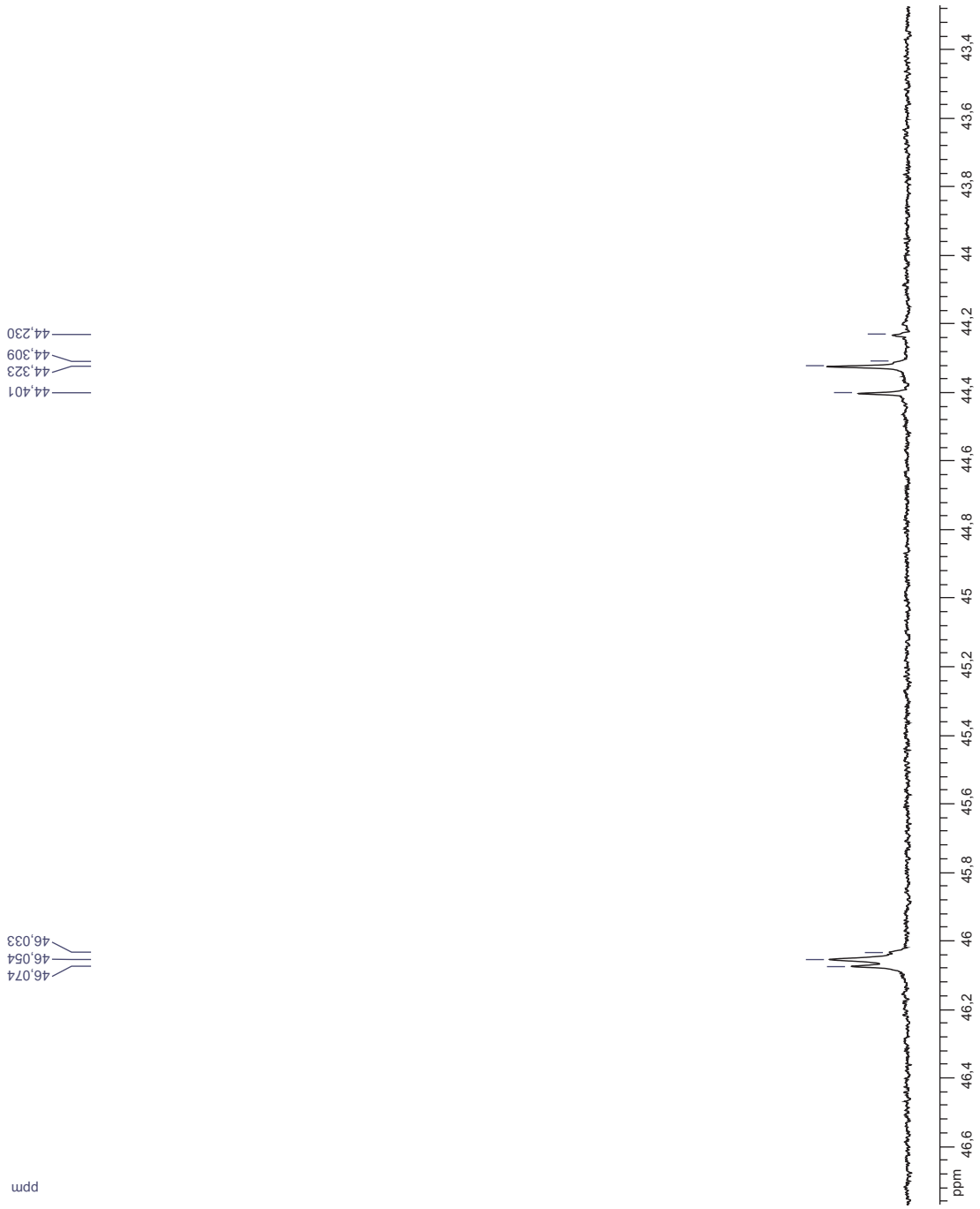

ppm
23,999
23,992
23,986
23,978
22,777
22,692
22,591
ppm
25
24,8
24,6
24,4
24,2
24
23,8
23,6
23,4
23,2
23
22,8
22,6
22,4
22,2
22
21,8

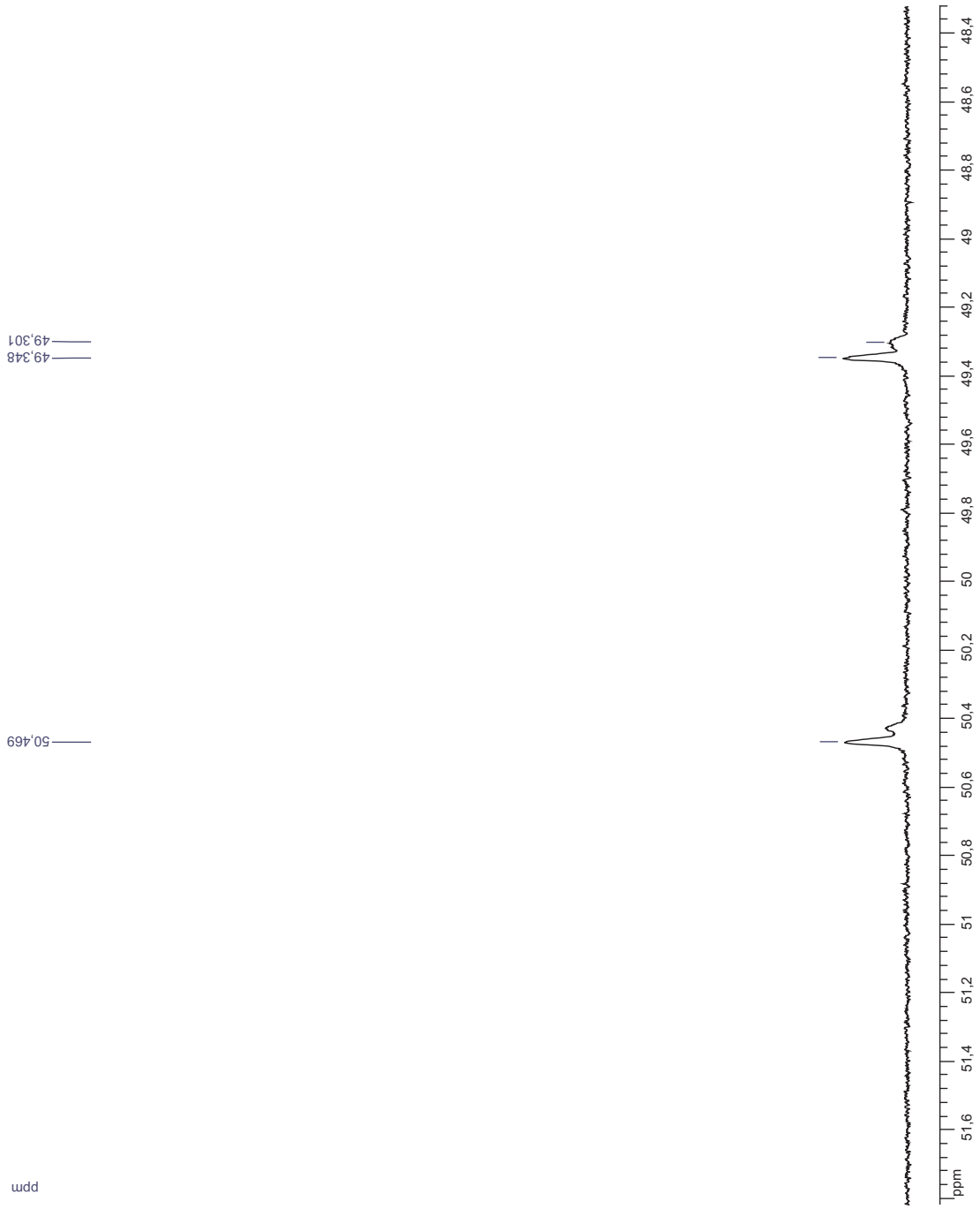

ppm
27,575
27,482
27,468
27,374
25,360
27,8
27,6
27,4
27,2
27
26,8
26,6
26,4
26,2
26
25,8
25,6
25,4
25,2
25
24,8
24,6
ppm

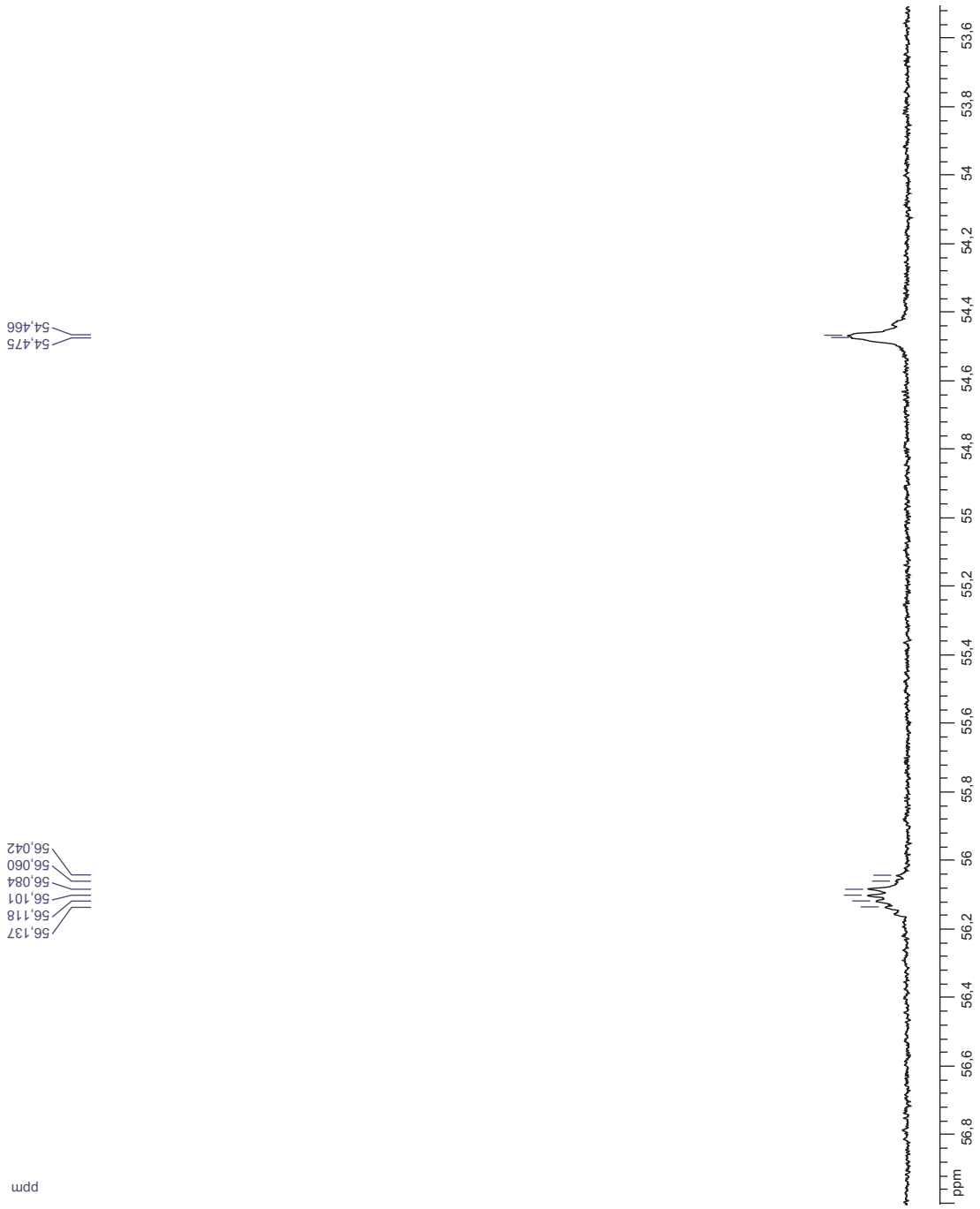

31,770
31,751
31,731
33,262
33,306
33,416
33,716
ppm
34,2
34
33,8
33,6
33,4
33,2
33
32,8
32,6
32,4
32,2
32
31,8
31,6
31,4
31,2
31
ppm

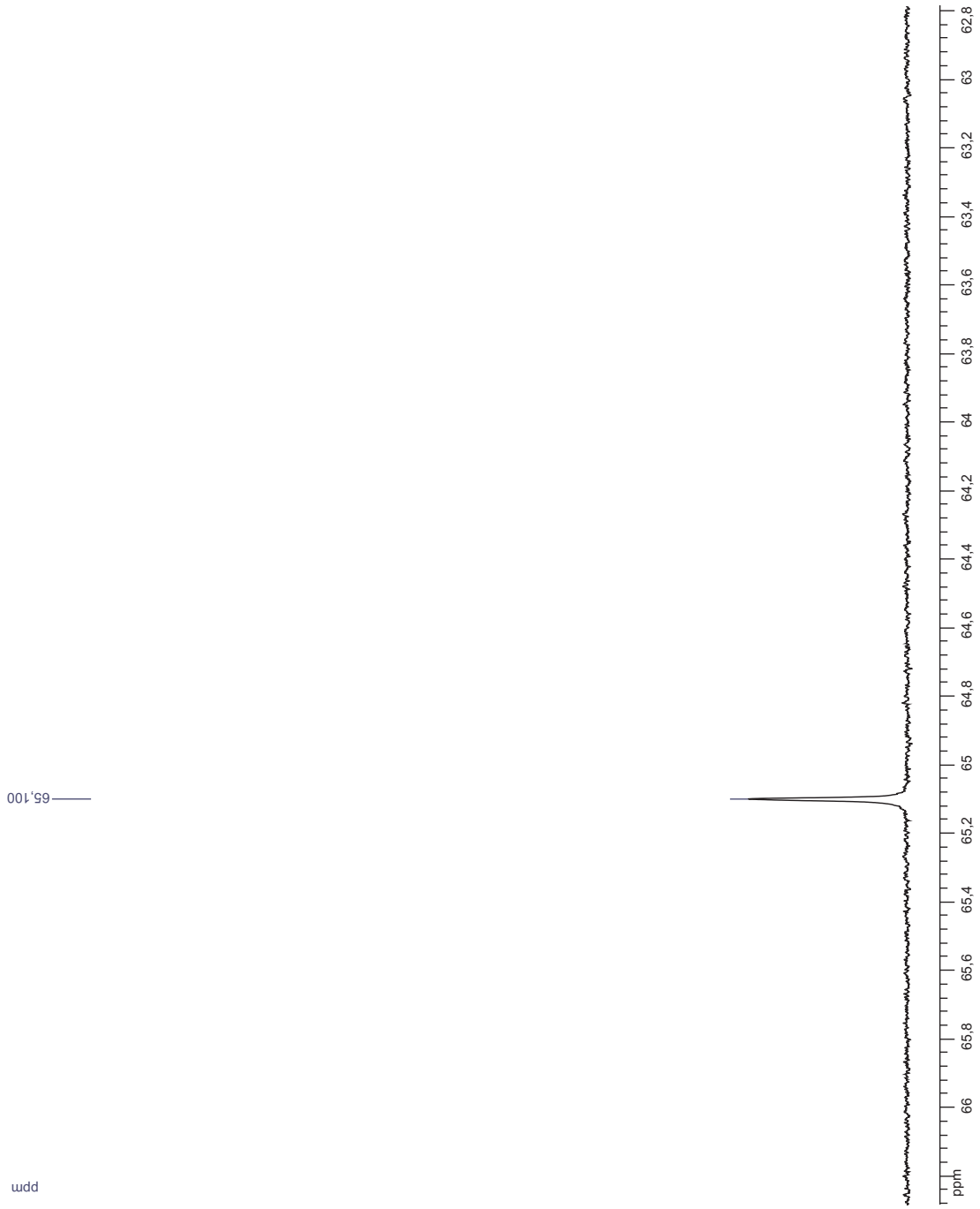

ppm
38,2
38
37,8
37,6
37,4
37,2
37
36,8
36,6
36,4
36,2
36
35,8
35,6
35,4
35,2
35
37,411
37,406
37,315
37,231
36,421
36,416
36,346
36,277


ppm
42,6
42,4
42,2
42
41,8
41,6
41,4
41,2
41
40,8
40,6
40,4
40,2
40
39,8
39,6
39,4
42,125
42,095
42,060
41,824
41,819
41,814
41,734
41,728
41,718
41,711
41,633
41,624
41,617
40,343


46,074
46,054
46,033
44,401
44,323
44,309
44,230
ppm
46,6
46,4
46,2
46
45,8
45,6
45,4
45,2
45
44,8
44,6
44,4
44,2
44
43,8
43,6
43,4
ppm

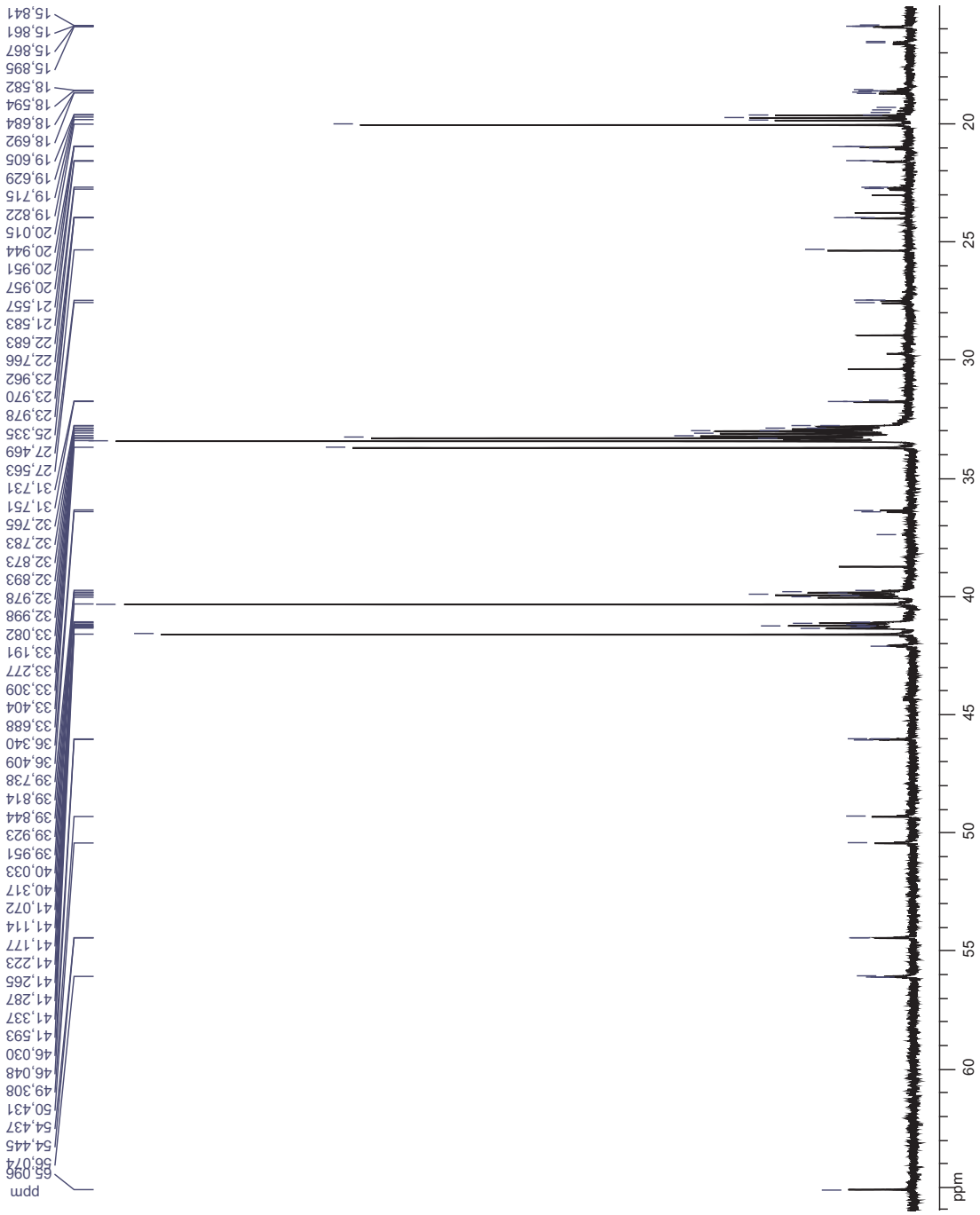

50,469
49,348
49,301
ppm
ppm
51,6
51,4
51,2
51
50,8
50,6
50,4
50,2
50
49,8
49,6
49,4
49,2
49
48,8
48,6
48,4

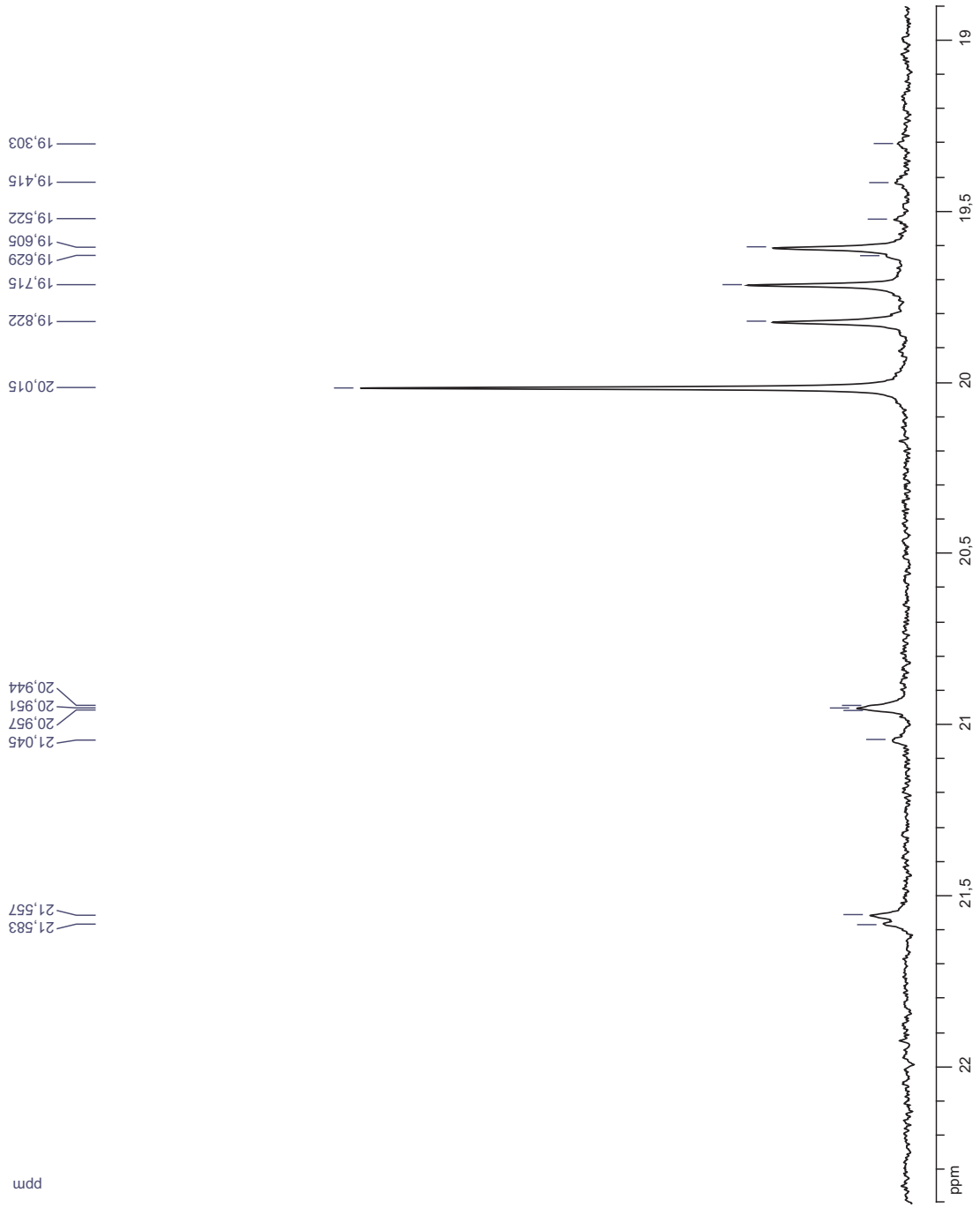

ppm
56,8
56,6
56,4
56,2
56
55,8
55,6
55,4
55,2
55
54,8
54,6
54,4
54,2
54
53,8
53,6
56,042
56,060
56,084
56,101
56,118
56,137
54,466
54,475

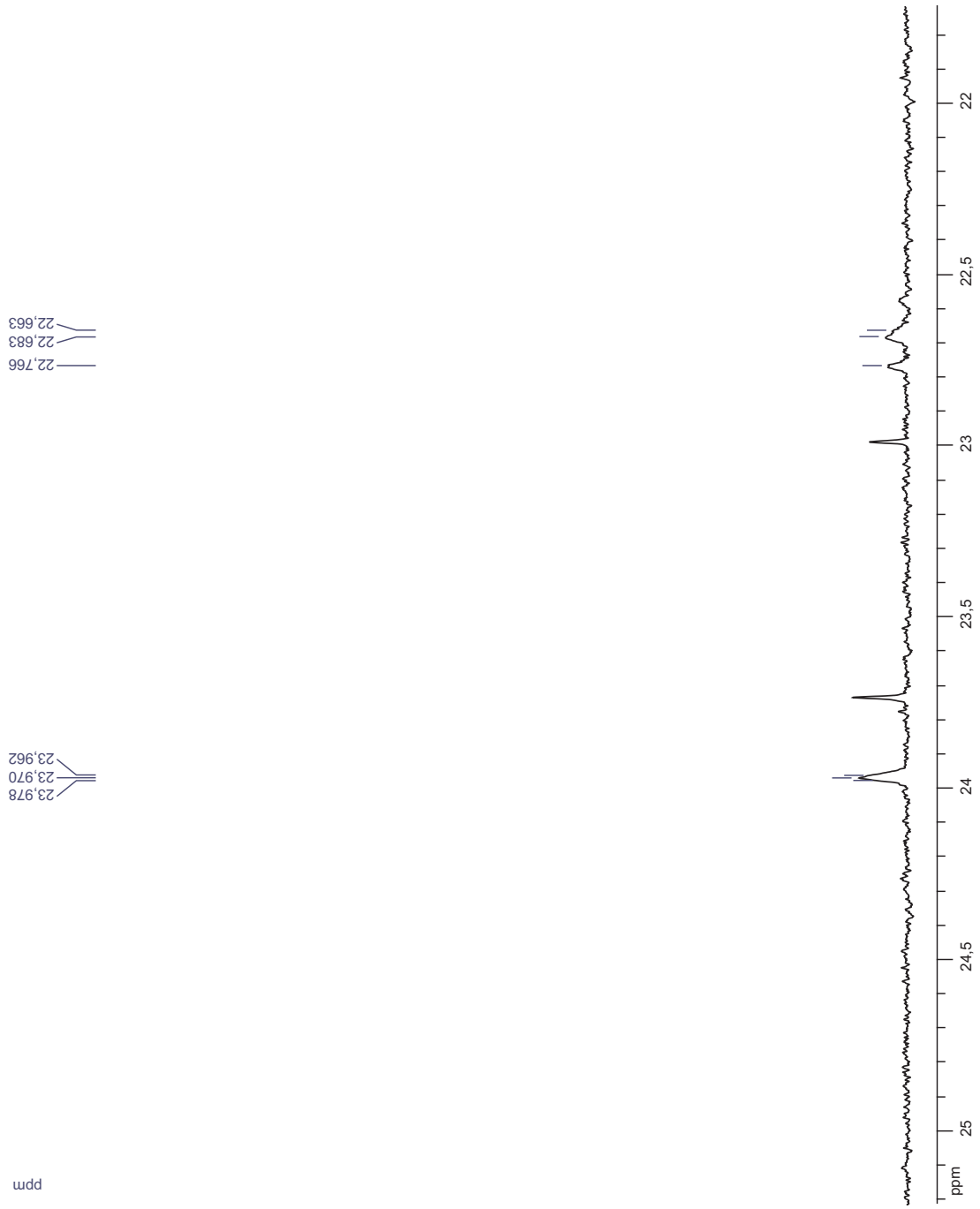

65,100
ppm
66
65,8
65,6
65,4
65,2
65
64,8
64,6
64,4
64,2
64
63,8
63,6
63,4
63,2
63
62,8
ppm

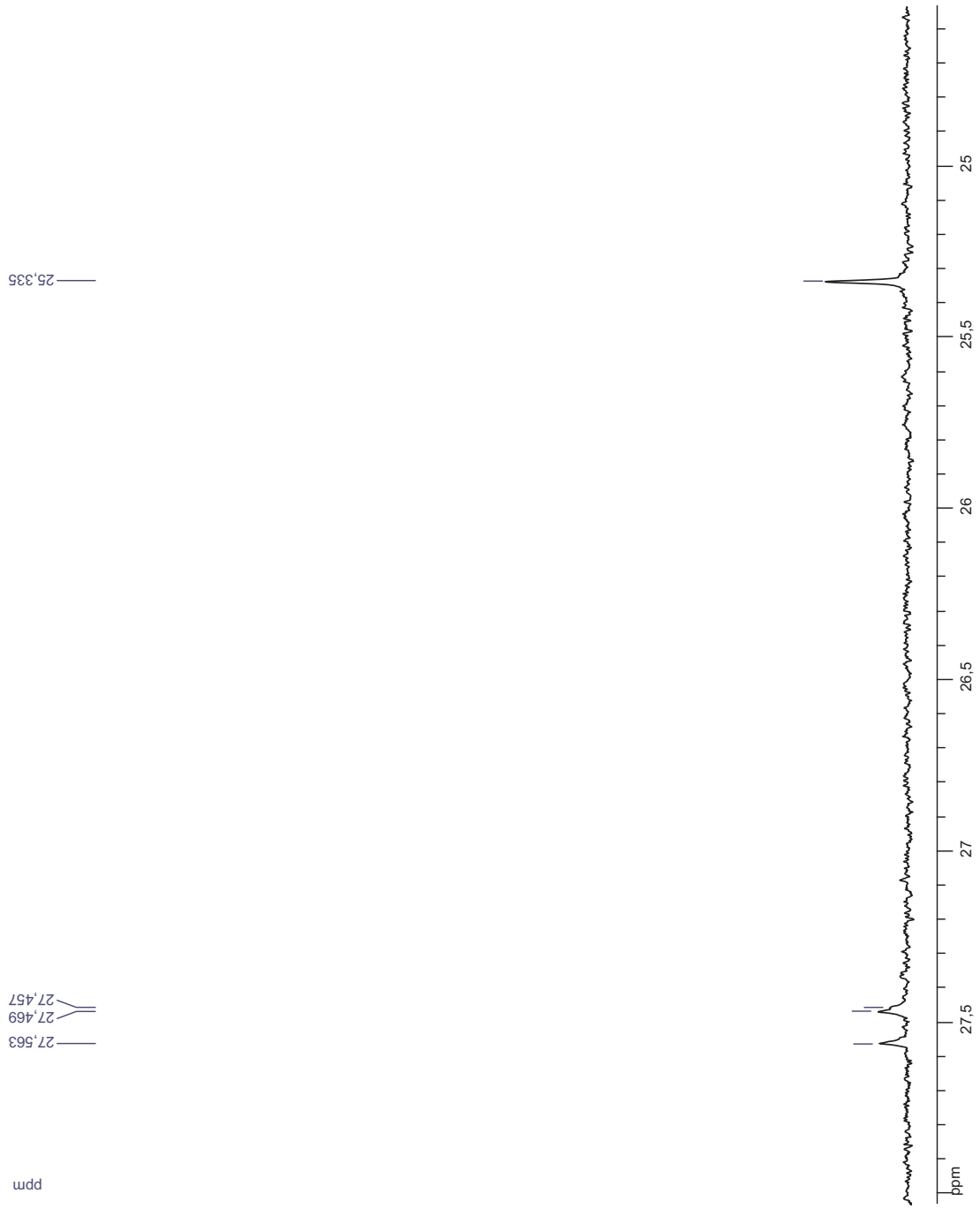
Annexe 3

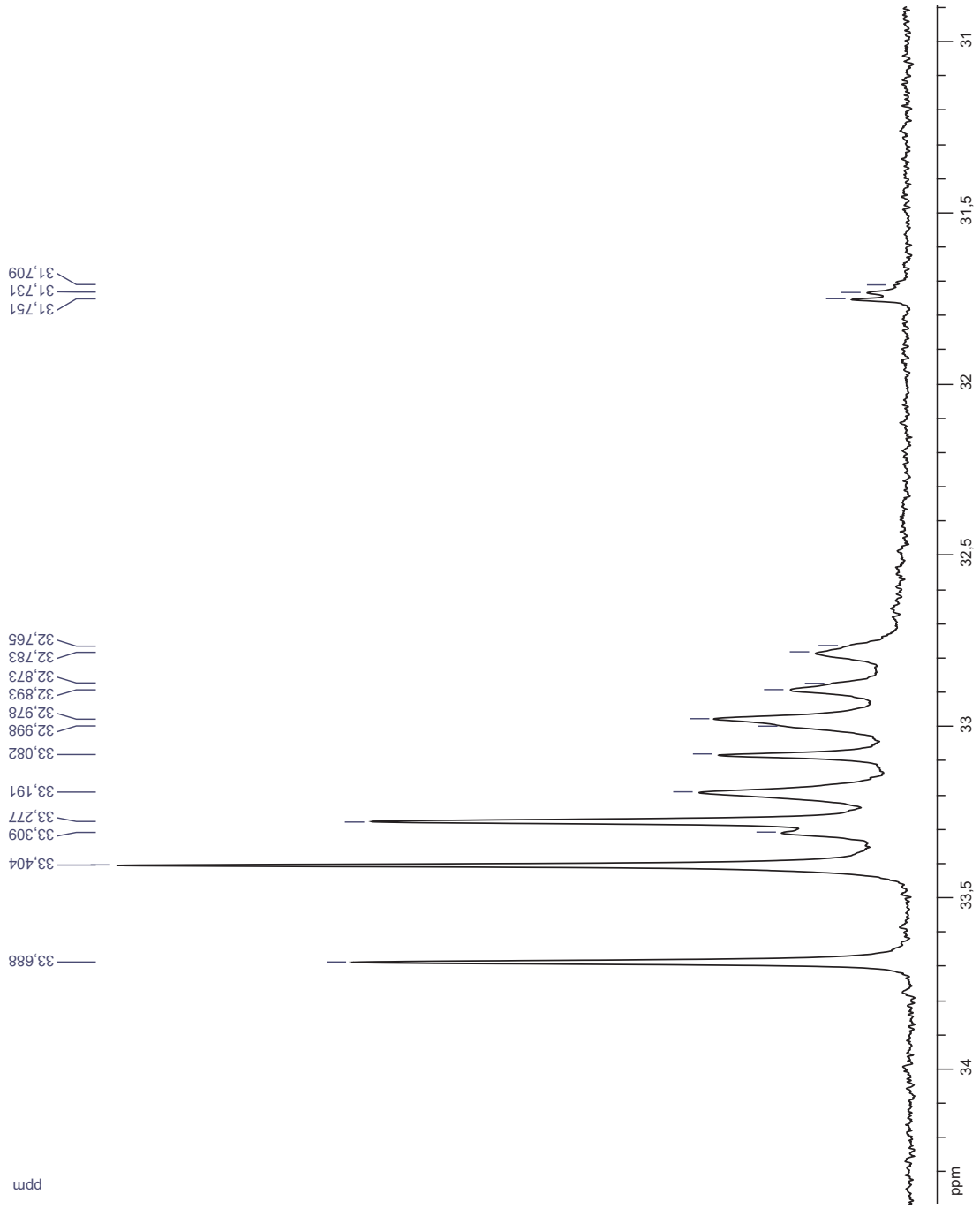
Spectre de RMN ^{13}C de l'acétate de bishomohopanol obtenu à partir des hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* après incorporation du [4-^{13}C]glucose

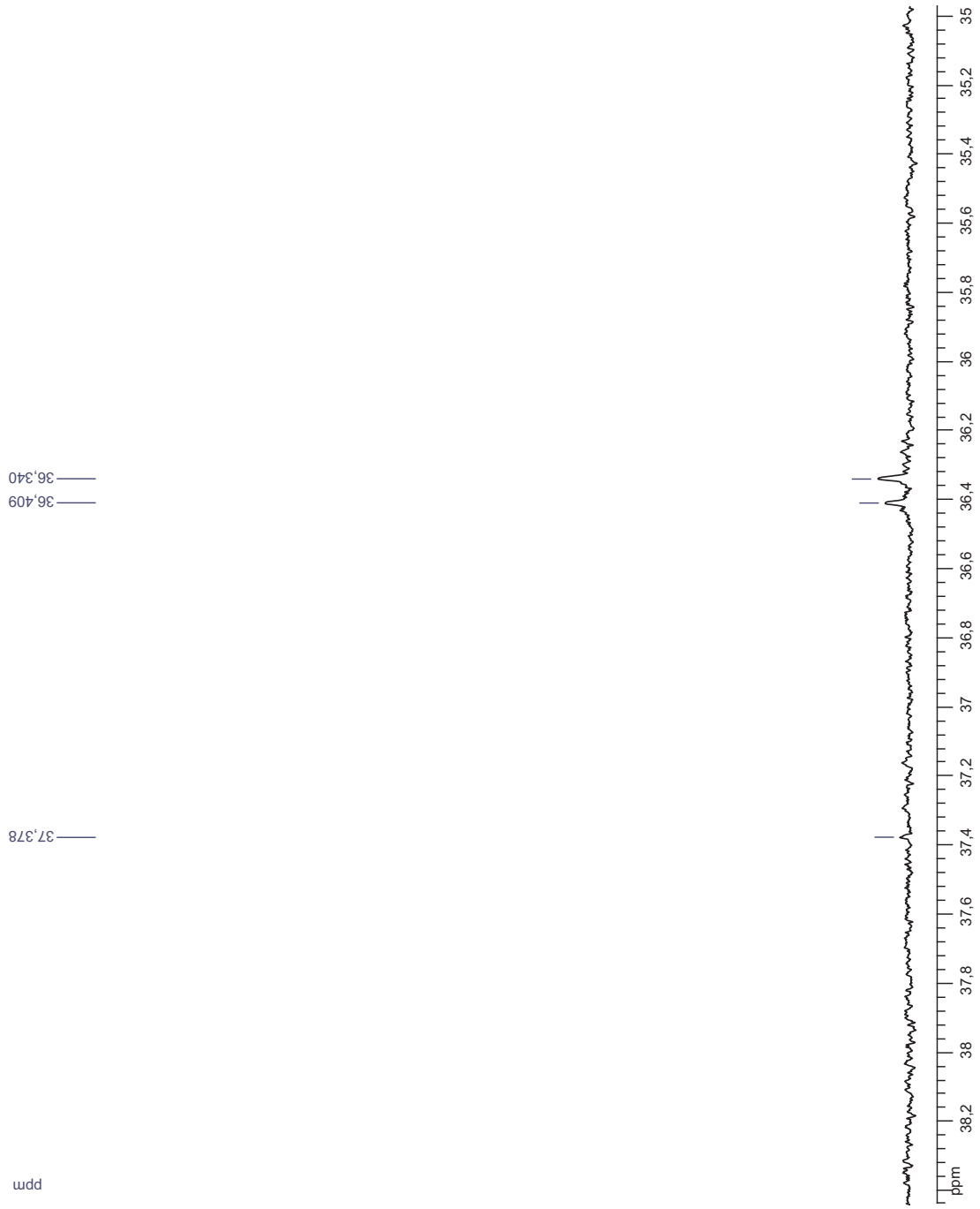

ppm
65,096
56,074
54,445
54,437
50,431
49,308
46,048
46,030
41,593
41,337
41,287
41,265
41,223
41,177
41,114
40,317
40,033
39,951
39,923
39,844
39,814
39,738
36,409
36,340
33,688
33,404
33,309
33,277
33,191
33,082
32,998
32,978
32,893
32,873
32,783
32,765
31,751
31,731
27,563
27,469
25,335
23,978
23,970
23,962
22,766
22,683
21,583
21,557
20,957
20,951
20,944
20,015
19,822
19,715
19,629
19,605
18,692
18,684
18,594
18,582
15,895
15,867
15,861
15,841
ppm
20
25
30
35
40
45
50
55
60

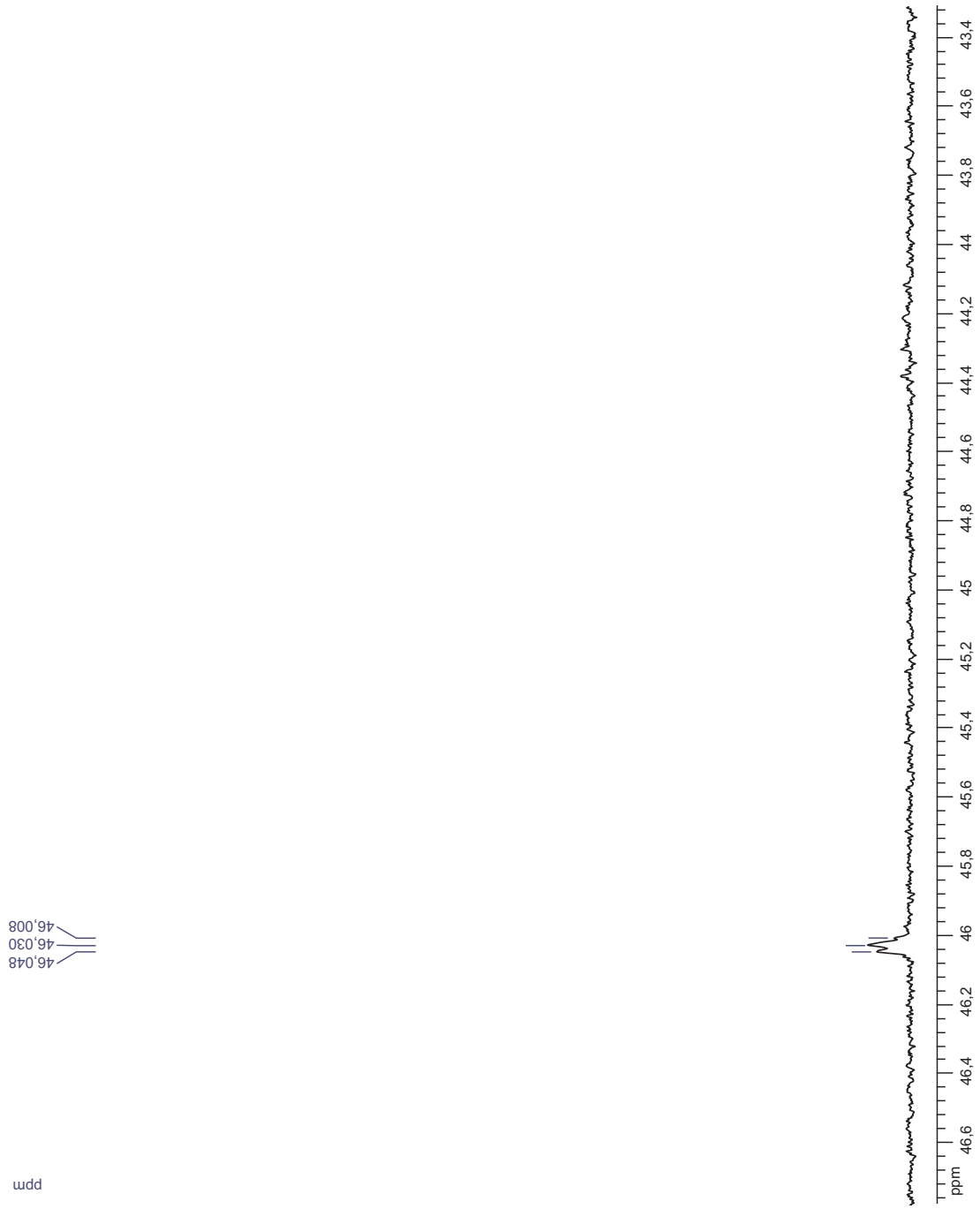

ppm
22
21,583
21,557
21,5
21,045
20,957
20,951
20,944
21
20,015
20,5
19,822
19,715
19,629
19,605
19,522
19,415
19,303
20
19,5
19

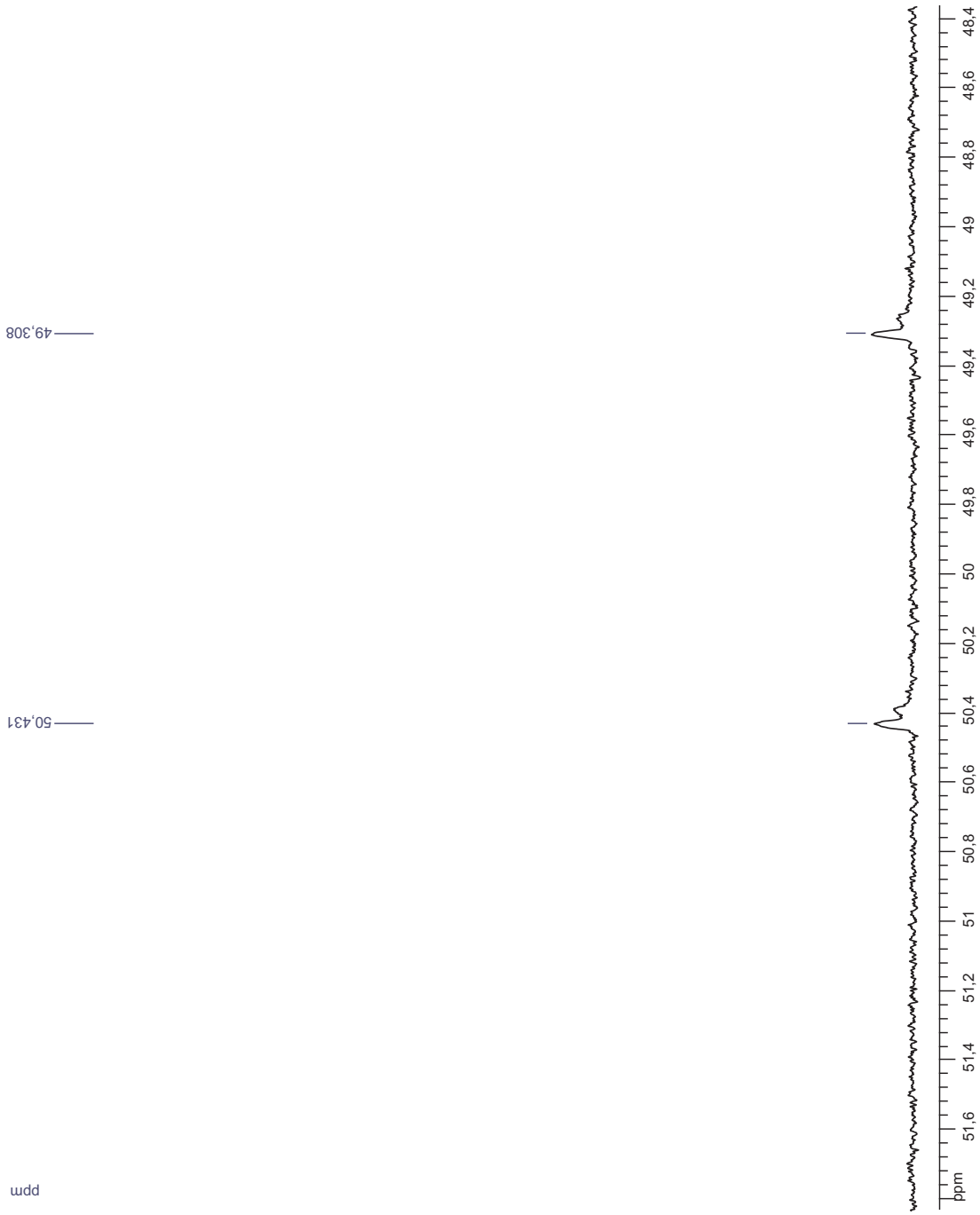

ppm
23,978
23,970
23,962
22,766
22,683
22,663
ppm
25
24,5
24
23,5
23
22,5
22

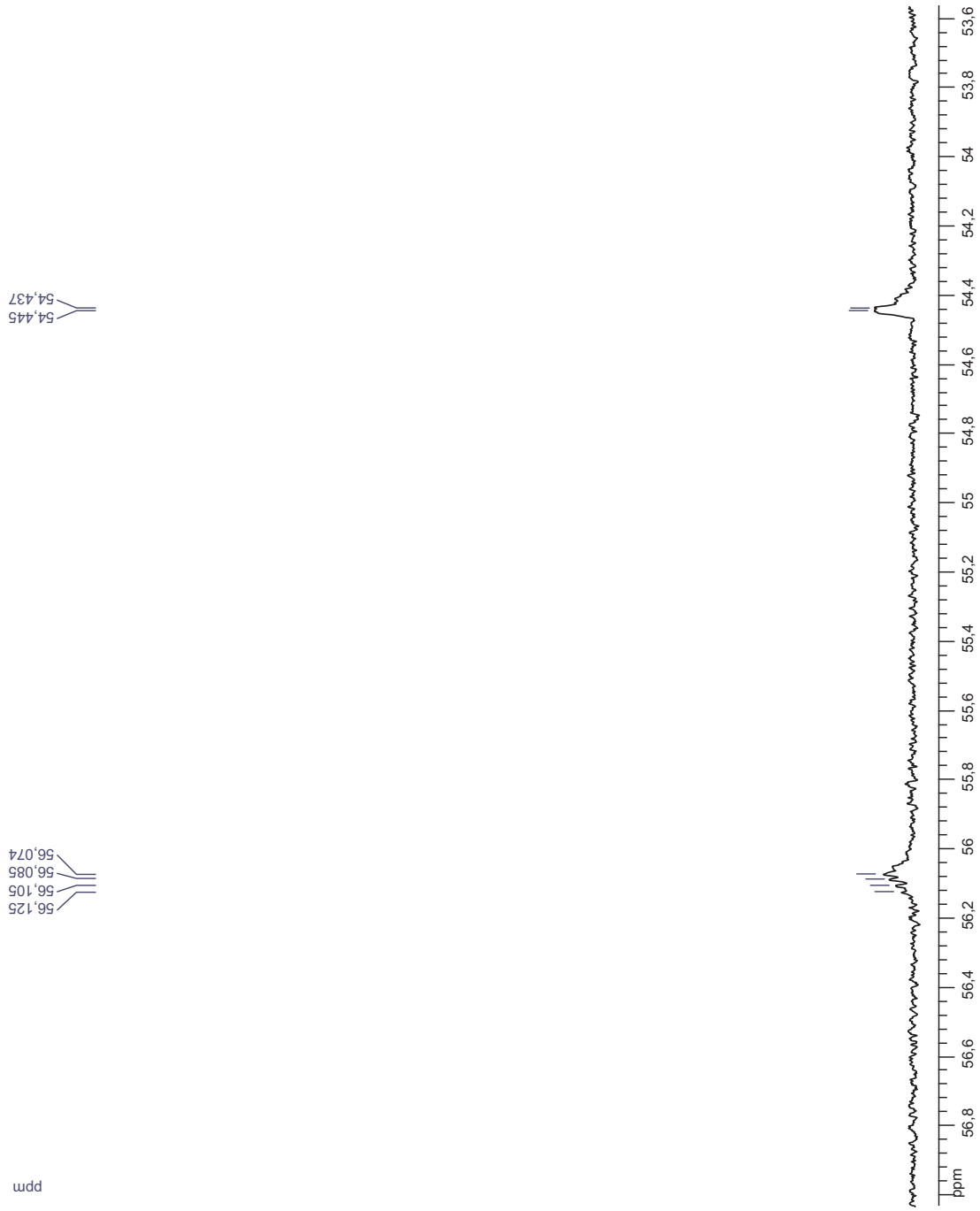

ppm
27,563
27,469
27,457
25,335
27,5
27
26,5
26
25,5
25
ppm

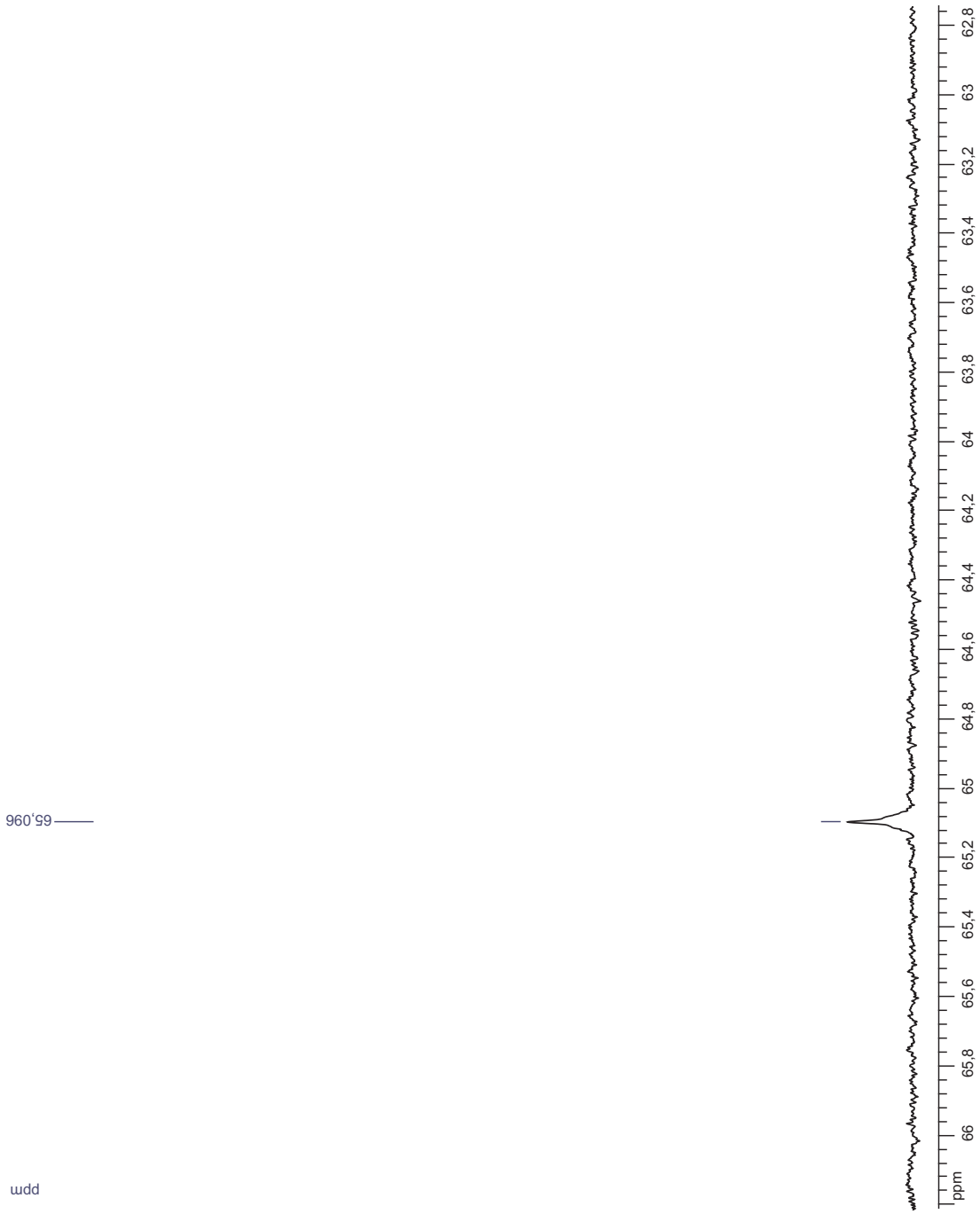

ppm
34
33,688
33,5
33,404
33,309
33,277
33,191
33,082
33
32,998
32,978
32,893
32,873
32,783
32,765
32,5
32
31,751
31,731
31,709
31,5
31


ppm
38,2
38
37,8
37,6
37,4
37,2
37
36,8
36,6
36,4
36,2
36
35,8
35,6
35,4
35,2
35
37,378
36,409
36,340


46,048
46,030
46,008
ppm
46,6
46,4
46,2
46
45,8
45,6
45,4
45,2
45
44,8
44,6
44,4
44,2
44
43,8
43,6
43,4
ppm


ppm
50,431
49,308
ppm
51,6
51,4
51,2
51
50,8
50,6
50,4
50,2
50
49,8
49,6
49,4
49,2
49
48,8
48,6
48,4


ppm
56,8
56,6
56,4
56,2
56
55,8
55,6
55,4
55,2
55
54,8
54,6
54,4
54,2
54
53,8
53,6
56,125
56,105
56,085
56,074
54,445
54,437


65,096
ppm
ppm
66
65,8
65,6
65,4
65,2
65
64,8
64,6
64,4
64,2
64
63,8
63,6
63,4
63,2
63
62,8

Annexe 4

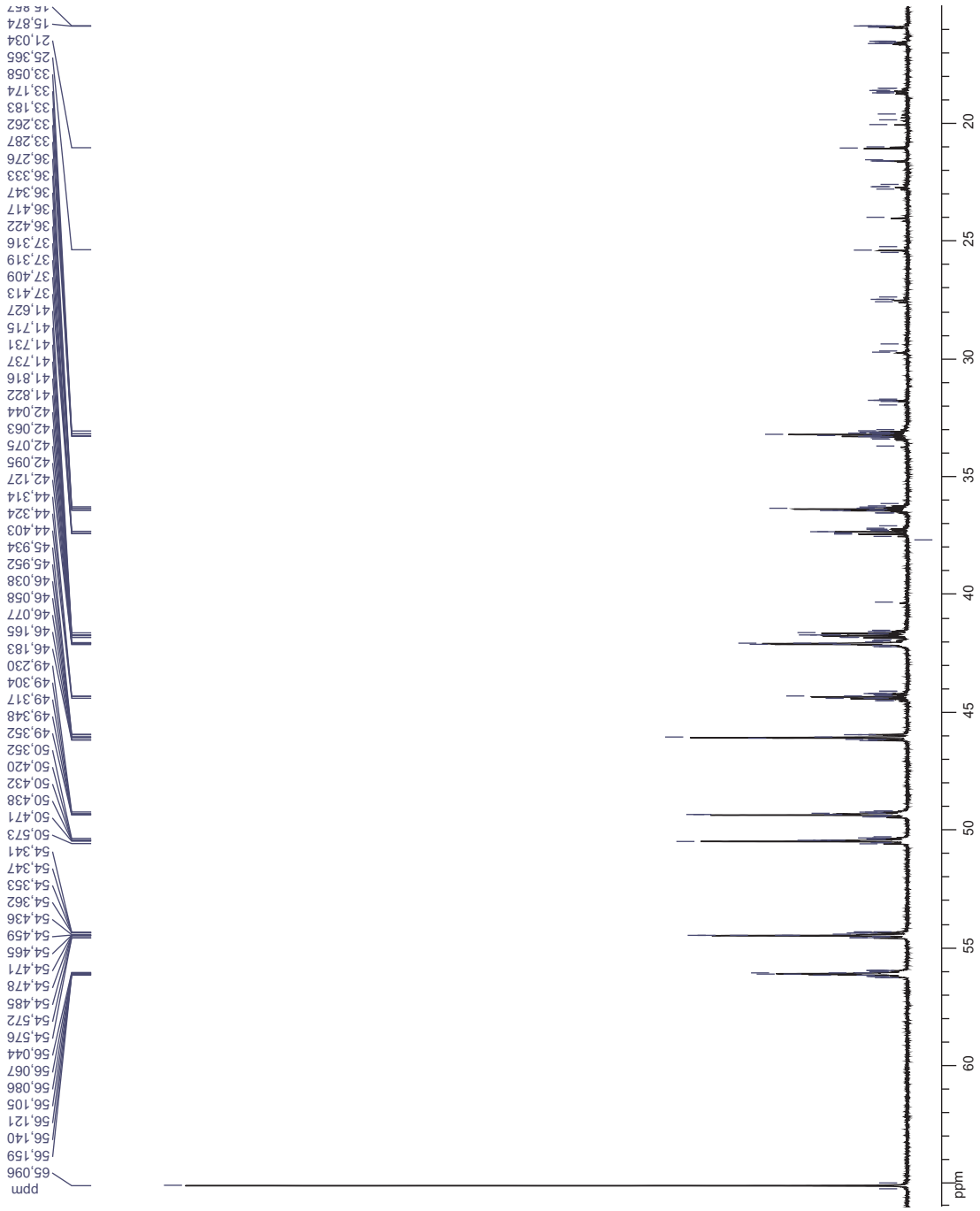
Spectre de RMN ^{13}C

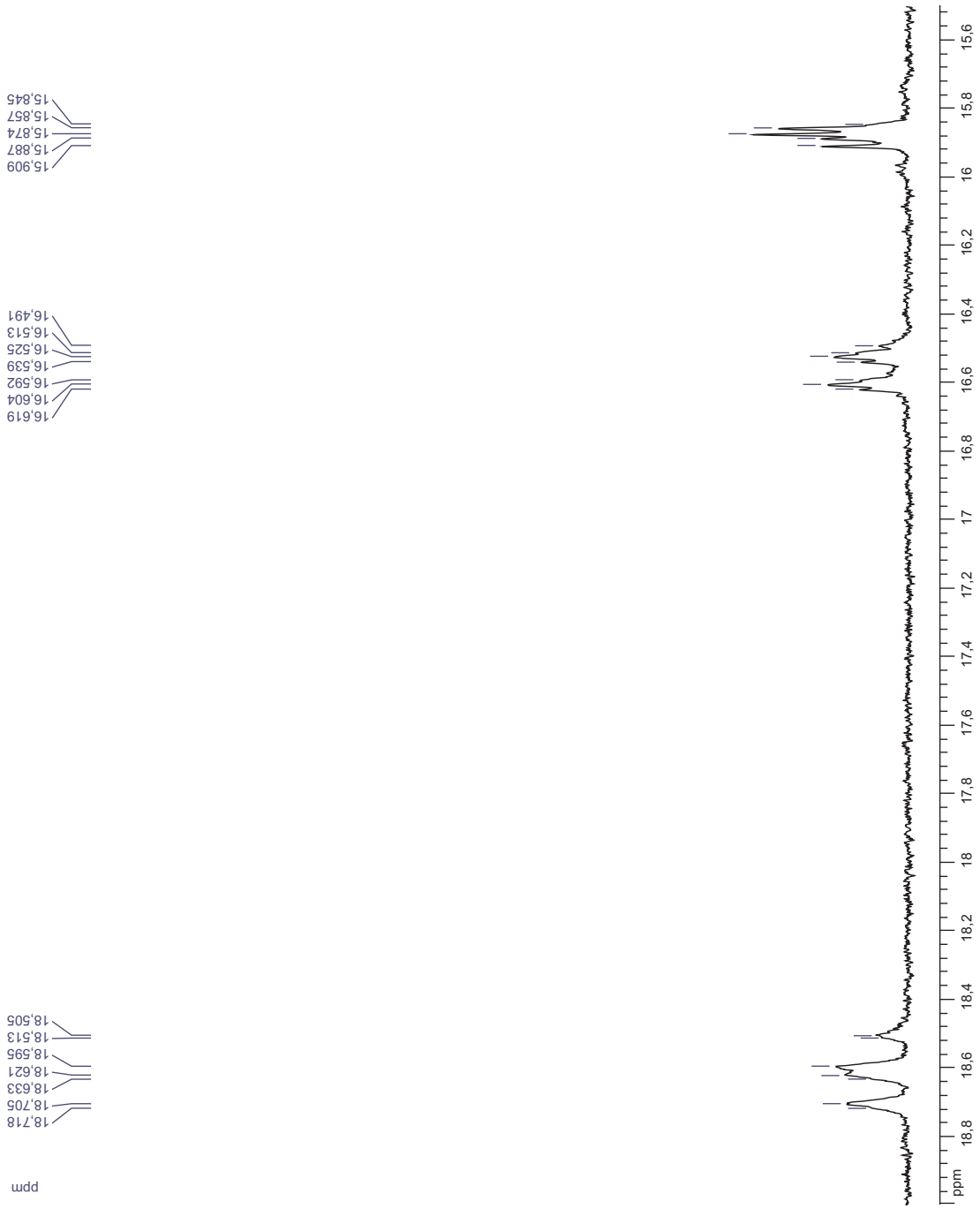
de l'acétate de bishomohopanol

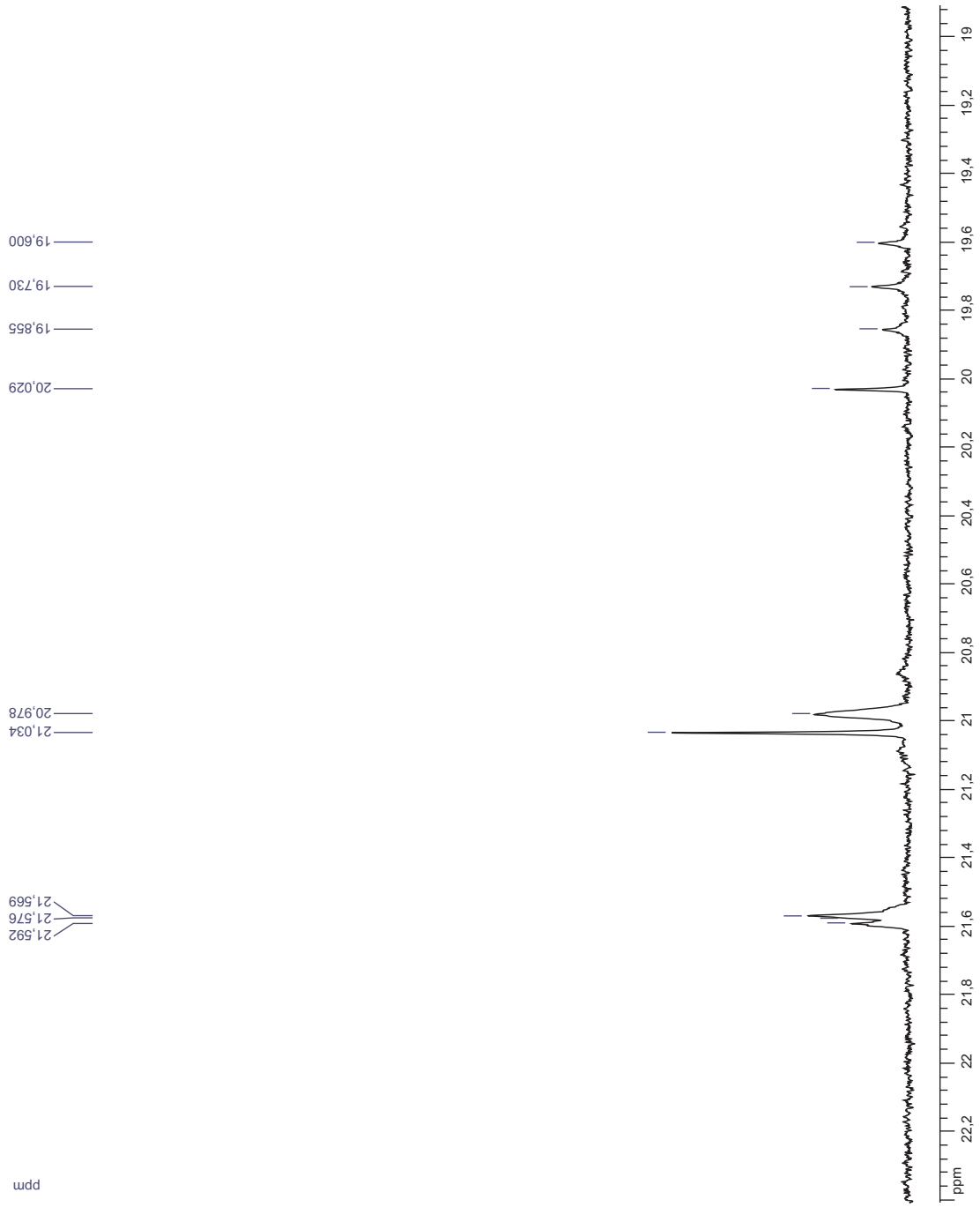
obtenu à partir des hopanoïdes

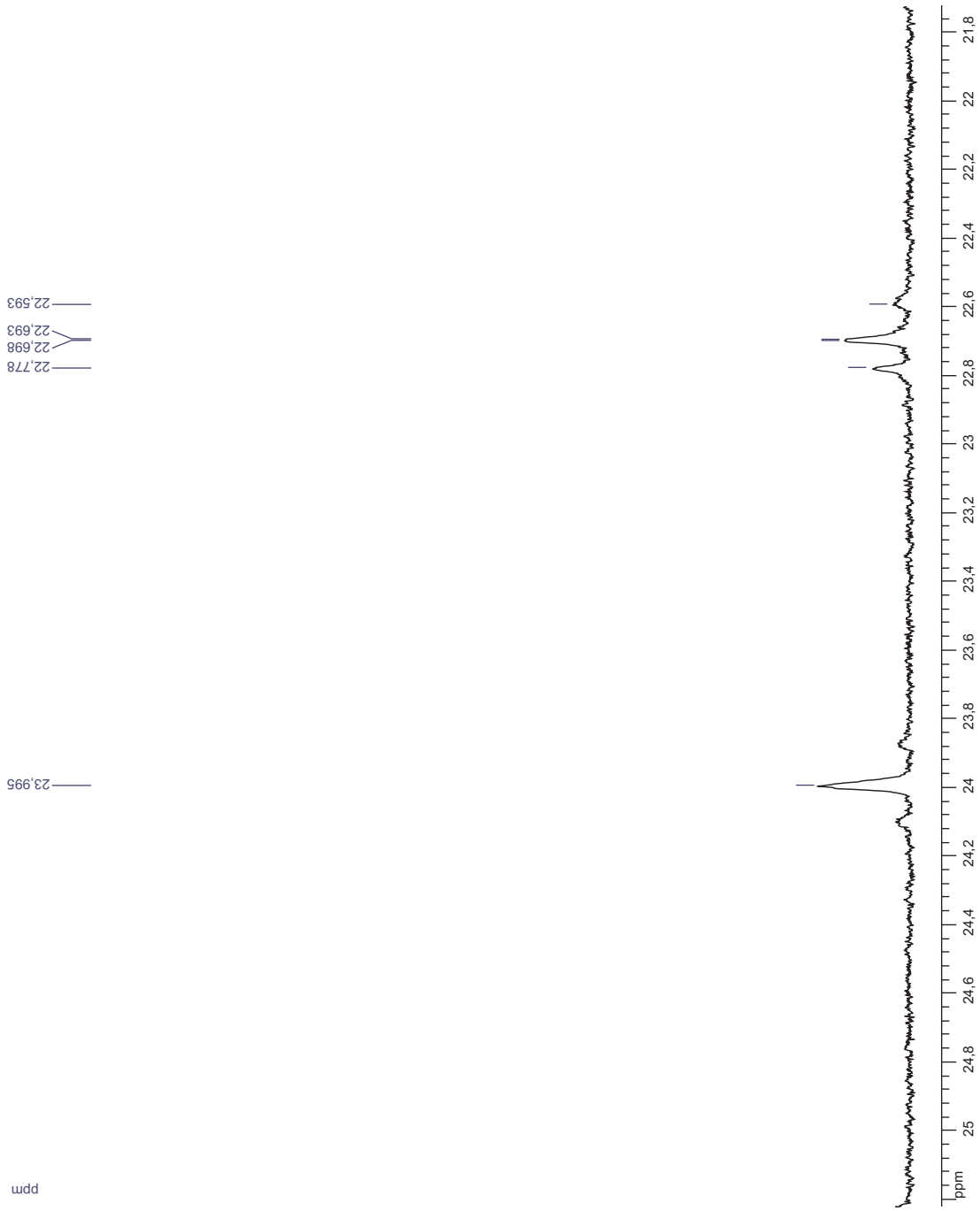
de *Zymomonas mobilis*

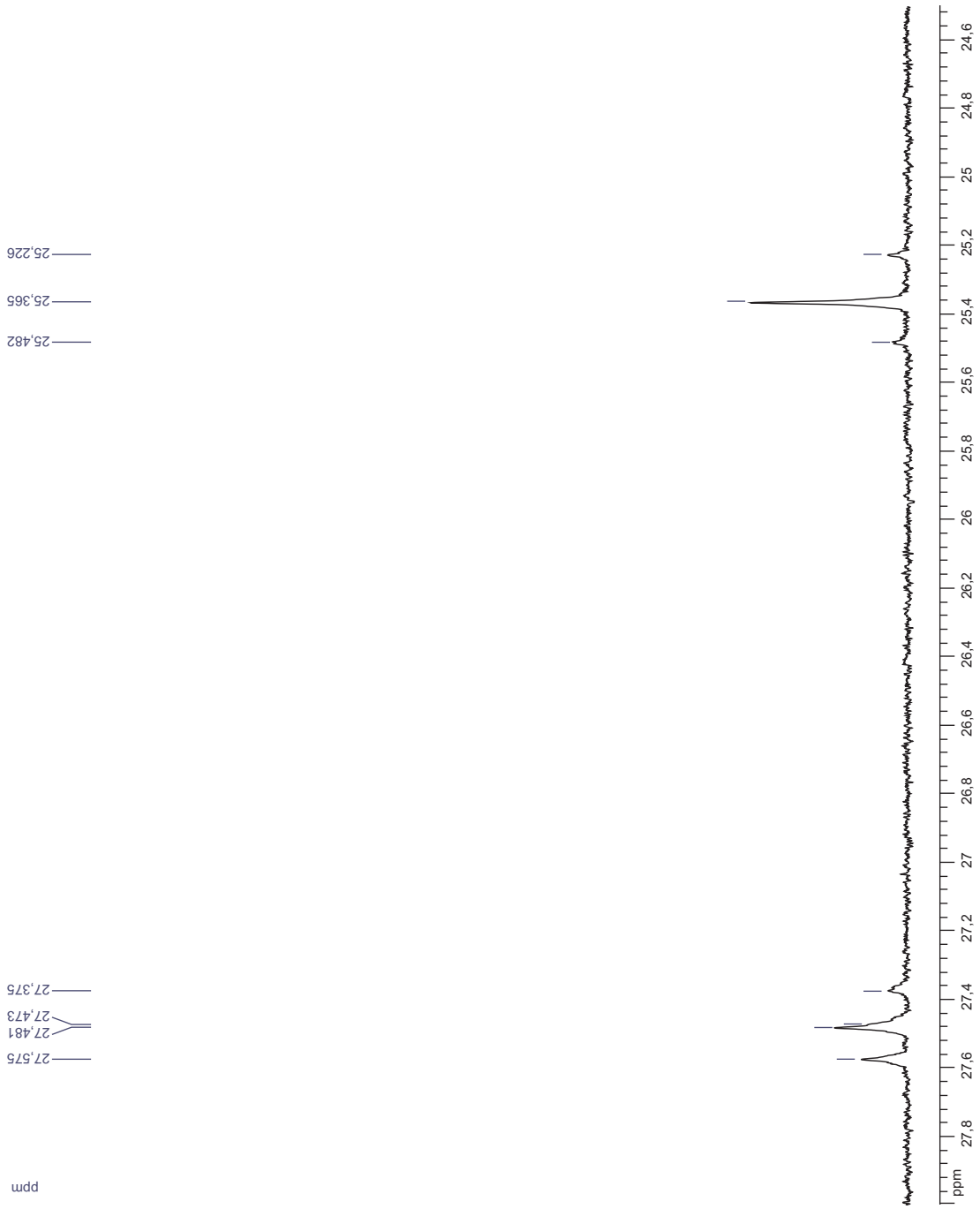
après incorporation du [5-^{13}C]glucose

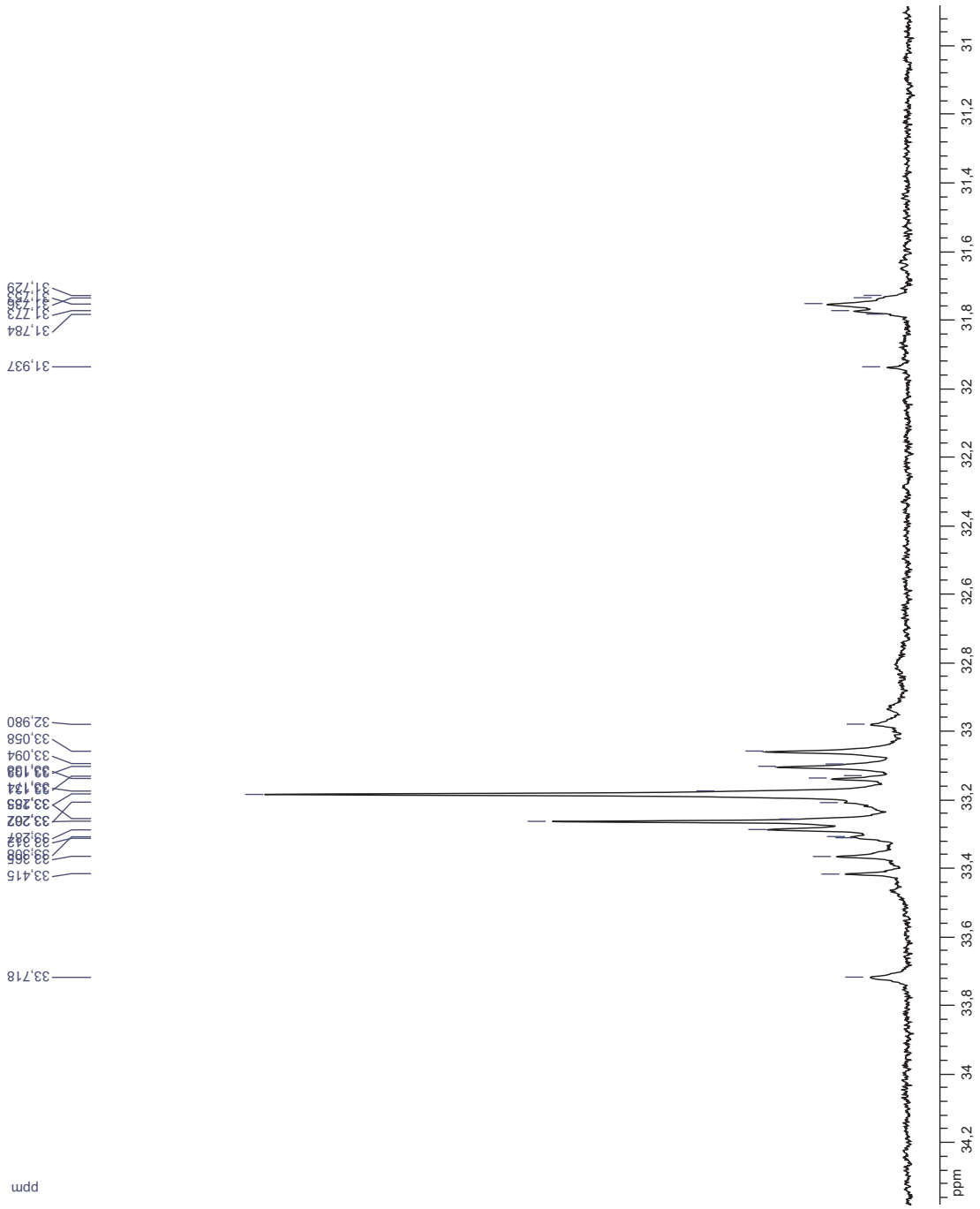

ppm
65,096
56,159
56,140
56,121
56,105
56,086
56,067
56,044
54,576
54,572
54,485
54,478
54,471
54,465
54,459
54,436
54,362
54,353
54,347
54,341
50,573
50,471
50,438
50,432
50,420
50,352
49,352
49,348
49,317
49,304
49,230
46,183
46,165
46,077
46,058
46,038
45,952
45,934
44,403
44,324
44,314
42,127
42,095
42,075
42,063
41,822
41,816
41,737
41,731
41,715
41,627
37,413
37,409
37,319
37,316
36,422
36,417
36,347
36,333
36,276
33,287
33,262
33,183
33,174
33,058
25,365
21,034
15,874
15,857
ppm
20
25
30
35
40
45
50
55
60

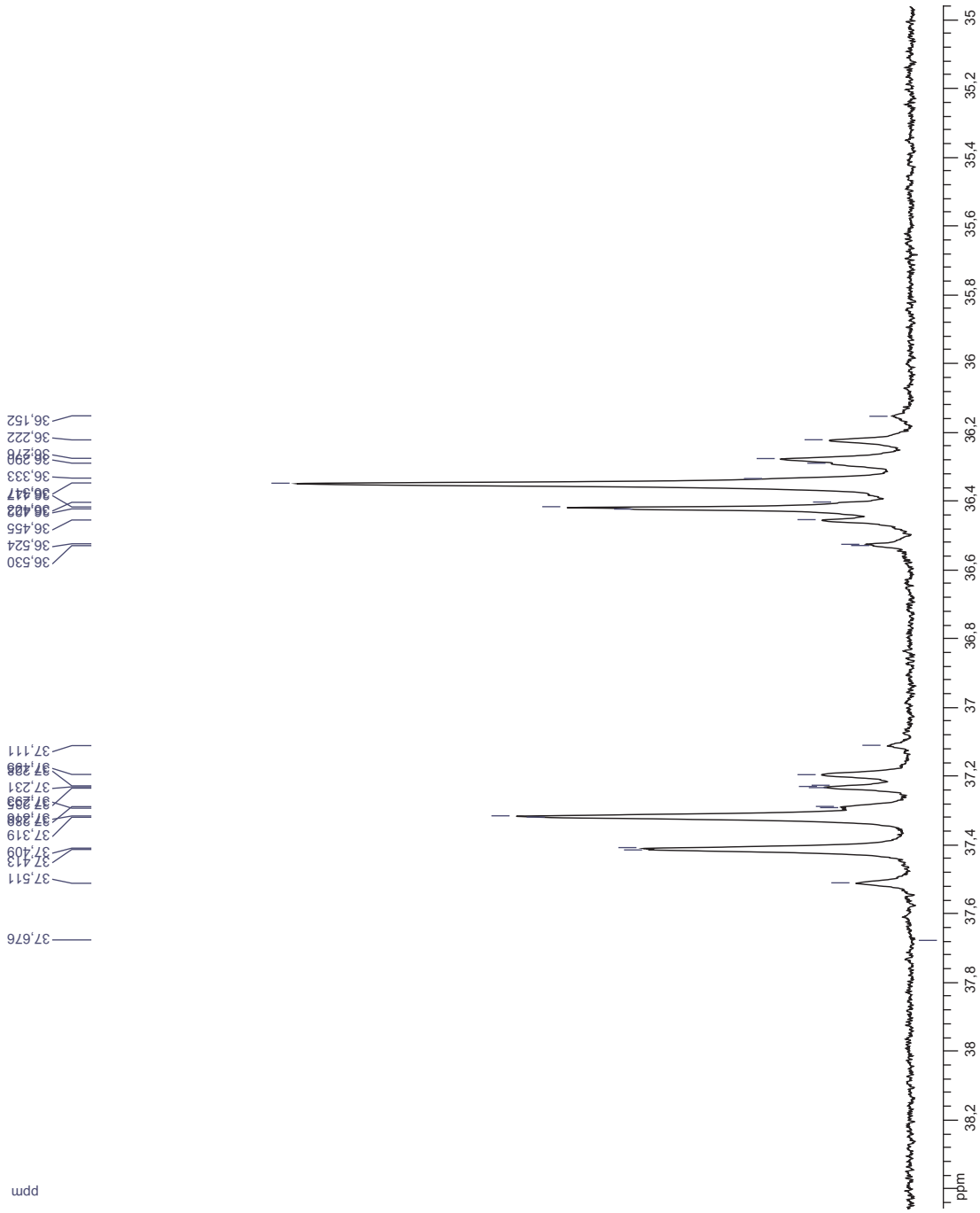

ppm
18,718
18,705
18,633
18,621
18,595
18,513
18,505
16,619
16,604
16,592
16,539
16,525
16,513
16,491
15,909
15,887
15,874
15,857
15,845
ppm
18,8
18,6
18,4
18,2
18
17,8
17,6
17,4
17,2
17
16,8
16,6
16,4
16,2
16
15,8
15,6

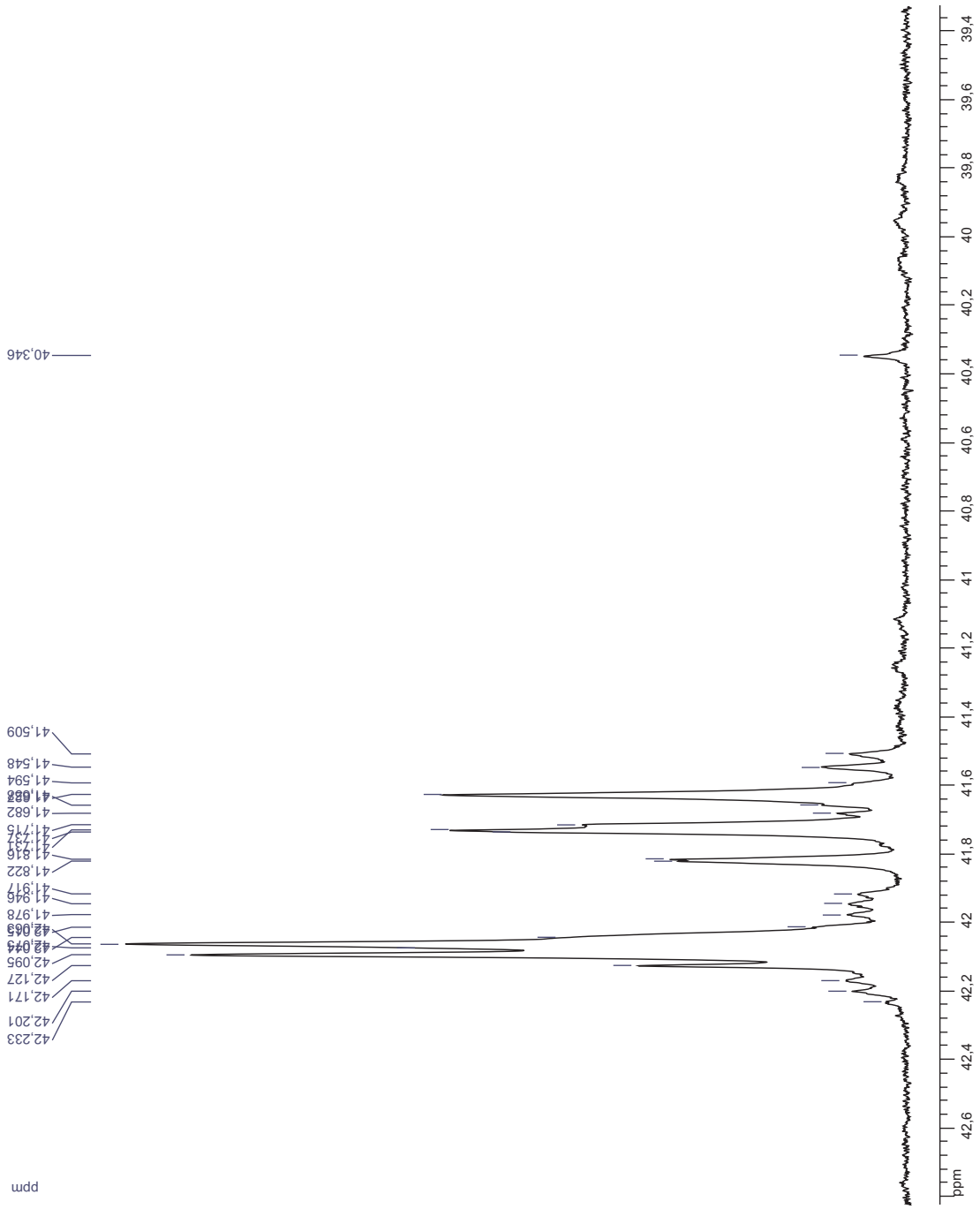

ppm
22,2
22
21,8
21,6
21,4
21,2
21
20,8
20,6
20,4
20,2
20
19,8
19,6
19,4
19,2
19
21,592
21,576
21,569
21,034
20,978
20,029
19,855
19,730
19,600

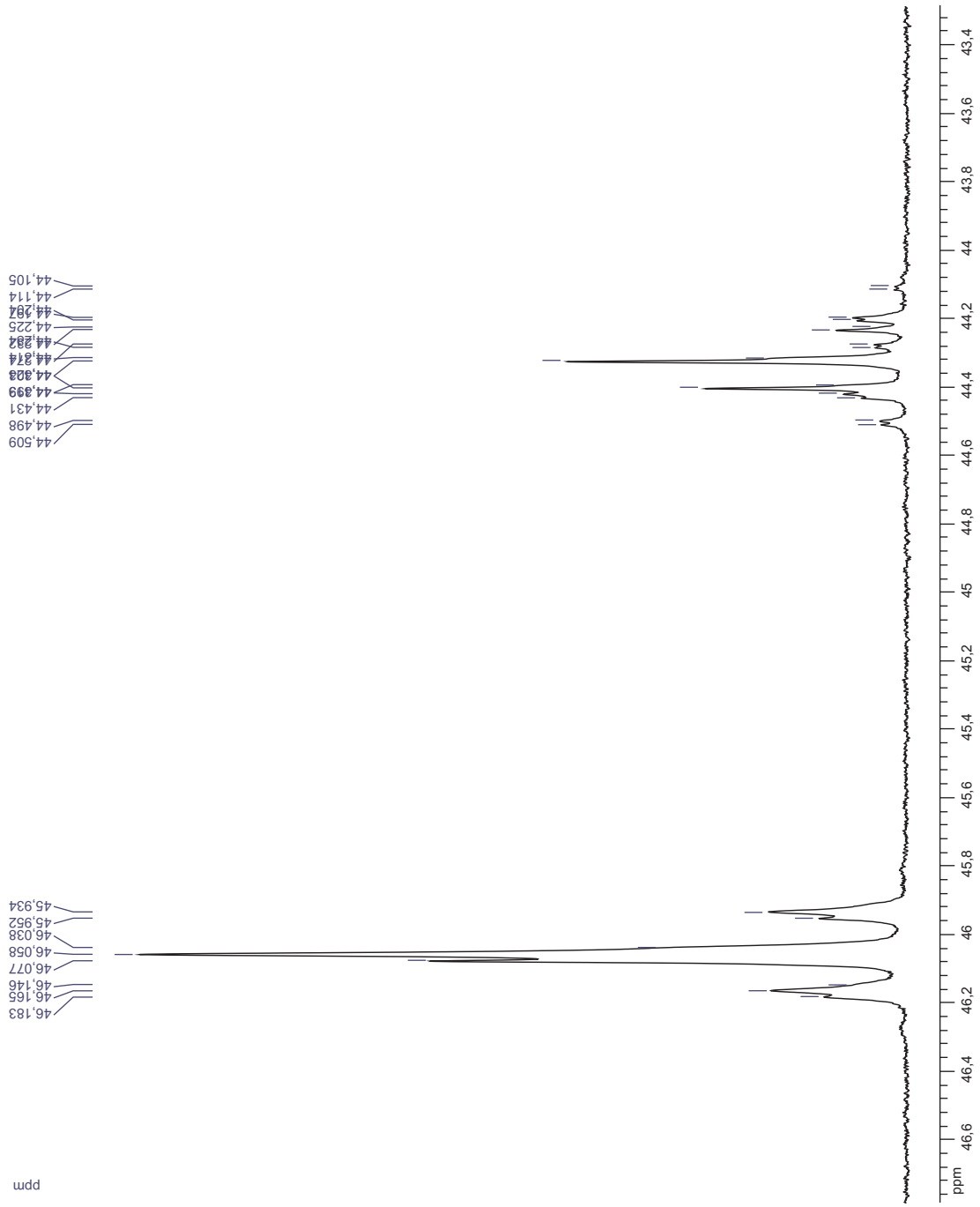

ppm
23,995
22,593
22,693
22,698
22,778
ppm
25
24,8
24,6
24,4
24,2
24
23,8
23,6
23,4
23,2
23
22,8
22,6
22,4
22,2
22
21,8

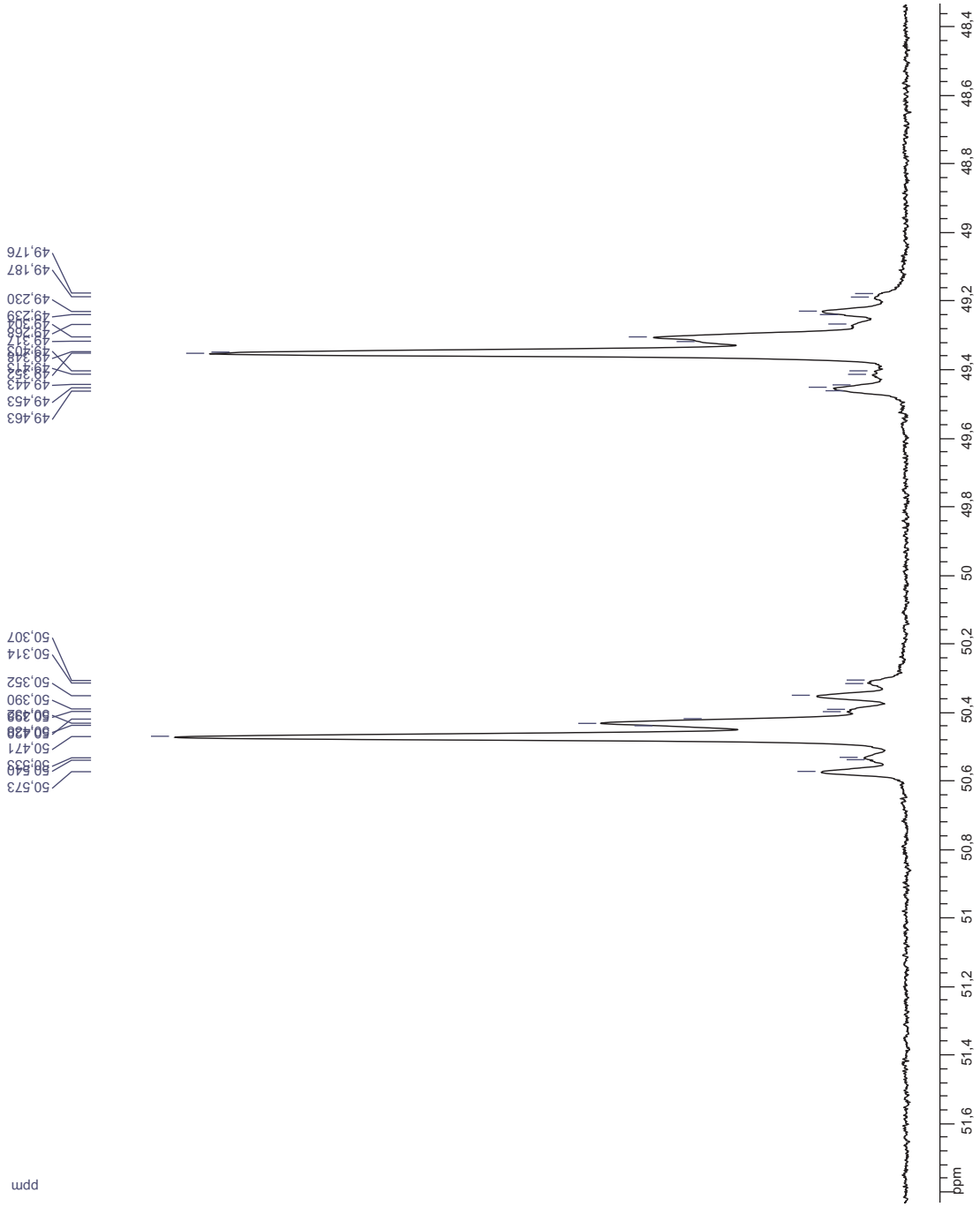

ppm
27,575
27,481
27,473
27,375
25,482
25,365
25,226
ppm
27,8
27,6
27,4
27,2
27
26,8
26,6
26,4
26,2
26
25,8
25,6
25,4
25,2
25
24,8
24,6

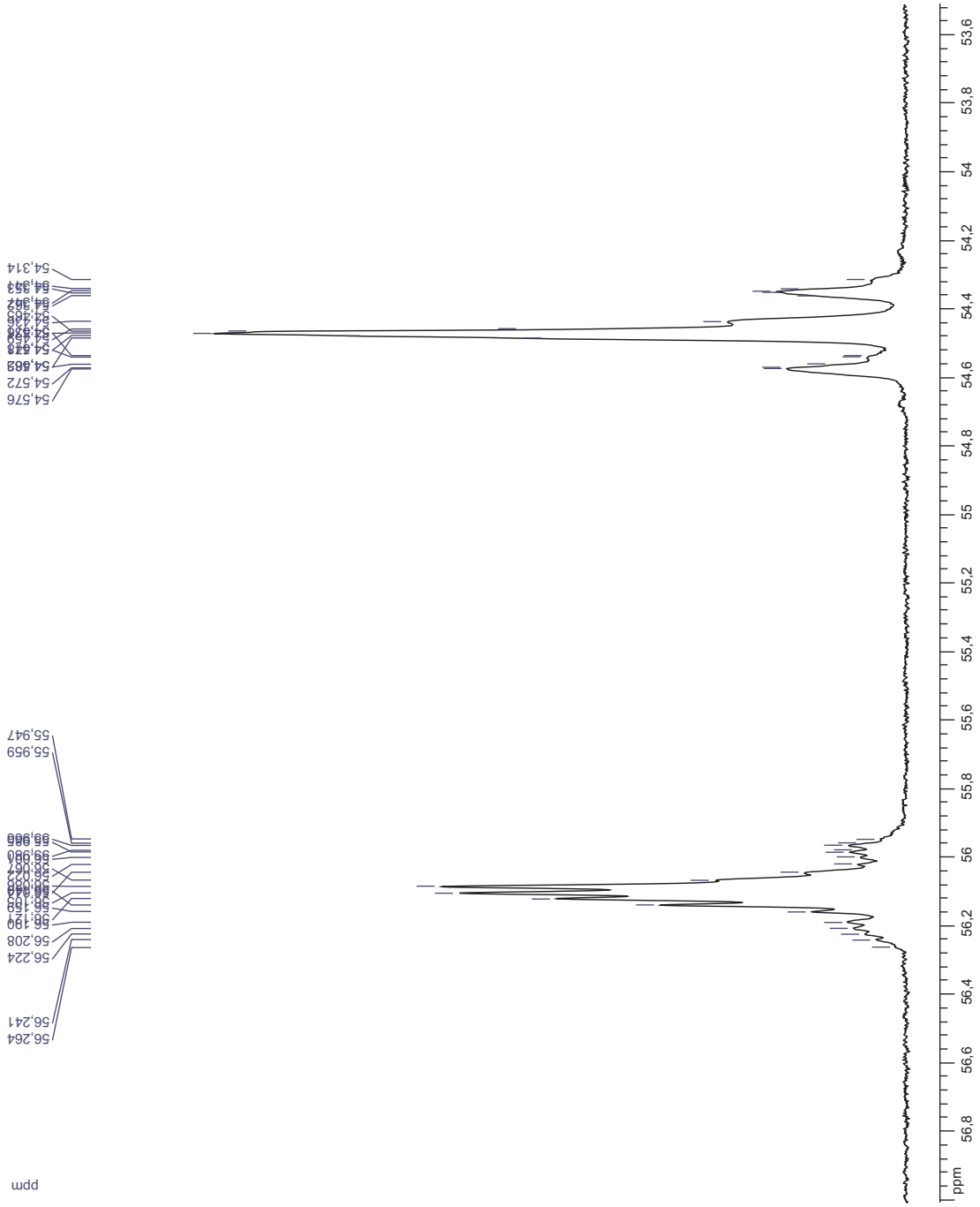

ppm
34,2
34
33,8
33,6
33,4
33,2
33
32,8
32,6
32,4
32,2
32
31,8
31,6
31,4
31,2
31
33,718
33,415
33,366
33,308
33,247
33,242
33,202
33,265
33,134
33,108
33,094
33,058
32,980
31,937
31,784
31,773
31,764
31,758
31,729

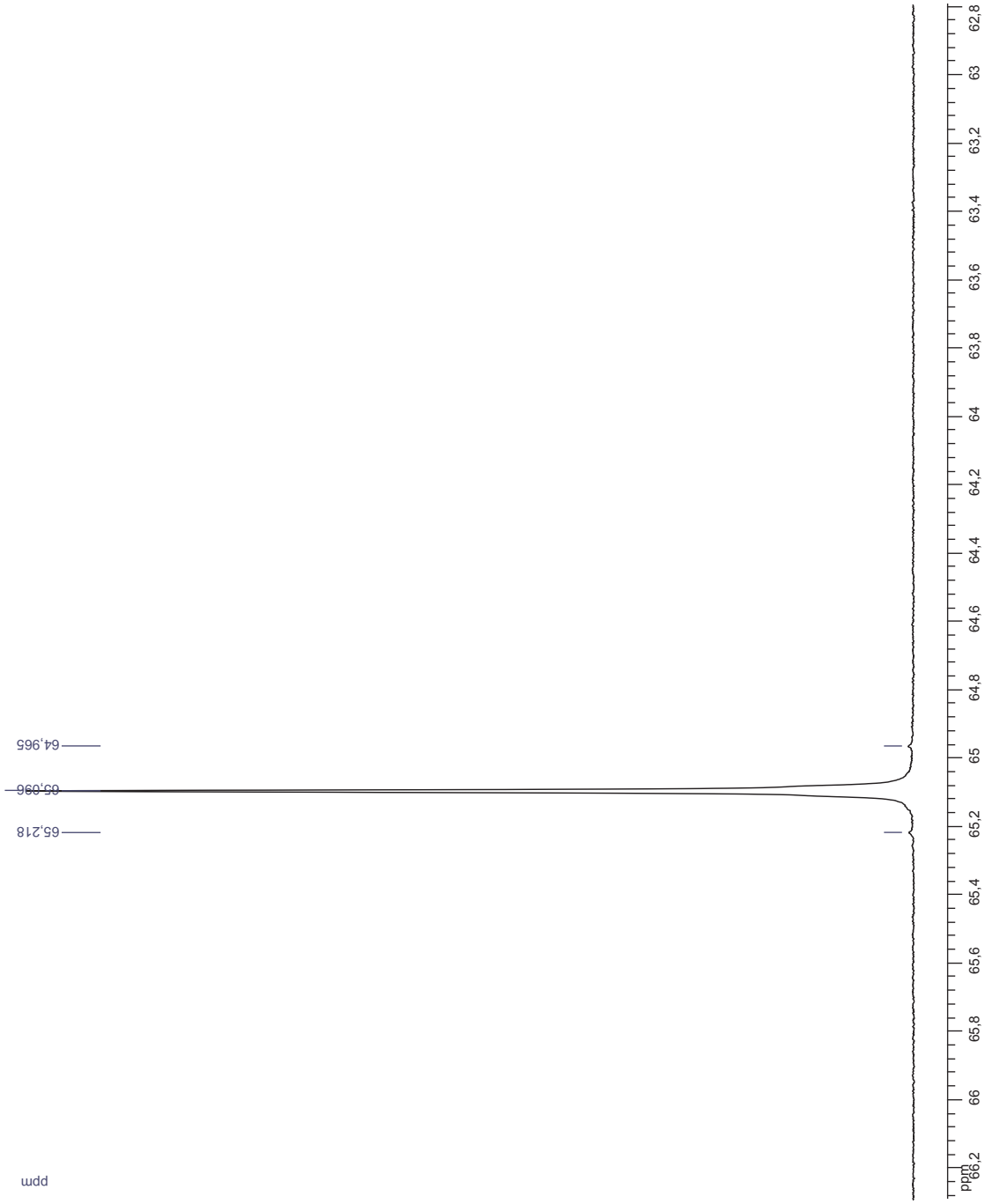

ppm
38,2
38
37,8
37,6
37,4
37,2
37
36,8
36,6
36,4
36,2
36
35,8
35,6
35,4
35,2
35
37,676
37,511
37,413
37,409
37,319
37,248
37,203
37,231
37,208
37,111
36,530
36,524
36,455
36,403
36,417
36,333
36,290
36,270
36,222
36,152


ppm
42,6
42,4
42,2
42
41,8
41,6
41,4
41,2
41
40,8
40,6
40,4
40,2
40
39,8
39,6
39,4
42,233
42,201
42,171
42,127
42,095
42,074
42,045
42,013
42,063
41,978
41,946
41,917
41,822
41,816
41,797
41,771
41,682
41,660
41,622
41,594
41,548
41,509
40,346


ppm
46,6
46,4
46,2
46
45,8
45,6
45,4
45,2
45
44,8
44,6
44,4
44,2
44
43,8
43,6
43,4
46,183
46,165
46,146
46,077
46,058
46,038
45,952
45,934
44,509
44,498
44,431
44,399
44,328
44,314
44,284
44,225
44,204
44,114
44,105

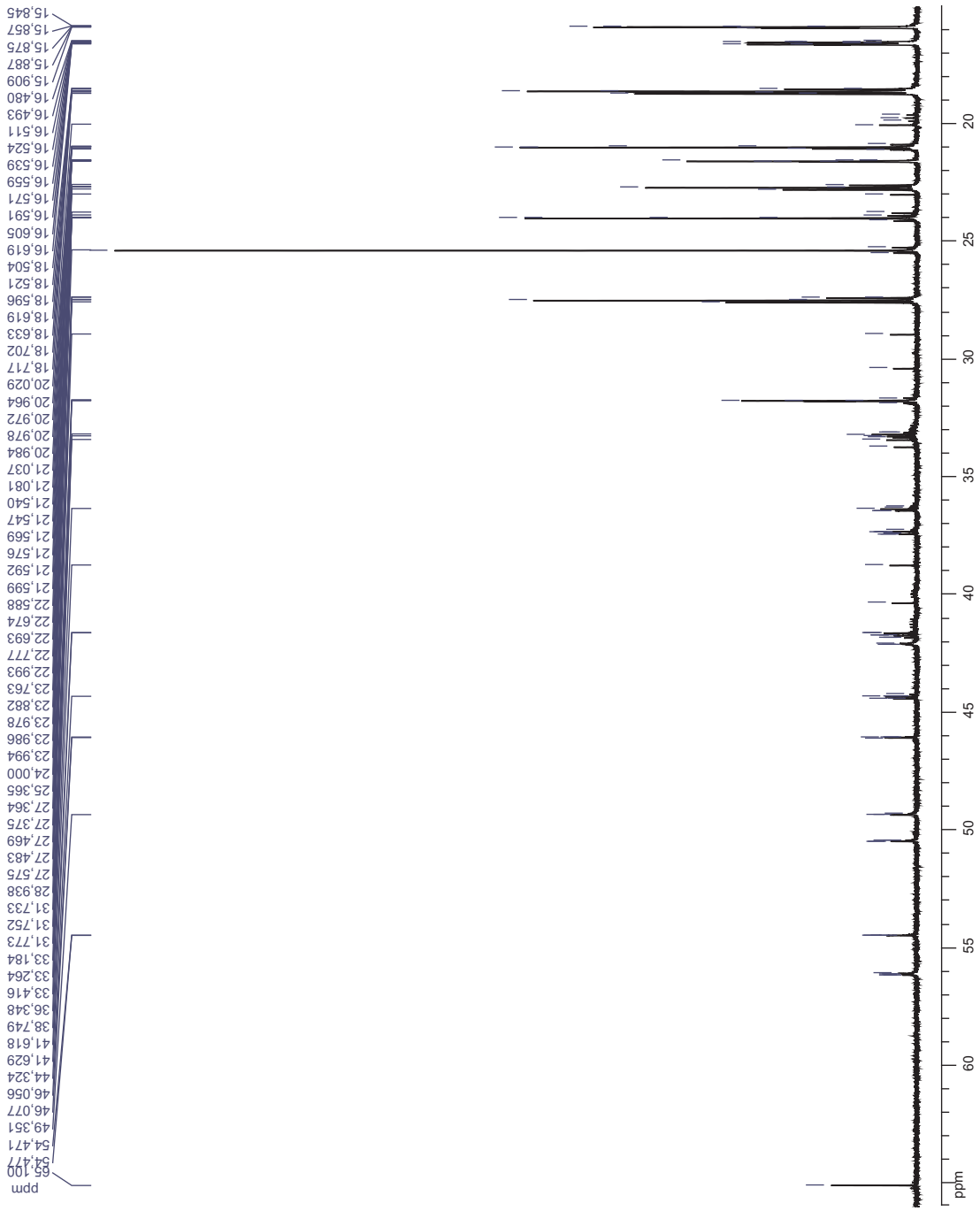

ppm
51,6
51,4
51,2
51
50,8
50,6
50,4
50,2
50
49,8
49,6
49,4
49,2
49
48,8
48,6
48,4
50,573
50,540
50,533
50,471
50,430
50,420
50,392
50,390
50,352
50,314
50,307
49,463
49,453
49,443
49,424
49,413
49,408
49,405
49,318
49,317
49,268
49,261
49,230
49,239
49,230
49,187
49,176

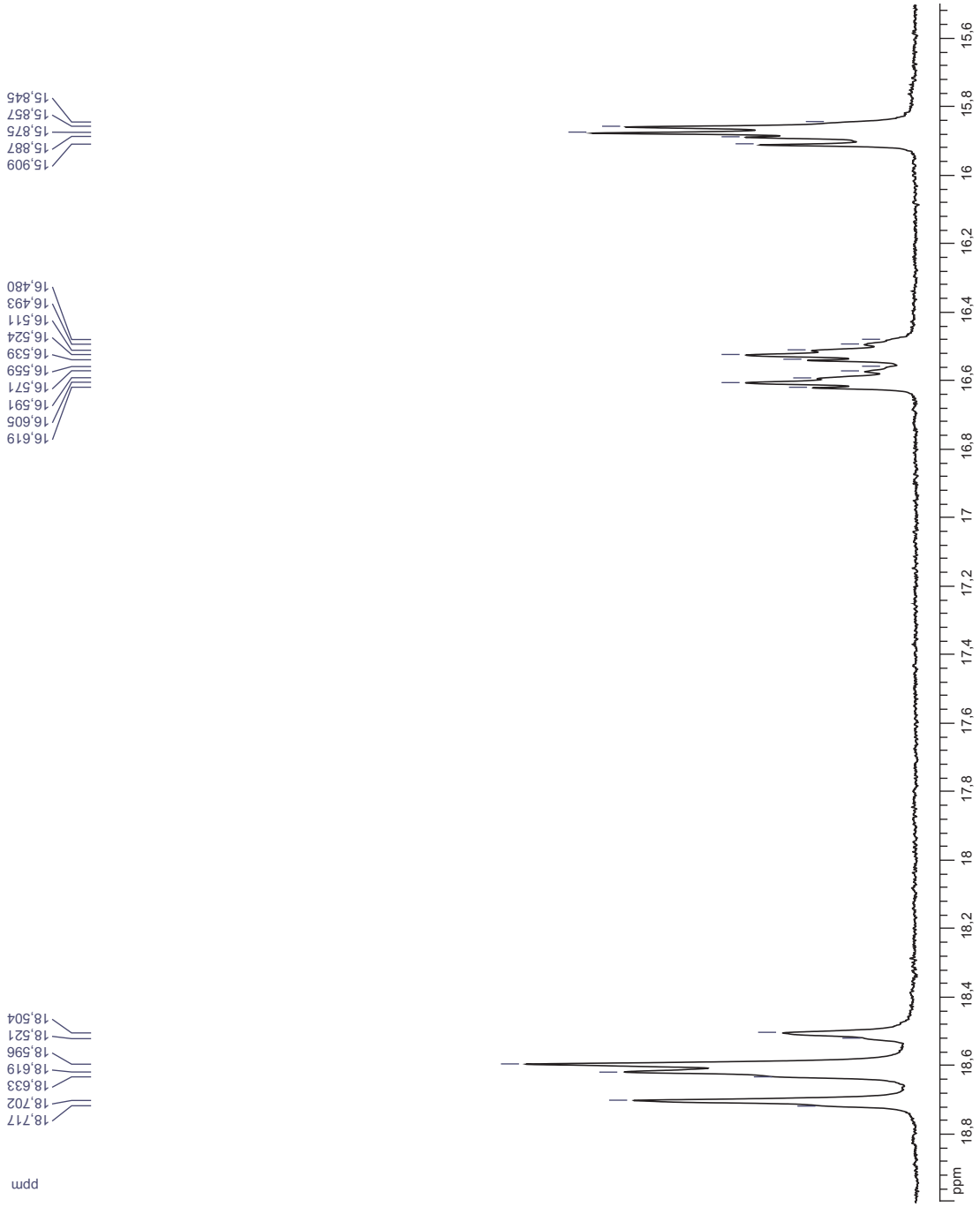

ppm
56,8
56,6
56,4
56,2
56
55,8
55,6
55,4
55,2
55
54,8
54,6
54,4
54,2
54
53,8
53,6
56,264
56,241
56,224
56,208
56,190
56,171
56,159
56,103
56,086
56,068
56,042
56,024
56,007
55,980
55,959
55,947
54,576
54,572
54,463
54,314

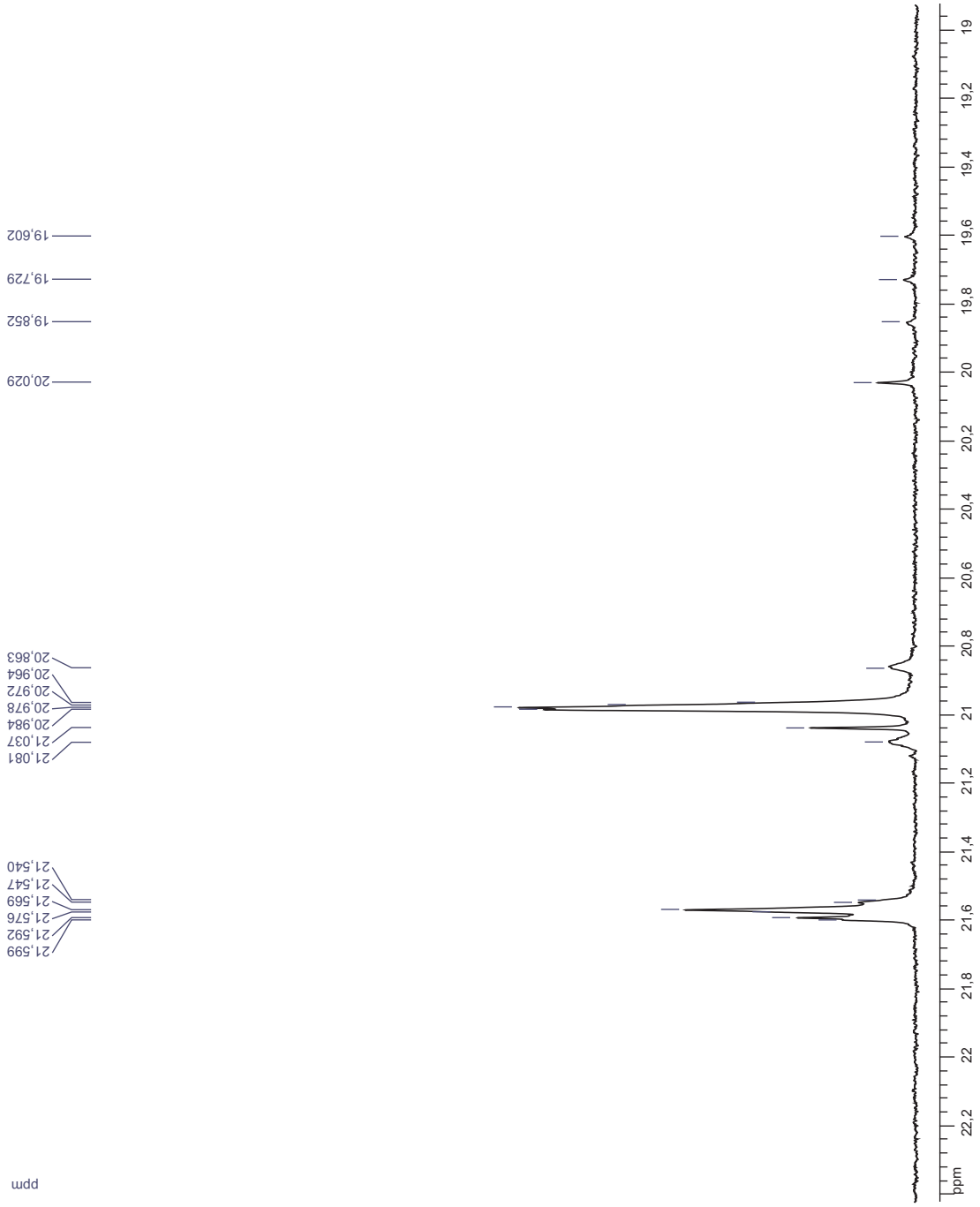

ppm
65,218
65,096
64,965
66,2
66
65,8
65,6
65,4
65,2
65
64,8
64,6
64,4
64,2
64
63,8
63,6
63,4
63,2
63
62,8
ppm

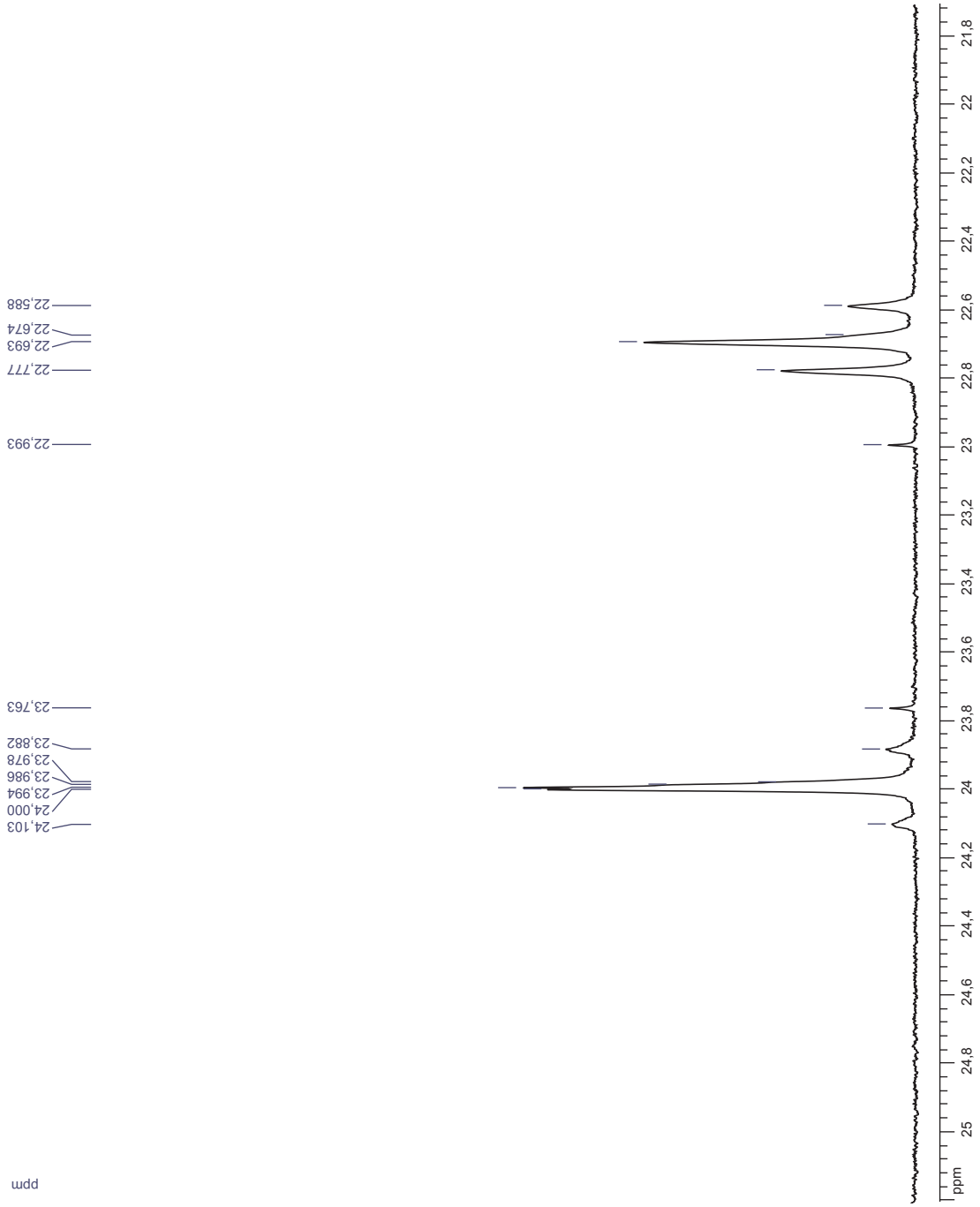
Annexe 5

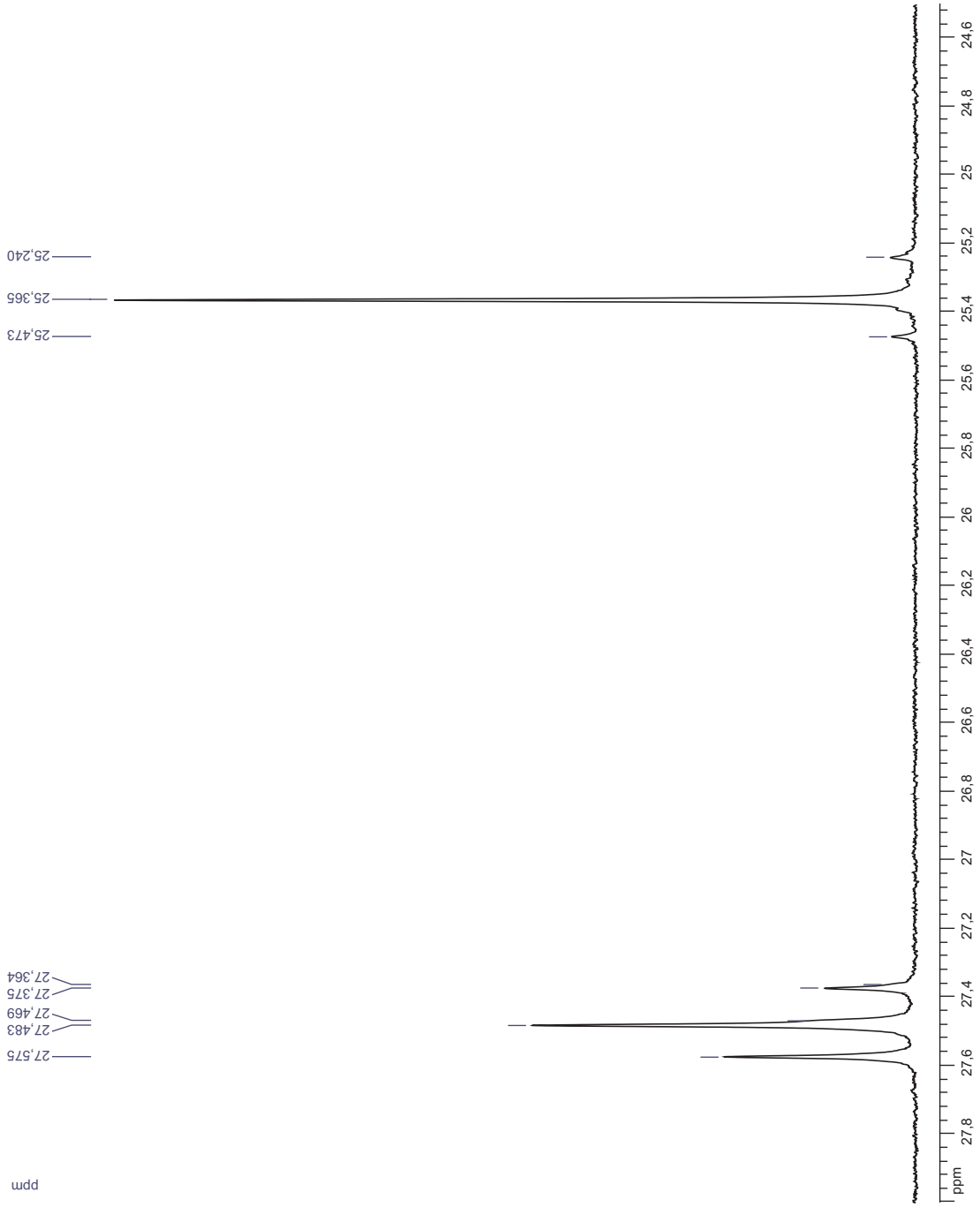
Spectre de RMN ^{13}C de l'acétate de bishomohopanol obtenu à partir des hopanoïdes de *Zymomonas mobilis* après incorporation du [6-^{13}C]glucose

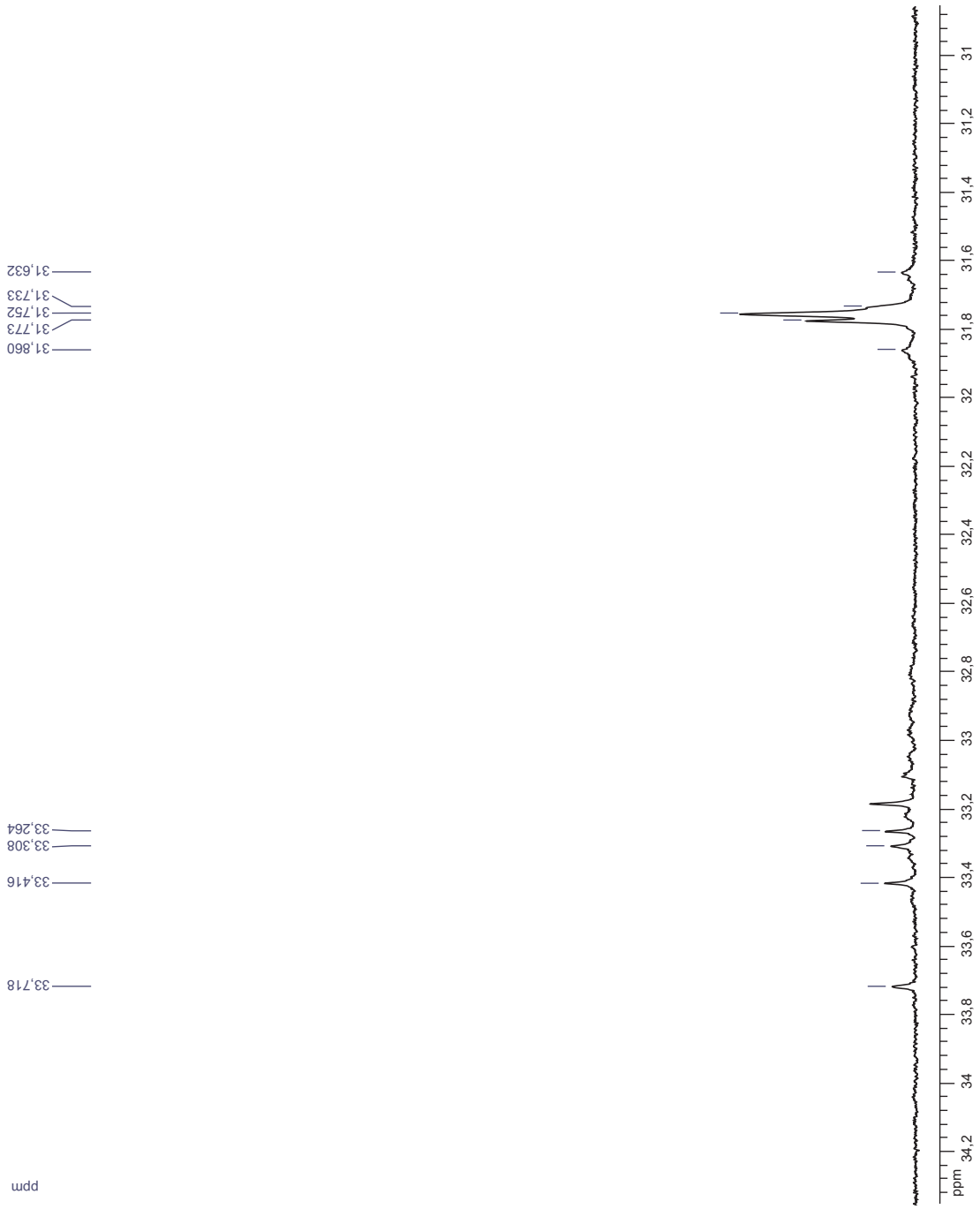

ppm
65,100
54,477
54,471
49,351
46,077
46,056
44,324
41,629
41,618
38,749
36,348
33,416
33,264
33,184
31,773
31,752
31,733
28,938
27,575
27,483
27,469
27,375
25,364
25,365
24,000
23,994
23,986
23,978
23,882
23,763
22,993
22,777
22,693
22,674
21,599
21,592
21,576
21,569
21,547
21,540
21,081
21,037
20,984
20,978
20,972
20,964
18,717
18,702
18,633
18,619
18,596
18,521
18,504
16,619
16,605
16,591
16,571
16,559
16,539
16,524
16,511
16,493
16,480
15,909
15,887
15,875
15,857
15,845
ppm
60
55
50
45
40
35
30
25
20

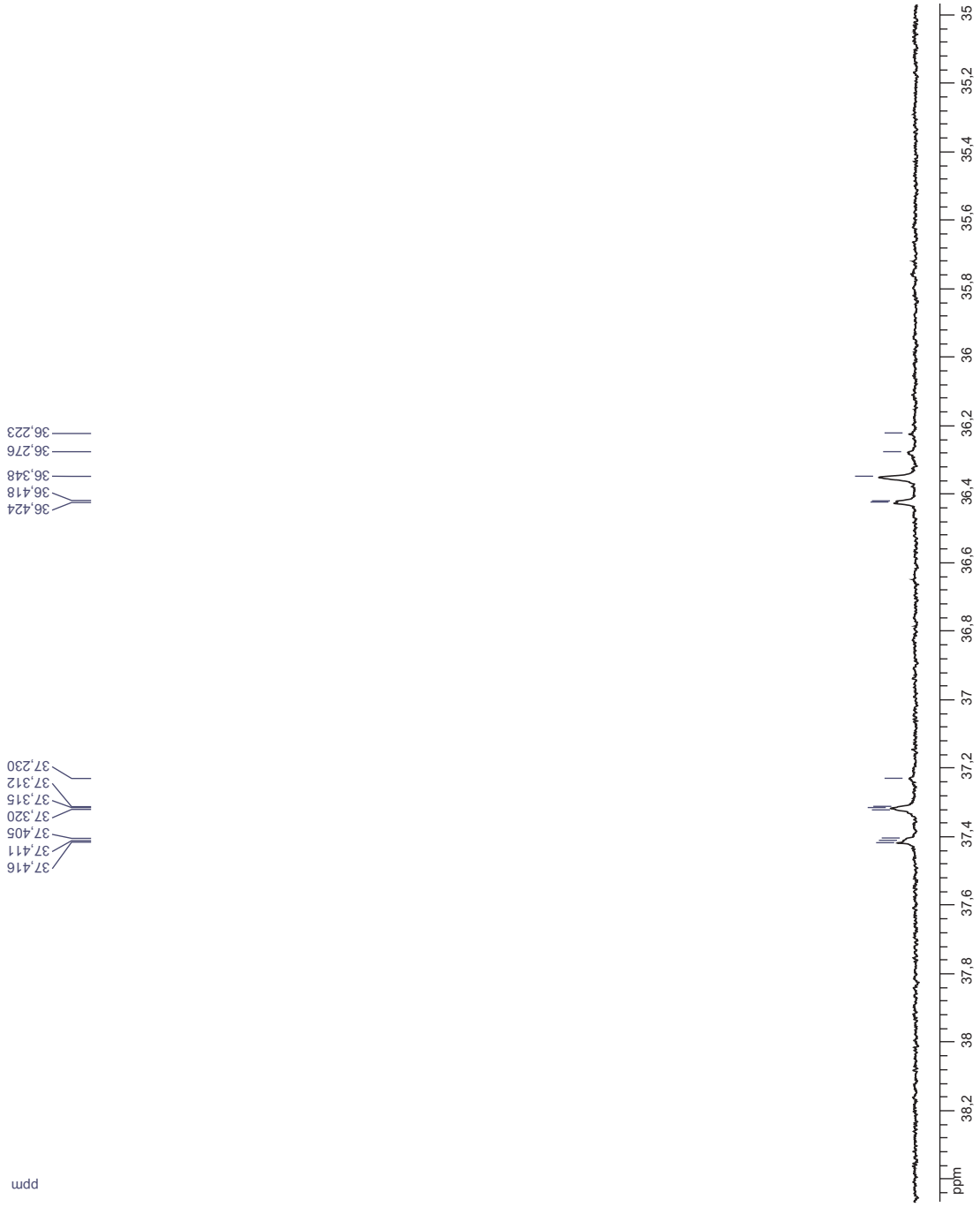

ppm
18,8
18,6
18,4
18,2
18
17,8
17,6
17,4
17,2
17
16,8
16,6
16,4
16,2
16
15,8
15,6
18,717
18,702
18,633
18,619
18,596
18,521
18,504
16,619
16,605
16,591
16,571
16,559
16,539
16,524
16,511
16,493
16,480
15,909
15,887
15,875
15,857
15,845

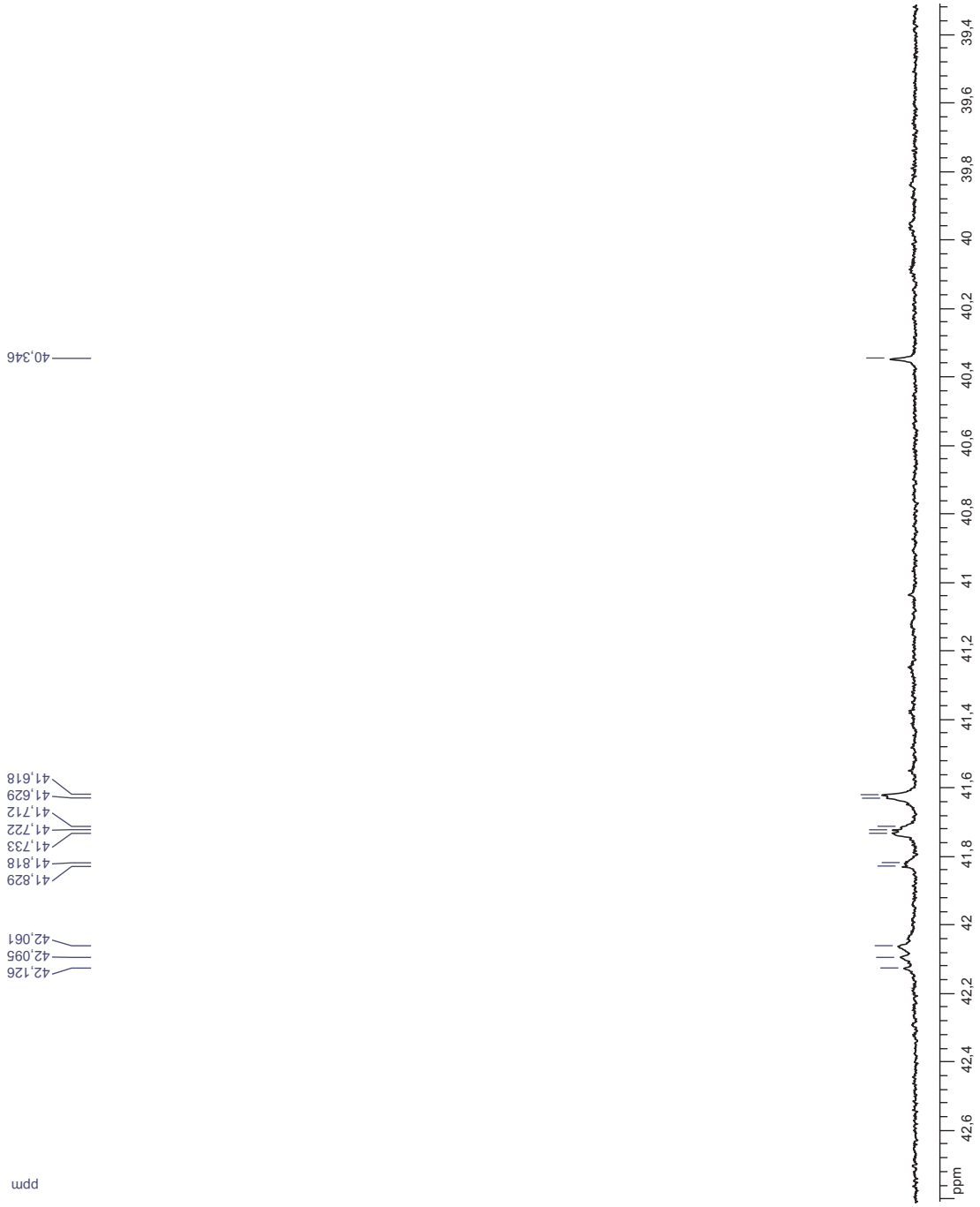

ppm
22,2
22
21,8
21,6
21,4
21,2
21
20,8
20,6
20,4
20,2
20
19,8
19,6
19,4
19,2
19
21,599
21,592
21,576
21,569
21,547
21,540
21,081
21,037
20,984
20,978
20,972
20,964
20,863
20,029
19,852
19,729
19,602

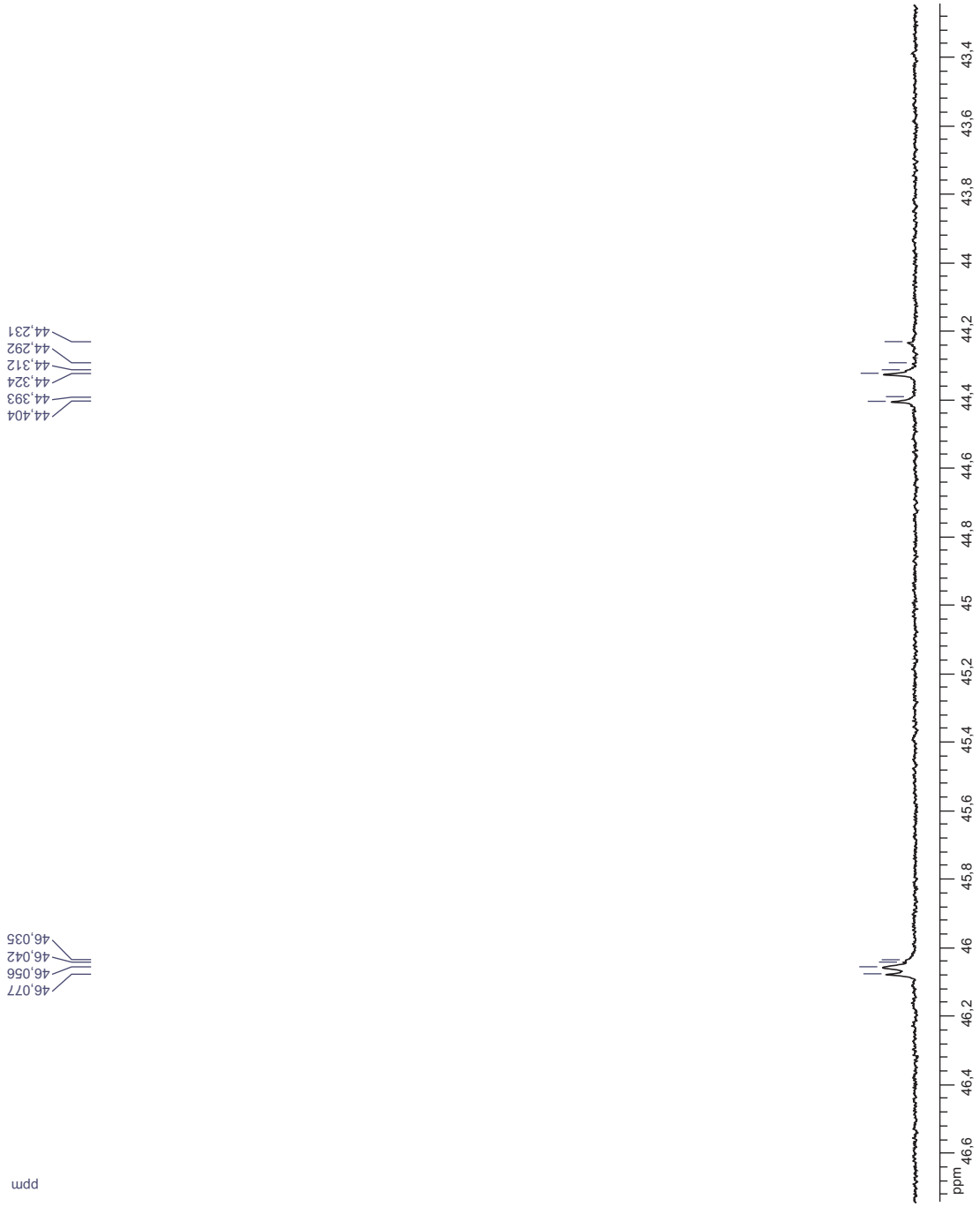

ppm
25
24,8
24,6
24,4
24,2
24
23,8
23,6
23,4
23,2
23
22,8
22,6
22,4
22,2
22
21,8
24,103
24,000
23,994
23,986
23,978
23,882
23,763
22,993
22,777
22,693
22,674
22,588

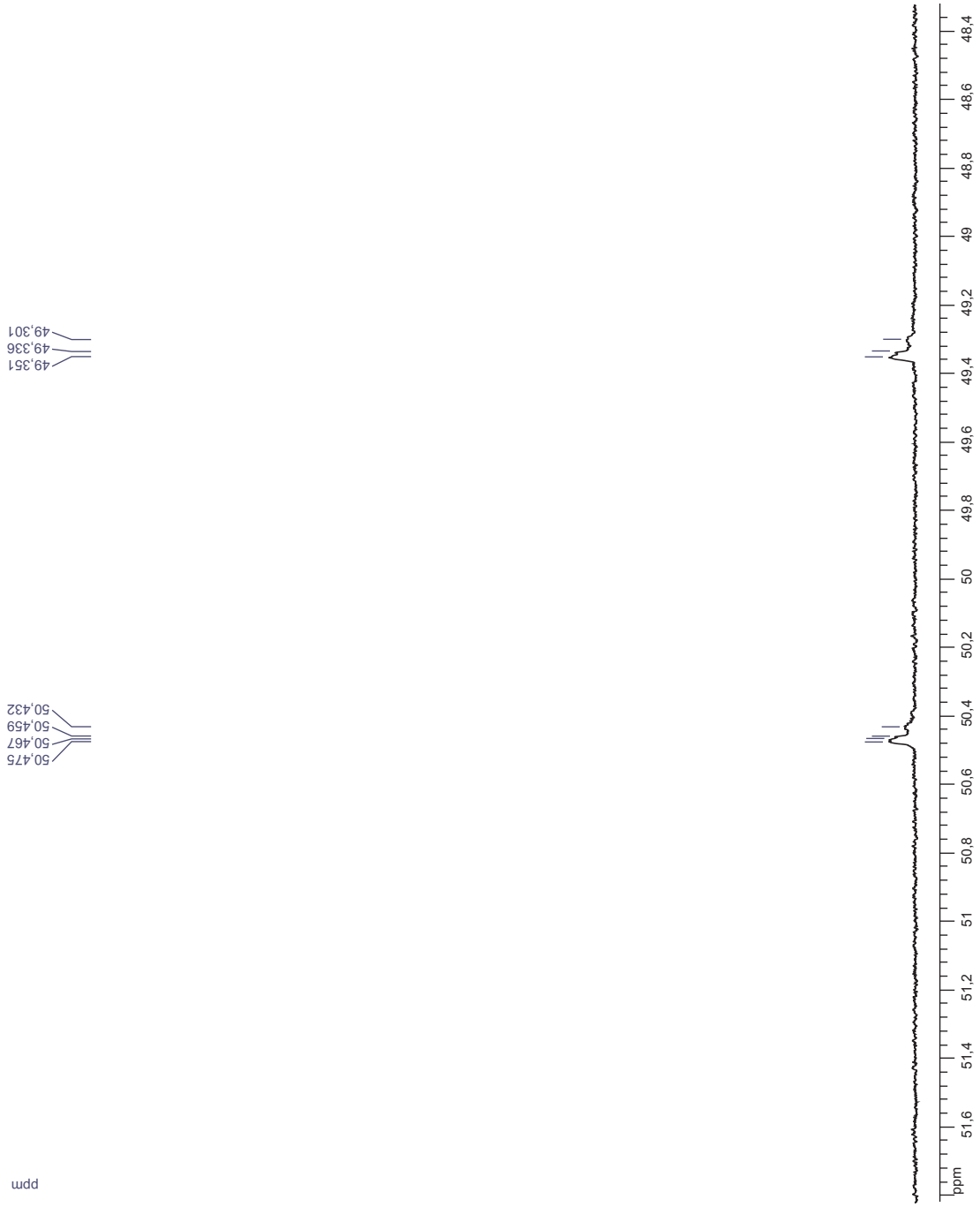

ppm
27,8
27,6
27,4
27,2
27
26,8
26,6
26,4
26,2
26
25,8
25,6
25,4
25,2
25
24,8
24,6
27,575
27,483
27,469
27,375
27,364
25,473
25,365
25,240

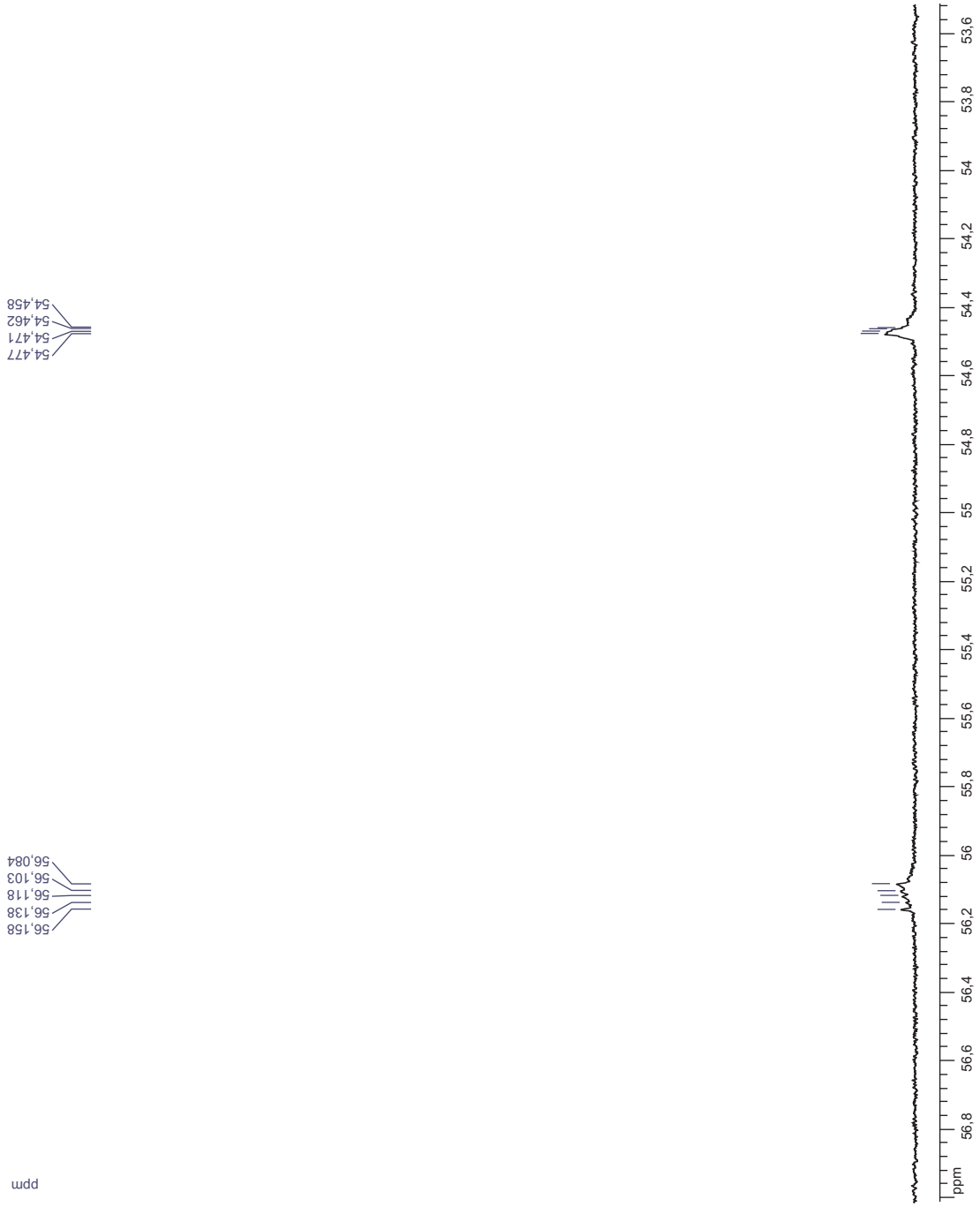

31,632
31,733
31,752
31,773
31,860
33,264
33,308
33,416
33,718
ppm
34,2
34
33,8
33,6
33,4
33,2
33
32,8
32,6
32,4
32,2
32
31,8
31,6
31,4
31,2
31
ppm

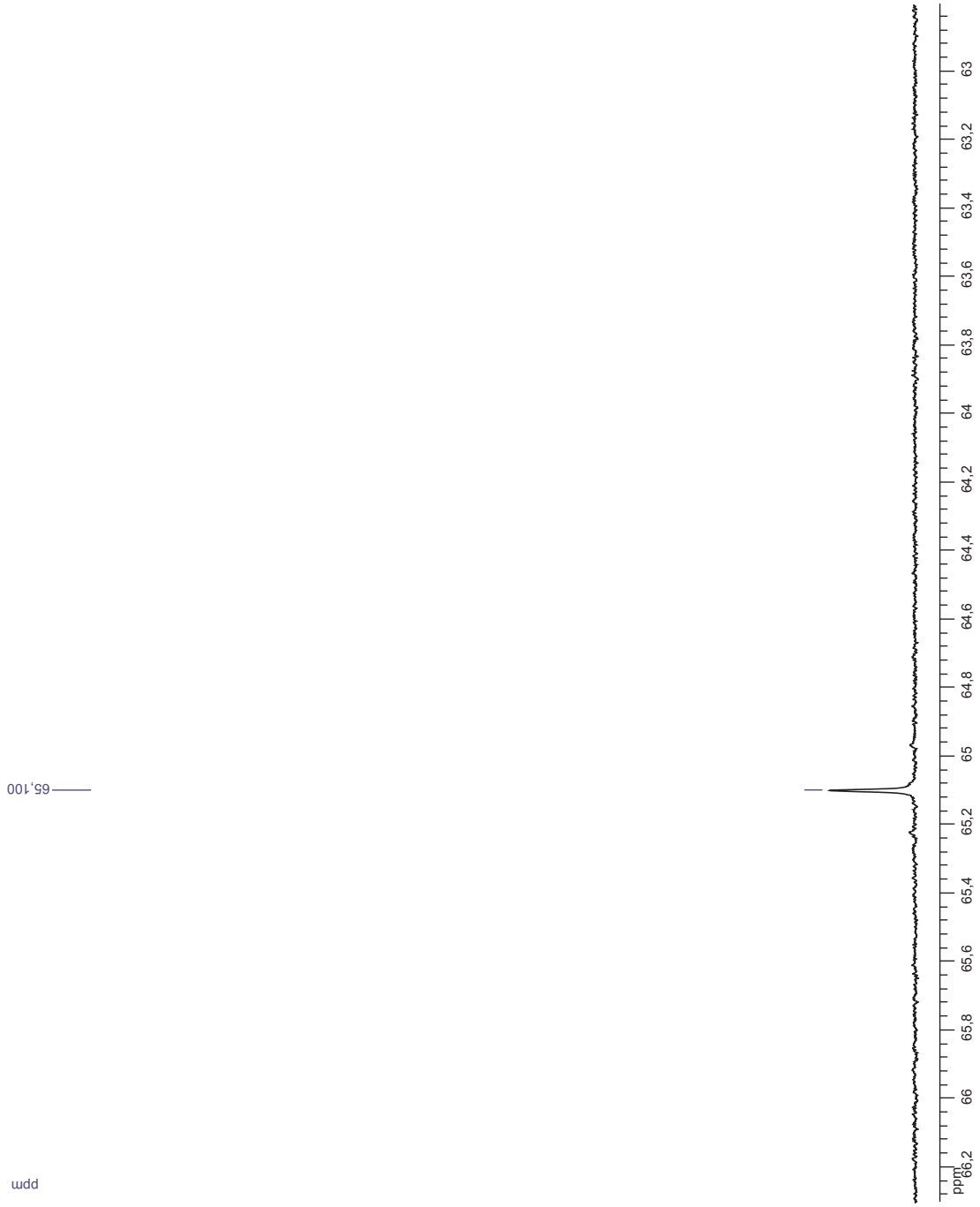

ppm
38,2
38
37,8
37,6
37,4
37,2
37
36,8
36,6
36,4
36,2
36
35,8
35,6
35,4
35,2
35
37,416
37,411
37,405
37,320
37,315
37,312
37,230
36,424
36,418
36,348
36,276
36,223


ppm
42,6
42,4
42,2
42
41,8
41,6
41,4
41,2
41
40,8
40,6
40,4
40,2
40
39,8
39,6
39,4
42,126
42,095
42,061
41,829
41,818
41,733
41,722
41,712
41,629
41,618
40,346


46,077
46,056
46,042
46,035
44,404
44,393
44,324
44,312
44,292
44,231
ppm
46,6
46,4
46,2
46
45,8
45,6
45,4
45,2
45
44,8
44,6
44,4
44,2
44
43,8
43,6
43,4
ppm


ppm
51,6
51,4
51,2
51
50,8
50,6
50,4
50,2
50
49,8
49,6
49,4
49,2
49
48,8
48,6
48,4
50,475
50,467
50,459
50,432
49,351
49,336
49,301


ppm
56,8
56,6
56,4
56,2
56
55,8
55,6
55,4
55,2
55
54,8
54,6
54,4
54,2
54
53,8
53,6
56,158
56,138
56,118
56,103
56,084
54,477
54,471
54,462
54,458


65,100
ppm
66,2
66
65,8
65,6
65,4
65,2
65
64,8
64,6
64,4
64,2
64
63,8
63,6
63,4
63,2
63
ppm