

Université de Montréal

Synthèse et études cinétiques de substrats analogues et d'inhibiteurs
de l'étape d'acylation
de la γ -glutamyl transpeptidase

par

Christian Lherbet

Département de chimie

Faculté des arts et sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en chimie

Décembre 2003

© Christian Lherbet, 2003

Université de Montréal

Faculté des études supérieures



QD
3
U54
2004
v.004

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

Synthèse et études cinétiques de substrats analogues et d'inhibiteurs
de l'étape d'acylation
de la γ -glutamyl transpeptidase

présentée par :

Christian Lherbet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. W. Lubell (F.A.S. – Chirurgie)	[Redacted]	Président-rapporteur
Prof. J. W. Keillor (F.A.S. - Chimie)	[Redacted]	Membre de recherche
Prof. A. Schmitzer (F.A.S. – Chimie)	[Redacted]	Membre du jury
Prof. R. Chênevert	[Redacted]	Examineur externe
Dr J.Y. Lapointe	[Redacted]	Représentant du doyen

Thèse acceptée le :

01/03/04

Sommaire

La *gamma*-glutamyl transpeptidase (GGT) est une enzyme hétérodimérique, hautement glycosylée, liée à la membrane externe des cellules. Elle est impliquée dans les processus de détoxification cellulaire, le transport des acides aminés, l'apoptose et l'activation de prodrogues anti-cancéreuses. Récemment, il a été montré que l'activité de la GGT était aussi reliée aux maladies cardio-vasculaires et au diabète. Cette enzyme joue un rôle clé dans le métabolisme du glutathion (substrat *in vivo* de la GGT) et catalyse le clivage et la formation de nouveaux liens γ -glutamyles dans des étapes d'acylation et de désacylation pour la réaction de transpeptidation de l'enzyme. Malgré son implication dans divers processus physiologiques, son mécanisme d'action n'est pas bien connu.

Afin d'obtenir de plus amples renseignements sur le mécanisme d'acylation de la GGT, une série de substrats analogues au glutathion (*gamma*-glutamylanilides *para*-substitués) a été synthétisée et testée comme substrat donneur en présence d'une concentration saturante en substrat accepteur Gly-Gly. Ainsi, en variant la force du lien amide grâce à différents substituants (électrodonneurs ou électroattracteurs) en position *para* sur l'anilide, des études de chimie physico-organique (courbes de Hammett, Eyring et van't Hoff) ont été effectuées. Un mécanisme concerté suggérant un état de transition très ordonné a été proposé pour l'étape critique de l'acylation. Des études de marquage par le cyanate de potassium ont été faites pour identifier des acides aminés importants dans la réaction de transpeptidation. Nous avons montré dans cette étude que la GGT en présence de KCNO est inhibée. Des analyses de l'enzyme inhibée ont permis d'identifier un peptide correspondant à la partie *N*-terminale de la grosse sous-unité jouant un rôle dans la réaction de transpeptidation. Un mécanisme de cette réaction est proposé et servira dans la conception de substrats ou inhibiteurs efficaces pour la GGT.

La nucléophilie de l'acide aminé attaquant le substrat donneur dans la GGT n'est pas bien connue. Aussi, une nouvelle série d'analogues du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, avec des hétéroatomes en position *gamma* sur la chaîne latérale, a été synthétisée. Ces composés ont été testés comme substrats et inhibiteurs de la GGT de rat. Il semble que l'électrophilie du groupement carbonyle soit faible et que la nucléophilie de l'acide aminé de la GGT (thréonine ou sérine) réagissant sur le substrat donneur ne soit pas

assez grande pour faire la catalyse. Cependant, ces composés pourraient agir comme inhibiteurs avec d'autres enzymes possédant un acide aminé plus nucléophile dans le site actif, ce qui en fait un outil puissant pour obtenir des intermédiaires enzymatiques réactionnels.

La GGT étant impliquée dans plusieurs désordres physiologiques, la synthèse de substrats ou d'inhibiteurs devient primordiale. Ceci passe par une meilleure compréhension des éléments nécessaires à la reconnaissance de ces molécules par l'enzyme et par l'identification du nucléophile. Dans ce but, une cartographie du site actif de la GGT avec des analogues de la L-glutamine a été effectuée et a démontré l'importance des groupements ammonium et carboxylate en position α . Une étude similaire a été faite avec des analogues de l'acide glutamique comportant différentes fonctionnalités inhibitrices en position δ . L'importance de la stéréochimie du site actif de la GGT a été prouvée grâce aux différents diastéréoisomères de la L-méthionine sulfoxyde. En s'appuyant sur ces informations, un inhibiteur sulfoxyde analogue au glutathion a été synthétisé, testé et a montré une très bonne affinité avec la GGT. Ceci ouvre la porte à la synthèse d'analogues plus puissants.

Un inhibiteur phosphonamide analogue au glutathion a été envisagé afin de piéger le nucléophile de manière irréversible et de l'identifier pour la première fois sur une GGT de mammifère. La synthèse a été menée avec succès jusqu'à la déprotection finale des groupements protecteurs. Ces premiers essais ont montré la difficulté de synthétiser des phosphonamides avec un squelette glutamyle totalement déprotégé mais aussi en présence d'une liaison P-N extrêmement fragile. Des solutions impliquant la modification de la synthèse sont apportées.

Une meilleure compréhension du mécanisme de la GGT et de la structure de celle-ci a été obtenue grâce à ces études. Ces informations seront très importantes pour la synthèse future de médicaments servant à lutter contre des désordres physiologiques impliquant la GGT.

Mots clés : enzyme, γ -glutamyl transpeptidase, inhibition, cinétiques, cyanate de potassium, cartographie, glutathion, sulfoxyde, phosphonamide.

Summary

γ -Glutamyl transpeptidase (GGT) is a heterodimeric, highly glycosylated enzyme bound to the extracellular membrane of cells. It is implicated in cellular detoxification processes, amino acid transport, apoptosis and anti-cancer prodrug activation. It has also been shown that GGT activity is related to cardiovascular diseases and diabetes. This enzyme plays a key role in glutathione metabolism (its *in vivo* substrate) by catalyzing the cleavage and formation of γ -glutamyl bonds through acylation and deacylation of GGT in a transpeptidation reaction. Despite its implication in many important physiological processes, its mechanism of action is not well known.

In order to gain insight into the mechanism of acylation of GGT, a series of γ -glutamyl *para*-substituted-anilide substrate analogues was synthesized and tested as donor substrates in the presence of saturated concentration of Gly-Gly, the best acceptor substrate. Physical-organic chemistry studies (Hammett, Eyring and van't Hoff plots) allowed us to propose a highly ordered concerted mechanism for the critical acylation step. Labelling studies using potassium cyanate were carried out in order to identify some important amino acids implicated in the transpeptidation reaction. We have shown in this study that treatment of the enzyme with potassium cyanate led to its inhibition. Analysis of the modified enzyme showed that carbamylation is effected on a fragment corresponding to a *N*-terminal small peptide of the heavy subunit. A mechanism for the transpeptidation reaction is proposed and will help in the design of efficient GGT substrates and inhibitors.

To obtain details on the nucleophilicity of the amino acid attacking the donor substrate in GGT, a new series of L-glutamic acid *p*-nitroanilide analogues, with heteroatoms at the γ -position on the side chain was synthesized. These compounds were tested as substrates and inhibitors of rat GGT. It appears that the electrophilicity of the carbonyl group is low and that the unknown nucleophile of GGT is not powerful enough to effect catalysis. However, these kinds of compounds could act as inhibitors with

enzymes bearing good nucleophiles in the active site, thus they may be tools for identifying enzyme intermediates.

The synthesis of substrates and inhibitors of GGT is important because of its implication in several physiological disorders. A better knowledge of the recognition elements of GGT for these molecules is required. A mapping of the active site of GGT was carried out with some L-glutamine analogues which demonstrated the importance of the ammonium and carboxylate groups in α -position for high affinity at the active site of GGT. We have also studied different inhibiting functionalities of L-glutamic acid analogues at the δ -position. By using the two diastereoisomers of L-methionine sulfoxide, we proved that GGT displays high stereoselectivity for one of them at the δ -position. With this information, a sulfoxide inhibitor, analogous to glutathione, was synthesized, tested and exhibited high affinity for GGT, indicating a new direction for making more powerful GSH inhibitors.

A phosphonamide inhibitor analogous to GSH was made to trap irreversibly and to identify the nucleophile for the first time for a mammalian GGT. The synthesis of the protected glutathione derivative was demonstrated successful; however, the final step for the removal of the protecting groups demonstrated the difficulty in synthesizing phosphonamides with a γ -glutamyl moiety in the presence of a fragile P-N bond. Potential solutions involving the modification of the synthesis are proposed.

A better comprehension of the mechanism and structure of GGT has been achieved. This information may be of importance in the future synthesis of drugs acting against physiological disorders where GGT is implicated.

Key words : enzyme, γ -glutamyl transpeptidase, inhibition, kinetics, potassium cyanate, mapping, glutathione, sulfoxide, phosphonamide

Table des matières

Sommaire.....	iii
Summary.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	xii
Liste des schémas.....	xv
Liste des tableaux.....	xviii
Liste des abréviations.....	xx
Dédicace.....	xxv
Remerciements.....	xxvi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. Présentation de la GGT	2
1.1.1. Généralités.....	2
1.1.2. Rôles physiologiques	3
1.1.3. Mécanisme de catalyse de la GGT	8
1.1.4. Site actif de la GGT.....	11
1.1.4.1 Acides aminés impliqués dans la reconnaissance des substrats.....	11
1.1.4.2. Acides aminés impliqués dans la catalyse	12
1.1.4.3. Spécificité des substrats	14
1.2. Objectifs de recherche	15
1.2.1. Mécanisme d'acylation de la GGT	15
1.2.2. Étude de la nucléophilie de la GGT par la synthèse de dérivés aza et oxaglutamyl- <i>p</i> -nitroanilide.....	16
1.2.3. Cartographie du site actif de la GGT	16
1.2.4. Synthèse d'inhibiteurs réversibles de l'étape d'acylation de la GGT	17
1.2.5. Synthèse et études cinétiques d'inhibiteurs irréversibles de la GGT	17
Chapitre 2 : Mécanisme d'acylation de la GGT.....	18
2.1. Introduction.....	19
2.2. Effets de température : courbe de Eyring.....	22
2.2.1. Introduction.....	22
2.2.2. Résultats	23
2.2.3. Discussion	24
2.3. Identification de l'acide général par une courbe de van't Hoff.....	27
2.3.1. Introduction.....	27
2.3.2. Résultats	28

2.3.3.	Discussion	33
2.4.	Identification de la base générale	36
2.4.1.	Résultats	38
2.4.1.1.	Tests d'inhibition	38
2.4.1.2.	Marquage de la GGT et spectrométrie de masse	41
2.4.1.3.	Courbe log k_{cat} – pH	44
2.4.1.4.	Activité transpeptidase <i>versus</i> hydrolase	46
2.4.2.	Interprétation des résultats	48
2.5.	Conclusion : acides aminés proposés dans le mécanisme pour la transpeptidation	50
Chapitre 3 : Étude de la nucléophilie de la GGT par la synthèse de dérivés aza et oxaglutamyl-<i>p</i>-nitroanilide		54
3.1.	Introduction	55
3.2.	Études cinétiques d'analogues de la L-glutamine	57
3.2.1.	Méthodologie employée	57
3.2.2.	Résultats et discussion	58
3.2.2.1.	Essai avec la L-glutamine	58
3.2.2.2.	Essais avec des analogues de la L-glutamine	59
3.3.	Analogues du L-γ-glutamyl-<i>p</i>-nitroanilide	60
3.3.1.	Synthèses effectuées	60
3.3.2.	Résultats cinétiques et discussion	64
3.4.	Conclusion et perspectives	71
Chapitre 4 : Cartographie du site actif de la GGT		74
4.1.	Introduction	75
4.2.	Cartographie du site de liaison par l'utilisation de composés dérivés de la L-glutamine	76
4.2.1.	Introduction	76
4.2.2.	Synthèse des dérivés de la L-glutamine	77
4.2.3.	Études cinétiques effectuées	80
4.2.4.	Conclusion	83
4.3.	Étude de composés analogues à la L-glutamine modifiés en position γ	84
4.3.1.	Introduction	84
4.3.2.	Analogues de l'acide glutamique	87

4.3.3.	Étude de la stéréochimie du site actif de la GGT.....	92
4.3.3.1.	Synthèse et séparation des deux diastéréoisomères de la L-méthionine sulfoxyde.....	92
4.3.3.2.	Analyse cinétique d'un mélange de deux diastéréoisomères.....	95
4.3.3.3.	Résultats et discussion.....	98
4.3.3.4.	Autre application de la méthode cinétique déterminée à la section 4.3.3.2.....	101

Chapitre 5 : Synthèse d'inhibiteurs réversibles de l'étape d'acylation de la GGT106

5.1. Introduction.....	107
-------------------------------	------------

5.2. Synthèse et études cinétiques d'inhibiteurs soufrés analogues au glutathion.....	110
--	------------

5.2.1.	Synthèse de dérivés sulfoxydes ressemblant au glutathion.....	110
5.2.1.1.	Molécules envisagées comme inhibiteurs réversibles.....	110
5.2.1.2.	Méthodologie employée.....	112
5.2.1.3.	Synthèse de l'analogue sulfoxyde 5.14 du glutathion.....	113
5.2.1.4.	Synthèse de l'analogue thioéther 5.16 du glutathion.....	116
5.2.1.5.	Synthèse de l'analogue sulfone 5.19 du glutathion.....	117
5.2.1.6.	Synthèse du dérivé sulfoxyde 5.23 comportant une partie aromatique.....	118
5.2.2.	Résultats et discussion.....	119
5.2.3.	Conclusion.....	123

5.3. Études cinétiques d'un inhibiteur de type phosphinate.....	124
--	------------

Chapitre 6 : Synthèse et études cinétiques d'inhibiteurs irréversibles de la GGT 128

6.1. Introduction.....	129
-------------------------------	------------

6.2. Inhibiteurs de protéase à sérine ou cystéine.....	132
---	------------

6.2.1.	Introduction.....	132
6.2.2.	Résultats obtenus et discussion.....	133
6.2.2.1.	L'acivicine 6.2.....	133
6.2.2.2.	Les composés 6.4, 6.5 et 6.6.....	135
6.2.2.2.1.	Résultats.....	135
6.2.2.2.2.	Interprétation des résultats.....	136

6.3. Inhibiteurs de type phosphonamide.....	140
--	------------

6.3.1.	Introduction.....	140
6.3.2.	Rétrosynthèses proposées.....	143
6.3.3.	Résultats.....	146
6.3.3.1.	Synthèses de bromoalcane.....	146

6.3.3.2.	Réaction d'Arbuzov	149
6.3.3.3.	Synthèse des dérivés phosphonamides.....	153
6.3.3.3.1.	Synthèse du monoester de l'acide phosphonique	153
6.3.3.3.2.	Synthèse des amines analogues (ou non) de la cystéinyglycine.....	154
6.3.3.3.3.	Synthèse du phosphonamide.....	157
6.3.3.3.4.	Déprotection du dérivé phosphonamide 6.34	159
6.4.	Conclusion.....	163
Chapitre 7 :	Conclusion.....	165
Chapitre 8 :	Partie expérimentale	169
8.1.	Synthèse des substrats ou inhibiteurs.....	170
8.1.1.	Matériel utilisé	170
8.1.1.1.	Caractérisation des composés synthétisés.....	170
8.1.1.2.	Purification des produits	170
8.1.1.3.	Produits chimiques.....	170
8.1.2.	Méthode expérimentale.....	171
8.1.2.1.	Préparation des composés du chapitre 3	171
8.1.2.2.	Préparation des composés du chapitre 4	184
8.1.2.3.	Préparation des composés du chapitre 5	197
8.1.2.4.	Préparation des composés du chapitre 6	217
8.2.	Études cinétiques des substrats ou inhibiteurs.....	243
8.2.1.	Matériel utilisé pour les cinétiques	243
8.2.2.	Appareils pour les études cinétiques des composés synthétisés	243
8.2.3.	Détermination de l'activité spécifique	244
8.2.4.	Études cinétiques réalisées au chapitre 2	244
8.2.4.1.	Courbe de Eyring	244
8.2.4.1.1.	Cinétiques avec le L-GPNA	244
8.2.4.1.2.	Cinétiques avec les substrats donneurs L- γ -glutamyl- <i>p</i> - méthoxyanilide et L- γ -glutamylanilide	245
8.2.4.2.	Courbe de van't Hoff	246
8.2.4.3.	Identification de la base générale par le KCNO.....	247
8.2.4.3.1.	Tests d'inhibition	247
8.2.4.3.2.	Marquage de la GGT et spectrométrie de masse	247
8.2.4.3.3.	Courbe log k_{cat} -pH avec KCNO	248
8.2.4.3.4.	Activité transpeptidase <i>versus</i> hydrolase	248
8.2.5.	Études cinétiques pour les dérivés du chapitre 3	249
8.2.5.1.	Tests enzymatiques en présence de GDH	249
8.2.5.2.	Cinétiques enzymatiques avec les composés analogues au L- GPNA.....	249
8.2.6.	Études cinétiques pour les composés du chapitre 4	250

8.2.6.1.	Composés contenant un lien amide primaire	250
8.2.6.2.	Étude de composés analogues à la L-glutamine modifiée en position γ	251
8.2.6.3.	Configuration du site actif.....	252
8.2.6.4.	Application de la méthode cinétique au composé 4.22	252
8.2.7.	Études cinétiques pour les composés du chapitre 5	253
8.2.7.1.	Dérivés soufrés.....	253
8.2.7.2.	Dérivé phosphonique	254
8.2.8.	Études cinétiques pour les dérivés du chapitre 6	254
Références.....		256
Annexe 1		xxvii

Liste des figures

- Figure 1.1** : Le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide (L-GPNA) et le glutathion (GSH) : des substrats donneurs pour la GGT..... 9
- Figure 2.1** : Substrats γ -glutamylanilides *para*-substitués synthétisés pour l'étude de l'étape d'acylation de la GGT. (GEA représente un groupement électroattracteur et GED pour électrodonneur)..... 20
- Figure 2.2** : Courbe de Hammett pour la réaction de transpeptidation de la GGT avec les substrats donneurs L- γ -glutamylanilides *para*-substitués en présence de Gly-Gly en concentration saturante à pH 8.0. Les vitesses sont normalisées par rapport au composé sans substituant en position *para* sur l'aromatique. Le paramètre σ^- représente le paramètre de Hammett. Les substituants en position *para* sont indiqués au-dessus de chacun des points... 21
- Figure 2.3** : Courbe de Eyring pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl *p*-nitroanilide en présence de 20 mM du substrat accepteur glycyglycine dans un tampon 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 à différentes températures..... 23
- Figure 2.4** : Profil pH-vitesse pour la transpeptidation par la GGT du L-GPNA en présence de concentrations saturantes de Gly-Gly à 37°C..... 27
- Figure 2.5** : Profil pH-vitesse pour la transpeptidation du L-GPNA par la GGT en présence de 20 mM de Gly-Gly à 30°C. La courbe théorique (modèle) a été tracée selon un modèle (en cloche avec deux états d'ionisation) utilisé dans le laboratoire..... 29
- Figure 2.6** : Courbe Lineweaver-Burk pour la transpeptidation par la GGT du L-GPNA en présence de conditions saturantes en Gly-Gly, à différents pH à 30°C..... 30
- Figure 2.7** : Courbe secondaire représentant les pentes obtenues dans le graphique Lineweaver-Burk (Figure 2.6) en fonction de l'inverse de la concentration de protons (tirée du pH) afin de déterminer la valeur de pK_a 31
- Figure 2.8** : Courbe de van't Hoff pour la transpeptidation de la GGT de reins de rat..... 32
- Figure 2.9** : Profil pH-vitesse à 30°C représentant possiblement deux courbes superposées..... 33
- Figure 2.10** : Courbe représentant le pourcentage d'activité spécifique résiduelle de la GGT après incubation avec différentes concentrations de KCNO en fonction du temps de préincubation..... 39
- Figure 2.11** : Détermination des constantes cinétiques k_{inact} et K_I pour l'inhibiteur KCNO..... 40
- Figure 2.12** : Courbes pH-log k_{cat} pour la transpeptidation de la GGT à 37°C sans KCNO ou en présence de 100 mM de KCNO préincubé avec l'enzyme durant 45 min..... 45

- Figure 3.1** : Composés envisagés pour étudier l'électrophilie du carbonyle des substrats donneurs et la nucléophilie de la GGT..... 56
- Figure 3.2** : Graphique de Michaelis-Menten permettant de déterminer le V_{\max} et le K_M de la L-glutamine à pH 8.0 à 37°C..... 58
- Figure 3.3** : Courbe Lineweaver-Burk pour l'inhibition non-compétitive mixte du L-GPNA par le composé **3.10** en présence de 20 mM Gly-Gly, à pH 8.0 à 37°C..... 67
- Figure 3.4** : Détermination du K_i du dérivé **3.10** en tant qu'inhibiteur compétitif du L-GPNA de la réaction de transpeptidation pour la GGT..... 68
- Figure 3.5** : Inhibiteurs de la transglutaminase de foie de cochon d'Inde..... 72
- Figure 3.6** : Analogues du L-GPNA γ -monofluorés et difluoré..... 73
- Figure 4.1** : Analogues du L-GPNA avec un *p*-nitrophényl ester..... 75
- Figure 4.2** : Molécules permettant de connaître la structure minimale d'un substrat donneur pour une bonne reconnaissance par la GGT..... 77
- Figure 4.3** : Structure minimale pour les substrats de type L-glutamine reconnus dans le site de liaison du substrat donneur..... 84
- Figure 4.4** : Groupements analogues de liens peptidiques..... 86
- Figure 4.5** : Composés analogues de la glutamine testés avec la GGT. La configuration du carbone α du composé testé est indiquée..... 87
- Figure 4.6** : Courbe $\frac{1}{K_i^{\text{app}}}$ vs f où f représente la fraction de L-méthionine sulfoxyde **4.21a** dans le mélange des diastéréoisomères **4.21a** et **4.21b** utilisé en compétition avec le L-GPNA..... 99
- Figure 4.7** : Reconnaissance différente par la GGT pour les deux diastéréoisomères **4.21a** et **4.21b**..... 100
- Figure 4.8** : Parallèle entre l'intermédiaire tétraédrique formé lors de l'attaque du nucléophile sur le substrat donneur et l'inhibition par le sulfoxyde **4.21a** montrant les différentes interactions possibles pour stabiliser chacune des espèces. R représente une chaîne alkyle ou un groupe aromatique. Les résidus sont numérotés selon leur position dans la GGT humaine..... 101
- Figure 4.9** : Acide (D,L)-2-amino-4-phosphonobutyrique **4.22** représenté sous leurs deux états de protonation majoritaires (**4.22a** et **4.22b**) selon le pH en solution..... 102
- Figure 4.10** : Courbe représentant $\frac{K_M}{K_i^{\text{app}}}$ en fonction de la fraction de **4.22b** dans le mélange de **4.22a** et **4.22b** où K_M représente la constante d'affinité du L-GPNA selon le pH et K_i^{app} la constante d'inhibition compétitive du mélange de **4.22**..... 104

Figure 5.1 : Différents inhibiteurs réversibles de la GGT : Complexe sérine-borate, l'acide L-2-amino-4-boronobutanoïque liés au groupement hydroxyle d'une thréonine du site de liaison du substrat donneur de la GGT de rat, les γ -glutamylhydrazones d' α -cétoacides et les γ -glutamylphénylhydrazides.....	107
Figure 5.2 : Quelques exemples d'inhibiteurs soufrés utilisés avec différentes enzymes, mimant l'état de transition lors de l'hydrolyse de peptides.....	109
Figure 5.3 : Inhibiteurs réversibles envisagés pour la GGT.....	110
Figure 5.4 : Courbe Lineweaver-Burk pour la transpeptidation de la GGT en présence de L-GPNA, de Gly-Gly et différentes concentrations de L-SPG 5.14 à 37°C et pH 8.0.....	120
Figure 5.5 : Courbe secondaire pour la détermination du K_i pour l'inhibiteur réversible L-SPG 5.14.....	121
Figure 5.6 : Future approche de la synthèse d'inhibiteurs sulfoxyde de la GGT.....	124
Figure 5.7 : Inhibiteur 5.27 fourni par le professeur Coward.....	125
Figure 5.8 : Courbe Lineweaver-Burk pour la transpeptidation du L-GPNA par la GGT en présence de 20 mM de Gly-Gly à 37°C et à pH 8.0, en présence de différentes concentrations fixes de l'inhibiteur 5.24.....	126
Figure 5.9 : Inhibiteur réversible de type phosphinique proposé (à droite) contre la GGT en raison de sa ressemblance avec le dérivé sulfoxyde L-SPG 5.14.....	127
Figure 6.1 : Inhibiteurs supposément irréversibles de la GGT : le DON (6.1a), l'azasérine (6.1b), l'acivicine (AT-125, 6.2) et le dérivé fluoré de l'acide 2-amino-4-phosphonobutyrique (6.3).....	130
Figure 6.2 : Inhibiteurs irréversibles de la glucosamine synthétase (enzyme étudiée par le professeur Badet) : l'acivicine 6.2, l'acide L-2-amino-6-bromo-5-oxo-hexanoïque 6.4, l'acide L-2-amino-6-iodo-5-oxo-hexanoïque 6.5, l'acide L-3-(2-amino-2-carboxy-éthylcarbamoyle)-acrylique méthyl ester 6.6.....	132
Figure 6.3 : Courbe d'inactivation pour l'acivicine en présence de 400 μ M de L-GPNA et 20 mM de Gly-Gly à pH 8.0 et à 37°C pour la GGT de reins de rat.....	134
Figure 6.4 : Phosphonamides 6.7 et 6.8 proposés pouvant agir comme analogues du glutathion et du sulfoxyde L-SPG 5.14.....	142
Figure 6.5 : Produit secondaire de la réaction de 6.12 avec le triméthylphosphite....	151

Liste des schémas

Schéma 1.1 : Cycle du γ -glutamyle et biosynthèse du glutathion. (1) : GGT, (2) : γ -glutamylcyclotransférase, (3) : 5-oxoprolinase, (4) : protéase intracellulaire, (5) : γ -glutamylcystéine synthétase, (6) : glutathion synthétase.....	5
Schéma 1.2 : Génération de peroxydes au niveau physiologique par la GGT.....	6
Schéma 1.3 : Différentes réactions catalysées par la GGT : réactions de transpeptidation, d'autotranspeptidation et d'hydrolyse entre le glutathion (substrat donneur) et différents substrats accepteurs.....	8
Schéma 1.4 : Modèle mécanistique ping-pong modifié pour la catalyse de la GGT. Nuc représente le nucléophile. R est un squelette γ -glutamyle, R' un groupement aryle ou un squelette d'acide aminé, R'' un squelette d'acide aminé.....	10
Schéma 2.1 : Mécanisme ping-pong modifié proposé pour la GGT. L'étape d'acylation est en gras. Nuc représente le nucléophile. R, R' et R'' représentent un squelette d'acide aminé.....	19
Schéma 2.2 : Mécanisme proposant deux voies possibles de décomposition de l'intermédiaire tétraédrique en fonction de la nature des substituants en position <i>para</i> sur le groupe aromatique (GEA représente un groupement électroattracteur et GED un groupement électrodonneur). R désigne la partie γ -glutamyle du substrat donneur, Nuc le nucléophile de la GGT).....	26
Schéma 2.3 : Mécanisme proposé pour l'hydrolyse de substrats donneurs dérivés de l'acide aspartique par la glycosylasparaginase.....	36
Schéma 2.4 : Étapes décrivant comment déterminer la nature d'un acide aminé ou d'un peptide marqué par un agent chimique. Les acides aminés importants, impliqués dans le site du substrat donneur de la GGT de rat, sont indiqués...	42
Schéma 2.5 : Mécanisme proposé pour la transpeptidation de la GGT. R représente un squelette d'acide aminé ou un groupement aryle et R ₁ représente un squelette d'acide aminé.....	52
Schéma 3.1 : Inhibition d'une protéase à sérine par un carbamate. R et R ₁ représentent des groupements aryles, des chaînes alkyles ou des squelettes d'acides aminés.....	55
Schéma 3.2 : Système à deux enzymes couplées pour le suivi de manière continue de la libération d'ammoniac par la GGT.....	57
Schéma 3.3 : Synthèse de l'acide L-glutamique γ - <i>p</i> -nitroanilide méthyl ester 3.4.....	60
Schéma 3.4 : Synthèse de l'acide L-4-azaglutamique γ - <i>p</i> -nitroanilide méthyl ester 3.8.....	61

Schéma 3.5 : Synthèse de l'acide L-4-azaglutamique γ - <i>p</i> -glutamique 3.10.....	62
Schéma 3.6 : Synthèse du dérivé acide L-4-oxaglutamique γ - <i>p</i> -nitroanilide méthyl ester 3.13.....	63
Schéma 3.7 : Synthèse du dérivé 3.14 à partir de la Boc-L-sérine commerciale.....	64
Schéma 3.8 : Explications possibles pour la réactivité des substrats modifiés en tant qu'accepteur. Les trois sous-sites représentent les trois sites d'interactions possibles entre l'enzyme et chacun des acides aminés du GSH.....	70
Schéma 3.9 : Rétrosynthèse possible pour la synthèse d'analogues de l'acide glutamique γ -monofluoré ou γ -difluoré.....	73
Schéma 4.1 : Synthèse du 4-carboxybutyramide 4.3.....	78
Schéma 4.2 : Synthèse du sel de 4-aminobutyramide 4.7.....	79
Schéma 4.3 : Synthèse de la L-glutamine méthyl ester 4.11.....	79
Schéma 4.4 : Synthèse du composé phthalylé 4.24.....	93
Schéma 4.5 : Séparation des deux diastéréoisomères 4.21a et 4.21b de la L-méthionine sulfoxyde.....	94
Schéma 4.6 : Inhibition de type compétitif par un mélange de deux inhibiteurs distincts (I et I'). k_1 , k_{-1} et k_2 représentent des constantes de vitesse.....	96
Schéma 4.7 : Schéma d'une réaction enzymatique typique.....	104
Schéma 5.1 : Deux voies possibles pour la synthèse d'un dérivé thioéther.....	112
Schéma 5.2 : Synthèse en une étape d'un dérivé ribosylhomocystéine 5.5.....	113
Schéma 5.3 : Synthèse du synthon propylglycine 5.6.....	114
Schéma 5.4 : Synthèse de la Boc-L-homocystéine méthyl ester 5.10.....	115
Schéma 5.5 : Synthèse du dérivé sulfoxyde 5.14 analogue au glutathion.....	116
Schéma 5.6 : Synthèse du dérivé thioéther 5.16.....	117
Schéma 5.7 : Synthèse du dérivé sulfone 5.19.....	118
Schéma 5.8 : Synthèse du dérivé sulfoxyde L-STG (5.23) analogue au composé 5.14.....	119
Schéma 6.1 : Mécanisme d'inhibition proposé d'une diazométhyl cétone en présence de protéase à cystéine. R représente une chaîne latérale d'un acide aminé.....	137
Schéma 6.2 : Inactivation des protéases à sérine par des inhibiteurs de type cétone α -halogénée <i>via</i> un résidu histidine. R représente une chaîne latérale d'un acide aminé.....	138
Schéma 6.3 : Mécanisme d'inhibition des protéases à cystéine par des dérivés α,β -insaturés. R, R_1 et R_2 représentent des chaînes alkyles.....	139

Schéma 6.4 : Inhibition des protéases à sérine par des phosphonates. R représente la chaîne latérale d'un acide aminé.....	140
Schéma 6.5 : Mécanisme d'acylation de la GGT et analogues de l'état de transition (fluorophosphonate existant (6.3) et phosphonamide proposé) pouvant agir comme inhibiteurs irréversibles de la GGT. R représente une chaîne alkyle..	141
Schéma 6.6 : Dégradation d'un phosphonamide en présence d'eau. R et R' représentent des groupements alkyles.....	143
Schéma 6.7 : Deux rétrosynthèses possibles pour la synthèse du diméthyl ester de l'acide phosphonique, précurseur de phosphonamides. R, R ₁ et R ₂ représentent des groupements protecteurs de l'amine et de l'acide carboxylique, R ₃ des groupements méthyles ou éthyles et R' un squelette d'acide aminé.....	144
Schéma 6.8 : Réaction secondaire possible lors de la réaction d'Arbuzov en présence d'un groupement protecteur Cbz.....	145
Schéma 6.9 : Synthèses de dérivés phosphonate et de phosphonamide selon la méthodologie de Coward et ses collaborateurs.....	146
Schéma 6.10 : Synthèse des dérivés bromés méthyl ester 6.12 et benzyl ester 6.13...	147
Schéma 6.11 : Synthèse du dérivé bromé 6.16 protégé par un groupement protecteur Cbz.....	148
Schéma 6.12 : Synthèse possible du trialkylphosphate où Nuc représente un nucléophile présent en solution.....	151
Schéma 6.13 : Synthèse possible du phosphate en partant du triméthylphosphate....	152
Schéma 6.14 : Synthèse des monoesters de l'acide phosphonique 6.23 et 6.24.....	153
Schéma 6.15 : Synthèse du dérivé de la cystéinyglycine 6.27.....	155
Schéma 6.16 : Synthèse du précurseur du dipeptide cystéinyglycine 6.30.....	155
Schéma 6.17 : Synthèse du dérivé 6.26 à partir de 6.29.....	156
Schéma 6.18 : Synthèse du phosphonate 6.36 d'après le groupe de Coward.....	160
Schéma 6.19 : Essai de synthèse du dérivé phosphonamide 6.7.....	161
Schéma 6.20 : Synthèse d'un phosphonamide par hydrogénation (Coward <i>et coll.</i>)..	161
Schéma 6.21 : Essai de synthèse du phosphonamide 6.7.....	162
Schéma 6.22 : Autre voie possible pour la synthèse des phosphonamides 6.7 et 6.8..	164

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Pourcentage d'identité entre les séquences primaires en acides aminés de GGT de différentes espèces.....	3
Tableau 1.2: Différents membres de la famille des Ntn-hydrolases et leur nucléophile en position <i>N</i> -terminale.....	13
Tableau 2.1 : Valeurs d'enthalpie et entropie d'activation pour la transpeptidation par la GGT en présence de différents substrats donneurs L- γ -glutamylanilides <i>p</i> -substitués et de 20 mM glycylglycine à différentes températures dans 0.1M Tris•HCl à pH 8.0.....	24
Tableau 2.2 : Valeurs du 2 ^{ième} pK_a obtenues à partir des courbes secondaires telles qu'illustrées à la Figure 2.7.....	32
Tableau 2.3 : Valeurs typiques de pK_a et de ΔH d'ionisation pour les groupes fonctionnels acides de chaînes latérales.....	34
Tableau 2.4 : Influence du KCNO (100 mM) et du maléate (50 mM) sur la transpeptidation et l'hydrolyse catalysées par la GGT.....	47
Tableau 2.5 : Inventaire des acides aminés importants possiblement impliqués dans la réaction de transpeptidation catalysée par la GGT.....	51
Tableau 3.1 : Résultats cinétiques pour les composés L-GPNA, 3.4 , 3.8 , 3.10 , 3.13 et la L-sérine méthyl ester agissant comme substrats donneur ou accepteur pour la transpeptidation de la GGT.....	65
Tableau 4.1 : Résultats cinétiques obtenus à partir de différents composés de type amide en compétition avec le L-GPNA dans la réaction de transpeptidation de la GGT à pH 7.0 et 37°C en présence de 20 mM de Gly-Gly.....	81
Tableau 4.2 : Constantes d'inhibition (K_i) et valeurs d'IC ₅₀ pour les composés 4.14-4.22 comme inhibiteurs de la réaction de transpeptidation en présence du L-GPNA et Gly-Gly catalysée par la GGT de reins de rat à pH 8.0 et 37 °C.....	89
Tableau 4.3 : Différents paramètres cinétiques obtenus pour l'inhibition du L-GPNA par l'acide phosphonique 4.22 , en présence de GlyGly à 37°C à différents pH. La fraction <i>f</i> représente la fraction de l'état déprotoné sur la quantité totale du composé 4.22	103
Tableau 5.1 : Détermination des types d'inhibition et des K_i pour les molécules soufrées testées en présence de GGT à 37°C et à pH 8.0.....	121
Tableau 6.1 : IC ₅₀ déterminés pour les inhibiteurs 6.4 , 6.5 et 6.6 contre la GGT en présence de 400 μ M de L-GPNA.....	135
Tableau 6.2 : Réactions d'Arbuzov réalisées sur des dérivés possédant divers groupes protecteurs R, R ₁ et R ₂	150

Tableau 6.3 : Synthèse des dérivés phosphonamides à partir du monoester de l'acide phosphonique et de diverses amines analogues à la cystéinyglycine.....	158
--	-----

Liste des abréviations

Ac	Groupement acétyle
Arg	Arginine
Asp	Acide aspartique
Bn	Groupement protecteur benzyle
Boc	Groupement protecteur <i>tert</i> -butoxycarbonyle
Bu	Groupement butyle
c	Concentration
Cbz	Groupement protecteur benzyloxycarbonyle
ccm	Chromatographie sur couche mince
CHES	Acide 3-[Cyclohexylamino]-2-hydroxy-1-propanesulfonique
<i>Coll.</i>	Collaborateurs
comp.	Inhibition compétitive
CTP	Cytidine triphosphate
Cys	Cystéine
D	Isomère de configuration absolue (D)
d	Doublet
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
dd	Doublet dédoublé
déc.	Décomposition (point de fusion)
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E	Enzyme
EC	Enzyme Commission (numéro de classification correspondant à un enzyme)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

e.d.	Excès diastéréoisomérique
ES	Complexe Michaelis : complexe enzyme-substrat
Et	Groupement éthyle
EtOAc	Acétate d'éthyle
éq.	Équivalent
FAB	Fast atom bombardment
g	Gramme
GDH	Glutamate déshydrogénase
GEA	Groupe électroattracteur
GED	Groupe électrodonneur
GGT	γ -Glutamyl transpeptidase
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
Gly-Gly	Glycylglycine
GMP	Guanosine monophosphate (synthétase)
GSH	Glutathion
h	Heure
His	Histidine
Hz	Hertz
I	Inhibiteur
IC ₅₀	Concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle de 50% de sa valeur initiale non-inhibée
incomp.	Inhibition incompétitive
<i>J</i>	Constante de couplage dans les spectres RMN
kDa	Kilodalton : unité de masse pour les enzymes correspondant à 1000 g par mole
k _{cat}	Constante de vitesse de premier ordre d'une réaction enzymatique
Kg	Kilogramme
K _M	Constante de Michaelis
L	Isomère de configuration absolue (L)
litt.	Littérature

Lys	Lysine
M	Molaire
m	Multiplet
MAB	Metastable atom bombardment
Me	Groupement méthyle
mg	Milligramme
MHz	Méga Hertz
min	Minute
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
mmol	Millimoles
MOPS	Acide 3-[<i>N</i> -Morpholino]propanesulfonique
NADH	β -Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
nuc	Nucléophile
<i>p</i>	Position <i>para</i> d'un substituant sur un cycle aromatique
Pd/C	Palladium sur charbon
p.f.	Point de fusion
pH	Logarithme négatif de la concentration de protons
Pht	Groupement protecteur phthalyle
pK_a	Logarithme de la constante d'équilibre d'un acide
ppm	Partie par million
psi	Pounds per square inch
q	Quadruplet
qu	Quintuplet
R_f	Mobilité relative
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet
S	Substrat
Ser	Sérine

SMBR	Spectre de masse basse résolution
SMHR	Spectre de masse haute résolution
t	Triplet
TA	Température ambiante
tBu	Groupement protecteur <i>tert</i> -butyle
TBTU	Tétrafluoroborate de benzotriazole-1-yl-oxy-1,1,3,3-tétraméthyluronium
TFA	Acide trifluoroacétique
Thr	Thréonine
Tris	tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
Ts	Groupement tosyle
U	Unité d'enzyme
UV	Ultraviolet
V_{\max}	Vitesse maximale
α	Position α d'un substituant sur une chaîne carbonée
β	Position β d'un substituant sur une chaîne carbonée
δ	Déplacement chimique dans un spectre RMN
ΔH^\ddagger	Enthalpie d'activation
ΔS^\ddagger	Entropie d'activation
ε	Coefficient d'extinction molaire
γ	Position γ d'un substituant sur une chaîne carbonée
λ	Longueur d'onde
σ^-	Sigma, paramètre de Hammett

*« Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez pas à travailler un
seul jour de votre vie. »*

Confucius

À mes parents, mes grand-parents

À Cécile

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le professeur Jeffrey Keillor pour ces quatre belles années passées dans son laboratoire. J'ai énormément apprécié son support à la fois personnel et professionnel et je le remercie de m'avoir donné une aussi grande liberté de travail dans les différents projets. Je lui suis également reconnaissant de m'avoir donné l'opportunité de connaître le goût de la bière et du whisky en Écosse.

Moran taing 

J'aimerais remercier Roselyne Castonguay et Caroline Rivard pour leur aide précieuse lors de la correction de cette thèse. Je remercie aussi Mylène Morin pour sa contribution comme étudiante d'été dans le projet des hétéroatomes.

Je désire remercier spécialement Roselyne et Caroline du groupe GGT pour les nombreuses discussions et leur amitié au fil des années. Je suis fier de considérer Roselyne comme une amie et j'espère garder cette complicité dans le futur.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire, passés et présents, pour les nombreuses discussions et pour leur bonne humeur. Un merci particulier à Christophe Pardin pour sa gaieté quotidienne.

Je remercie également le comité des études supérieures de l'Université de Montréal pour l'octroi d'une bourse d'Excellence. Je tiens à remercier le professeur André Beauchamp pour sa gentillesse, son soutien lors de ma coopération militaire et sa prévenance, facilitant ainsi ma venue au Canada.

Un grand merci à ma famille pour leur soutien et leur compréhension.

Chapitre 1
Introduction

La plupart des transformations chimiques dans le monde du vivant sont catalysées par des enzymes. Ce sont des catalyseurs biologiques qui servent à accélérer la vitesse d'une réaction de manière très efficace grâce à leur grande spécificité pour leur substrat, comparativement aux différents catalyseurs chimiques connus.

Chacune des enzymes est représentée selon un numéro : l'*EC* (Enzyme Commission), qui est un ensemble de quatre nombres séparés par des points¹. Le premier de ces nombres désigne le type de la réaction catalysée par l'enzyme, parmi les six grandes classes existantes : les oxydo-réductases (*EC* 1), les transférases (*EC* 2), les hydrolases (*EC* 3), les lyases (*EC* 4), les isomérases (*EC* 5) et les ligases (*EC* 6)¹. Les deuxième et troisième nombres expriment la nature des corps chimiques sur lesquels cette réaction se produit. Le quatrième nombre est un numéro d'ordre.

Les enzymes peuvent donc catalyser des réactions très variées, allant de l'hydrolyse de liens peptidiques à l'isomérisation de doubles liaisons. La classe des transférases (*EC* 2) regroupe des enzymes permettant le transfert d'un groupement d'un substrat appelé donneur à un autre appelé accepteur. Parmi cette classe, plusieurs sous-classes existent telles les glycosyltransférases (*EC* 2.4), les transférases de groupements alkyles ou aryles (*EC* 2.5), *etc.*

La γ -glutamyl transpeptidase (GGT, *EC* 2.3.2.2), membre de la sous-classe des acyltransférases qui regroupe les enzymes capables de transférer des groupements acyles pour faire de nouveaux liens amides, est une enzyme impliquée dans de nombreux désordres physiologiques et fera l'objet de cette thèse de doctorat.

1.1. Présentation de la GGT

1.1.1. Généralités

La γ -glutamyl transpeptidase est une enzyme hétérodimérique fortement glycosylée liée à la surface externe des membranes cellulaires par sa grosse sous-unité².

La γ -glutamyl transpeptidase est présente dans beaucoup d'organes tels le foie, le cerveau et le pancréas mais son activité la plus importante se trouve dans les reins, les cellules épithéliales et celles du sang^{3,4,5}. Il existe plusieurs types de GGT, dont celle de

mammifères⁶, de plantes⁷ et de bactéries⁸. En comparant les séquences primaires en acides aminés des différentes GGTs⁹, une grande homologie existe sauf en ce qui concerne la GGT de *Escherichia coli* (Tableau 1.1). Les GGTs humaine, de rat et de cochon se ressemblent fortement par leurs séquences primaires avec une identité de séquence avoisinant les 80 %. La GGT de rat, fortement étudiée dans la littérature⁶, représente donc un excellent modèle pour la GGT humaine. Il aurait été intéressant de comparer ces séquences avec celle de plante mais elle n'est pas disponible actuellement.

Tableau 1.1 : Pourcentage d'identité entre les séquences primaires en acides aminés de GGT de différentes espèces.

Type de GGT	GGT humaine	GGT de cochon	GGT de rat
GGT de <i>E. coli</i>	31%	30%	31%
GGT de rat	79%	79%	
GGT de cochon	84%		

La GGT peut être purifiée à partir de plusieurs sources, notamment les reins de rats et les vésicules séminales de rat et de l'homme². La GGT obtenue à partir de reins de rats est composée de deux sous-unités hautement glycosylées ayant des poids moléculaires de 46 kDa et 22 kDa, après purification à l'aide d'un clivage avec de la papaine afin d'enlever son ancre transmembranaire¹⁰.

1.1.2. Rôles physiologiques

La GGT est impliquée dans plusieurs phénomènes physiologiques. Elle joue un rôle clé dans le métabolisme du glutathion (γ -glutamylcystéinyglycine ou GSH)³. Elle est liée à la surface externe des cellules et elle régule la quantité de glutathion en catalysant sa dégradation. Meister a proposé un cycle de l'entité γ -glutamyle qui montre la dégradation et la biosynthèse du glutathion, faisant intervenir six enzymes¹¹ (dont la

GGT) et le transport d'acides aminés à l'intérieur de la cellule (Schéma 1.1)³. Seule la GGT fonctionne à l'extérieur de la cellule, les autres enzymes sont toutes présentes dans le milieu intracellulaire. Le lien amide entre l'entité γ -glutamyle et la cystéine du glutathion est clivé par la GGT (Schéma 1.1, enzyme 1) et la partie γ -glutamyle est transférée à un acide aminé pour former un dipeptide comportant un nouveau lien isopeptidique. Le dipeptide Cys-Gly est ainsi libéré et clivé par une protéase intracellulaire (Schéma 1.1, enzyme 4) pour se dissocier en deux acides aminés libres dans la cellule. Le nouveau dipeptide formé par la GGT entre dans la cellule et est utilisé par la γ -glutamylcyclotransférase (Schéma 1.1, enzyme 2) pour donner la 5-oxoproline (l'acide pyroglutamique) avec libération de l'acide aminé (AA). La 5-oxoprolinase (Schéma 1.1, enzyme 3) clive le lien amide intramoléculaire pour donner le glutamate. Ensuite, un nouveau lien isopeptidique est formé entre le glutamate précédemment formé et la cystéine issue du dipeptide Cys-Gly par la γ -glutamylcystéine synthétase (Schéma 1.1, enzyme 5). Le glutathion est lui-même synthétisé grâce à la glutathion synthétase (Schéma 1.1, enzyme 6) en présence de glycine. Il est ainsi formé à l'intérieur de la cellule à partir des mêmes composantes présentes dans la molécule de GSH initiale. Le tout est accompagné du transport d'un acide aminé et de l'hydrolyse de trois molécules d'ATP.

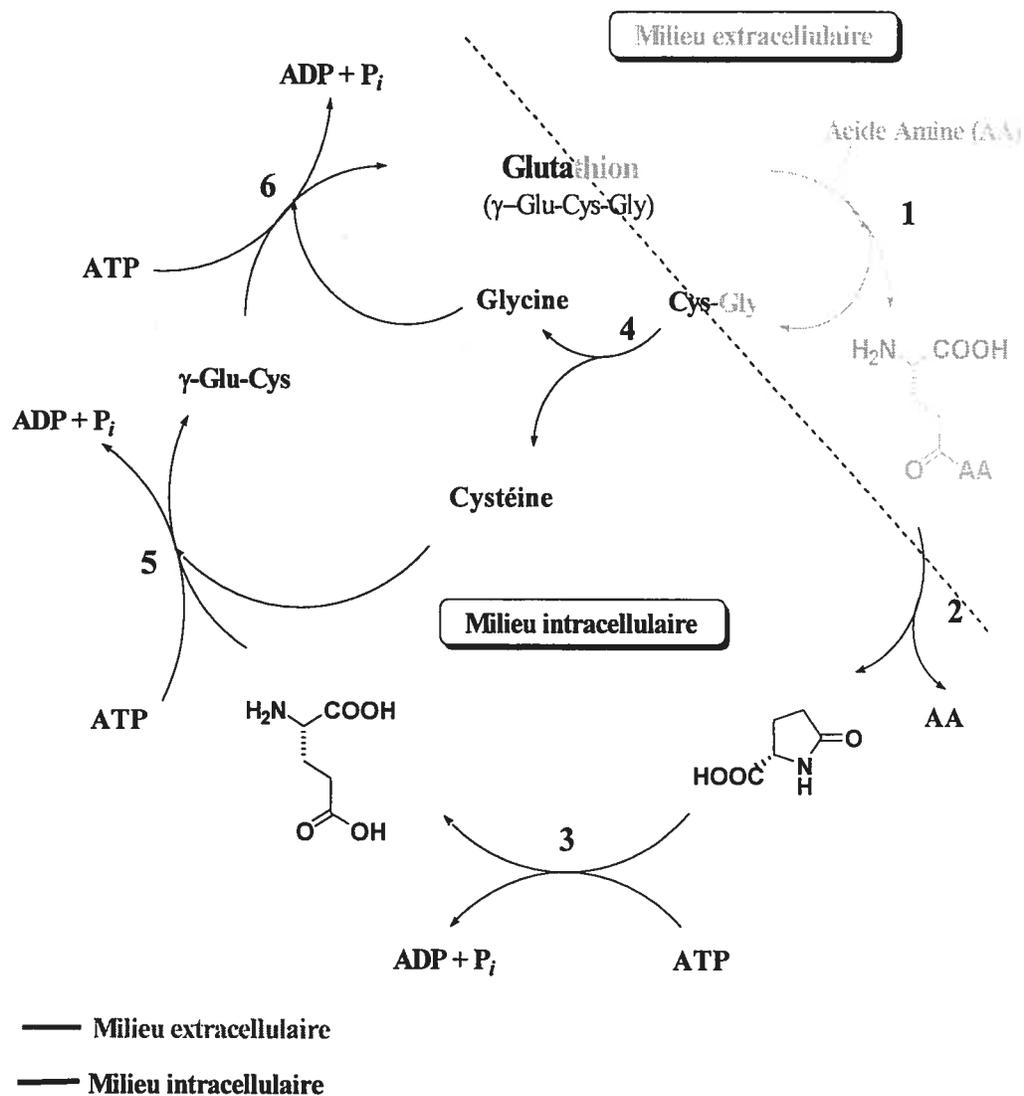


Schéma 1.1 : Cycle du γ -glutamyle¹¹ et biosynthèse du glutathion. (1) : GGT, (2) : γ -glutamylcyclotransférase, (3) : 5-oxoprolinase, (4) : protéase intracellulaire, (5) : γ -glutamylcystéine synthétase, (6) : glutathion synthétase.

Le glutathion peut se conjuguer, par le biais de sa cystéine, à des déchets métaboliques présents dans le milieu grâce à la glutathion *S*-transférase. La GGT catalyse le clivage de ce composé conjugué, participant ainsi au processus de détoxification cellulaire⁶. Parfois, des médicaments sont conjugués au GSH et la GGT élimine ces nouveaux composés comme s'il s'agissait de déchets métaboliques, ce qui

permet aux cellules de devenir résistantes à ces composés. Le glutathion, grâce à sa cystéine, est également capable d'éliminer certaines espèces oxygénées oxydantes en grande quantité (peroxydes, *etc*) qui causent un stress oxydatif ^{6,12}. Puisque la GGT contrôle la quantité de GSH disponible grâce au cycle du γ -glutamyle présenté dans le Schéma 1.1, il agit dans l'élimination de ces espèces. Le stress oxydatif est associé à un grand nombre de processus pathologiques comme l'inflammation, la carcinogénèse, l'athérosclérose et aussi le diabète ¹³. Récemment, il a été prouvé que la GGT pourrait jouer le rôle de biomarqueur pour le diabète ¹⁴ et être impliquée dans la maladie de Parkinson ¹⁵.

Cependant, en contrepartie, l'activité de la GGT induit la formation de peroxydes en faibles quantités dans les hépatocytes en présence d'espèces préoxydantes comme le fer, comme il est montré au Schéma 1.2 ^{16,17}.

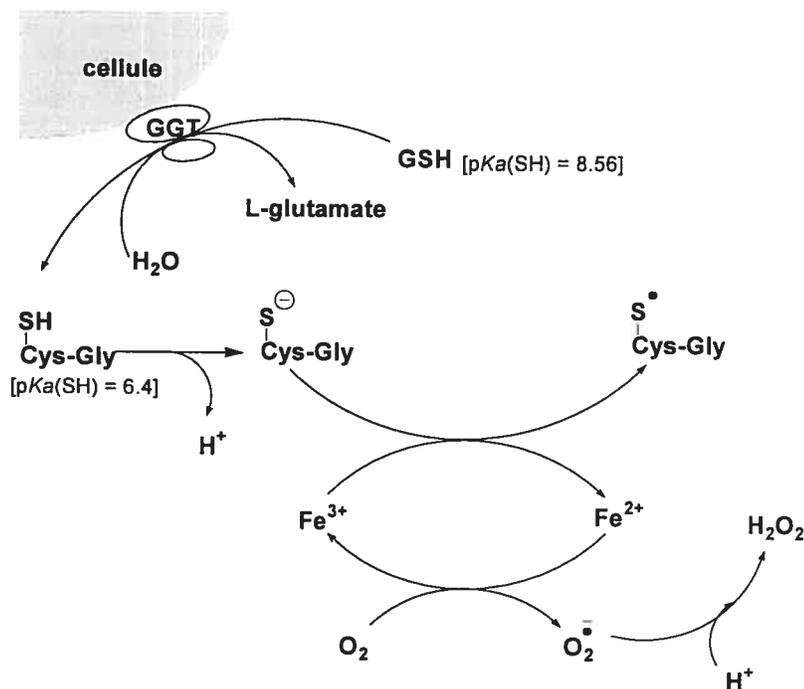


Schéma 1.2 : Génération de peroxydes au niveau physiologique par la GGT ¹³.

L'exposition à un bas niveau d'espèces oxygénées réactives, telles le peroxyde, peut exercer un effet stimulant sur la prolifération de plusieurs lignées de cellules. Des études ont montré qu'en présence d'acivicine (l'acide L-(α S,5S)- α -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazolacétique, un inhibiteur irréversible de la GGT), la quantité de peroxyde d'hydrogène formée diminue et l'apoptose des cellules augmente¹⁶. Ceci a été prouvé par la dégradation de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), phénomène fréquemment observé lors de cette mort cellulaire programmée¹⁶. L'inhibition de la GGT pourrait donc constituer un moyen de lutte efficace pour supprimer la croissance ou la métathèse de cancers et serait un stimulus suffisant dans l'induction de l'apoptose¹⁸.

Le cisplatine (cis-diamminedichloroplatine (II)) est un agent antitumoral utilisé dans le traitement de nombreux cancers. Son activité thérapeutique a été attribuée à sa capacité de réagir avec des paires de bases de l'ADN¹⁹, mais des effets secondaires sont observés. En effet, une équipe de chercheurs de l'Université de Virginie aux États-Unis a montré que l'activité de la GGT est liée à la néphrotoxicité du cisplatine²⁰. L'effet néfaste de ce traitement n'affecte pas la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie basée sur le cisplatine. Cependant, cette toxicité pourrait être bloquée en inhibant la GGT.

La GGT peut également être utilisée pour activer certaines prodrogues. Des prodrogues ont déjà été synthétisées et reconnues par la GGT. C'est le cas de la γ -glutamyl-dermorphine²¹, capable de traverser différentes barrières naturelles. Une prodrogue de l'acivicine (agent antitumoral et inhibiteur de la GGT) a été synthétisée et testée en présence des cellules cancéreuses HL-60 contenant la GGT. Cette molécule pourrait être utilisée comme un conjugué prodrogue-anticorps pour cibler l'acivicine contre les cellules malignes²².

De plus, l'expression de la GGT est connue pour être induite dans le foie par l'alcool²³. C'est une enzyme qui est toujours utilisée pour diagnostiquer les tumeurs cancéreuses dans le foie²⁴.

1.1.3. Mécanisme de catalyse de la GGT

La GGT catalyse le transfert de la partie γ -glutamyle du glutathion à une variété de substrats accepteurs²⁵. Le Schéma 1.3 montre les différents types de réaction que peut catalyser la GGT, selon la nature du substrat accepteur. Dans le Schéma 1.3, le substrat donneur de l'entité γ -glutamyle est le glutathion. Si le substrat accepteur est un acide aminé ou un dipeptide, un dipeptide ou tripeptide contenant un nouveau lien isopeptidique est formé respectivement dans une réaction de transpeptidation. Le dipeptide le plus couramment utilisé comme substrat accepteur est la glycylglycine (Gly-Gly), dû à sa très grande efficacité dans la catalyse de cette réaction^{26,27,28}.

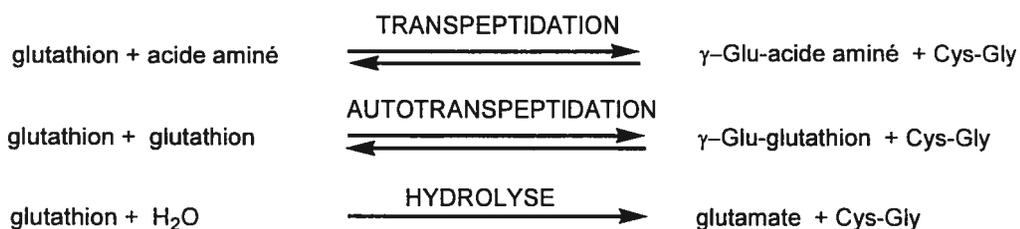


Schéma 1.3 : Différentes réactions catalysées par la GGT⁶: réactions de transpeptidation, d'autotranspeptidation et d'hydrolyse entre le glutathion (substrat donneur) et différents substrats accepteurs.

Si le substrat accepteur est également une molécule de glutathion, la réaction catalysée par la GGT sera une autotranspeptidation. Dans une troisième réaction, l'accepteur peut être une molécule d'eau pour former de manière irréversible le glutamate. La réaction la plus importante *in vivo* a été proposée comme étant la transpeptidation, mais certains auteurs ont proposé que l'hydrolyse avait un rôle prépondérant à jouer.^{29,30} La GGT a été montrée comme catalysant aussi la formation de γ -glutamylcystéine *in vivo*. Une réaction de transpeptidation se fait entre le glutathion et la cystéine présente dans le milieu extracellulaire, ce qui souligne l'importance de ce rôle physiologique³¹.

Dans tous les cas, la GGT catalyse le clivage du lien isopeptidique du GSH avec libération de cystéinylglycine. Ce dipeptide libéré est difficile à détecter par des méthodes spectrométriques directes. C'est pourquoi le substrat donneur le plus souvent employé, notamment dans le dosage de l'activité de l'enzyme, reste le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, qui, par catalyse de la GGT, libère une molécule de *p*-nitroaniline³². Les réactions avec ce substrat peuvent être facilement suivies par spectroscopie UV-visible à 410 nm. Son efficacité catalytique est comparable à celle du substrat naturel, le glutathion (Figure 1.1).

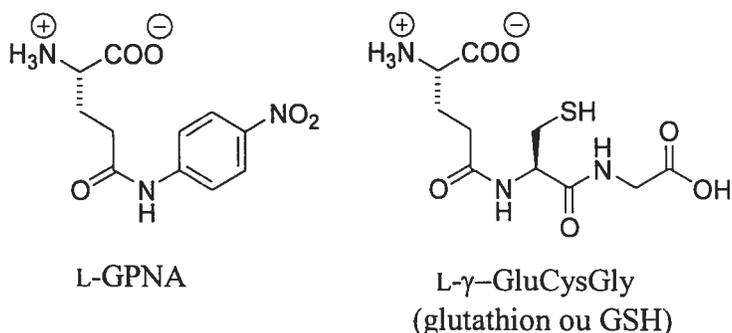


Figure 1.1 : Le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide (L-GPNA) et le glutathion (GSH) : des substrats donneurs pour la GGT.

Le modèle mécanistique probable de la GGT est un mécanisme ping-pong modifié^{6,26}. La GGT catalyse le clivage du lien amide entre la partie γ -glutamyle et la cystéine du glutathion (substrat donneur) pour former l'intermédiaire γ -glutamyl-enzyme dans une étape d'acylation et libérer le dipeptide cystéinylglycine (Schéma 1.4). Cet intermédiaire a été mis en évidence pour la première fois dans notre laboratoire par des expériences en état pré-stationnaire grâce à un mélangeur rapide en flot arrêté (« stopped-flow »)³³. Il se forme par la suite une liaison entre l'enzyme et un accepteur qui peut être un dipeptide ou un acide aminé. Un transfert du groupement γ -glutamyle est effectué sur l'accepteur pour libérer le produit γ -glutamyl-accepteur et régénérer l'enzyme libre dans une étape de désacylation. Le processus total est une

transpeptidation. L'intermédiaire acyl-enzyme peut également être hydrolysé pour régénérer l'enzyme libre et libérer l'acide glutamique dans une réaction d'hydrolyse.

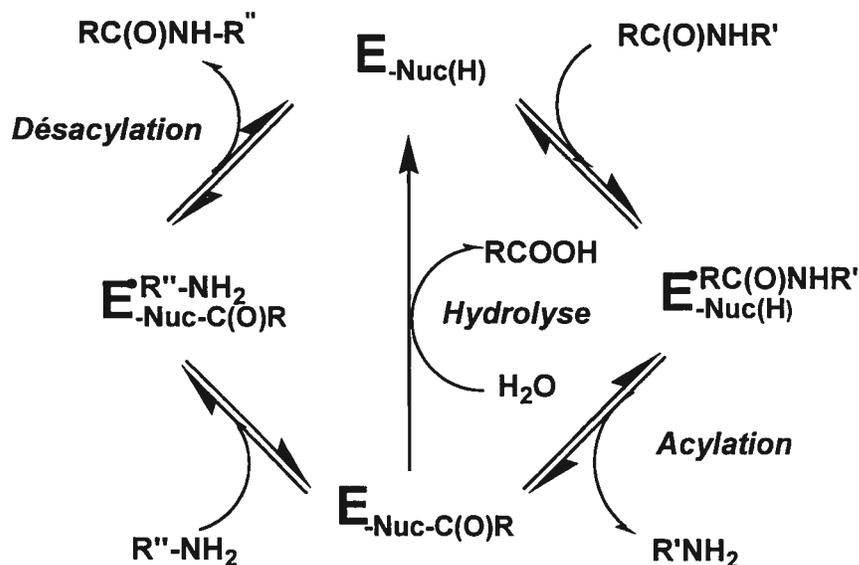


Schéma 1.4 : Modèle mécanistique ping-pong modifié^{2,30} pour la catalyse de la GGT. Nuc représente le nucléophile. R est un squelette γ -glutamyle, R' un groupement aryle ou un squelette d'acide aminé, R'' un squelette d'acide aminé.

En général, l'activité transpeptidase est dix fois plus élevée que l'activité hydrolase pour la GGT³⁴. Récemment, le groupe de Suzuki a muté l'acide aminé acide aspartique 445 pour une alanine (D445A) dans la petite sous-unité de la GGT de *Bacillus subtilis* et a réussi ainsi à supprimer l'activité transpeptidase; de plus, l'activité hydrolase a été multipliée par trois³⁵. De même, la mutation de l'asparagine 113 sur la grosse sous-unité par une lysine (R113K) n'affecte pas l'activité hydrolase, tandis que l'activité transpeptidase a chuté de cinq fois.

1.1.4. Site actif de la GGT

1.1.4.1 Acides aminés impliqués dans la reconnaissance des substrats

Il n'existe pas de structure cristalline précise de la GGT. Aussi, de nombreuses études ont été effectuées en utilisant des agents chimiques capables de modifier spécifiquement certains acides aminés importants dans le site actif de l'enzyme. Différents inhibiteurs mimant le substrat donneur, marqués au ^{14}C , ont été utilisés avec la GGT et ont réagi de manière irréversible avec la petite sous-unité de l'enzyme³⁶. Ceci montre donc que le site de liaison de l'entité γ -glutamyle se trouve en partie dans cette région de l'enzyme. En fait, le site actif et le site de liaison de l'enzyme ont été proposés pour se retrouver à l'interface des deux sous-unités³⁶. De plus, le site de liaison du substrat accepteur a été proposé comme étant sur la grosse sous-unité de la GGT et serait le même que celui liant les résidus Cys et Gly du substrat donneur du GSH³⁶. Stole et Meister ont utilisé du phénylglyoxal radiomarké, agent chimique connu pour réagir avec le groupement guanidinium de l'arginine mais aussi avec la lysine, pour inactiver complètement l'enzyme³⁷. Deux acides aminés ont pu être ainsi identifiés après digestion avec la trypsine et par HPLC, l'arginine 107 et la lysine 99, deux résidus situés dans la grosse sous-unité de la GGT de rat. Des études par mutagenèse dirigée ont aussi été menées afin d'identifier, voire confirmer, les différents acides aminés impliqués dans le site de liaison du substrat donneur de l'enzyme. La lysine (Lys-99) interagirait avec l'acide carboxylique de la glycine du glutathion et serait donc impliquée aussi dans le site de liaison du substrat accepteur dans le troisième sous-site correspondant à la glycine du glutathion³⁷. Ces auteurs et le groupe de Groffen ont aussi montré que l'arginine 107 (Arg-111 pour le rat) de la grosse sous-unité et l'acide aspartique 423 (Asp-422 pour le rat) de la petite sous-unité chez la GGT humaine interagissent respectivement avec le groupement acide carboxylique et le groupement ammonium de la partie γ -glutamyle du substrat^{38,39}.

1.1.4.2. Acides aminés impliqués dans la catalyse

Le fluorure de phénylméthane sulfonyl⁴⁰ (PMSF), connu pour inhiber les protéases à sérine, inhibe la GGT en présence de maléate seulement⁴¹. Dû au manque de reconnaissance de la GGT pour le PMSF, le maléate peut induire un changement de conformation qui permettrait de mettre à découvert une sérine qui agirait comme nucléophile. Une série de mutants de la GGT recombinante humaine a été préparée afin de vérifier si les résidus sérines de la petite sous-unité étaient requis pour l'activité de l'enzyme et son inhibition avec l'acivicine (inhibiteur irréversible de la GGT)⁴². La substitution des résidus Ser-451 et Ser-452 par des alanines a mené à une baisse de l'activité et une diminution de l'inhibition par l'acivicine. Ces sérines sont importantes, mais ne sont pas nécessaires, car l'activité n'est pas complètement nulle. Un autre rôle possible pour ces deux résidus serait de stabiliser l'intermédiaire tétraédrique formé lors de l'attaque du nucléophile de la GGT sur le carbonyle du substrat donneur⁴².

Récemment, le groupe de Hiratake a prouvé, par inhibition irréversible avec un analogue fluorophosphonate de l'acide glutamique, pouvant agir comme marqueur d'affinité, et par spectrométrie de masse, que le nucléophile est la thréonine 391 chez la GGT de *E. coli*^{43,44}. Ce résidu conservé dans toutes les espèces de GGT est en position *N*-terminale de la petite sous-unité, donc la GGT ferait partie d'une nouvelle famille d'enzyme : les Ntn-hydrolases (*N*-terminal nucléophile hydrolase). Les deux premières enzymes à être reconnues comme telles sont la pénicilline acylase⁴⁵ et le protéasome eucaryotique⁴⁶. Dans celles-ci, l'acide aminé en position *N*-terminale sert à la fois comme nucléophile et base générale. Le nucléophile peut être une sérine, une cystéine ou une thréonine tel qu'indiqué au Tableau 1.2.

Tableau 1.2: Différents membres de la famille des Ntn-hydrolases⁴⁷ et leur nucléophile en position *N*-terminale.

Enzymes	Nucléophile
Pénicilline V acylase	Cys
Glutamine amidotransférase de classe II	Cys
Pénicilline G acylase	Ser
Protéasome procaryotique	Thr
Glycosylasparaginase	Thr
Acide glutaryl-7-aminocéphalosporique acylase	Thr ou Ser

Les Ntn-hydrolases possèdent cette particularité de s'autocatalyser à partir d'un précurseur inactif pour former une enzyme active avec ses deux sous-unités et ainsi libérer le résidu *N*-terminal donc le nucléophile^{48,49}. Récemment, Suzuki et ses collaborateurs ont montré que la GGT de bactérie était capable de se cliver en ses sous-unités par le biais de la thréonine *N*-terminale⁵⁰. Pour cela, ils ont muté la thréonine en une sérine et une cystéine et ils ont observé une diminution de la vitesse de formation des deux sous-unités,⁵⁰ mais avec une activation tout de même du précurseur.

Dans la plupart des enzymes catalysant le bris d'une liaison peptidique, un résidu qui joue le rôle d'une base générale peut jouer le rôle d'acide général sous forme d'acide conjugué. Dans le mécanisme catalytique, une base générale est requise pour rendre plus nucléophile l'oxygène d'une sérine ou d'une thréonine potentielle. Des groupes basiques comme des imidazoles, carboxylates et groupes aminés peuvent agir substantiellement comme base dans beaucoup d'enzymes¹. Des profils pH-vitesse effectués pour les GGT de rat et humaine ont été obtenus et montrent une forme en cloche^{26,51}. Sur le côté acide de la courbe, le pK_a de 6-7 a été proposé comme dû à une histidine jouant le rôle de base générale. Cependant, Cook a montré plus tard que ce pK_a était dû en fait au substrat accepteur⁵². Des expériences de mutagenèse dirigée sur

deux histidines conservées dans toutes les espèces de GGT dans la petite sous-unité (His-383 et His-505) ont montré que l'activité de l'enzyme n'était pas modifiée⁵³. Ces histidines ne sembleraient donc pas fonctionner comme base, voire même acide général. L'activité de l'enzyme dépendrait donc d'autres résidus histidines ou d'autres types de groupements ioniques. Au niveau du côté basique de la courbe pH-vitesse, aucun résidu, avant l'étude présentée au chapitre 2, n'a été proposé pour expliquer ce comportement.

Une étude a aussi montré que l'acide glutamique 108 de la grosse sous-unité joue un rôle important dans la catalyse. La mutation de ce résidu en glutamine cause une perte de la charge qui expliquerait l'effet important sur la perte d'affinité du substrat accepteur et la catalyse dans l'étape de désacylation⁵⁴. Toutefois, aucun mécanisme n'a réellement été proposé pour l'étape catalytique de désacylation.

1.1.4.3. Spécificité des substrats

L'enzyme présente une stéréospécificité pour un substrat accepteur avec la configuration (L), mais pour le substrat donneur, la stéréochimie est moins importante^{2,6}, même si la configuration (L) est mieux reconnue. En effet, la constante d'affinité (K_M) du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide (L-GPNA) pour la réaction d'hydrolyse de la GGT de rat est de 5 μM tandis que le K_M pour le D-GPNA est de 31 μM^2 . Cependant, la molécule possédant la configuration (D) reste un substrat de choix afin d'éviter la réaction secondaire d'autotranspeptidation. En effet dans ce cas précis, le D-GPNA n'est pas reconnu en tant que substrat accepteur. Des études sont à faire pour mieux connaître les éléments de reconnaissance du substrat donneur.

Le site de liaison du substrat accepteur est proposé comme étant le site qui lie les entités cystéinyle et glycyle du glutathion (sous-sites deux et trois) au site de liaison du substrat donneur⁶. La configuration (L) est la seule reconnue dans le deuxième sous-site²⁶. Les meilleurs acides aminés accepteurs sont les acides aminés neutres sur la chaîne latérale comme la L-cystine, la L-méthionine, la L-glutamine, *etc*²⁶. Les acides aminés plus encombrés comme la proline et les acides aminés di-substitués en α ne sont

pas reconnus. Les dipeptides sont la plupart du temps les meilleurs accepteurs, comme la glycylglycine ou la cystéinyglycine. La glycine doit être absolument le deuxième acide aminé du dipeptide pour être bien reconnu. Des acides aminés tels l'alanine diminuent beaucoup le K_M du substrat accepteur².

1.2. Objectifs de recherche

1.2.1. Mécanisme d'acylation de la GGT

La principale réaction de la GGT est le transfert d'un groupement γ -glutamyle sur différents substrats accepteurs. En utilisant différents L-glutamyl- γ -anilides *para*-substitués comme substrat donneur et la glycylglycine comme substrat accepteur, nous avons pu obtenir, précédemment dans le laboratoire³⁴, une corrélation entre le $\log(k_{cat})$ et le paramètre σ^- de Hammett qui courbe vers le haut en forme de 'V'. Ces résultats seraient en accord avec un mécanisme d'acylation catalysée par un acide général où la géométrie de l'état de transition change selon la nature du substituant en position *para* du groupement aromatique. Des effets isotopiques de solvant ont été réalisés et ont montré qu'un proton est en vol dans l'étape déterminant la vitesse.

Des études complémentaires de physico-chimie avec des effets de température doivent être effectuées afin de compléter et appuyer le mécanisme et notamment identifier les acides aminés importants lors du mécanisme d'acylation de la GGT tel l'acide général servant vraisemblablement à protoner le groupe partant de cette étape.

Concernant l'identification de la base générale nécessaire dans ce mécanisme pour déprotoner le groupement hydroxyle du nucléophile, nous nous sommes appuyés sur une étude basée sur une Ntn-hydrolase, l'acide glutaryl-7-aminocéphalosporique acylase⁵⁵. Cette étude a permis de découvrir la base générale de cette enzyme par marquage à l'aide d'une petite molécule : le cyanate de potassium. Une étude semblable est

envisagée pour la GGT de rat avec notamment des études d'inhibition, une courbe pH-vitesse et l'impact du marquage sur les activités hydrolase et transpeptidase de la GGT.

1.2.2. Étude de la nucléophilie de la GGT par la synthèse de dérivés aza et oxaglutamyl-*p*-nitroanilide

Le mécanisme d'acylation de la GGT lors de la transpeptidation a été élucidé en utilisant différents analogues du L-GPNA et par ce biais en modifiant la force du lien amide des substrats donneurs (voir chapitre 2). Par contre, peu d'information existe quant à l'électrophilie du carbonyle de ces substrats. Il est aussi important de connaître le nucléophile du site actif et sa capacité à attaquer les substrats ou les inhibiteurs irréversibles. Pour y parvenir, l'électrophilie du carbonyle du substrat donneur a été modifiée en remplaçant une entité méthylène de la chaîne latérale du L-GPNA en position γ par des hétéroatomes. Les synthèses et les cinétiques de ces composés sont présentées, ainsi que les renseignements obtenus sur le nucléophile.

1.2.3. Cartographie du site actif de la GGT

Pour la synthèse d'inhibiteurs, il est important de connaître quelle est la structure minimale pour une bonne reconnaissance, par la GGT, de cette molécule. Ceci implique, dans un premier temps, la synthèse d'analogues de la L-glutamine avec modification de la chaîne carbonée et des groupements ammonium et carboxylate. Ces molécules ont été testées, par la suite, en présence de la GGT comme inhibiteurs de la réaction de transpeptidation du L-GPNA catalysée par cette enzyme.

De plus, afin d'obtenir des informations supplémentaires sur les fonctionnalités capables d'inhiber la GGT, des analogues de l'acide glutamique au niveau de la fonction acide carboxylique sur la chaîne latérale ont été testés. Une étude de la stéréochimie du site actif de la GGT sera également présentée grâce à l'utilisation de dérivés soufrés.

1.2.4. Synthèse d'inhibiteurs réversibles de l'étape d'acylation de la GGT

Le rôle central de la GGT dans beaucoup de désordres physiologiques nous permet d'envisager l'importance de la synthèse d'inhibiteurs spécifiques de cette enzyme. Il existe de nombreux inhibiteurs réversibles de la GGT se liant à l'enzyme avec une très bonne affinité. Cependant, certains sont peu spécifiques et peuvent se lier à d'autres enzymes reconnaissant la partie γ -glutamyle ou bien sont instables *in vivo*. En se basant sur les résultats présentés au chapitre 4, une nouvelle famille d'inhibiteurs réversibles a été envisagée pour inhiber la GGT. Pour faciliter la reconnaissance de la GGT envers ces molécules supposément inhibitrices, des analogues du glutathion, plus spécifiques à la GGT, ont été synthétisés et testés. Une comparaison avec les analogues de substrats ou les inhibiteurs déjà existants sera également présentée.

1.2.5. Synthèse et études cinétiques d'inhibiteurs irréversibles de la GGT

Un inhibiteur irréversible de la GGT peut avoir plusieurs avantages. D'une part, nous espérons par ce biais mieux connaître la GGT et ses différents rôles physiologiques. D'autre part, un inhibiteur irréversible spécifique peut permettre l'identification du nucléophile dans le site actif de l'enzyme comme cela a été fait pour la GGT de bactérie, mais à un pH physiologique et avec un composé plus stable. La synthèse d'inhibiteurs irréversibles, comportant une fonctionnalité phosphonamide, est présentée dans ce dernier chapitre.

Chapitre 2
Mécanisme d'acylation de la GGT

2.1. Introduction

Comme il a été montré au chapitre 1, les acides aminés importants au niveau de la reconnaissance des substrats et de la catalyse de ceux-ci dans la réaction d'acylation par la GGT sont peu connus. De plus, aucun mécanisme détaillé de l'étape d'acylation n'existe et la nature exacte de l'étape limitante de ce processus n'est pas connue (Schéma 2.1). Aussi, afin d'étudier le mécanisme d'acylation de la GGT, une série de substrats analogues au glutathion (γ -glutamylanilides *para*-substitués) a été synthétisée et testée comme substrat donneur dans notre laboratoire³⁴ (Figure 2.1).

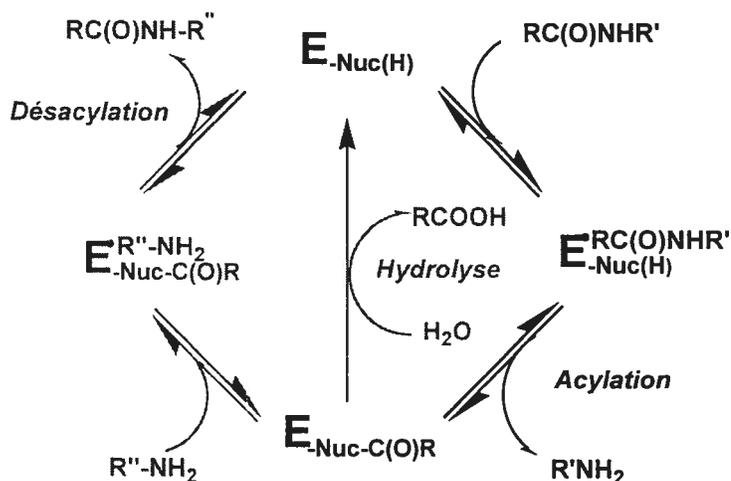


Schéma 2.1 : Mécanisme ping-pong modifié proposé pour la GGT. L'étape d'acylation est en gras. Nuc représente le nucléophile. R, R' et R'' représentent un squelette d'acide aminé.

En utilisant des concentrations saturantes d'un bon substrat accepteur, l'étape d'acylation devient limitante. La force du lien amide clivé au cours de l'acylation de la GGT est modifiée grâce à la présence de différents substituants (électrodonneurs ou électroattracteurs) en position *para* sur l'anilide des substrats donneurs de la Figure 2.1.

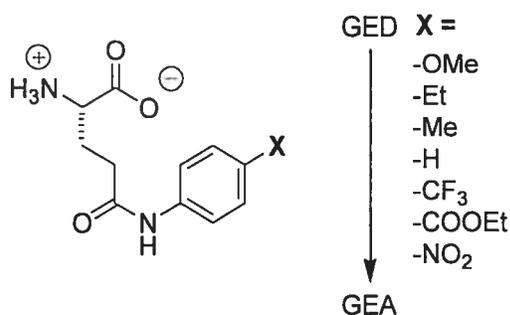


Figure 2.1 : Substrats γ -glutamylanilides *para*-substitués synthétisés pour l'étude de l'étape d'acylation de la GGT. (GEA représente un groupement électroattracteur et GED pour électrodonneur).

Une courbe représentant les vitesses de clivage de ce lien par la GGT en fonction du paramètre σ^- de Hammett⁵⁶ (pouvant être corrélé avec le $\text{p}K_a$ de l'anilinium libéré pendant la réaction et variant selon la nature du substituant, attracteur ou donneur, sur l'anilinium) peut être tracée et est appelée une courbe de Hammett. Ces composés libérés n'étant toutefois pas détectables directement par spectrophotométrie UV-visible, une technique de diazotation formant un complexe coloré avec l'aniline libérée a été employée. La diazotation a été mise au point dans le laboratoire et se fait par condensation des anilines diazotées sur la *N*-(1-naphtyl)éthylènediamine pour donner un complexe coloré qui peut être, lui, détecté par spectrométrie visible^{34,57}.

Une courbure vers le haut a été observée dans la courbe de Hammett avec, comme minimum, le substrat donneur ne comportant pas de substituant (Figure 2.2)³⁴. De plus, afin de confirmer cette forme, les composés avec les substituants méthoxy ($-\text{OMe}$), nitro ($-\text{NO}_2$) et sans substituant ($-\text{H}$) ont été testés avec de l'enzyme provenant de différentes purifications et les mêmes résultats ont été obtenus.

L'interprétation de ce résultat nous permet d'envisager deux cas possibles: un changement de mécanisme selon la nature du substituant ou un changement de géométrie à l'état de transition de l'étape limitante lors de la réaction enzymatique³⁴.

Des effets isotopiques de solvant (réaction dans l'eau deutérée *versus* l'eau déionisée) ont été observés³⁴ pour les substituants $-\text{OCH}_3$, $-\text{H}$ et $-\text{NO}_2$ démontrant un proton en vol. Tous ces résultats confirment que l'acylation est l'étape déterminant la vitesse.

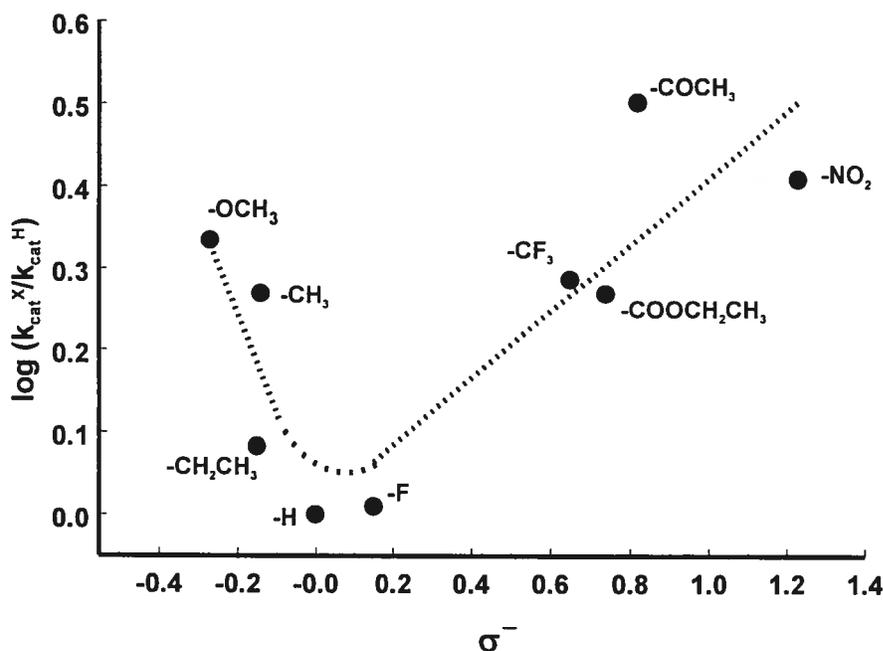


Figure 2.2 : Courbe de Hammett pour la réaction de transpeptidation de la GGT avec les substrats donneurs L- γ -glutamylanilides *para*-substitués en présence de Gly-Gly en concentration saturante à pH 8.0. Les vitesses sont normalisées par rapport au composé sans substituant en position *para* sur l'aromatique. Le paramètre σ^- représente le paramètre de Hammett. Les substituants en position *para* sont indiqués au-dessus de chacun des points.

Le même profil biphasique en 'V' a été obtenu avec une autre enzyme, la glycosylasparaginase, avec des substrats donneurs quasi-identiques⁵⁸. En effet, les auteurs ont suivi l'hydrolyse de β -aspartylanilides substitués en position *para*. Comme cela a été montré pour la GGT, la courbe de Hammett a prouvé que l'acylation est l'étape limitant la vitesse.

Afin d'obtenir de plus amples informations sur ce mécanisme et notamment sur l'état de transition de l'étape limitante, des effets de température ont été effectués pour permettre d'obtenir une courbe de Eyring. Une courbe de van't Hoff a aussi été faite pour identifier les acides aminés impliqués dans le transfert de protons pendant l'étape d'acylation.

2.2. Effets de température : courbe de Eyring

2.2.1. Introduction

Les valeurs des paramètres d'entropie (ΔS^\ddagger) et d'enthalpie d'activation (ΔH^\ddagger) peuvent être obtenues en traçant une courbe de Eyring^{59,60}. Notamment, la valeur d'entropie d'activation peut apporter des informations sur l'ordre ou le désordre au niveau de l'état de transition de l'étape limitante. Si le système est bien ordonné lors d'une réaction chimique ou enzymatique, la valeur d'entropie sera négative, mais si le système est peu ordonné (par exemple une seule molécule impliquée), la valeur sera positive. La valeur d'enthalpie souligne l'énergie nécessaire pour obtenir le complexe activé, c'est aussi l'énergie totale qu'il faut fournir pour briser et former des liaisons⁶¹.

L'équation pour tracer une courbe de Eyring est présentée ci-dessous (1) :

$$\ln \frac{k_{\text{obs}} \cdot h}{k_B \cdot T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (1)$$

où k_{obs} représente la vitesse observée de la réaction enzymatique, h la constante de Planck, T la température en Kelvin, k_B la constante de Boltzmann et R la constante des gaz parfaits. À partir de l'équation 1, il est possible d'obtenir graphiquement les différentes valeurs d'entropie (ΔS^\ddagger) et d'enthalpie (ΔH^\ddagger) en faisant varier la température.

2.2.2. Résultats

Les réactions enzymatiques de transpeptidation ont été faites pour les trois substrats donneurs L- γ -glutamylanilides substitués en *para* par des groupements nitro, méthoxy ou sans substituant avec des concentrations saturantes en substrat accepteur Gly-Gly, selon la méthode expérimentale expliquée au chapitre 7. La réaction pour les substrats donneurs possédant ces deux derniers substituants (-H, -OCH₃) ne peut pas être suivie directement du fait de la nature de l'aniline libérée. La méthode par diazotation expliquée dans l'introduction de ce chapitre a été utilisée et est décrite au chapitre 7. Un exemple typique de la courbe de Eyring est montré à la Figure 2.3 pour le L-GPNA (comportant un substituant nitro).

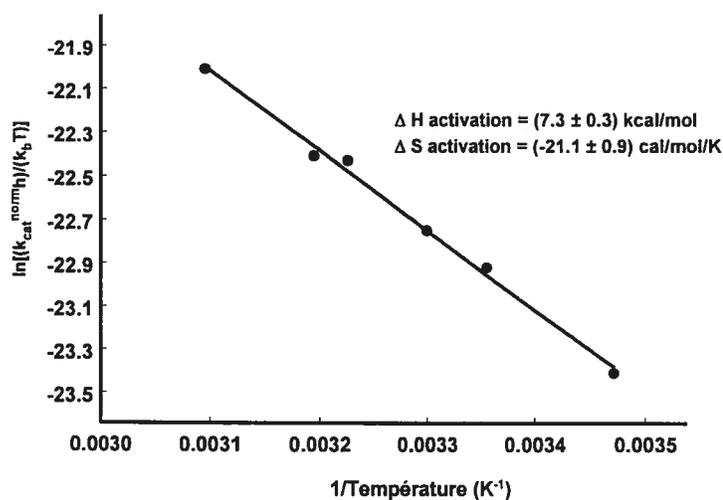


Figure 2.3 : Courbe de Eyring pour la transpeptidation par la GGT du L- γ -glutamyl *p*-nitroanilide en présence de 20 mM du substrat accepteur glycylglycine dans un tampon 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 à différentes températures.

Chaque point de la courbe a été obtenu à partir d'une courbe Michaelis-Menten où le V_{max} déterminé a été transformé en constante de vitesse k_{cat}^{nomm} . Cette expérience a été faite pour des températures de 15 à 50°C (température du bloc). Le détail de ces

transformations est discuté dans le chapitre 7. Des courbes similaires ont été obtenues pour les deux autres substrats donneurs testés. Les résultats de l'enthalpie et l'entropie d'activation ainsi obtenus sont présentés dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Valeurs d'enthalpie et entropie d'activation pour la transpeptidation par la GGT en présence de différents substrats donneurs L- γ -glutamylanilides *p*-substitués et de 20 mM glycyglycine à différentes températures dans 0.1M Tris•HCl à pH 8.0.

Substrats donneurs testés	ΔH^\ddagger (kcal•mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (cal•mol ⁻¹ •K ⁻¹)
L-γ-glutamyl-<i>p</i>-méthoxyanilide	8.8 ± 1.6	-16.4 ± 5.4
L-γ-glutamylanilide	8.3 ± 0.9	-19.0 ± 2.9
L-γ-glutamyl-<i>p</i>-nitroanilide (L-GPNA)	7.3 ± 0.3	-21.1 ± 0.9

Les erreurs expérimentales ont été calculées en considérant les incertitudes sur la pente de la droite ou sur l'ordonnée à l'origine selon le cas.

2.2.3. Discussion

En considérant la courbe de Hammett en forme de 'V', un changement de géométrie à l'état de transition peut expliquer ces résultats. La courbe de Eyring peut compléter cette étude mécanistique en offrant des informations sur l'état de transition de l'étape limitante d'un processus enzymatique.

Les valeurs de l'enthalpie d'activation (ΔH^\ddagger) et les valeurs d'entropie d'activation (ΔS^\ddagger) pour les trois substrats donneurs substitués en position *para* se ressemblent (en tenant compte des erreurs expérimentales). Les techniques de suivi de la réaction enzymatique sont différentes. En effet, pour le substrat donneur substitué avec un groupement méthoxy et celui sans substituant, la réaction a été suivie de façon non continue par diazotation impliquant plus d'erreurs expérimentales. Pour la

p-nitroaniline, la réaction est suivie de manière continue par spectrométrie visible, diminuant l'importance de ces erreurs.

Cependant, des études dans le laboratoire ont montré que pour le même composé (L-GPNA), les deux techniques de détection mènent aux mêmes résultats³⁴. Il est donc impossible de proposer une corrélation entre le pK_a (ou le paramètre de Hammett σ^-) de l'aniline libérée et la valeur de ΔS^\ddagger déterminée, dû aux erreurs expérimentales.

Les valeurs d'entropie d'activation sont très largement négatives dans tous les cas testés, donc ceci implique un système très organisé à l'état de transition. Des valeurs d'entropie et d'enthalpie du même ordre de grandeur ont été trouvées pour l'acylation de la chymotrypsine par la benzoyl-L-tyrosylglycinamide, plus précisément sur la libération du premier produit, avec un ΔS^\ddagger de $-17.4 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ et un ΔH^\ddagger de 11.5 kcal/mol ⁶². Ces données, comparables à celles obtenues pour la GGT, ne permettent pas cependant de conclure sur les acides aminés présents dans le site actif lors de l'étape d'acylation. Nous ne savons pas si ces valeurs peuvent être partiellement dues à une réorganisation des molécules d'eau dans le site actif.

Pour certaines enzymes, les valeurs d'entropie d'activation peuvent être positives. Par exemple, pour l'oligopeptidase B, une courbe de Eyring a été obtenue avec une pente négative et un ΔS^\ddagger de l'ordre de $12.52 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ dus dans ce cas-là à un changement de conformation de la structure de la protéine⁶³.

Grâce aux informations obtenues précédemment dans le groupe de recherche, provenant de la courbe de Hammett (Figure 2.2) et des effets isotopiques de solvant et grâce aux études présentées ici, un mécanisme concerté suggérant un état de transition très ordonné au niveau du substrat donneur est proposé au Schéma 2.2 pour l'étape critique d'acylation.

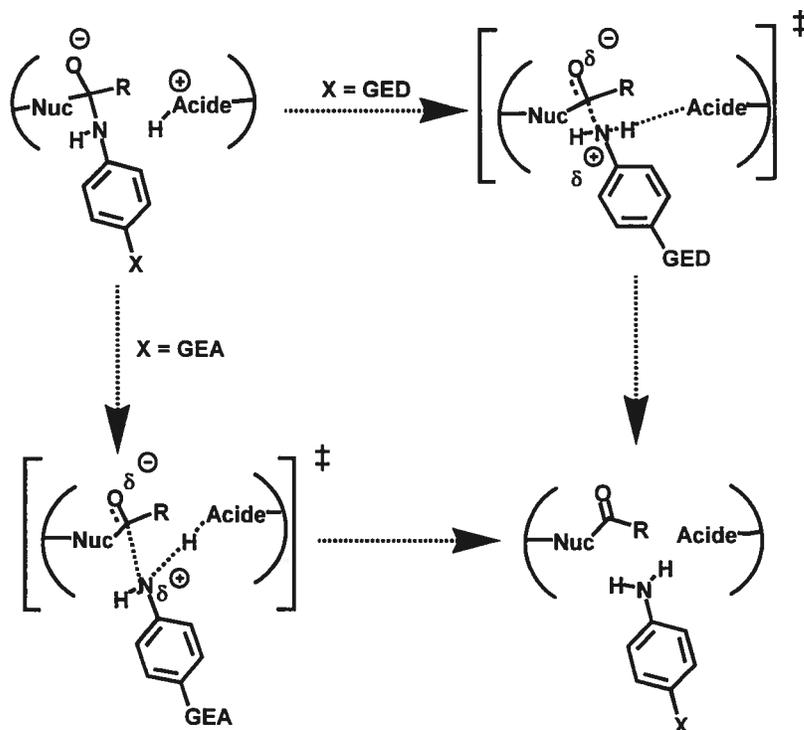


Schéma 2.2 : Mécanisme proposant deux voies possibles de décomposition de l'intermédiaire tétraédrique en fonction de la nature des substituants en position *para* sur le groupe aromatique (GEA représente un groupement électroattracteur et GED un groupement électrodonneur). R désigne la partie γ -glutamyle du substrat donneur, Nuc le nucléophile de la GGT).

L'étape limitante, d'après la courbe de Hammett (Figure 2.2), est donc le bris simultané du lien C-N dans l'intermédiaire tétraédrique formé à partir de l'enzyme et du substrat donneur et la protonation du groupe partant, l'aniline. Le degré du transfert de proton dépend de la nature électronique du substituant en position *para* sur l'anilide. Les substituants électroattracteurs favoriseront le bris du lien C-N, ce qui se traduit par un lien C-N plus long à l'état de transition mais rendront la protonation de l'aniline moins avancée car l'azote sera moins basique. Cependant, dans le cas des substituants électrodonneurs, le bris du lien C-N sera tardif et la protonation de l'aniline sera précoce.

Un acide aminé servant d'acide général est proposé dans le mécanisme ci-dessus (Schéma 2.2). Celui-ci permet la protonation du groupe partant, donc de l'aniline après la dégradation de l'intermédiaire tétraédrique. Afin d'identifier cet acide général, une courbe de van't Hoff a été faite.

2.3. Identification de l'acide général par une courbe de van't Hoff

2.3.1. Introduction

Aucune structure cristalline de la GGT n'existe avec une résolution assez bonne permettant d'identifier avec précision le site actif de la GGT⁶⁴. Aussi, les acides aminés importants lors de la catalyse de la GGT sont peu connus. Des expériences de mutagenèse dirigée ont été effectuées sans réel succès, telles que décrites au chapitre 1.

Dans le laboratoire, une courbe pH-vitesse a été préalablement obtenue afin de déterminer les pK_a des acides aminés présents dans le site actif de l'enzyme (Figure 2.4).

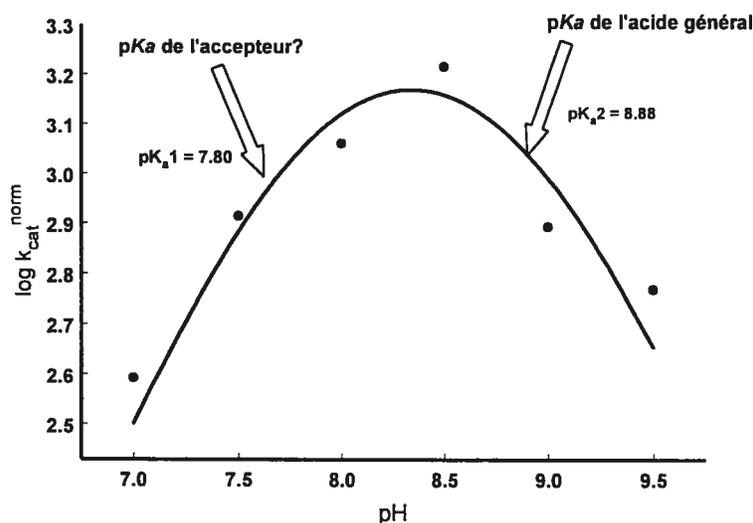


Figure 2.4 : Profil pH-vitesse pour la transpeptidation par la GGT du L-GPNA en présence de concentrations saturantes de Gly-Gly à 37°C.

Les points d'inflexion représentent les pK_a des acides aminés pouvant être impliqués dans la catalyse. Le premier point d'inflexion rapporté à un pK_a de 7.80 peut être celui de la base générale nécessaire pour déprotoner le groupement hydroxyle agissant comme nucléophile au cours de la réaction. Cependant, ce point d'inflexion a été attribué aux différentes valeurs de pK_a du groupement ammonium des accepteurs⁵². La même expérience a été effectuée en modifiant les substrats donneurs. Aucune modification dans le profil pH-vitesse n'a été observée, donc le deuxième pK_a à 8.88 pourrait correspondre à l'acide général présent dans le site actif de l'enzyme⁶⁵.

Une courbe de van't Hoff pourrait apporter des informations quant à la nature de l'acide général lors de la catalyse par la GGT. L'équation de cette courbe est la suivante :

$$\ln Ka = \frac{-\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + C \quad (2)$$

où Ka représente la concentration en proton, R la constante des gaz parfaits ($1.987 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), ΔH l'énergie de dissociation, T la température absolue et C une constante.

Des profils pH-vitesse peuvent être effectués à différentes températures et étudiés en considérant le déplacement du deuxième pK_a sur la courbe pH-vitesse. En utilisant l'équation (2) et selon la valeur de l'enthalpie ΔH , spécifique à un type d'acide aminé, il est possible de préciser la nature de l'acide aminé responsable de la catalyse de type acide général.

2.3.2. Résultats

Le substrat donneur utilisé a été le L- γ -glutamyl *p*-nitroanilide (L-GPNA). La libération de la *p*-nitroaniline peut être facilement suivie lors de la transpeptidation du L-GPNA en présence de concentrations saturantes de glycyglycine à pH 8.0. Les

paramètres cinétiques comme le K_M et le V_{max} ont été obtenus grâce à des courbes de Michaelis-Menten à chaque pH et à chaque température. Le V_{max} a été transformé par la suite en k_{cat}^{norm} , connaissant la concentration d'enzyme utilisée. Des courbes pH-vitesse ont été obtenues à différentes températures (15 à 50°C), l'enzyme se dénaturant au-delà de 50°C⁶⁵. Le pH de la solution a été vérifié et ajusté à chaque température avant de faire l'expérience.

Un profil pH-vitesse typique a été obtenu, dans le cas présent à 30°C, comme présenté à la Figure 2.5.

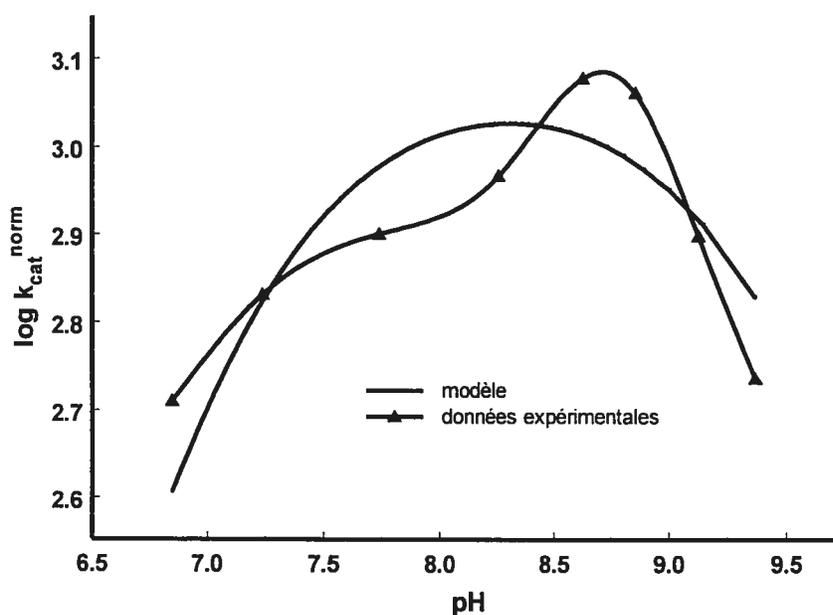


Figure 2.5 : Profil pH-vitesse pour la transpeptidation du L-GPNA par la GGT en présence de 20 mM de Gly-Gly à 30°C. La courbe théorique (modèle) a été tracée selon un modèle (en cloche avec deux états d'ionisation) utilisé dans le laboratoire³⁴.

Si les données expérimentales sont considérées en détail, deux courbes en cloche semblent superposées avec un premier plateau vers 7.75 et un deuxième sommet vers 8.75. La courbe théorique a été tracée selon un modèle en cloche avec les états d'ionisation des deux acides aminés et elle ne correspond pas du tout aux données expérimentales, ce qui ne facilite pas l'obtention du deuxième pK_a . Aussi, une autre méthode a dû être utilisée en considérant les courbes Lineweaver-Burk pour déterminer

ce deuxième pK_a autour de 9. Dans cette méthode, le proton est alors considéré comme un inhibiteur ou activateur de la réaction enzymatique. Des courbes Lineweaver-Burk sont tracées à différents pH pour une température précise. Seuls les points sur la partie basique (vers pH 9.0) sont considérés puisque c'est ce pK_a qui nous intéresse, ce qui donne la Figure 2.6. Une activation « non-compétitive simple » est observée, démontrant que le proton agit comme activateur au niveau de l'enzyme libre et du complexe enzyme-substrat (E•S)⁶².

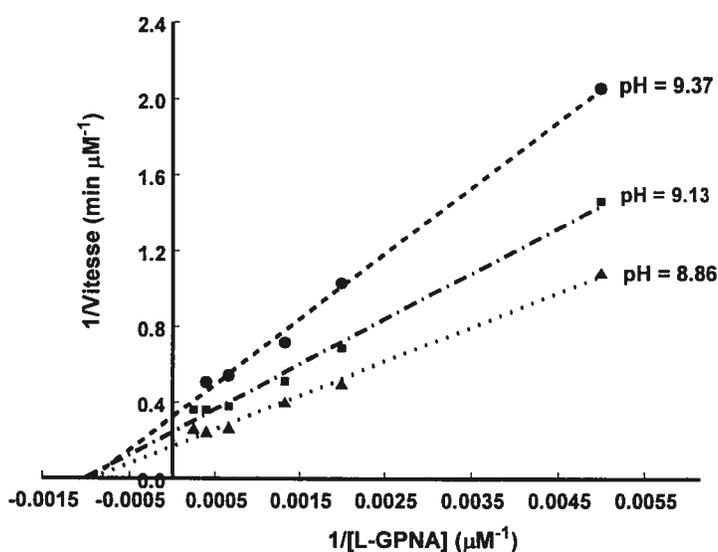


Figure 2.6 : Courbe Lineweaver-Burk pour la transpeptidation par la GGT du L-GPNA en présence de conditions saturantes en Gly-Gly, à différents pH à 30°C.

Ensuite, les pentes de chacune des droites de la Figure 2.7 sont considérées pour générer une courbe secondaire permettant de déterminer la valeur du pK_a correspondant au point d'inflexion de la partie basique du profil pH-vitesse (Figure 2.7). L'abscisse à l'origine donne le pK_a de ce deuxième acide aminé impliqué dans l'étape d'acylation de la GGT.

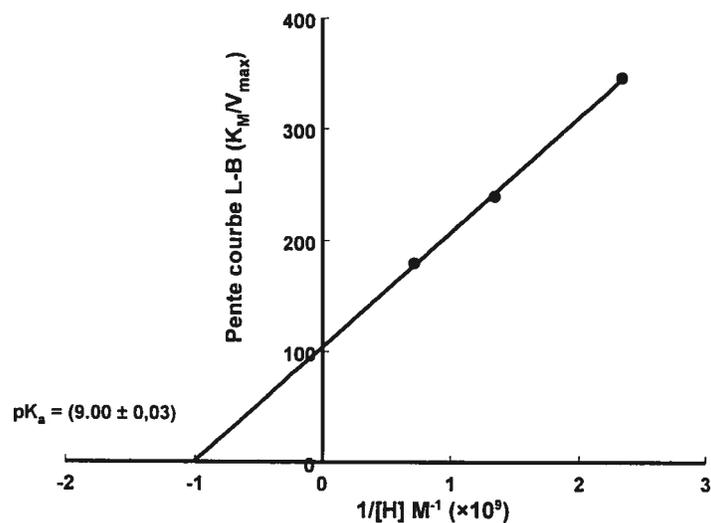


Figure 2.7 : Courbe secondaire représentant les pentes obtenues dans le graphique Lineweaver-Burk (Figure 2.6) en fonction de l'inverse de la concentration de protons (tirée du pH) afin de déterminer la valeur de pK_a .

Les mêmes expériences ont été répétées aux différentes températures pour donner le tableau ci-contre :

Tableau 2.2 : Valeurs du 2^{ième} pK_a obtenues à partir des courbes secondaires telles qu'illustrées à la Figure 2.7.

Température du profil pH (°C)	Valeur du 2 ^{ième} pK_a
15	9.04 ± 0.11
25	8.58 ± 0.04
30	9.00 ± 0.03
37	9.01 ± 0.01
40	8.46 ± 0.02
50	8.20 ± 0.08

La courbe de van't Hoff représentant les pK_a en fonction de l'inverse de la température a été tracée et la valeur de l'enthalpie d'ionisation ΔH a été déterminée à partir de la pente pour donner (4 ± 2) kcal/mole (Figure 2.8).

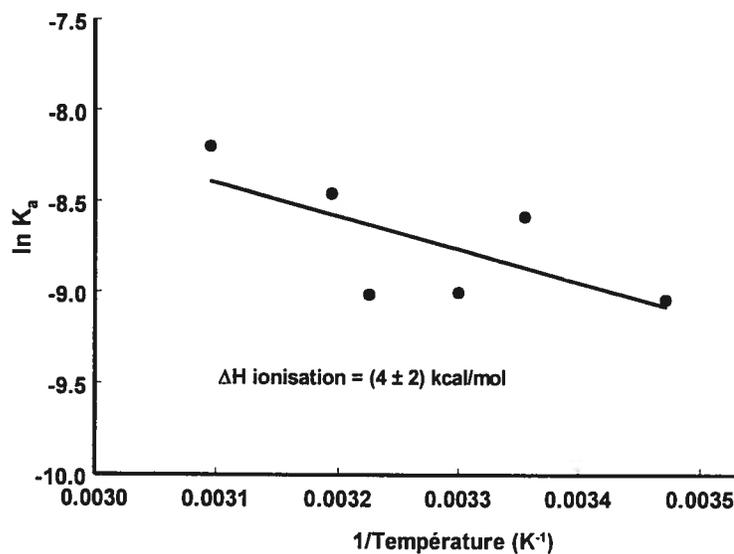


Figure 2.8 : Courbe de van't Hoff pour la transpeptidation de la GGT de reins de rat.

2.3.3. Discussion

Des profils pH-vitesse ont été effectués à différentes températures afin de déterminer le ΔH de l'acide aminé pouvant agir comme acide général. Ces expériences, visant à s'appuyer sur l'enthalpie d'ionisation et non sur le pK_a pour identifier l'acide aminé, ont été faites car la valeur cinétique du pK_a déterminée sur des profils pH-vitesse dépend du micro-environnement présent dans la cavité d'une enzyme. Un environnement hydrophobe va stabiliser des groupements non-ionisables. De plus, la proximité d'un acide aminé chargé positivement va diminuer le pK_a de l'acide aminé concerné tandis qu'une charge négative va augmenter ce pK_a ⁶². Ainsi, il est impossible de comparer le pK_a cinétique avec celui d'un acide aminé seul en solution pour identifier l'acide général.

Avec plus de données en main par comparaison avec la Figure 2.4, ceci nous a permis de mieux définir la courbe pH-vitesse. Deux courbes en cloche seraient superposées et la Figure 2.9 propose une identification plus précise des différents points d'inflexion.

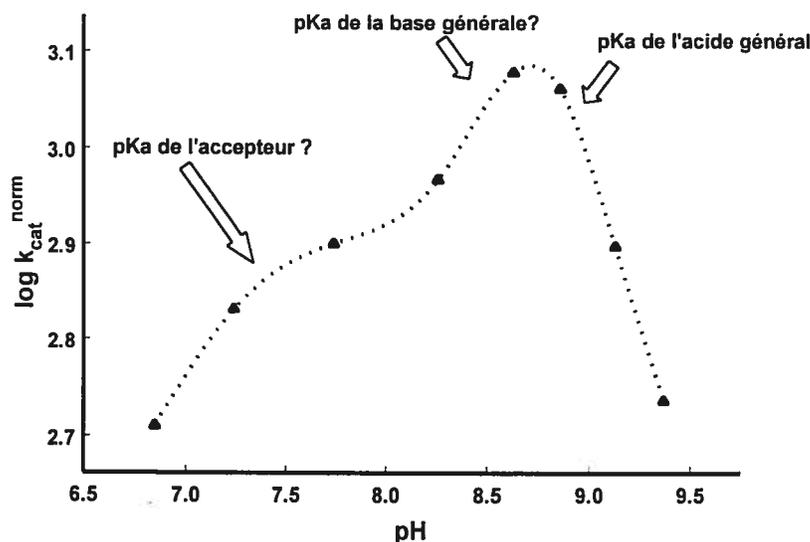


Figure 2.9 : Profil pH-vitesse à 30°C représentant possiblement deux courbes superposées.

La pente d'une valeur de 1 dans la partie basique de la courbe pH-vitesse indique qu'un seul acide aminé est impliqué dans le changement de vitesse et le point d'inflexion serait dû à l'acide aminé qui jouerait le rôle d'acide général. À pH 8.3, il pourrait y avoir un début de pente d'une valeur de 1 symétrique avec la pente dans la partie basique, mais celle-ci serait partiellement cachée par une autre courbe superposée. Ceci expliquerait la difficulté de l'analyse de la partie acide de la courbe pH.

Tel qu'indiqué dans le Tableau 2.3, en général, pour un acide carboxylique, l'enthalpie d'ionisation est autour de 0 kcal/mol⁶². Pour les groupements ammonium tels que la lysine, l'enthalpie serait plutôt autour de 12 kcal/mol, ce qui est loin de la valeur obtenue. Des cystéines avec une valeur de 7 kcal/mol pourraient correspondre aux valeurs obtenues dans cette étude, seulement leurs mutations par des alanines n'ont montré aucune perte significative d'activité pour la GGT, donc ces résidus ne sont probablement pas impliqués dans la catalyse par la GGT³⁹. Par contre, des histidines mutées (His-383 et His-505 de la GGT humaine, conservées chez le rat) ont montré une perte d'activité appréciable⁵³, mais pas totale. Le profil pH-vitesse étant le même pour les enzymes mutée et sauvage, ces histidines, finalement, ne sembleraient pas fonctionner comme acide général. Cependant, d'autres histidines pourraient jouer ce rôle de catalyseur. Selon les résultats que nous avons obtenus, nous pensons qu'une histidine agirait comme acide général dans le site actif de la GGT.

Tableau 2.3 : Valeurs typiques de pK_a et de ΔH d'ionisation pour les groupes fonctionnels acides de chaînes latérales⁶².

Résidus	pK_a	ΔH d'ionisation (kcal/mol)
Asp, Glu	4	0
His	6	7
Cys	9	7
Lys	10	12
Tyr	10	7

Pour la glycosylasparaginase, une Ntn-hydrolase, les auteurs proposent une thréonine comme nucléophile, dont le groupement ammonium libre agirait aussi comme base générale pour la déprotoner et ensuite comme acide général pour protoner le groupe partant, l'aniline⁵⁸. Ensuite, elle déprotonerait l'accepteur, ici une molécule d'eau, puis protonerait le nucléophile pour qu'il soit un bon groupe partant (Schéma 2.3). En fait, le groupement ammonium ou amine selon le cas de la thréonine jouerait le même rôle qu'une histidine dans les protéases à sérine comme par exemple la chymotrypsine⁶⁶. La GGT fait aussi partie de la famille des Ntn-hydrolases, mais nous croyons que le groupement ammonium de la thréonine n'agit pas forcément comme acide général comme présenté pour la glycosylasparaginase, un autre acide aminé comme une histidine pourrait être impliqué.

Les conclusions mécanistiques de la courbe de Hammett et les études de température (courbes de Eyring et van't Hoff) ont fait l'objet d'un article⁶⁷.

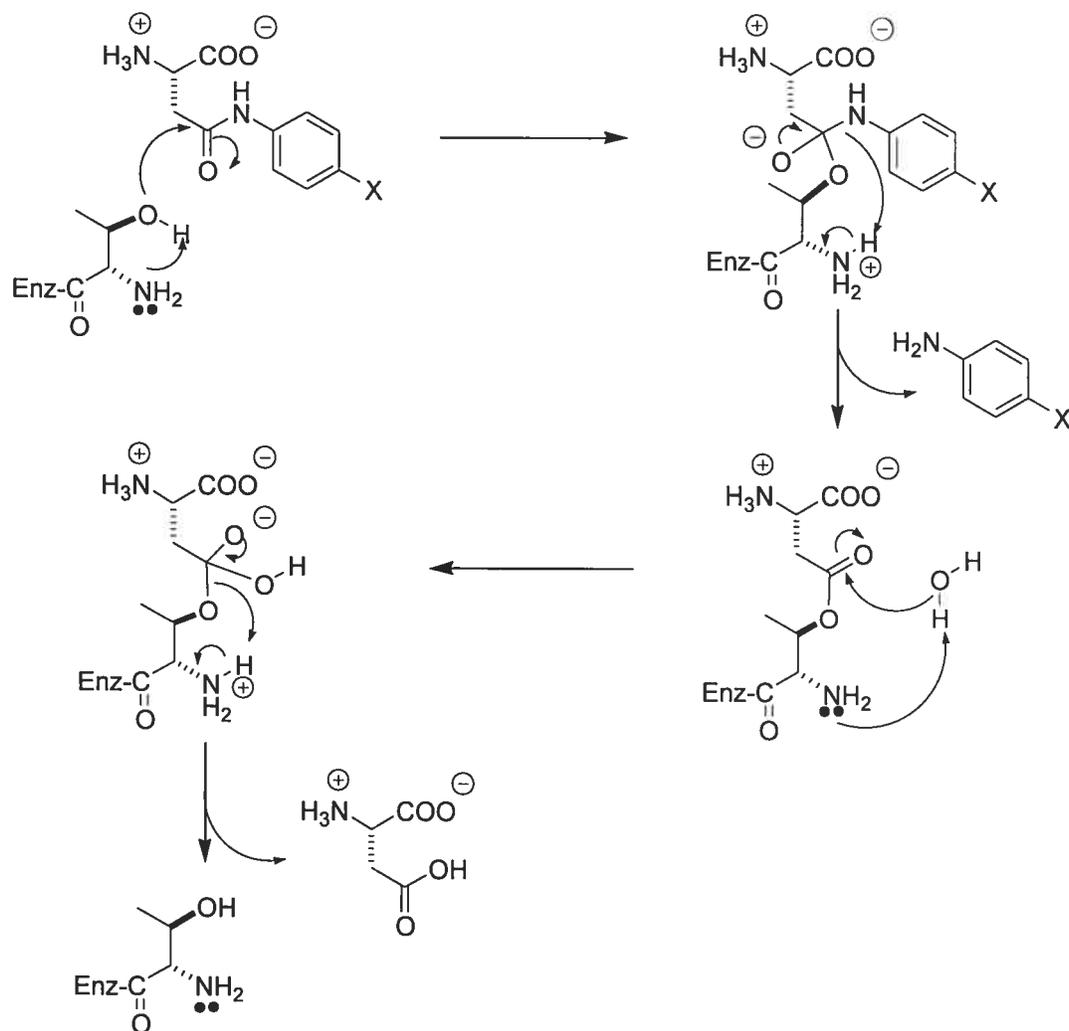


Schéma 2.3 : Mécanisme proposé pour l'hydrolyse de substrats donneurs dérivés de l'acide aspartique par la glycosylasparaginase⁵⁸.

2.4. Identification de la base générale

La première triade catalytique pour les protéases à sérine a été observée il y a 30 ans par D. Blow et son groupe en utilisant la cristallographie par rayon X pour la α -chymotrypsine⁶⁸. Leurs analyses ont mené à l'identification de deux résidus : Ser-195 et His-57. Le troisième résidu à être identifié a été l'acide aspartique 102. Chaque acide aminé dans cette triade joue un rôle dans la catalyse enzymatique, la sérine comme

nucléophile, l'histidine comme acide et base générale et l'acide aspartique est important dans la catalyse (pour orienter le groupe imidazole de l'histidine) mais pas essentiel. Finalement, il s'est avéré que l'histidine joue un rôle comme acide/base général dans la plupart des protéases à sérines⁶¹. Dans les β -lactamases, un résidu lysine joue le rôle de base analogue à l'histidine⁶⁹.

La cristallographie n'est pas toujours facile à effectuer pour certaines enzymes. Pour déterminer les résidus importants, des modifications chimiques, en plus de la mutagenèse dirigée, peuvent être faites. Dans le cas du nucléophile, différents agents de marquage seront expliqués au chapitre 6. En ce qui concerne la base générale, certains agents chimiques de marquage ont dû être utilisés pour marquer des acides aminés comme les histidines, les cystéines, les lysines de manière sélective, due à la réactivité spécifique de leurs chaînes latérales. Quelques agents chimiques sont présentés ci-dessous.

La [¹⁴C]-1-bromooctan-2-one a permis d'identifier une histidine dans la lipase de *Staphylococcus hyicus*⁷⁰. La localisation exacte de l'acide aminé a été faite par spectrométrie de masse. La propyl endopeptidase a été inactivée par un peptide contenant une α -chloro méthyl cétone⁷¹. Dans ce cas également, après digestion par la trypsine en petits fragments, cinq peptides ont été marqués par un équivalent d'agent alkylant. Les acides aminés ont été identifiés comme étant quatre cystéines et une histidine, cette dernière étant impliquée dans la catalyse. Le dérivé TLCK (1-chloro-3-tosylamido-7-aminoheptan-2-one) est un agent spécifique utilisé pour identifier une histidine dans le site actif de la trypsine⁷².

La GGT a été proposée comme faisant partie de cette nouvelle classe d'enzyme, les Ntn-hydrolases. Le nucléophile peut varier d'une enzyme à l'autre comme il a été démontré au Tableau 1.1 du chapitre 1. Pour chacun des membres de cette famille, il est suggéré que le groupe α -aminé du résidu N-terminal responsable de la catalyse peut agir comme une base qui augmenterait la nucléophilie du groupement hydroxyle ou thiol. Ce mécanisme a été notamment proposé pour la glycosylasparaginase, une autre Ntn-

hydrolase qui catalyse l'hydrolyse de β -aspartylanilides substitués en position *para*, substrats très proches de ceux de la GGT⁵⁸.

Le groupe de Park a montré, dans le cas de l'acylase de l'acide glutaryl-7-aminocéphalosporanique (GL-7-ACA acylase), la présence d'une sérine en position *N*-terminale qui joue le rôle de nucléophile et de base générale⁵⁵. Cette dernière fonction a été démontrée en utilisant le cyanate de potassium (KCNO) comme inhibiteur. Par des tests d'inhibition et de spectrométrie de masse, le groupe de recherche a identifié un adduit urée sur la fonction amine de cet acide aminé *N*-terminale.

Des expériences similaires ont été faites avec la GGT, afin d'identifier la base générale nécessaire pour rendre plus nucléophile cet acide aminé.

2.4.1. Résultats

2.4.1.1. Tests d'inhibition

La GGT a été préincubée avec différentes concentrations de cyanate de potassium à pH 8.0 et à 37°C selon le protocole expérimental écrit au chapitre 7. À un temps donné, un aliquot est prélevé et un test d'activité est effectué. Ceci a été fait pour différentes concentrations de KCNO à plusieurs temps de préincubation, comme le montre la Figure 2.10. Le KCNO, une très petite molécule, peut réagir avec des résidus qui lui sont accessibles, tels ceux qui sont à l'extérieur de l'enzyme et dans la cavité du site actif.

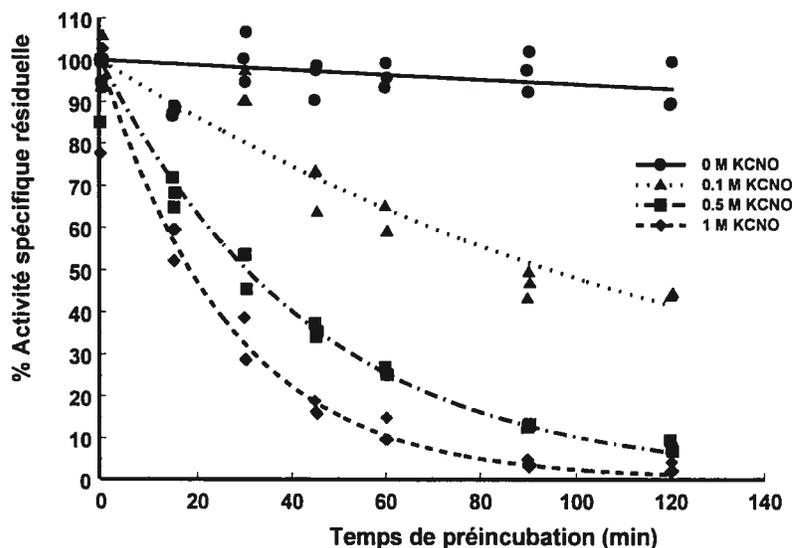


Figure 2.10 : Courbe représentant le pourcentage d'activité spécifique résiduelle de la GGT après incubation avec différentes concentrations de KCNO en fonction du temps de préincubation.

La Figure 2.10 montre une diminution de l'activité spécifique selon un processus de premier ordre en fonction du temps. Ce phénomène est observé lorsqu'il y a une inhibition irréversible d'une enzyme⁵⁵. Avec 100 mM de KCNO, l'activité résiduelle de la GGT est de 50% après 2 heures. Les concentrations nécessaires sont assez élevées dû probablement au manque de spécificité de ce composé. Le cyanate réagit sur un ou plusieurs acides aminés qui touchent à l'activité catalytique de la GGT pour réussir à inhiber ainsi l'enzyme.

Les courbes que nous avons obtenues à la Figure 2.10 ont permis d'obtenir des constantes de vitesse d'inhibition de premier ordre. L'inverse des constantes de vitesse observées en fonction de l'inverse de la concentration en KCNO nous permet d'obtenir les constantes cinétiques k_{inact} et K_I , le k_{inact} représentant la constante de vitesse d'inactivation de l'enzyme et le K_I , la constante d'inhibition irréversible (Figure 2.11). La valeur de k_{inact} peut être déterminée expérimentalement en considérant l'intersection

avec l'axe des ordonnées et la valeur de K_I peut être tirée de l'intersection avec l'axe des abscisses. Ces valeurs confirment que la concentration de KCNO nécessaire pour obtenir la moitié de l'enzyme sous forme inhibée est très élevée (710 mM) et que l'efficacité avec laquelle cette inhibition se fait est toute de même assez basse avec un k_{inact}/K_I de $0.08 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

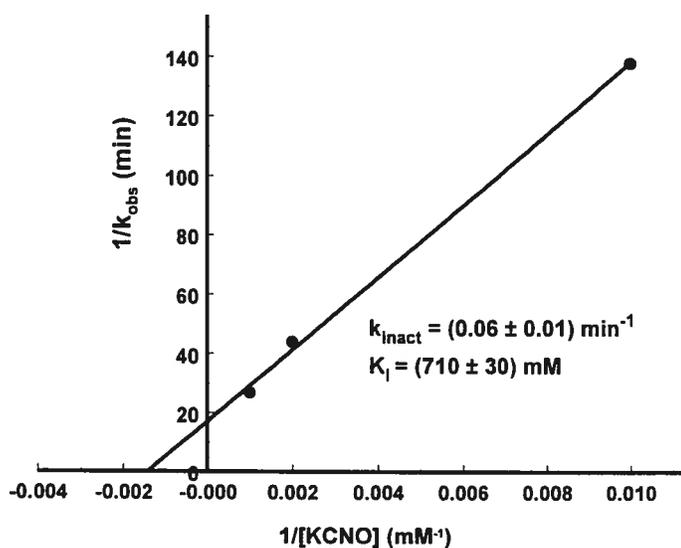


Figure 2.11 : Détermination des constantes cinétiques k_{inact} et K_I pour l'inhibiteur KCNO.

2.4.1.2. Marquage de la GGT et spectrométrie de masse

Il serait intéressant de déterminer à partir des résultats des Figures 2.9 et 2.11, le nombre et la nature des acides aminés modifiés par le KCNO. D'après les résultats de la courbe d'inhibition, la GGT est complètement inhibée avec 1 M de KCNO en solution. Cette concentration a été choisie pour marquer la GGT de manière irréversible assez rapidement. Deux échantillons, l'enzyme libre (non inhibée) et celle marquée avec le KCNO et inhibée (ce qui a été vérifié par un test d'activité), ont été envoyés en Colombie-Britannique dans le groupe du professeur Withers pour identifier le ou les acides aminés marqués par le KCNO. Ce groupe de recherche a acquis une solide expérience permettant de déterminer le ou les peptide(s) modifié(s) par un agent chimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse⁷³.

La méthodologie appliquée par le groupe Withers est décrite dans le Schéma 2.4. Après inhibition de l'enzyme, celle-ci est digérée par l'endopeptidase LysC formant ainsi plusieurs petits peptides. Ceux-ci sont séparés par HPLC et leur masse est déterminée par spectrométrie. Un programme informatique permet de prédire la séquence possible d'un peptide et celle-ci est comparée à la séquence connue de la GGT de rat. La comparaison des peptides obtenus pour l'enzyme libre et l'enzyme inhibée permet de déterminer le peptide ayant subi la modification.

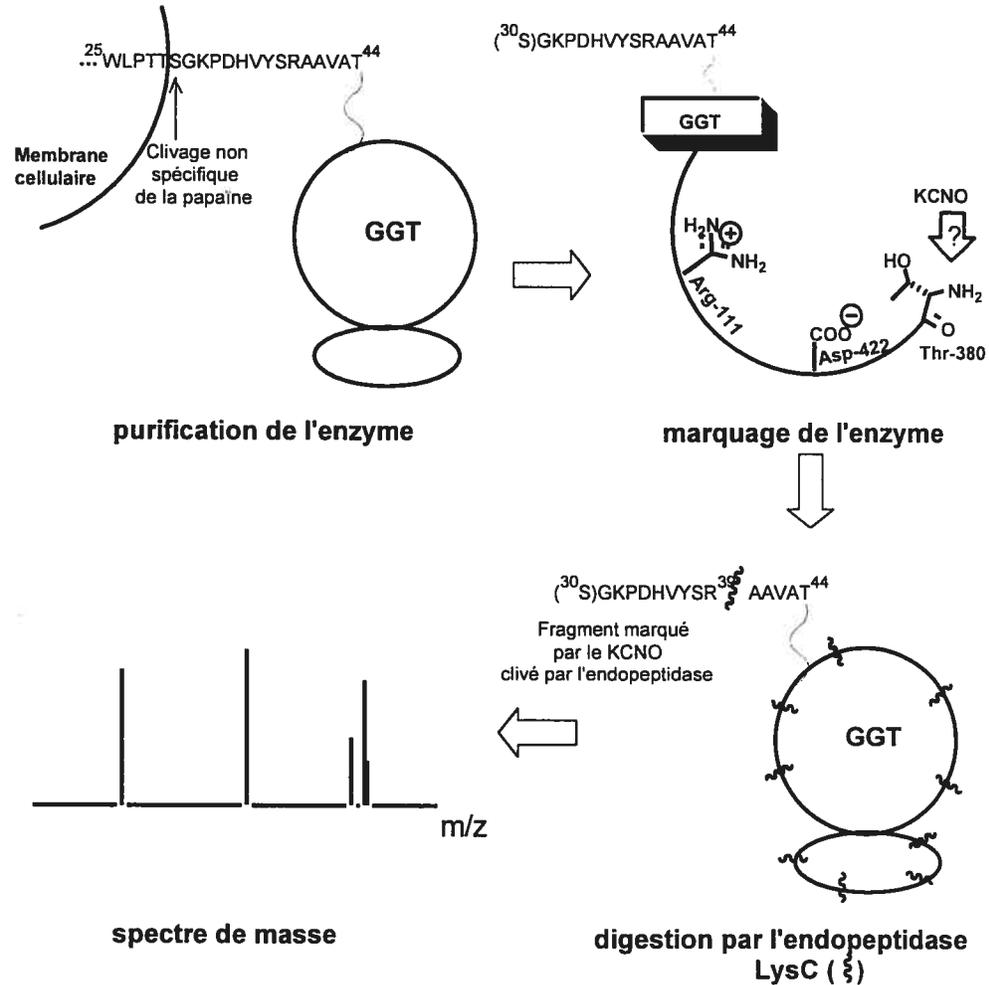


Schéma 2.4 : Étapes décrivant comment déterminer la nature d'un acide aminé ou d'un peptide marqué par un agent chimique. Les acides aminés importants, impliqués dans le site du substrat donneur de la GGT de rat, sont indiqués.

En fait, deux séquences marquées ont été trouvées par spectrométrie de masse et correspondent aux peptides ³¹GKPDHVYSR³⁹ et ³⁰SGKPDHVYSR³⁹ concordants avec la partie *N*-terminale de la grosse sous-unité. Cette séquence en position *N*-terminale est générée à la suite du clivage de l'ancre transmembranaire par la papaine au cours de la purification de la GGT et celui-ci n'affecte pas la catalyse de l'enzyme⁷⁴. Sur ces séquences, un seul acide aminé a été marqué puisqu'il n'y a qu'un seul adduit détecté correspondant à la formation d'une urée, mais sa position n'a pas été identifiée avec précision. Ces deux séquences sont identiques avec en plus une sérine pour l'une d'elles. Cet acide aminé "supplémentaire", la sérine, est dû à la faible spécificité de la

papaïne utilisée lors du clivage de la GGT de la membrane de la cellule. Le cyanate de potassium, normalement, va réagir avec un acide aminé comportant une amine⁵⁵. Les fonctionnalités sur les autres chaînes latérales ne sont pas assez nucléophiles ou les liens formés ne sont pas assez solides et peuvent se défaire après leur formation. Il existe donc trois possibilités d'acide aminé marqué d'après les séquences : la lysine 32 (K), l'acide aminé *N*-terminale de la grosse sous-unité, la sérine 30 (S) ou la glycine 31 (G) ou bien l'histidine 35 (H). Il est difficile de croire que le marquage de l'acide aminé *N*-terminale, que ce soit la sérine ou la glycine, pourrait entraîner l'inhibition irréversible de la GGT à fortes concentrations de KCNO à cause justement de la présence de ces deux peptides et de la faible spécificité de la papaïne. L'histidine pourrait être marquée mais la lysine, plus nucléophile, a plus de chance de se lier au KCNO. Cette dernière pourrait donc jouer un rôle dans la catalyse par la GGT. Elce a proposé un mécanisme faisant intervenir deux lysines lors de l'acylation et de la désacylation de la GGT⁷⁵. Une servirait de nucléophile pour attaquer le carbonyle du substrat donneur alors que l'autre servirait de base pour déprotoner l'accepteur. Pour arriver à ces conclusions, des études d'inhibition par l'agent chimique *N*-acétylimidazole sur la GGT de rat ont montré une inhibition de l'hydrolyse de l'intermédiaire γ -glutamyl-enzyme formé au cours de l'acylation par incubation à pH 7.5. En effectuant des tests sur la solidité du lien acétyl-acide aminé formé, Elce a démontré qu'un lien amide était formé. Donc, il a proposé que le *N*-acétylimidazole réagisse sur un groupement aminé libre comme une lysine⁷⁵. L'acide aminé marqué servirait donc de base générale qui aiderait l'attaque de l'eau sur l'intermédiaire acyl-enzyme. Meister et ses collaborateurs ont fait la même série d'expériences avec le *N*-acétylimidazole⁷⁶. Plusieurs acides aminés ont été marqués par le *N*-acétylimidazole, notamment la Lys-99, et peuvent affecter le clivage du lien γ -glutamyl-enzyme. Il est remarquable de constater que dans les deux cas, une lysine a été marquée par un inhibiteur de faible spécificité comme le *N*-acétylimidazole. Meister a identifié la lysine 99 tandis que Elce n'avait aucune évidence sur la lysine marquée. Quelque soit l'agent chimique (*N*-acétylimidazole ou KCNO), la modification faite sur l'acide aminé reste quasiment la même avec un amide ou une urée.

2.4.1.3. Courbe $\log k_{\text{cat}} - \text{pH}$

Un profil pH-vitesse de l'enzyme inhibée partiellement par le KCNO a été fait afin de voir si l'acide aminé modifié est important dans l'un des mouvements de protons de la GGT. Cette courbe a été obtenue en prenant des solutions de substrat accepteur glycyglycine, de L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide comme substrat donneur et des tampons à différents pH (7.0 à 9.5). La GGT est préincubée 45 min avec 100 mM de KCNO. La concentration de 100 mM en KCNO et le temps d'incubation ont été choisis d'après la Figure 2.10, afin de ne pas inhiber complètement l'enzyme pour qu'elle puisse toujours catalyser la réaction de transpeptidation. Cependant l'effet doit être suffisamment important pour constater tout de même une différence avec la courbe pH-vitesse sans KCNO. Pendant la prise des valeurs de k_{cat} et de K_M pour la courbe pH, le KCNO doit être suffisamment dilué pour éviter que l'inhibition de l'enzyme se poursuive. C'est le cas dans nos expériences puisque l'aliquot (contenant 100 mM de KCNO) d'enzyme utilisée pour démarrer la réaction est dilué 140 fois dans la cuvette de test où la réaction de transpeptidation a lieu. À une concentration de 710 μM dans la cuvette, le KCNO n'inhibe pas l'enzyme, comme il est montré à la Figure 2.10.

La courbe obtenue est montrée à la Figure 2.12. Pour débiter, nous pouvons voir un effet du KCNO en tant qu'inhibiteur irréversible puisque les deux courbes sont superposables seulement avec des échelles différentes en ordonnée. Avec 100 mM de KCNO, il reste 60% de l'enzyme sous sa forme active, d'après la Figure 2.10, ce qui correspond assez bien à la différence observée à pH 8.0.

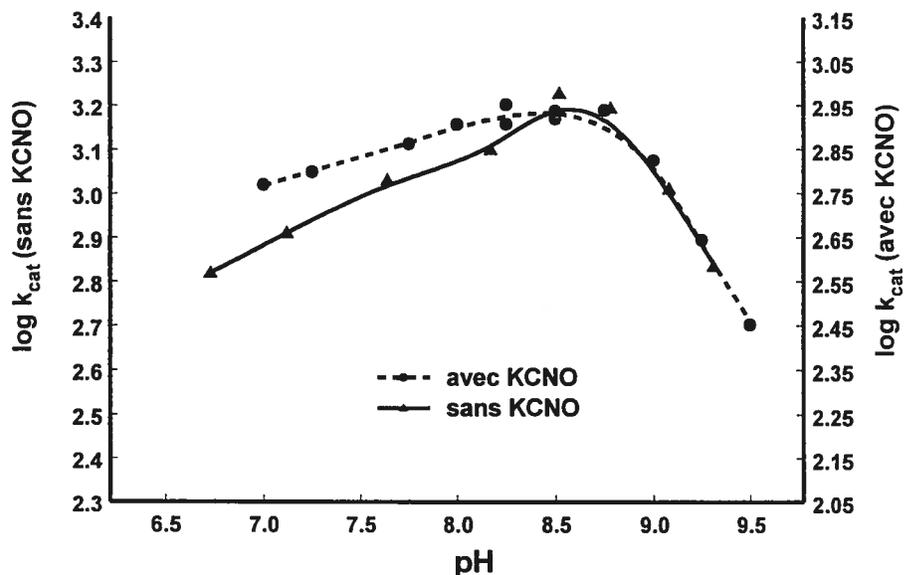


Figure 2.12 : Courbes pH- $\log k_{\text{cat}}$ pour la transpeptidation de la GGT à 37°C sans KCNO ou en présence de 100 mM de KCNO préincubé avec l'enzyme durant 45 min.

Un plateau est observé, pour les deux courbes, environ à pH 8.6. Les points d'inflexion des courbes représentent les pK_a des acides aminés importants impliqués dans la catalyse de la réaction de transpeptidation par la GGT tel que discuté au début de ce chapitre. La partie correspondant à l'ionisation de l'acide général (partie basique de la courbe en cloche) reste inchangée. Par contre, la partie acide, correspondant à la base générale et/ou au substrat accepteur (Gly-Gly) est modifiée. La courbe observée au niveau de la partie acide n'est pas modifiée par la réaction du KCNO avec Gly-Gly puisque Gly-Gly est utilisé en concentration saturante. Une partie infime de Gly-Gly modifié ne changerait rien par rapport à la saturation en substrat accepteur. Des explications sont données à la section 2.4.2.

2.4.1.4. Activité transpeptidase *versus* hydrolase

Il est intéressant de vérifier quel impact l'inhibition de la GGT par le KCNO peut avoir sur la transpeptidation *versus* l'hydrolyse. Pour cela, différents tests ont été effectués avec et sans KCNO en présence de maléate ou non. Le maléate est une petite molécule connue pour activer l'hydrolyse catalysée par la GGT. Il a la capacité de se lier dans le site de liaison du substrat accepteur et il inhibe le transfert de l'entité γ -glutamyle du glutathion⁷⁷. Ainsi, ce modulateur de l'hydrolyse peut nous donner des informations importantes en ce qui concerne les rôles de l'inhibition par le KCNO.

La GGT est préincubée avec une concentration de 100 mM de cyanate de potassium pendant 45 min et ensuite un aliquot est prélevé pour un test d'activité avec le L-GPNA comme substrat donneur et Gly-Gly comme substrat accepteur ou l'eau dans la réaction d'hydrolyse. Des valeurs d'activité spécifique sont obtenues et répertoriées dans le Tableau 2.4. La même expérience a été répétée en présence de maléate et de KCNO au cours de la préincubation. Comme dans le cas des expériences de la Figure 2.10, le KCNO prélevé dans l'aliquot, servant à effectuer les tests d'activité, est dilué 150 fois, donc il est à une concentration finale trop faible pour interagir avec l'enzyme de manière efficace. De plus, le test d'activité se déroule durant 10 minutes, ce qui constitue un temps trop court pour que le KCNO puisse réagir efficacement avec d'autres nucléophiles présents dans la solution à pH 8.0, tels le L-GPNA ou le Gly-Gly, et en diminuer suffisamment la quantité pour expliquer l'effet observé au Tableau 2.4. Ce délai représente moins de 10 % de la réaction enzymatique effectuée avec ces substrats, d'où un faible effet de la concentration de substrats utilisés et de produits formés. Même si une faible réaction avec ces nucléophiles est possible, l'effet de diminution de la quantité de ceux-ci serait identique dans toutes les expériences effectuées. Les différences observées dans le Tableau 2.4 sont donc fort probablement dues à un effet du KCNO sur l'enzyme et non un artéfact de la méthode de suivi de l'inhibition.

Tableau 2.4 : Influence du KCNO (100 mM) et du maléate (50 mM) sur la transpeptidation et l'hydrolyse catalysées par la GGT.

#	Conditions de pré-incubation	Transpeptidation		Hydrolyse		Rapport ^b
		A.S. (U/mg)	% ^a	A.S. (U/mg)	% ^a	
(1)	sans KCNO	288	100	14.9	100	19.3
(2)	avec KCNO	170	59 ^c	11.3	76 ^d	15.0
(3)	avec maléate sans KCNO	228	79	13.8	93	16.5
(4)	avec maléate avec KCNO	168	58	10.0	67	16.8

^a % de l'activité spécifique par rapport à la situation (1)

^b Rapport entre l'A.S de transpeptidation et celle de l'hydrolyse.

^c Erreur de 1 % (duplicata)

^d Erreur de 5 % (duplicata)

Nous pouvons constater en comparant les cas 1 et 2, que le KCNO inhibe à la fois la transpeptidation et l'hydrolyse, mais pas par le même facteur. Il semblerait que l'inhibition de la transpeptidation soit plus importante que celle de l'hydrolyse (59% *versus* 76%). Ces résultats peuvent s'expliquer par la liaison du KCNO sur un acide aminé impliqué dans l'étape de désacylation, car l'hydrolyse est moins touchée par l'inhibition que la transpeptidation. Aussi, il serait possible que cet acide aminé marqué inhibe l'approche ou l'attaque de l'accepteur sur l'intermédiaire acyl-enzyme.

Les expériences ont été aussi effectuées dans les mêmes conditions, mais en présence de maléate (cas 3 et 4). Pour la réaction d'hydrolyse, la valeur d'activité spécifique reste inchangée sans KCNO mais pour la réaction de transpeptidation, une baisse significative de l'activité est observée. Ceci semblerait prouver que le maléate inhiberait la liaison du substrat accepteur en se liant à l'enzyme⁷⁷. Par contre, la valeur obtenue pour l'hydrolyse reste inchangée. Ceci n'est pas surprenant car le maléate,

activateur de l'hydrolyse, doit être présent à des concentrations autour de 50 mM pour observer son effet⁷⁷. En prenant un aliquot de l'enzyme préincubée avec le maléate en solution pour en faire un test d'activité, il est alors dilué plus de 100 fois. Ainsi, il n'active pas l'hydrolyse à des faibles concentrations. Dans le cas de la transpeptidation, le maléate, toujours présent, peut compétitionner avec le substrat accepteur pour se lier à l'enzyme, diminuant ainsi l'efficacité de la transpeptidation.

Si le maléate et le KCNO sont préincubés en même temps avec la GGT (cas 4), les valeurs d'activités spécifiques restent sensiblement les mêmes que pour le cas avec KCNO, la même inhibition par le KCNO est observée. Donc, le marquage d'un acide aminé par le KCNO ne semble pas être affecté par la liaison du maléate dans le site de liaison du substrat accepteur.

Si nous regardons les rapports entre l'activité spécifique de transpeptidation et celle de l'hydrolyse, l'effet est beaucoup plus marqué sur la transpeptidation que sur l'hydrolyse dans tous les cas observés.

2.4.2. Interprétation des résultats

Comme la GL-7-ACA acylase, la GGT est inhibée par le KCNO à très forte concentration. Dans le cas de l'acylase, des concentrations de 1 M ont été utilisées pour marquer l'enzyme. Cependant, avec une concentration de 140 mM, une activité résiduelle de 7-8% était présente⁵⁵. Donc, en comparant ces résultats avec les nôtres, il semblerait que l'inhibiteur KCNO soit plus efficace pour l'acylase que pour la GGT.

Des études de marquage par le KCNO ont été effectuées afin d'identifier le ou les acide(s) aminé(s) marqué(s). Un seul acide aminé a été marqué par cette molécule dans le peptide (³⁰S)GKPDHVYSR. Dans celui-ci, seuls les acides aminés *N*-terminaux (sérine ou glycine), la lysine ou encore l'histidine peuvent avoir réagi avec le cyanate de potassium pour faire un nouveau lien covalent urée (N-CO-NH₂). Les deux peptides identifiés, dû à la faible spécificité de la papaine lors du clivage de l'ancre transmembranaire de la GGT, appuient l'idée que ce ne sont pas les deux acides *N*-

terminaux marqués qui sont responsables de l'inhibition irréversible de l'enzyme. Si tel était le cas, toutes les expériences cinétiques ne seraient pas reproductibles d'une purification à l'autre de la GGT à partir des reins de rat ce qui n'a pas été observé³⁴. Ensuite, chimiquement, il serait plus facile de carbamyleur un azote primaire d'une lysine qu'un azote secondaire dans un cycle imidazole d'une histidine. Toutefois, l'expérience serait à répéter pour identifier formellement l'acide aminé marqué.

De plus, deux courbes pH-vitesse ont été faites en présence ou non de KCNO. Le profil semble différent notamment sur la partie acide correspondant à la base générale et/ou l'accepteur, les pentes sont différentes. Cependant, sans tenir compte des axes des ordonnées, les valeurs de k_{cat} se ressemblent avec des pH de plus en plus acides, mais la différence entre les courbes subsiste. L'influence du pH de la réaction enzymatique après le marquage par le KCNO n'est pas négligeable. Aussi, le KCNO agirait sur un acide aminé dans l'enzyme qui serait impliqué directement ou indirectement dans la catalyse base générale par la GGT. De plus, les études sur la transpeptidation et l'hydrolyse en présence de KCNO suggèrent que le KCNO inhiberait en partie (seulement) la désacylation de la GGT, donc la réaction du substrat accepteur sur l'acyl-enzyme.

Tous ces résultats concorderaient avec les résultats obtenus par les groupes de Elce et Meister^{75,76} où la présence d'une lysine comme base générale au niveau de l'étape de désacylation a été montrée en inhibant la GGT avec le *N*-acétylimidazole (section 2.4.1.2). La lysine pourrait être impliquée dans la catalyse de la GGT et possiblement comme base générale dans la déprotonation de l'accepteur pour que l'attaque nucléophile de celui-ci se fasse plus rapidement. Une autre hypothèse serait que le KCNO, une fois lié à la lysine de l'enzyme, modifierait les ponts hydrogènes formés entre la lysine et l'imidazole d'une histidine. Ce dernier agirait comme acide/base général de la réaction de transpeptidation par la GGT. La lysine marquée masquerait l'entrée du substrat accepteur lors de la réaction de transpeptidation et non de l'eau pour la réaction d'hydrolyse. Ceci expliquerait pourquoi l'hydrolyse est moins touchée que la transpeptidation lors du marquage par le KCNO.

Cette lysine est conservée pour les GGT de mammifères mais pas dans *E. coli* (Annexe 1). En effet, l'identité de séquence de la GGT de bactérie par rapport à celle de

rat n'est que de 31% (Annexe 1). La GGT de *E. coli* n'accepte pas les mêmes acides aminés et dipeptides comme substrat accepteur⁷⁸. En effet, pour celle-ci, des acides aminés basiques comme L-Arg, L-Lys, L-His et des acides aminés aromatiques comme L-Phe et L-DOPA sont de bons substrats accepteurs voire meilleurs que Gly-Gly, le meilleur substrat accepteur pour les GGT de mammifères. Des substrats accepteurs comme L-Ala, L-Glu, L-Cys et L-Ser sont de bons substrats pour la GGT de rat ou humaine mais ne sont pas reconnus ou sont de très pauvres accepteurs pour la GGT de bactérie. Il est possible que le mécanisme pour la transpeptidation soit différent chez les enzymes mammifères et se fasse grâce à d'autres acides aminés.

Avec ces informations en main, il est possible d'envisager que la lysine que nous pouvons retrouver dans les mammifères aurait un rôle à jouer dans la transpeptidation. Elle pourrait agir comme base générale ou pourrait influencer sur l'histidine qui jouerait ce rôle. Un autre acide aminé Glu-108 a été proposé comme base générale⁷⁹. Le groupe de Tanigushi a observé en mutant cet acide aminé par une glutamine, une diminution de la catalyse dans l'étape de désacylation et une diminution de l'affinité du substrat accepteur pour son site de liaison. Cependant, la GGT, après mutation, est encore active. Des histidines ont aussi été proposées pour jouer ce rôle mais les mutations effectuées n'ont pas montré une baisse significative de l'activité⁵³. Sans structure cristalline de l'enzyme, il est difficile de conclure sur le rôle exact de ces acides aminés.

2.5. Conclusion : acides aminés proposés dans le mécanisme pour la transpeptidation

Avec toutes les recherches exposées dans la littérature et les résultats obtenus dans cette étude, il est possible de proposer un mécanisme pour la transpeptidation de la GGT. Les études sur l'effet de la température (courbe de van't Hoff) ont montré qu'un ion imidazolium pourrait agir comme acide général. Le pK_a autour de 8.8 correspondant à un acide aminé avec une enthalpie d'ionisation de (4 ± 2) kcal/mol serait concordant avec cette supposition⁶⁷. Les acides aminés His-505 et His-383 pour la GGT humaine ont été mutés pour identifier l'acide/base général de la GGT⁵³. Ce sont les deux seuls

résidus histidines conservés dans toutes les GGT. Le groupe de Taniguchi a conclu qu'elles jouaient un rôle dans la catalyse mais pas directement. Par contre, il existe des histidines qui sont conservées dans les GGT de mammifères que l'on ne retrouve pas dans *E. coli*, telles His-364, His-314, His-36, *etc* dans l'humain (Annexe 1). La GGT de *E. coli* est assez différente des autres GGT de par sa séquence primaire mais aussi par le type d'acides aminés qu'elle reconnaît au niveau du site de liaison du substrat accepteur. Il est donc envisageable que l'acide aminé agissant comme acide général ne soit pas le même, *idem* pour la base générale déprotonant l'accepteur. Donc, pour le rat, il est fort possible qu'une histidine soit l'acide général servant à protoner le groupe partant au cours de l'acylation (Tableau 2.5).

Ensuite, les études de marquage avec le KCNO ont servi à identifier une amine primaire comme étant possiblement responsable de la déprotonation d'un substrat accepteur au cours de la désacylation de la GGT. Cette base pourrait être la lysine 31 ou bien l'histidine agissant déjà comme acide général (Tableau 2.5). Cette histidine interagirait avec la lysine marquée sous forme de ponts hydrogènes.

Tableau 2.5 : Inventaire des acides aminés importants possiblement impliqués dans la réaction de transpeptidation catalysée par la GGT.

GGT	Nucléophile	Acide/base général pour le nucléophile	Acide général pour le groupe partant	Base générale pour l'accepteur
Humaine	Thr-381	Thr-381	His-?	His-?, Lys-31
Cochon	Thr-380	Thr-380	His-?	His-?, Lys-31
Rat	Thr-380	Thr-380	His-?	His-?, Lys-32
<i>E. coli</i>	Thr-391	Thr-391	His-?	His-?

Le Glu-108 chez la GGT humaine a été proposé comme un acide important lors de cette étape⁷⁹. Cet acide aminé est donc probablement plus impliqué dans la liaison ou l'orientation de l'accepteur que dans la déprotonation directe du substrat.

La thréonine *N*-terminale de la petite sous-unité agirait comme nucléophile mais aussi comme base générale pour l'acylation, la GGT étant possiblement une Ntn-hydrolase comme cela est proposé dans le mécanisme d'acylation de la glycosylasparaginase⁵⁸. L'histidine ou la lysine serviraient de base générale dans l'étape de désacylation pour déprotoner l'accepteur lors de l'attaque nucléophile sur l'acyl-enzyme. Dans ce cas, le groupement ammonium de la thréonine pourrait servir uniquement pour protoner et déprotoner le nucléophile. Un mécanisme est proposé pour la transpeptidation de la GGT, résumant tout ce qui a été spéculé auparavant (Schéma 2.5).

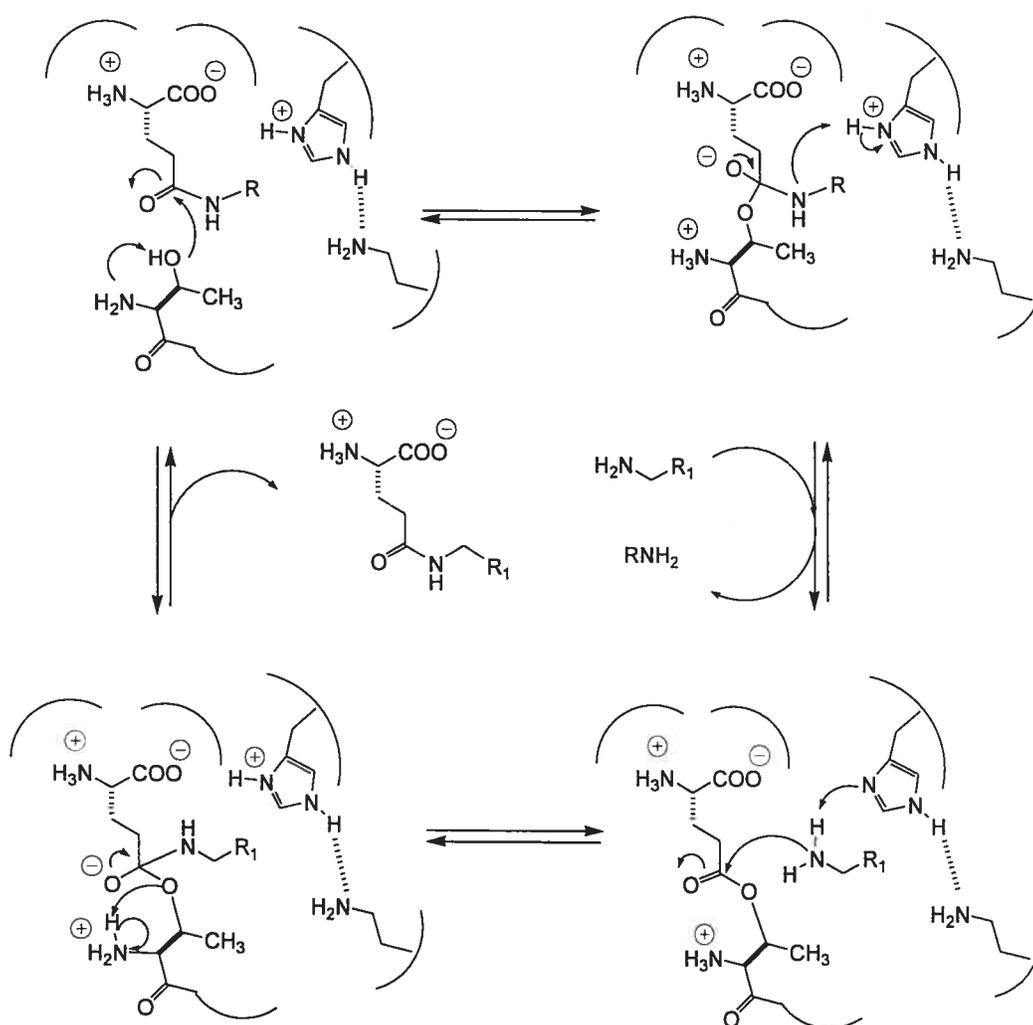


Schéma 2.5 : Mécanisme proposé pour la transpeptidation de la GGT. R représente un squelette d'acide aminé ou un groupement aryle et R₁ représente un squelette d'acide aminé.

La mutagenèse dirigée de la lysine permettrait d'obtenir des informations supplémentaires quant au rôle joué par cet acide aminé. De plus, la cristallisation de la GGT pourrait aider à confirmer ces hypothèses. Cependant, les faibles quantités d'enzyme que nous obtenons à partir des reins de rat ne permettent pas ces expériences. Aussi, l'expression et la purification de la GGT humaine ont été entreprises dans le laboratoire pour obtenir de l'enzyme en plus grande quantité.

Chapitre 3
Étude de la nucléophilie de la GGT
par la synthèse de
dérivés aza et oxaglutamyl-*p*-nitroanilide

3.1. Introduction

Le chapitre précédent a permis d'obtenir plus d'informations concernant l'étape limitante de l'acylation de la GGT. Il s'avère que la décomposition de l'intermédiaire tétraédrique menant à la libération du premier produit et à la formation de l'intermédiaire acyl-enzyme est l'étape limitante pour l'acylation de la GGT. Dans cette étude, des substrats γ -glutamylanilides *p*-substitués, dont la force du lien amide varie, ont été utilisés. Le groupement carbonyle, attaqué par le nucléophile de la GGT, possède une électrophilie variée selon la nature du substituant, mais la différence n'est pas grande pour toute la gamme⁶⁷. L'utilisation d'une classe de composés où l'électrophilie du groupement carbonyle est plus variée permettrait d'obtenir des informations sur l'attaque nucléophile (par une sérine ou une thréonine) de la GGT sur le substrat donneur, donc sur la première partie de l'étape d'acylation.

La présence d'un hétéroatome à côté d'un carbonyle permet de changer son électrophilie⁸⁰. Les aza-peptides, les carbamates et les thiocarbamates sont connus pour inhiber spécifiquement certaines enzymes comme la trypsine⁸¹, la chymotrypsine⁸², la papaïne^{83,84} ou des élastases^{85,86,87}. Un lien covalent est formé, entre le nucléophile de l'enzyme (le plus souvent une sérine) et le substrat dont l'électrophilie du carbonyle est diminuée, pour former une nouvelle fonctionnalité carbamate (Schéma 3.1). Dans la plupart des carbamates synthétisés, l'alcool partant est le *p*-nitrophénolate⁸⁷. L'intermédiaire acyl-enzyme formé peut être hydrolysé dans certains cas comme la chymotrypsine⁸².

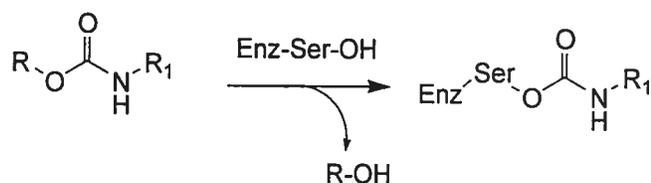


Schéma 3.1 : Inhibition d'une protéase à sérine par un carbamate. R et R₁ représentent des groupements aryles, des chaînes alkyles ou des squelettes d'acides aminés.

Récemment, des analogues du glutathion contenant différents hétéroatomes en position γ , adjacents au carbonyle sur la chaîne latérale, ont été synthétisés^{88,89,90}. Ces composés ont été testés sur la GGT de cochon. L'effet des hétéroatomes sur la force du lien amide et les implications sur le mécanisme de la GGT n'ont pas été discutés. Aussi, afin d'obtenir de plus amples renseignements sur l'électrophilie du carbonyle du substrat donneur, sur la nucléophilie de la GGT et finalement sur le mécanisme de la transpeptidation, deux familles de substrats (voire inhibiteurs) comportant des hétéroatomes placés en position γ de la molécule ont été étudiées (Figure 3.1).

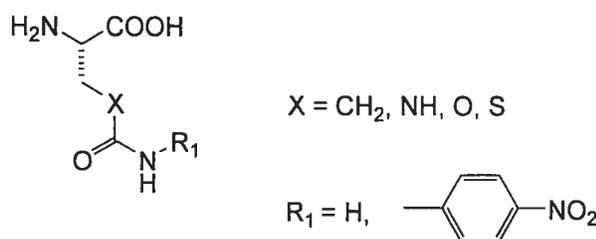


Figure 3.1 : Composés envisagés pour étudier l'électrophilie du carbonyle des substrats donneurs et la nucléophilie de la GGT.

Ces deux familles de composés diffèrent selon le groupe partant lors de la catalyse par la GGT (Figure 3.1). Le premier groupement partant choisi est l'ammoniac. En effet, il est connu que la glutamine peut agir comme substrat donneur de la GGT² et l'ammoniac est alors libéré. Sa libération par la GGT peut être observée de façon continue en utilisant une autre enzyme, la L-glutamate déshydrogénase (GDH), qui utilise l'ammoniac pour transformer le α -cétoglutarate en acide glutamique²⁸. La deuxième famille ressemble au substrat donneur L-GPNA généralement utilisé, étant donné que le groupe partant est la *p*-nitroaniline, un bon groupe activable et facilement détecté à 410 nm par spectrophotométrie visible. La synthèse de ces composés, leur utilisation dans des études cinétiques et les informations acquises sur le mécanisme de la GGT seront présentées dans ce chapitre.

3.2. Études cinétiques d'analogues de la L-glutamine

3.2.1. Méthodologie employée

Les analogues comportant des hétéroatomes en position γ sur la chaîne latérale de la glutamine sont tous commerciaux sauf le composé avec un oxygène. Il s'agit de l'albizzine ($X = \text{NH}$) et de la *S*-carbamyl-L-cystéine ($X = \text{S}$) (Figure 3.1).

Le groupe partant pendant la catalyse par la GGT est l'ammoniac. Trois méthodes peuvent être utilisées pour sa détection : l'utilisation d'une seconde enzyme, la GDH déjà utilisée avec la GGT (système d'enzymes couplées)²⁸, le réactif de Nessler ($\text{HgI}_2 \cdot 2\text{KI}$)⁹¹, ou la ninhydrine qui forme un complexe coloré avec une amine⁹². Cependant, ces deux dernières méthodes ne seront pas évaluées dans cette étude, dû à une limite de détection élevée (concentrations de l'ordre de 1 mM) et à une faible spécificité, les amines primaires étant aussi reconnues.

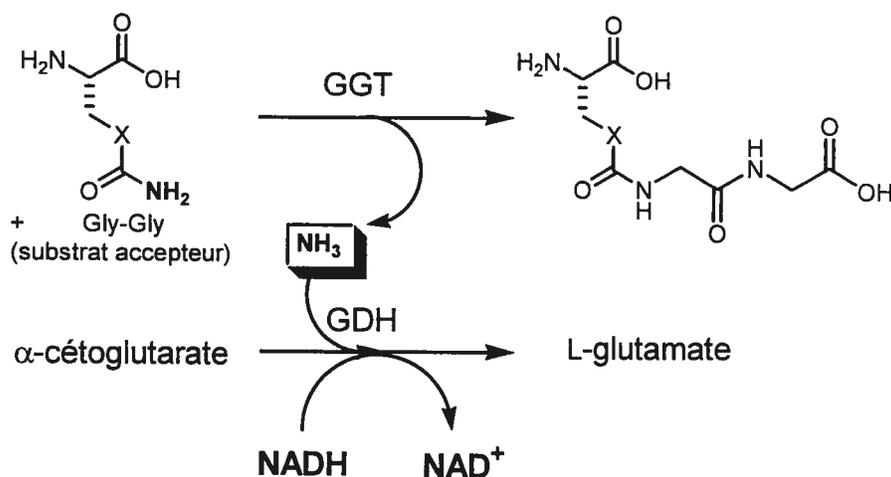


Schéma 3.2 : Système à deux enzymes couplées pour le suivi de manière continue de la libération d'ammoniac par la GGT.

Le Schéma 3.2 explique le rôle de la GDH dans la détection de l'ammoniac. La GGT clive le lien amide du substrat donneur pour libérer l'ammoniac. Celui-ci réagit

avec l' α -cétoglutarate pour former, grâce à la GDH, un dérivé imine. Cette imine est réduite en présence de GSH et de NADH (α -nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite) qui est oxydé en NAD⁺⁹². La consommation oxydative du NADH est étudiée à 340 nm par spectrophotométrie UV, permettant un suivi, de manière continue, de la réaction de la GGT.

3.2.2. Résultats et discussion

3.2.2.1. Essai avec la L-glutamine

Le protocole utilisé pour la détection de l'ammoniac en utilisant la GDH est basé sur celui existant pour la GGT²⁸ avec quelques modifications décrites au chapitre 7. Afin de se familiariser avec cette méthode utilisant deux enzymes couplées, la L-glutamine a été testée comme substrat donneur à pH 8.0 en présence de l'accepteur Gly-Gly en concentration saturante. Le K_M et le V_{max} de la L-glutamine sont déterminés à partir de la courbe Michaelis-Menten obtenue (Figure 3.2).

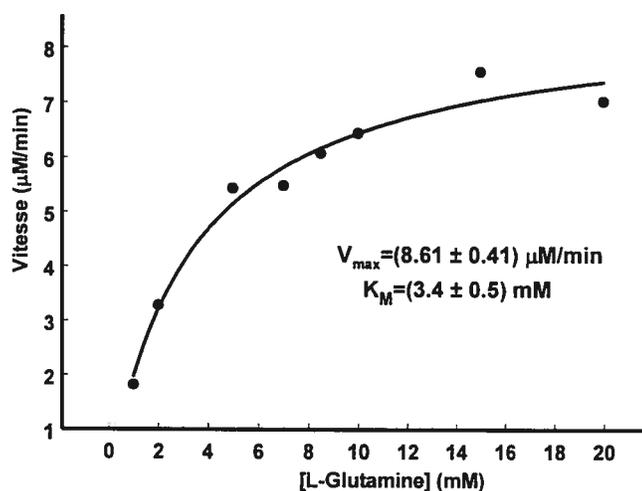


Figure 3.2 : Graphique de Michaelis-Menten permettant de déterminer le V_{max} et le K_M de la L-glutamine à pH 8.0 à 37°C.

Les résultats obtenus à la suite de la cinétique enzymatique révèlent que la L-glutamine est un substrat donneur de la GGT, mais avec une moins bonne affinité que le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, car son K_M est de 3.4 mM comparativement à 0.470 mM pour le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide⁶⁷. Ces valeurs cinétiques concordent avec celles déterminées lorsque la L-glutamine est mise en compétition avec le L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide (L-GPNA) en présence d'accepteur (Gly-Gly) et de GGT à pH 8.0 afin de déterminer son efficacité⁹³.

Cette méthode fonctionnant pour la L-glutamine, nous l'avons appliquée aux différents analogues de la L-glutamine comportant des hétéroatomes en position γ sur la chaîne latérale.

3.2.2.2. Essais avec des analogues de la L-glutamine

La L-albizzine (X=NH) et la *S*-carbamyl-L-cystéine (X=S) ont été testés en utilisant le même protocole que pour la L-glutamine.

En absence de GGT mais en présence de toutes les autres composantes du système à deux enzymes (dont la GDH), l'oxydation du NADH en NAD⁺ est observée quel que soit le composé commercial utilisé. Après plusieurs expériences témoins, il s'est avéré que la présence d'ammoniac dans le composé commercial est probablement responsable de l'oxydation du composé. Deux suppositions peuvent être formulées : les composés sont instables dans les conditions utilisées ou de l'ammoniac est prisonnier dans les produits commerciaux. D'autres expériences complémentaires seraient à faire, telles la recristallisation des produits avant les cinétiques pour s'assurer d'éliminer toutes les possibilités.

Une autre alternative a été choisie en synthétisant des analogues du substrat L-GPNA comportant des hétéroatomes en position γ . Ces composés auront l'avantage de posséder un bon groupe partant, la *p*-nitroaniline, détectable par spectrophotométrie visible.

3.3. Analogues du L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide

3.3.1. Synthèses effectuées

Les analogues du L-GPNA avec des hétéroatomes en position γ ont été synthétisés aussi bien avec l'acide carboxylique libre qu'avec un ester méthylique en position α , afin d'étudier l'efficacité de ces supposés en tant que substrats avec l'enzyme. L'ester méthylique de la L-glutamine est reconnu par la GGT de rat et ne risque pas de modifier les résultats obtenus mais peut simplifier la synthèse⁹³.

Le Schéma 3.3 décrit la synthèse de l'acide L-glutamique γ -*p*-nitroanilide méthyl ester 3.4 à partir de l'acide L-glutamique. Ceci permettra de voir l'effet d'un groupement méthyle sur l'acide carboxylique en position α à la place de l'acide libre au niveau de la reconnaissance par la GGT.

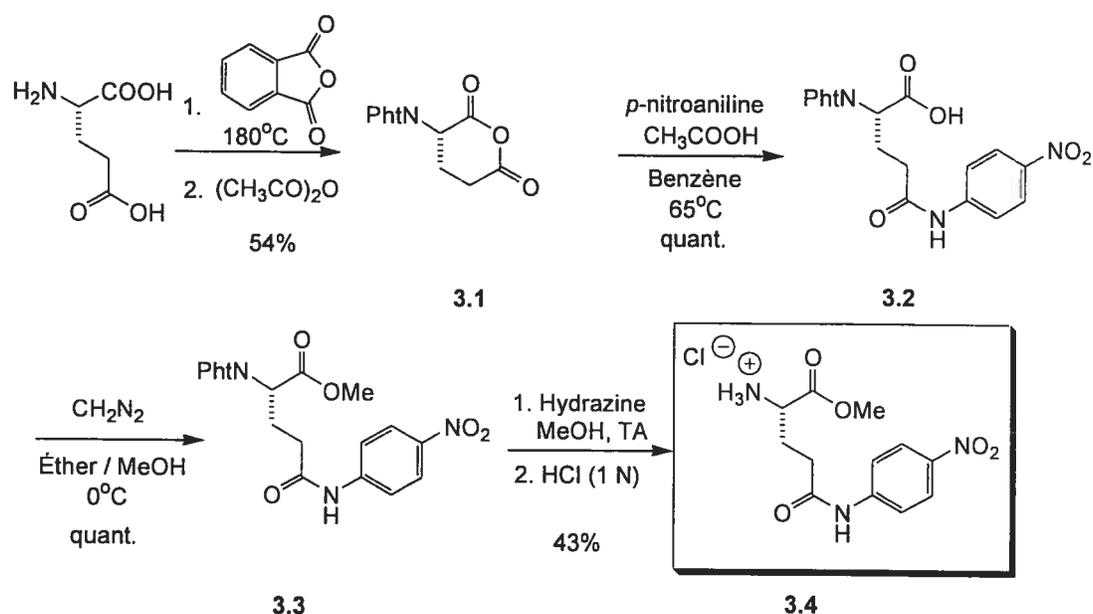


Schéma 3.3 : Synthèse de l'acide L-glutamique γ -*p*-nitroanilide méthyl ester 3.4.

Les deux premières étapes sont bien décrites dans la littérature pour donner le dérivé phthalyle **3.2** couplé à la *p*-nitroaniline⁹⁴. Par la suite, l'ester méthylique **3.3** est obtenu quantitativement en utilisant une solution de diazométhane dans l'éther. La dernière étape consiste à utiliser l'hydrazine pour déprotéger le groupe phthalyle pour donner le produit désiré **3.4**. Le rendement moyen de la réaction peut s'expliquer par la formation de produits secondaires comme l'hydrazide par attaque sur l'ester.

Le Schéma 3.4 illustre la synthèse du dérivé L-4-aza méthyl ester **3.8** à partir du produit commercial, la *N*-*tert*-butoxycarbonyl-L-asparagine. La première étape consiste en la protection de l'acide carboxylique libre du dérivé de l'asparagine par un ester méthylique en utilisant le diazométhane dans l'éther pour donner le produit désiré **3.5**. L'étape clé est le réarrangement d'Hofmann pour obtenir le dérivé **3.6** à partir de l'amide **3.5**. Cette étape est bien décrite dans la littérature⁹⁵ pour le même type de composés et utilise un réactif avec un iode trivalent^{96,97}.

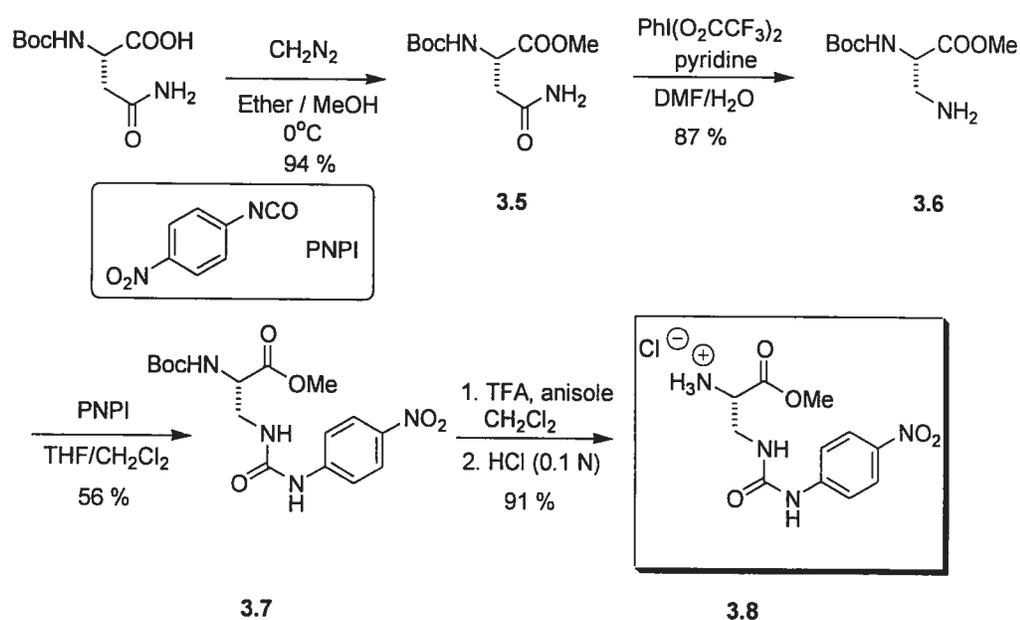


Schéma 3.4 : Synthèse de l'acide L-4-azaglutamique γ -*p*-nitroanilide méthyl ester **3.8**.

L'amine est ensuite condensée avec le *p*-nitrophényl isocyanate (PNPI) pour donner le composé **3.7** avec un rendement relativement moyen mais comparable avec la littérature⁹⁸. Le groupement protecteur Boc est ensuite enlevé par l'acide trifluoroacétique (TFA) pour donner le composé désiré **3.8**.

Le Schéma 3.5 décrit les mêmes étapes permettant d'obtenir le dérivé **3.10** dépourvu d'une protection d'ester méthylique sur l'acide carboxylique en position α . La première étape est le réarrangement d'Hofmann pour obtenir l'amine libre sur la chaîne latérale. Des tentatives pour isoler l'amine ont été faites mais finalement, la condensation directe de l'amine sur le PNPI donne les meilleurs résultats avec un rendement de 56 % pour les deux étapes pour obtenir le composé **3.9**. Ensuite, le dérivé obtenu est déprotégé en présence de TFA pour obtenir le produit final **3.10** avec un très bon rendement. Le contre-ion trifluoroacétate est échangé pour un chlorure en présence de HCl.

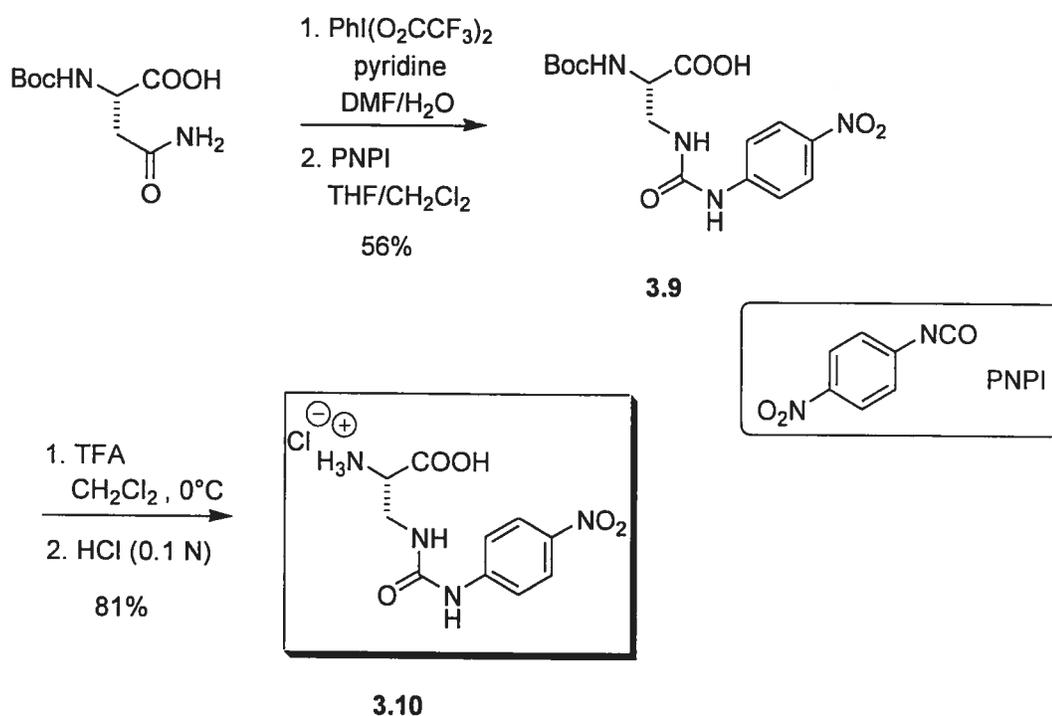


Schéma 3.5 : Synthèse de l'acide L-4-azaglutamique γ -*p*-nitroanilide **3.10**.

Le Schéma 3.6 met en évidence la synthèse du dérivé **3.13** contenant un oxygène en position γ de la chaîne latérale en partant de la L-sérine méthyl ester. La première étape consiste en la protection de l'amine libre par un groupement Boc pour obtenir le composé **3.11**. Ensuite, l'alcool est condensé avec le PNPI en présence de pyridine pour donner le dérivé **3.12**. La base permet de diminuer le temps de réaction pour donner un rendement de 59%. La dernière étape consiste enfin en une déprotection du groupement Boc pour donner le composé **3.13** avec un groupement α -aminé libre avec un très bon rendement.

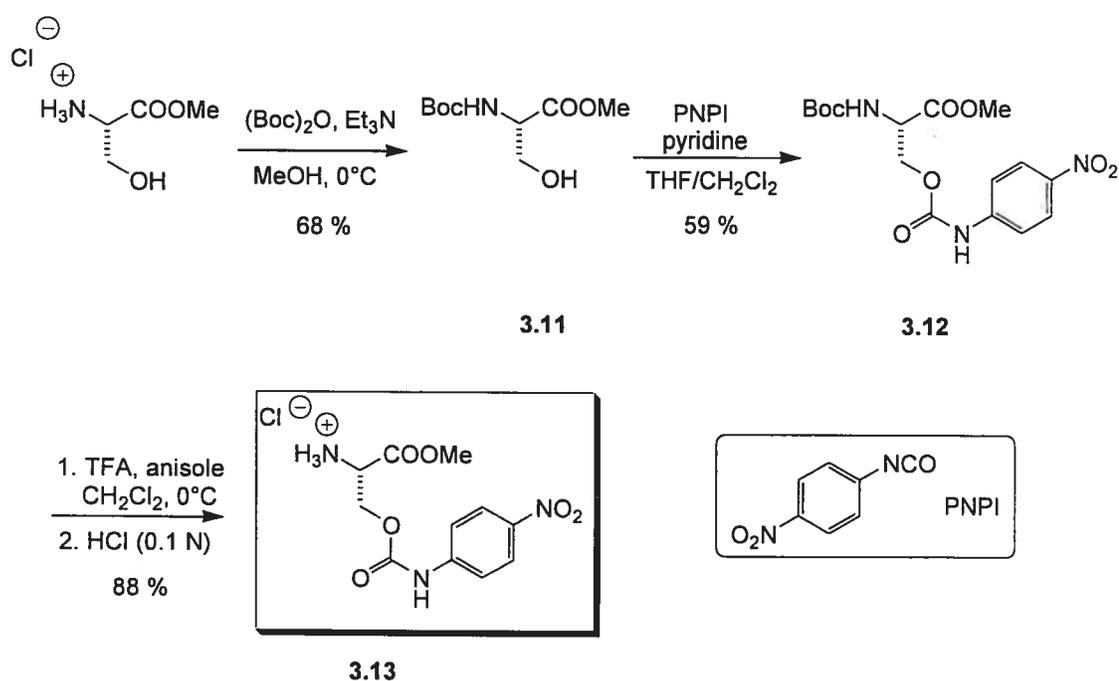


Schéma 3.6 : Synthèse de l'acide L-4-oxaglutamique γ -*p*-nitroanilide méthyl ester **3.13**.

Le dérivé **3.14** comportant un oxygène sur la chaîne latérale et un acide libre en position α n'a pas été obtenu dans les conditions données au Schéma 3.7. Ceci serait dû à des problèmes de dégradation provenant d'une cyclisation intramoléculaire ou à l'instabilité du groupement carbamate, une fois formé. L'acide carboxylique libre du dérivé **3.14** pourrait servir d'acide général et faciliterait la dégradation.

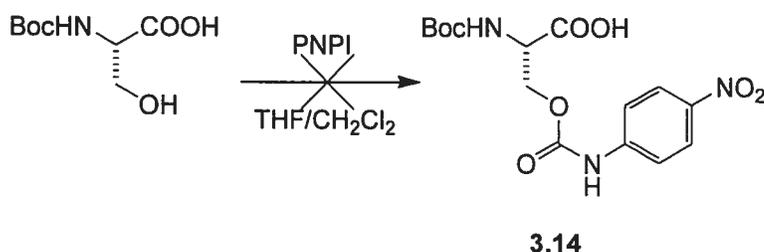


Schéma 3.7 : Synthèse du dérivé **3.14** à partir de la Boc-L-sérine commerciale.

Le composé avec le soufre en position γ sur la chaîne latérale n'a pas été synthétisé. Le composé avec l'azote s'est avéré stable à pH 8.0 contrairement à celui avec l'oxygène. De plus, un lien thiocarbamate est connu pour être plus instable qu'un lien carbamate⁹⁹. Nous pouvons nous attendre à ce que la molécule avec un soufre en position γ se dégrade plus facilement qu'un dérivé avec un oxygène, déjà très instable lors de la synthèse. Donc, le composé thiocarbamate n'a pas été synthétisé.

3.3.2. Résultats cinétiques et discussion

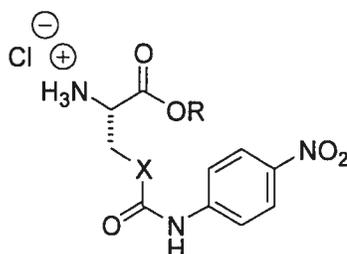
Des constantes cinétiques (k_{cat} , K_M) ont été déterminées pour tous les analogues du L-GPNA synthétisés (**3.4**, **3.8**, **3.10** et **3.13**), en tant que substrats donneur et/ou accepteur. Le k_{cat}/K_M représente l'efficacité de l'enzyme pour le substrat testé.

En tant que substrat donneur, les composés ont été testés en présence d'une concentration saturante en Gly-Gly à pH 8.0. Le composé **3.13**, qui était instable à pH 8.0, a été testé à pH 7.0. En tant qu'accepteur, les composés ont été testés en présence de D-GPNA (1 mM) pour éviter les réactions d'autotranspeptidation possibles avec le dérivé de configuration (L)². Les résultats se retrouvent au Tableau 3.1.

La référence reste le L-GPNA lui-même pour lequel les paramètres cinétiques mesurés sont comparables à ceux rapportés dans la littérature⁶⁷. Son analogue méthyl ester **3.4** est aussi reconnu par l'enzyme en tant que substrat donneur, mais avec une moins bonne efficacité en comparant les k_{cat}/K_M . Ceci démontre donc l'importance de

la charge négative du substrat donneur à cet endroit; cette charge négative peut être stabilisée par une arginine dans le site de liaison du substrat donneur³⁷.

Tableau 3.1 : Résultats cinétiques pour les composés L-GPNA, 3.4, 3.8, 3.10, 3.13 et la L-sérine méthyl ester agissant comme substrats donneur ou accepteur pour la transpeptidation de la GGT.



R, X(Composés testés)	Nature du substrat	K_M (mM)	k_{cat} ($10^3 \cdot \text{min}^{-1}$)	k_{cat}/K_M ($10^6 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)
L-GPNA	Donneur	0.47 ± 0.05	69 ± 7	150 ± 20
	Accepteur	6.3 ± 0.2	16 ± 2	2.5 ± 0.1
Me, CH ₂ (3.4)	Donneur	5.7 ± 0.5	1.5 ± 0.3	0.27 ± 0.02
	Accepteur	6 ± 1	3.2 ± 0.4	0.58 ± 0.07
Me, NH (3.8)	Donneur	Inactif ^a	Inactif ^a	Inactif ^a
	Accepteur	4 ± 1	6.1 ± 0.6	1.4 ± 0.1
H, NH (3.10)	Donneur	Inactif ^a	Inactif ^a	Inactif ^a
	Accepteur	Insoluble ^b	Insoluble ^b	Insoluble ^b
Me ^c , O (3.13)	Donneur	Inactif ^a	Inactif ^a	Inactif ^a
	Accepteur	1.5 ± 0.1	4.8 ± 0.4	3.0 ± 0.3
L-sérine méthyl ester	Donneur	N/A ^d	N/A ^d	N/A ^d
	Accepteur	34 ± 9	1.3 ± 0.2	0.038 ± 0.006

^a Ces composés ne sont pas actifs en présence de 2 mM de substrat et avec 33.8 mU de GGT.

^b Insoluble pour des concentrations supérieures à 15 mM.

^c Ce composé a été testé à pH 7.0 avec 0.1 M d'un tampon Mops.

^d N/A, non applicable.

Étonnamment, nos résultats indiquent clairement que la présence d'hétéroatomes en position γ sur la chaîne latérale des composés **3.8** et **3.13** défavorise complètement le clivage du lien CO-NH. Des problèmes de solubilité empêchant la préparation de solutions très concentrées, ces substrats n'ont pas pu être utilisés à de hautes concentrations. Cependant, même en utilisant des concentrations d'enzyme dix fois supérieures aux tests usuels (33.8 mU au lieu de 3.38 mU), aucune réaction n'a été observée. En atténuant la réactivité des dérivés carbamate et urée par comparaison avec les carboxamides, ces derniers n'agissent pas comme substrat donneur mais possiblement comme inhibiteur⁸⁰. Leur réactivité ainsi modifiée est souvent employée dans le concept de molécules capables d'acyler une enzyme par la formation d'un lien covalent donc l'enzyme est inhibée de manière irréversible ou lentement réversible⁸². Des analogues de substrat avec un hétéroatome pour l' α -chymotrypsine ont été synthétisés par Abeles et ses collaborateurs pour former un acyl-enzyme qui peut être lentement hydrolysé. Cependant, dans notre cas, la GGT est incapable de former un acyl-enzyme avec les composés **3.8** et **3.13**. Ceux-ci ont seulement la capacité de se lier en tant que substrat accepteur. Ces composés ont été préincubés avec l'enzyme et des aliquots ont été prélevés à différents temps pour des tests d'activité. Aucune inhibition irréversible n'a été observée par rapport à l'expérience témoin sans inhibiteur.

Comme expérience témoin, afin de s'assurer que le groupement ester méthylique de ces composés **3.8** et **3.13** n'est pas responsable de ce manque d'efficacité comme substrat donneur, le composé **3.10** a été synthétisé et testé avec la GGT. Cependant, même avec un acide carboxylique libre, il n'agit pas en tant que substrat donneur.

Finalement, il est important de vérifier si l'inactivité des composés **3.8**, **3.10** et **3.13** est due à leur faible réactivité et pas simplement à leur manque d'affinité pour le site de liaison du substrat donneur dû à la présence d'un hétéroatome à la place d'un groupement méthylène sur la chaîne latérale. Pour cela, des expériences de compétition ont été réalisées entre le L-GPNA et le composé **3.10** en présence d'une concentration saturante de Gly-Gly comme substrat accepteur. Le dérivé **3.10** réagit comme un

inhibiteur non-compétitif mixte sous ces conditions, tel que montré à la Figure 3.3. Il est possible de calculer les K_i pour les différents types d'inhibition.

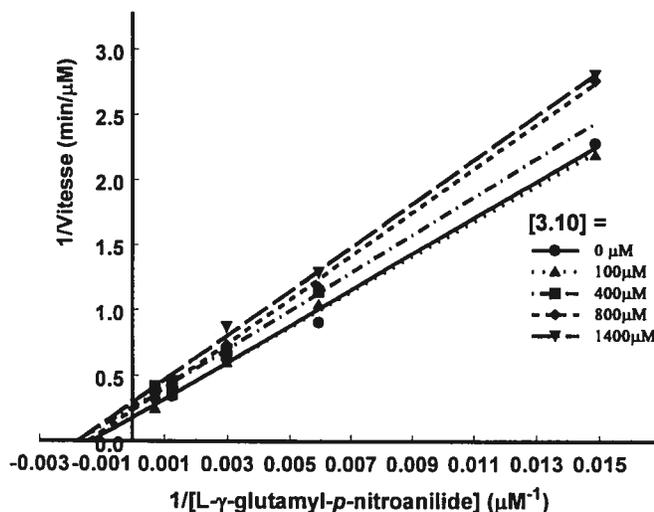


Figure 3.3 : Courbe Lineweaver-Burk pour l'inhibition non-compétitive mixte du L-GPNA par le composé 3.10 en présence de 20 mM Gly-Gly, à pH 8.0 à 37°C.

Lors d'une inhibition non-compétitive mixte, les droites d'un graphique Lineweaver-Burk se croisent au-dessus ou au-dessous de l'axe des abscisses du côté des valeurs négatives⁶¹. L'inhibiteur peut faire une compétition avec le substrat donneur, donc le L-GPNA, et avec une autre forme de l'enzyme après le complexe Michaelis E•S. Lorsqu'une enzyme reconnaît deux types de substrat avec la possibilité de plusieurs sites de liaison, un inhibiteur non-compétitif mixte peut se lier dans le site de liaison du substrat donneur ou dans un autre site non-défini sur l'enzyme, mais pouvant être le site de liaison du substrat accepteur. Il est possible de caractériser séparément les deux modes d'inhibition, l'inhibition compétitive par rapport au substrat donneur et l'inhibition incompétitive lors de la liaison dans un autre site de l'enzyme. Pour une inhibition incompétitive, la vitesse maximale apparente (V_{\max}^{app}) varie selon la concentration d'inhibiteur I et la constante d'inhibition K_i' (équation (1))⁶¹. Il suffit donc de rapporter graphiquement les ordonnées à l'origine de la courbe Lineweaver-

Burk ($1/V_{\max}^{\text{app}}$) (Figure 3.3) en fonction de la concentration d'inhibiteur.

$$\frac{1}{V_{\max}^{\text{app}}} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) / V_{\max} \quad (1)$$

Pour une inhibition compétitive, le rapport $(K_M/V_{\max})^{\text{app}}$ varie en fonction de la concentration d'inhibiteur I et la constante d'inhibition K_i tel qu'indiqué à l'équation (2).

$$\left(\frac{K_M}{V_{\max}}\right)^{\text{app}} = \frac{K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{V_{\max}} \quad (2)$$

Il suffit donc de rapporter graphiquement la pente de chaque droite de la courbe Lineweaver-Burk $(K_M/V_{\max})^{\text{app}}$ en fonction de la concentration d'inhibiteur. Les données obtenues pour le composé 3.10 sont représentées à la Figure 3.4.

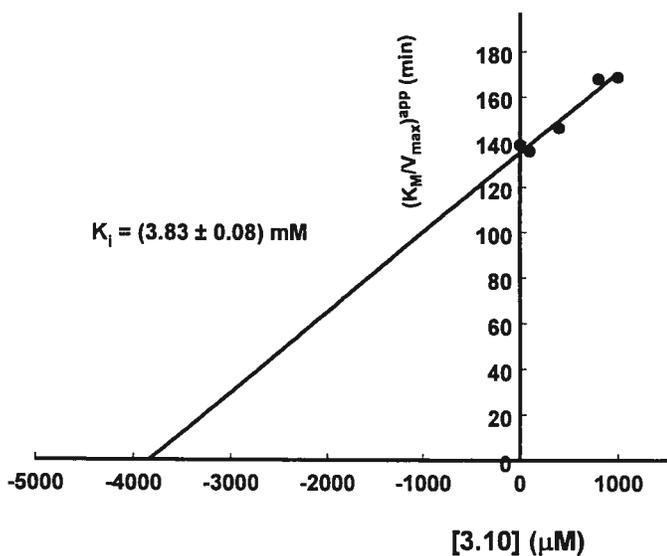


Figure 3.4 : Détermination du K_i du dérivé 3.10 en tant qu'inhibiteur compétitif du L-GPNA de la réaction de transpeptidation pour la GGT.

Les constantes d'inhibition déterminées graphiquement pour le composé **3.10** sont donc $K_{i,comp} = (3.8 \pm 0.1)$ mM et $K_{i',incomp} = (1.7 \pm 0.2)$ mM. Cela indique que le composé **3.10** est lié dans le site du substrat donneur et aussi dans un autre endroit sur l'enzyme, probablement dans le site de liaison du substrat accepteur, ce qui est communément observé pour des enzymes reconnaissant deux substrats avec un mécanisme ping-pong⁷⁷. L'étude d'inhibition avec le composé **3.8** mène aux mêmes conclusions. Aussi, les composés hétéroatomiques possédant un méthyl ester en position α sont liés à l'enzyme mais ne sont pas des substrats donneurs.

Les composés **3.8**, **3.10** et **3.13** ont été étudiés de façon plus détaillée en tant que substrat accepteur. Le site de liaison du substrat accepteur a été proposé comme étant en fait le site de liaison des résidus Cys et Gly du glutathion comme substrat donneur au cours de l'acylation⁶. Le composé Gly-Gly, le meilleur accepteur pour la GGT, a un k_{cat}/K_M de $5.9 \times 10^6 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ²⁸. Comme démontré dans le Tableau 3.1, les composés avec des hétéroatomes sont des accepteurs plus efficaces que les simples acides aminés tels que la L-sérine méthyl ester avec un k_{cat}/K_M de $3.8 \times 10^4 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$, mais moins efficaces que certains dipeptides comme par exemple Gly-Gly²⁸. La sérine méthyl ester qui peut être comparée au dérivé **3.13**, comportant un groupement carbamate, est 100 fois moins efficace en regardant le k_{cat}/K_M . Cette efficacité accrue des composés **3.8**, **3.10** et **3.13** par rapport à la sérine méthyl ester peut être due à la formation de liaisons hydrogène entre le site de liaison du substrat accepteur et le carbonyle de la chaîne latérale et/ou l'hétéroatome en position γ . Il ne faut pas oublier que la partie cystéinyle du glutathion, résidu qui se lie, probablement, dans le site de liaison du substrat accepteur à la même place que les composés testés, peut également avoir ce type d'affinité avec un soufre. D'après le Tableau 3.1, un faible effet de l'électronégativité de l'hétéroatome est observable en fonction de l'efficacité de l'enzyme pour le substrat. Des expériences de modélisation seraient nécessaires pour prouver cette interaction, mais aucune structure cristalline de la GGT n'est disponible à ce jour. Cette efficacité peut être aussi attribuée à la capacité pour ces molécules d'être liées dans une

orientation similaire à un γ -dipeptide comme par exemple la glycylglycine, le meilleur substrat accepteur de la GGT, tel que schématisé au Schéma 3.8 (1^{ère} possibilité).

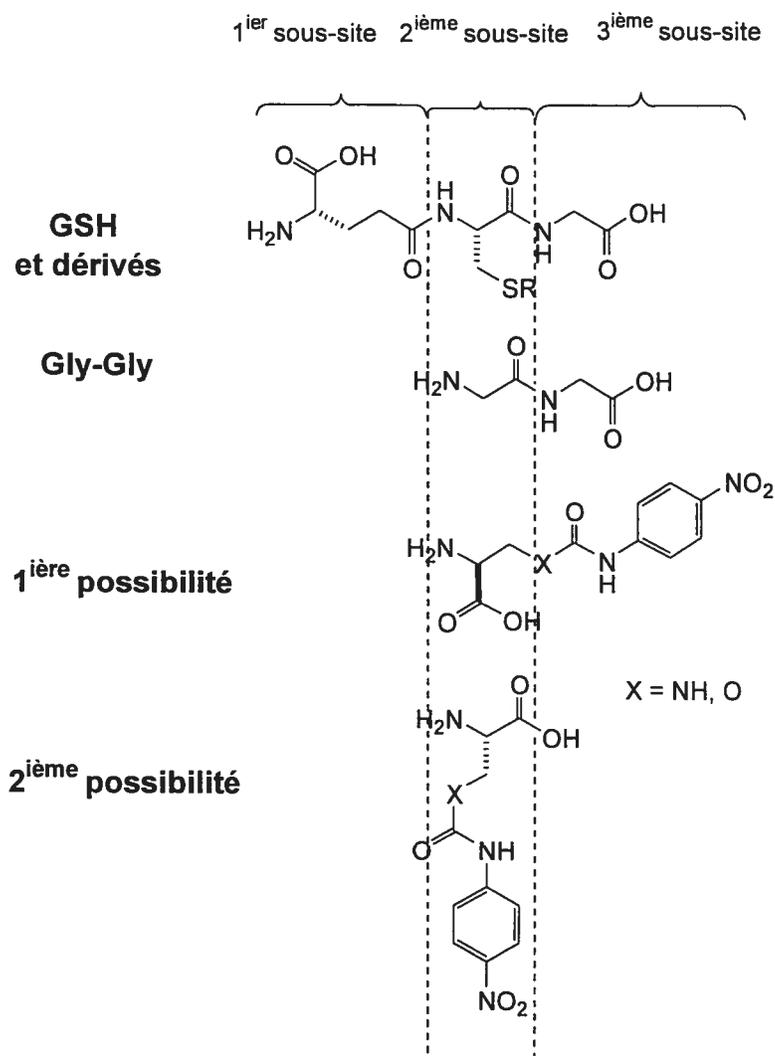


Schéma 3.8 : Explications possibles pour la réactivité des substrats modifiés en tant qu'accepteur. Les trois sous-sites représentent les trois sites d'interactions possibles entre l'enzyme et chacun des acides aminés du GSH⁶.

Une deuxième possibilité existe avec le fait que le substrat naturel de la GGT, le glutathion, soit capable d'accepter sur son soufre différents groupements. En effet, *in vivo*, il est conjugué à des métabolites grâce à l'enzyme glutathion *S*-transférase. Le glutathion conjugué est plus facilement éliminé du corps d'où le rôle que joue la GGT

dans la détoxification cellulaire⁶. Tate et Meister ont comparé la réactivité de différents dérivés du glutathion comportant des groupements fonctionnels sur l'atome de soufre pour la transpeptidation². Ils ont montré, dans un ordre de réactivité croissant : glutathion < *S*-propanone-glutathion (-S-CH₂-C(O)-CH₃) < *S*-acétamidoglutathion < *S*-acétophénone-glutathion, ce dernier ressemblant beaucoup à nos composés testés. Donc, les molécules comportant un hétéroatome en position γ se positionneraient comme montré dans le Schéma 3.8 et cela pourrait expliquer la stabilisation possible par ponts hydrogène comme discuté auparavant.

Il semble aussi que les composés comportant un ester méthylique ont un effet inverse sur l'efficacité de l'accepteur, en comparant les k_{cat}/K_M du L-GPNA et le composé correspondant méthylé 3.4. Une comparaison similaire peut être effectuée entre la L-sérine²⁸ avec un k_{cat}/K_M de $0.138 \times 10^6 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ et son dérivé méthyl ester pour en tirer les mêmes conclusions. La comparaison des dérivés 3.8 et 3.10 est impossible dû à la faible solubilité du composé 3.10 à pH 8.0.

3.4. Conclusion et perspectives

Une nouvelle classe de composés contenant des hétéroatomes à la position γ sur la chaîne latérale d'un squelette glutamyle a été synthétisée. Les dérivés testés dans l'étude présentée ici contiennent un très bon groupe partant pour la GGT, la *p*-nitroaniline, par comparaison aux précédents analogues du glutathion synthétisés comportant des hétéroatomes^{88,89}. Malgré cela, les liaisons CO-NH des dérivés uréthane (X = NH) et carbamate (X = O) sont résistantes, quel que soit le composé, au clivage par la GGT. La diminution trop grande de l'électrophilie du carbonyle du substrat donneur et la pauvre nucléophilie du nucléophile du site actif (possiblement une thréonine) pourraient expliquer le manque de réactivité. Toutefois, les résultats obtenus montrent que le nucléophile de l'enzyme n'est pas très fort et que peu de modifications sont acceptées à ce niveau pour qu'un composé puisse agir comme substrat donneur. De plus, ces composés peuvent agir efficacement comme substrat accepteur. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication¹⁰⁰.

Néanmoins, ces composés pourraient être efficaces avec des enzymes possédant un nucléophile plus fort (protéases à cystéine) comme c'est le cas pour la transglutaminase (TGase) étudiée dans le groupe de recherche. Les deux composés à la Figure 3.5 sont de bons inhibiteurs pour cette enzyme (de l'ordre du micromolaire), comme le démontrent les résultats obtenus par d'autres membres du laboratoire, notamment au niveau de l'acylation rapide et de l'inactivation de l'enzyme⁹⁹. Le *p*-nitrophénolate, un meilleur groupe partant, et la cystéine comme nucléophile de la TGase pourraient expliquer ces différences de résultats comparés aux nôtres.

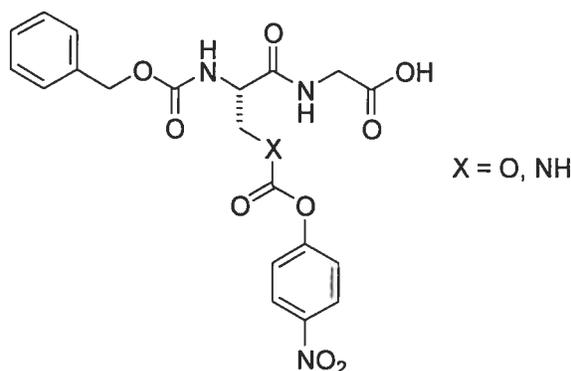


Figure 3.5 : Inhibiteurs de la transglutaminase de foie de cochon d'Inde.

À la suite de ces résultats, une autre classe de composés pourrait être testée avec la GGT. Ce sont des dérivés du L-GPNA γ -difluoré voire mono-fluorés (Figure 3.6). Ainsi, l'électrophilie du carbonyle seraient modifiée mais de manière moins importante qu'avec des hétéroatomes. Cela permettrait l'étude de la nucléophilie de la thréonine de notre enzyme et de constater l'effet du nombre de fluors sur l'électrophilie du carbonyle.

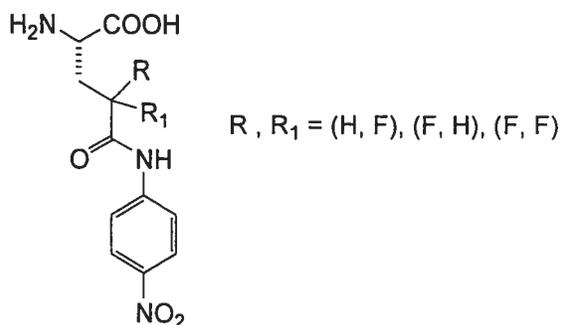


Figure 3.6 : Analogues du L-GPNA γ -monofluorés et difluorés¹⁰¹.

La voie synthétique pour arriver à des analogues de l'acide glutamique γ -difluoré peut s'inspirer des travaux de Coward en partant de pyrrolidinones^{102,103} ou en utilisant l'aldéhyde de Garner par une réaction de Reformatsky¹⁰⁴ comme montré au Schéma 3.9. Les dérivés γ -monofluorés peuvent être synthétisés à partir α -fluoroacrylate d'éthyle et de l'acétamidomalonate d'éthyle^{101,105}, à partir de l'acide pyroglutamique¹⁰⁶ ou de l'hydroxyproline¹⁰⁷.

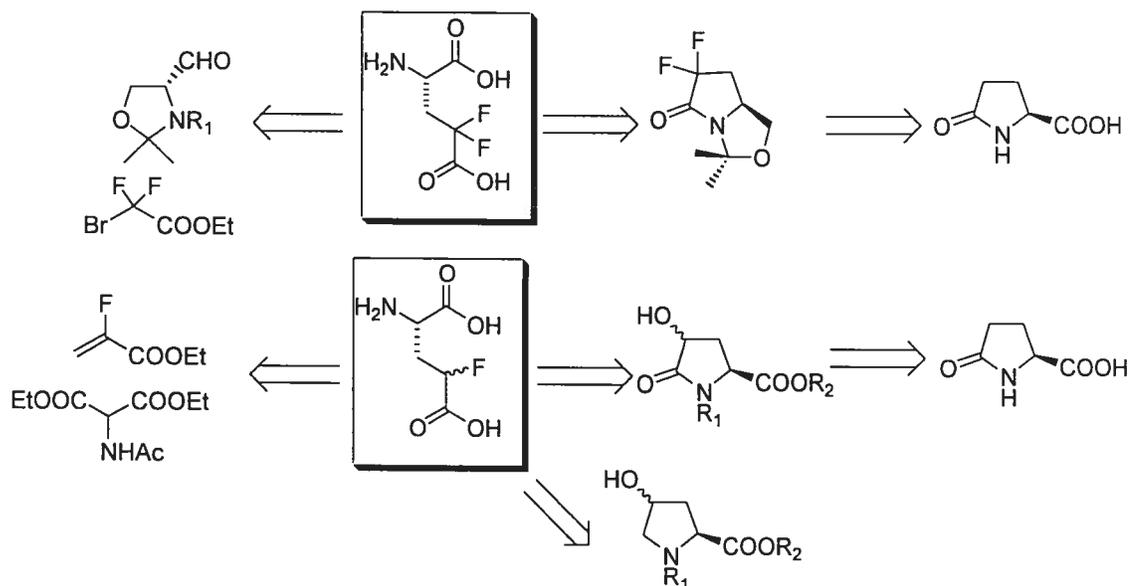


Schéma 3.9 : Rétrosynthèse possible pour la synthèse d'analogues de l'acide glutamique γ -monofluoré ou γ -difluoré¹⁰¹.

Des études préliminaires sur ce type de composé sont en cours dans le laboratoire.

Chapitre 4
Cartographie du site actif de la GGT

4.1. Introduction

Au cours d'études dans le laboratoire pour découvrir le mécanisme de la GGT de rat, notamment au niveau de l'étape de désacylation, la synthèse de molécules fortement activées en position γ avec un *p*-nitrophényl ester a été effectuée (Figure 4.1)⁶⁵.

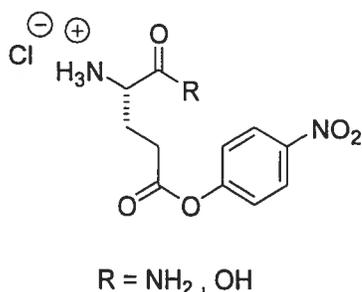


Figure 4.1 : Analogues du L-GPNA avec un *p*-nitrophényl ester.

Ces molécules offraient l'avantage de ressembler au substrat donneur L-GPNA fréquemment utilisé pour les tests d'activité spécifique de la GGT, permettant ainsi une bonne affinité avec l'enzyme. De plus, le lien ester serait clivé facilement par la GGT, donc l'étape d'acylation aurait été rapide et serait suivie par une désacylation plus lente. Cependant, les études cinétiques n'ont rien donné de probant avec ce type de composés. Le lien ester étant très instable, la molécule cyclisait très facilement par l'intermédiaire du groupement ammonium libre pour former l'acide pyroglutamique. Malgré des études à des pH plus acides, les mêmes résultats ont toujours été obtenus.

Afin de synthétiser un bon substrat pour la GGT pouvant être acylé rapidement, il faut connaître la structure minimale nécessaire à une bonne reconnaissance par la GGT. Cependant, peu d'études à ce sujet existent. Des études précédentes ont montré que des molécules comme la L-asparagine¹⁰⁸ ou la L-homoglutamine ne sont pas reconnues¹⁰⁹. Un groupement méthyle à la place d'un hydrogène à la position α est bien accepté par la GGT, mais aucune substitution n'est possible sur la chaîne latérale¹¹⁰. De plus, le lien amide généralement présent dans le L-GPNA ne peut être remplacé par un lien amide

avec un méthyle sur l'azote¹⁰⁸. Le groupement ammonium ne peut pas être également substitué par un groupement méthyle¹¹⁰. Certains points d'ombre restent cependant à élucider sur les substrats donneurs dans le but de synthétiser la molécule la plus simple possible, mais aussi la plus efficace, pouvant agir comme substrat ou inhibiteur de la GGT. Aussi, la synthèse de différents dérivés analogues de la L-glutamine a été effectuée afin de vérifier quelles étaient les fonctionnalités nécessaires pour une bonne affinité. De plus, un peu plus loin dans ce chapitre, la synthèse et les études cinétiques de composés ayant diverses fonctionnalités au niveau du lien amide en position δ seront présentées.

4.2. Cartographie du site de liaison par l'utilisation de composés dérivés de la L-glutamine

4.2.1. Introduction

Afin d'arriver à cartographier le site de liaison du substrat donneur, les composés décrits dans la Figure 4.2 seront synthétisés s'ils ne sont pas commerciaux et seront testés cinétiquement avec la GGT, afin de vérifier quelles sont les modifications à apporter sur un substrat donneur sans trop altérer son affinité dans son site de liaison.

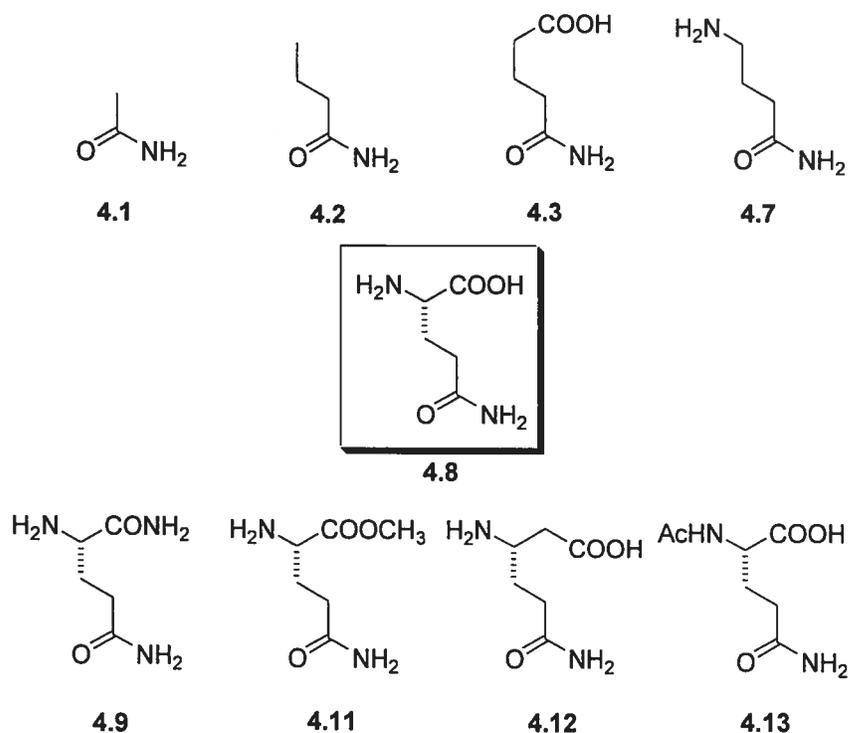


Figure 4.2 : Molécules permettant de connaître la structure minimale d'un substrat donneur pour une bonne reconnaissance par la GGT.

Tous ces composés permettront de connaître l'importance de la chaîne carbonée et la présence des groupements ammonium et carboxylate. Ils pourront être utilisés comme inhibiteurs de la réaction catalysée par la GGT entre son substrat donneur L-GPNA et le substrat accepteur Gly-Gly. L'absence d'un groupement aromatique sur l'amide de la chaîne latérale ne devrait pas interférer dans la liaison, puisque la L-glutamine est un substrat donneur de la GGT² et servira de référence.

4.2.2. Synthèse des dérivés de la L-glutamine

Le 4-carboxybutyramide **4.3** a été synthétisé afin de vérifier si le groupement ammonium en position α était important. Ceci a été fait par ouverture de l'anhydride glutarique par de l'ammoniac avec un rendement modeste de 34%, tel que présenté au

Schéma 4.1. Cette réaction n'a pas été optimisée, le dérivé **4.3** étant obtenu en quantité suffisante pour être testé en présence de GGT.

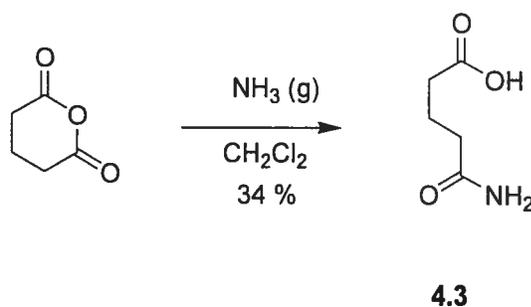


Schéma 4.1 : Synthèse du 4-carboxybutyramide **4.3**.

Le dérivé de la L-glutamine dépourvu du groupement carboxylate en position α , le 4-aminobutyramide **4.7**, a été synthétisé afin de vérifier si celui-ci était important pour une meilleure reconnaissance par la GGT. Le Schéma 4.2 présente la synthèse du dérivé amide **4.7** en 5 étapes. La première consiste en la protection du groupement ammonium par un groupement Boc en présence de triéthylamine dans le méthanol. Ensuite, l'acide libre est activé avec le chloroformate de *p*-nitrophényle (PNCl) en présence de DMAP, selon un protocole déjà établi^{111,112} pour former le dérivé **4.5** (Schéma 4.2). Le groupement *p*-nitrophénolate est déplacé par l'ammoniac gazeux pour obtenir l'amide **4.6**. La dernière étape est la déprotection du dérivé Boc en milieu acide généré sous forme de gaz pour donner le composé désiré **4.7**. Toutes les étapes de cette synthèse ont été effectuées avec de bons rendements.

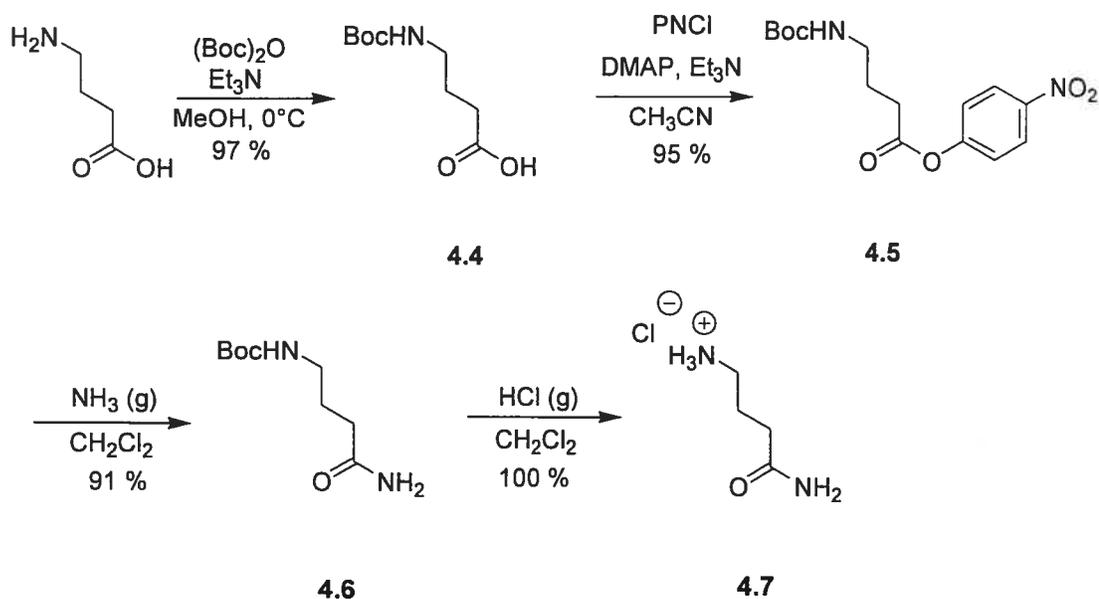


Schéma 4.2 : Synthèse du sel de 4-aminobutyramide **4.7**.

Il est également intéressant de vérifier si l'acide carboxylique de la L-glutamine doit être libre pour une reconnaissance de la GGT. Celui-ci a été protégé par un méthyle ester dans le dérivé **4.11** comme décrit au Schéma 4.3. La première étape consiste à synthétiser le méthyle ester de la Boc-L-glutamine à partir du diazométhane en solution étherée à 0°C pour donner le dérivé **4.10**. Ensuite, le groupement α -aminé est déprotégé en milieu acide pour obtenir le composé désiré **4.11**, comme cela a été vu pour le dérivé **4.7**. Encore une fois, cette synthèse a été effectuée avec d'excellents rendements.

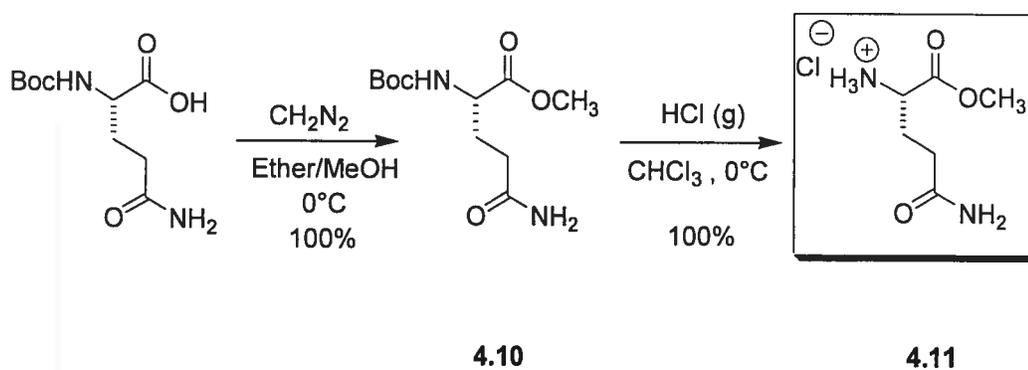


Schéma 4.3 : Synthèse de la L-glutamine méthyle ester **4.11**.

L'acétamide **4.1**, le butyramide **4.2**, la L-glutamine amide **4.9**, la L- β -homoglutamine **4.12** et la *N*-acétyl-L-glutamine **4.13** sont commercialement disponibles. Les études cinétiques de ces composés et de ceux synthétisés préalablement sont présentées ci-dessous.

4.2.3. Études cinétiques effectuées

Une série de molécules comportant des modifications structurales a donc été testée pour permettre une cartographie du site de liaison du substrat donneur. Des études de compétition avec le L-GPNA ont été menées en présence de concentrations saturantes de Gly-Gly, le meilleur substrat accepteur, à pH 7.0 et 37°C. Le L-GPNA a été utilisé afin de pouvoir suivre la catalyse effectuée par la GGT grâce à la libération de la *p*-nitroaniline. De plus, les expériences ont été effectuées à pH 7.0 afin de mieux comparer avec les valeurs obtenues précédemment avec les esters de *p*-nitrophényle décrits dans l'introduction de ce chapitre⁶⁵. Des courbes de type Michaelis-Menten sont obtenues pour diverses concentrations fixes de molécules supposées inhibitrices, permettant de déterminer les constantes cinétiques K_M et V_{max} . Si ces dérivés testés sont en compétition avec le L-GPNA, une inhibition est visible. Le K_i est alors calculé selon une courbe de Dixon qui représente l'inverse de la vitesse de catalyse du L-GPNA en fonction de la concentration en inhibiteur pour chacune des concentrations de L-GPNA testées. Les résultats sont inscrits dans le Tableau 4.1 ci-contre. Une grande compétition entre le L-GPNA et une molécule testée sera représentée par une faible valeur de K_i permettant de déterminer les fonctions structurales les plus importantes en comparant chacun des composés.

Tableau 4.1 : Résultats cinétiques obtenus à partir de différents composés de type amide en compétition avec le L-GPNA dans la réaction de transpeptidation de la GGT à pH 7.0 et 37°C en présence de 20 mM de Gly-Gly.

Composés testés	Valeur de K_i (mM)	Type d'inhibition
Acétamide (4.1)	N/O ^a	---
Butyramide (4.2)	N/O ^a	---
4-Carboxybutyramide (4.3)	9.3 ± 2.6 (incomp.) 55.2 ± 1.1 (comp.)	Non-compétitive mixte
4-Aminobutyramide (4.7)	23.2 ± 2.3	Incompétitive
L-Glutamine (4.8)	3.4 ± 0.3	Compétitive
L-Glutamine amide (4.9)	14.6 ± 1.5	Compétitive
L-Glutamine méthyl ester (4.11)	5.0 ± 0.5	Compétitive
L-β-homoglutamine ^b (4.12)	N/O	---
N-Acétyl-L-glutamine (4.13)	183 ^c	Compétitive

^a. Pas d'inhibition observée avec des concentrations de 100 mM.

^b. Composé testé à pH 8.0 dans un tampon 0.1 M Tris·HCl.

^c. Valeur extrapolée.

Le dérivé acétamide 4.1 a été, dans un premier temps, testé sans succès puisqu'aucune inhibition n'a été observée. Le butyramide 4.2, ayant une chaîne alkyle plus longue correspondant à la chaîne carbonée de la L-glutamine, n'est pas reconnu. Il semblerait donc que les groupements ammonium et/ou carboxylate soient importants pour une bonne reconnaissance de l'enzyme pour ces molécules. Ceci démontre une certaine spécificité de la GGT. Aussi, pour augmenter l'affinité de ces dérivés amide pour l'enzyme, le 4-carboxybutyramide 4.3 a été testé et a montré une inhibition non-compétitive mixte. Celle-ci peut être décomposée en ses deux composantes compétitive et incompétitive, tel que discuté au chapitre 3. Un K_i de 9.3 mM pour l'inhibition incompétitive et un K_i de 55.2 mM pour l'inhibition compétitive ont été calculés. Donc, la fonctionnalité carboxylate augmente beaucoup l'affinité de ces composés pour

l'enzyme. Le type d'inhibition (non compétitive) montre que cette molécule est liée dans le site de liaison du substrat donneur, mais aussi dans un autre site sur l'enzyme, possiblement celui du substrat accepteur, dû à une vague ressemblance avec le substrat accepteur glycyglycine. Le composé 4.7 possédant seulement le groupement ammonium montre une inhibition incompétitive avec un K_i de 23.2 mM. Il semblerait donc que cette molécule soit un compétiteur possible du site de liaison du substrat accepteur et non du site de liaison du substrat donneur. Ceci peut être attribué à une plus grande ressemblance avec le substrat accepteur glycyglycine comparativement au composé 4.3.

La L-glutamine 4.8, connue pour être un substrat² de la GGT, illustre bien la nécessité des deux groupements fonctionnels α -ammonium et α -carboxylate pour une meilleure affinité avec la GGT, puisqu'elle possède le K_i le plus faible du Tableau 4.1. Un K_i de 3.4 mM a été observé (Tableau 4.1). Aussi, nous avons utilisé des dérivés (4.9 et 4.11) avec la fonctionnalité carboxylate modifiée afin de vérifier l'importance de celle-ci dans la reconnaissance. Pour cela, nous avons essayé la L-glutamine amide 4.9 et avons déterminé un K_i de 14.6 mM. Donc, le remplacement d'un carboxylate par un amide primaire affecte par un facteur de 4 environ l'affinité de cette molécule pour l'enzyme. Ceci peut être dû à une perte des interactions électrostatiques avec un acide aminé de l'enzyme servant à stabiliser la charge négative. Des études de mutagenèse dirigée ont proposé qu'une arginine stabilise le carboxylate du substrat donneur dans nos conditions de pH³⁷. Pour appuyer cette hypothèse, la L-glutamine méthyl ester 4.11 a été testée et montre un K_i de 5.0 mM, ce qui est relativement proche de la L-glutamine. Ceci appuie le fait que ces interactions électrostatiques normalement entre le substrat donneur et l'enzyme peuvent être importantes, mais pas essentielles. Il semblerait aussi que l'encombrement stérique ne joue pas de rôle important pour ce type de composés dans l'affinité avec l'enzyme. Les analogues du L-GPNA comportant des hétéroatomes en position γ sur la chaîne latérale (chapitre 3) n'agissent pas comme substrat donneur mais peuvent se lier dans le bon site. Le méthyl ester du L-GPNA est reconnu comme substrat donneur mais dix fois moins efficacement que le L-GPNA lui-même. Ceci peut

ouvrir la porte à une gamme d'inhibiteurs ou substrats plus accessibles d'un point de vue synthétique mais avec une affinité moins importante pour la GGT.

L'analogue de la L-glutamine avec un groupe méthylène de plus en position α , la L- β -homoglutamine **4.12**, a été testé et n'est pas reconnu par l'enzyme. Il est donc nécessaire que le groupement carbonyle soit en position α , sinon le produit n'est pas reconnu.

La *N*-acétyl-L-glutamine **4.13** a été testée pour montrer l'importance d'avoir un groupement ammonium non protégé. Les résultats cinétiques montrent qu'elle agit comme un pauvre inhibiteur de la GGT avec un K_i de 183 mM. Ce résultat peut être dû à l'encombrement stérique créé par le groupement acétyle et la perte de la charge positive. La *N*-méthyl-L-glutamine avec une charge positive et moins d'encombrement stérique a été testée comme substrat donneur, mais n'a pas été reconnue¹¹⁰. Ceci confirme la nécessité d'avoir un groupe ammonium. Des interactions électrostatiques semblent être également impliquées et confirmées par mutagénèse dirigée démontrant la présence d'un résidu aspartate stabilisant la molécule⁷⁶.

4.2.4. Conclusion

Nous avons vérifié, par compétition de la réaction de transpeptidation entre le L-GPNA et des molécules simples, que la GGT est très spécifique au squelette carboné de la L-glutamine ou l'acide L-glutamique. Peu de modifications peuvent être effectuées pour obtenir une meilleure reconnaissance. La structure minimale est représentée à la Figure 4.3.

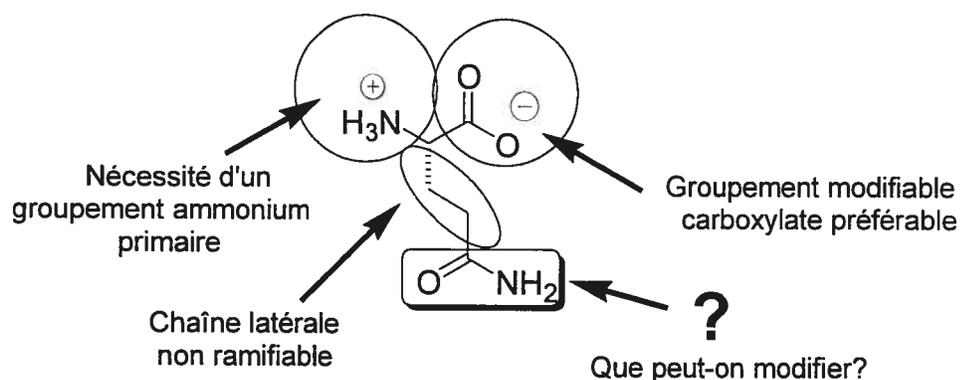


Figure 4.3 : Structure minimale pour les substrats de type L-glutamine reconnus dans le site de liaison du substrat donneur.

Les groupements α -ammonium et α -carboxylate d'un substrat ou inhibiteur de la GGT ne doivent pas être protégés ni substitués pour une bonne reconnaissance de la GGT, malgré quelques possibilités au niveau du carboxylate. De plus, la chaîne latérale ne doit pas être ramifiée ou modifiée avec un groupement méthylène de plus ou de moins. Cependant, nous ne savons rien des fonctionnalités pouvant être acceptées en position γ . Aussi, nous avons cherché à modifier cette position.

4.3. Étude de composés analogues à la L-glutamine modifiés en position γ

4.3.1 Introduction

La stratégie adoptée lors de la synthèse d'inhibiteurs réversibles consiste à substituer la liaison amide hydrolysable par un groupement susceptible de se lier dans le site actif de l'enzyme de manière à générer un adduit stable qui ressemblerait à l'intermédiaire tétraédrique de la protéolyse. Selon Pauling, une molécule stable qui mimerait la structure du substrat dans son état de transition aurait une bien meilleure affinité pour l'enzyme que le substrat lui-même dans son état fondamental^{113,114}.

La liaison peptidique est rigide, polaire et possède une structure planaire. La Figure 4.4 représente un échantillon des fonctionnalités qui peuvent mimer un lien peptidique. Un bon mime doit occuper le même espace (isostère) et doit respecter les interactions électrostatiques, liaisons hydrogène ou autres avec l'environnement de la protéine pour être de bons inhibiteurs¹¹⁵. Une fonctionnalité amide peut être remplacée par un thioamide ou un ester et remplir très facilement les exigences notées plus tôt. Celle-ci peut être inversée pour donner un rétro-amide donnant l'avantage d'éviter le clivage de la liaison peptidique par des protéases. Les composés phosphorés ou bien soufrés sont aussi couramment utilisés comme inhibiteurs réversibles ou irréversibles puisqu'ils peuvent ressembler, électroniquement et géométriquement, à l'état de transition tétraédrique lors de l'hydrolyse de la fonction amide. Toutes ces fonctionnalités analogues sont répertoriées et discutées de façon détaillée dans la littérature¹¹⁵.

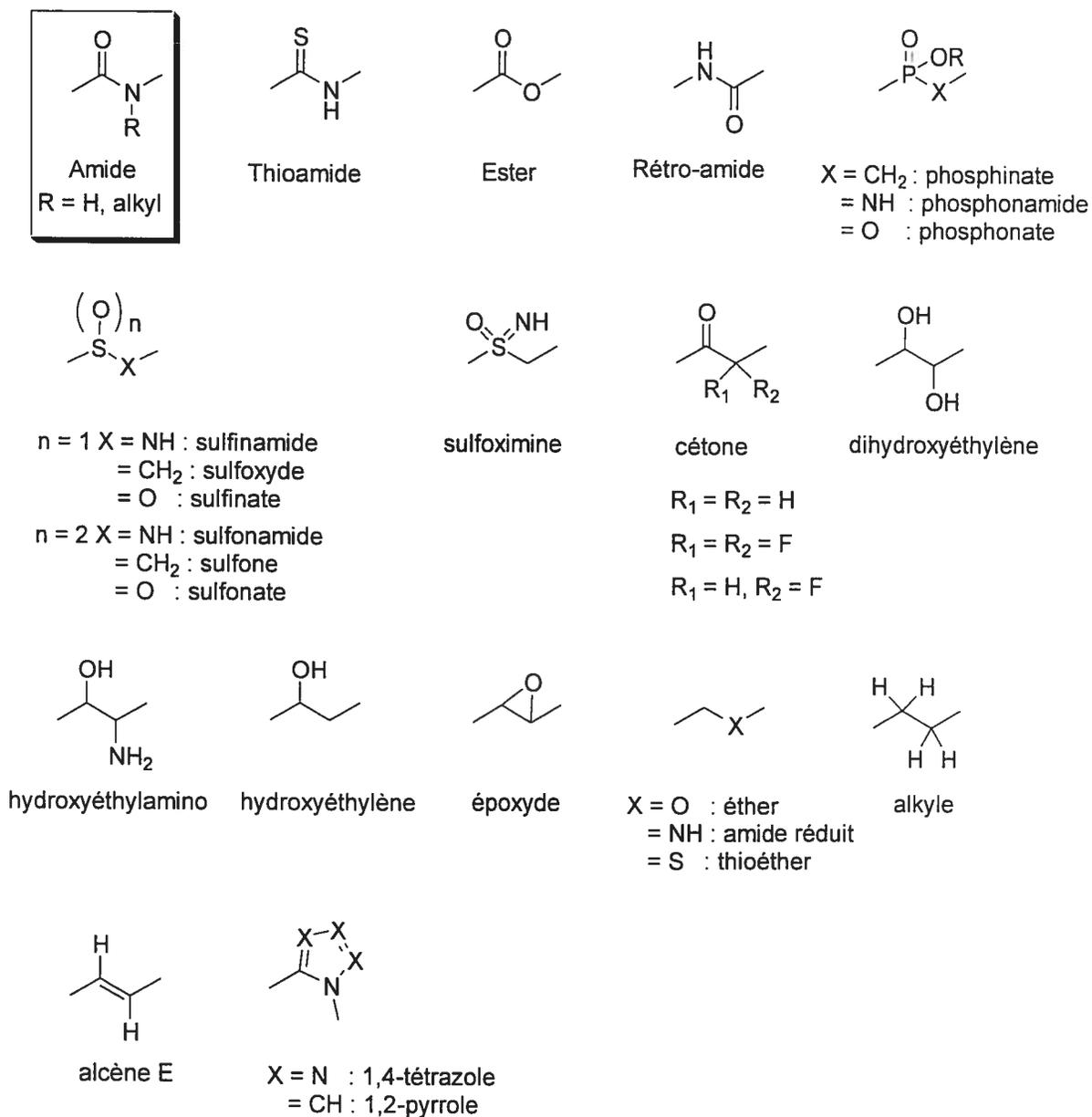


Figure 4.4 : Groupements analogues de liens peptidiques¹¹⁵.

Nous ne connaissons ni les contraintes stériques, ni les interactions électrostatiques en position γ entre le squelette glutamyle des divers dérivés du substrat donneur et son site de liaison dans la GGT. Aussi, nous avons voulu tester différentes molécules possédant des fonctionnalités analogues au carboxylate ou à l'amide en position γ sur un squelette de la L-glutamine. Cette étude a été effectuée afin de mieux connaître

l'enzyme au niveau des acides aminés (dont le nucléophile) impliqués dans la reconnaissance et la catalyse près de cette position. Ces informations permettront de concevoir de futurs inhibiteurs de la GGT.

4.3.2. Analogues de l'acide glutamique

Comme il a été montré dans la section 4.2 de ce chapitre, les groupements ammonium et carboxylate sont nécessaires à la position α pour une bonne affinité du substrat pour le site de liaison du substrat donneur de l'enzyme. La présence de substituants sur la chaîne latérale affecte la reconnaissance, excepté en position α^{110} . Cependant, la stéréochimie de l'acide aminé n'est pas aussi importante puisque que les configurations (L) ou (D) sont reconnues avec une préférence pour la configuration (L)². Nous avons vu dans le chapitre 3 que la substitution d'un groupement méthylène en position γ par un hétéroatome (oxygène ou azote) n'empêche pas la liaison de ce composé dans le site de liaison du substrat donneur. Des dérivés comportant diverses fonctionnalités en position γ sont présentés à la Figure 4.5 et seront étudiés en présence de GGT.

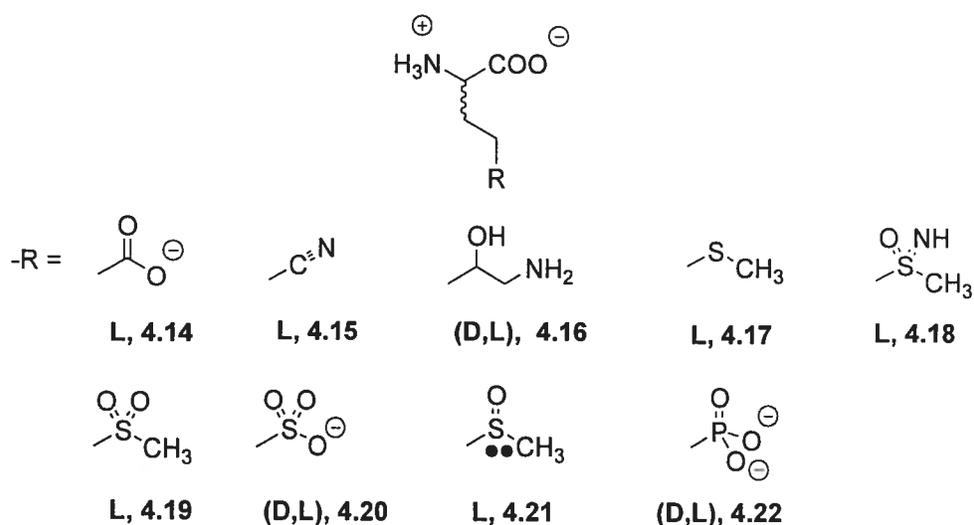
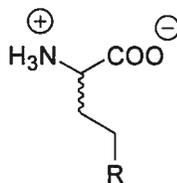


Figure 4.5 : Composés analogues de la glutamine testés avec la GGT. La configuration du carbone α du composé testé est indiquée.

Comme présenté dans la Figure 4.5, le groupe carbonyle en position γ a été remplacé par des groupements fonctionnels pouvant altérer la géométrie et les interactions électroniques et stériques autour du nucléophile. De plus, le composé **4.21** peut permettre une étude de la stéréospécificité grâce au centre chiral formé par le soufre.

Les composés **4.14** à **4.22**, comme présentés dans la Figure 4.5, ont été testés pour leur habileté à réagir comme inhibiteurs de la réaction de transpeptidation de la GGT entre le L-GPNA comme substrat donneur et glycyglycine comme substrat accepteur. La glycyglycine a été choisie comme substrat accepteur pour son efficacité comme accepteur²⁶ et pour son incapacité à réagir comme inhibiteur en se liant dans le site de liaison du substrat donneur. Ainsi, nos résultats d'inhibition seront dus aux composés testés et non à l'inhibition inhérente par Gly-Gly. Pour chaque composé testé, une valeur de K_i (ou un IC_{50}) a été déterminée (Tableau 4.2). Comme expliqué à la section 4.2 de ce chapitre, une bonne affinité du composé testé signifie que tous les éléments nécessaires à une bonne reconnaissance sont présents.

Tableau 4.2 : Constantes d'inhibition (K_i) et valeurs d' IC_{50} pour les composés 4.14-4.22 comme inhibiteurs de la réaction de transpeptidation en présence du L-GPNA et Gly-Gly catalysée par la GGT de reins de rat à pH 8.0 et 37 °C.



Configuration en α , groupe R (Composé #)	K_i (mM)	Type d'inhibition
L, CO ₂ ⁻ (4.14)	14.1 ^a	Compétitive
L, CN (4.15)	20.6 ^b	---
5-hydroxy-DL-lysine (4.16)	N/I ^c	---
L, SCH ₃ (4.17)	26.9 ^a	compétitive
L, SO(NH)CH ₃ (4.18)	N/I ^c	---
L, SO ₂ CH ₃ (4.19)	N/I ^c	---
DL, SO ₃ ⁻ (4.20)	11.1	incompétitive
L, SOCH ₃ ^d (4.21)	5.9	compétitive
DL, PO ₃ ²⁻ (4.22)	35.8	compétitive

^a Référence 26.

^b IC_{50} déterminé en présence de 400 μ M de L-GPNA et 20 mM de Gly-Gly.

^c N/I : Inhibition négligeable à des concentrations de 20 mM ou plus.

^d Mélange 50/50 de diastéréoisomères sur l'atome de soufre.

La plupart des composés agissent comme inhibiteurs compétitifs, tel que démontré par les courbes Lineweaver-Burk obtenues, ou ne sont pas reconnus. Le composé **4.14**, l'acide L-glutamique, est un bon analogue de la L-glutamine, qui elle-même sert comme substrat donneur pour la GGT, mais il agit comme un faible inhibiteur compétitif (Tableau 4.2). Le composé **4.15**, le dérivé nitrile de la L-glutamine, est un faible inhibiteur de la GGT, peut-être dû à sa géométrie linéaire à la position δ , bien que des inhibiteurs réversibles de ce type se soient montrés efficaces pour d'autres enzymes comme la chymotrypsine¹¹⁶.

Les autres composés dans le Tableau 4.2 contiennent des fonctionnalités ressemblant d'un point de vue électrostatique et/ou géométrique à l'état de transition de l'étape d'acylation du cycle catalytique de la GGT. En effet, dans la littérature, certains composés se sont révélés d'excellents inhibiteurs de la GGT, dû à leur similarité avec cet état de transition¹¹⁷. Par exemple, un complexe de L-sérine et borate formé *in situ* a été utilisé pour inhiber la GGT avec un K_i de 20 μM ¹¹⁸. L'analogue boronique de l'acide glutamique montre *in vitro* un K_i de 17 nM et c'est un des meilleurs inhibiteurs compétitifs de la GGT, bien qu'il inhibe d'autres enzymes reconnaissant le squelette glutamate, comme par exemple la glutamate pyruvique transaminase¹¹⁷. Son efficacité pour inhiber la croissance des cellules a été démontrée, bien qu'*in vivo* des concentrations de 1 mM soient requises¹¹⁷.

La 5-hydroxy-DL-lysine **4.16** a déjà été testée avec des enzymes comme la glutamine synthétase avec un certain succès, dû à sa ressemblance avec la glutamine¹¹⁹. Cependant, quand nous avons testé ce composé avec la GGT, aucune inhibition n'a été observée. Ceci serait peut-être dû à l'hybridation du carbone en position δ et/ou à l'absence de charge pour ressembler à l'état de transition. La L-méthionine **4.17**, un thioéther, a été démontrée comme agissant en tant qu'inhibiteur du site de liaison du substrat donneur et a montré un K_i relativement faible de 26.9 mM²⁶. L'absence d'une double liaison oxygène-soufre, par comparaison avec la double liaison oxygène-carbone du lien amide normalement présent, pourrait expliquer ce manque de reconnaissance de l'enzyme. Afin de tester la nécessité de l'oxygène, nous avons testé la L-méthionine sulfoximine **4.18**, connue pour être un bon inhibiteur des enzymes reconnaissant l'entité γ -glutamyle comme la glutamine synthétase¹²⁰. Ce dérivé n'est pas reconnu par la GGT

et la présence de la fonctionnalité imine pourrait en être responsable. C'est pourquoi la sulfone **4.19** a été testée. Ce composé s'est montré incapable d'inhiber l'enzyme même s'il est considéré comme un analogue de l'acide glutamique et un inhibiteur des enzymes telles la glutamate synthase¹²¹ et la glutamine synthétase¹²⁰. Afin de connaître l'effet du groupement méthyle sur la chaîne latérale après le soufre dans les composés **4.17** à **4.19**, l'acide DL-homocystéique **4.20** a été testé. Pour celui-ci, une faible inhibition incompétitive a été obtenue avec un K_i de 11.1 mM. Donc, la substitution d'un groupement méthyle par un oxygène inhibe l'enzyme contrairement aux autres composés précédemment testés mais n'augmente pas l'affinité de ce composé dans le site de liaison du substrat donneur d'après le type d'inhibition obtenu. Il serait davantage reconnu dans un deuxième site de la GGT. Des études de compétition entre ce composé et la glycyglycine n'ont pas montré une affinité évidente du dérivé **4.20** dans le site de liaison du substrat accepteur.

En résumant les premiers résultats obtenus avec les composés **4.17-4.20**, il apparaît clairement que la présence de deux doubles liaisons soufre-hétéroatome à la position γ affecte l'affinité de ces composés dans le site de liaison du substrat donneur. Le simple dérivé thioéther **4.17** est le meilleur inhibiteur pour ce site avec un K_i de 26.9 mM. Aussi, le composé L-méthionine sulfoxyde **4.21**, intermédiaire entre les dérivés **4.17** et **4.19** par rapport à l'encombrement stérique dû au nombre de doubles liaisons, a été testé et montre une inhibition compétitive par rapport au L-GPNA pour le site de liaison du substrat donneur dans la réaction de transpeptidation. Sa valeur de K_i (5.9 mM) représente une affinité deux fois plus grande que celle trouvée pour le composé **4.14**, l'acide L-glutamique. La fonctionnalité sulfoxyde avec ses propriétés électrostatiques a été largement utilisée comme inhibiteur analogue de l'acide L-glutamique avec différentes enzymes^{122,123}. Le groupe sulfoxyde peut être représenté par un atome de soufre ayant une double liaison avec un oxygène ou avec une charge positive partielle sur le soufre et une charge négative partielle sur l'oxygène¹²⁴. Dans tous les cas, l'atome de soufre à la position δ du composé **4.21** est un stéréocentre de géométrie tétraédrique déformée, la quatrième branche du tétraèdre étant un doublet d'électrons libres.

L'affinité démontrée par le dérivé sulfoxyde suggère que la distribution de charges dans ce groupement fonctionnel peut être importante pour des interactions favorables avec le site de liaison du substrat donneur. Des composés contenant un phosphore ont été largement utilisés comme analogues de l'état de transition pour des réactions enzymatiques⁸⁰. Par exemple, avec la GGT, un dérivé de l'acide L-glutamique de type acide fluorophosphonique a été utilisé comme inhibiteur irréversible pour identifier le nucléophile de la GGT de bactérie⁴³. Quand nous avons testé l'acide DL-2-amino-4-phosphonobutyrique **4.22**, commercialement disponible, une valeur de K_i assez élevée de 35.8 mM a été trouvée à pH 8.0. Cette faible affinité pourrait s'expliquer par les deux charges négatives, présentes à ce pH, du phosphonate sur la chaîne latérale. De plus, celles-ci sont délocalisées et pas aussi centrées sur un atome comme c'est le cas dans la fonctionnalité sulfoxyde, faisant ressembler plus cette dernière à un dérivé de l'état de transition.

Pour la détermination de la valeur de K_i rapportée dans le Tableau 4.2, un mélange commercial de diastéréoisomères de **4.21** a été utilisé. La GGT pourrait montrer une plus grande affinité pour un seul des deux diastéréoisomères de **4.21**. En effet, la stéréosélectivité de dérivés sulfoxydes chiraux a déjà été observée pour l'inhibition de peptidyltransférases par l'antibiotique sparsomycine¹²⁵. Cela pourrait donc fournir des informations intéressantes quant à la stéréosélectivité autour du nucléophile de la GGT.

4.3.3. Étude de la stéréochimie du site actif de la GGT

4.3.3.1. Synthèse et séparation des deux diastéréoisomères de la L-méthionine sulfoxyde

Afin d'étudier la stéréochimie du site actif de la GGT, il est nécessaire de séparer les deux diastéréoisomères du dérivé **4.24** (Schéma 4.4). Ainsi en comparant l'inhibition effectuée par chacun, une cartographie plus détaillée du site actif sera possible. Cependant, il est très difficile par des méthodes simples de séparer les deux diastéréoisomères du mélange commercial. Donc, les deux diastéréoisomères ont été

synthétisés et séparés selon une procédure déjà établie, mais avec quelques modifications^{126,127}.

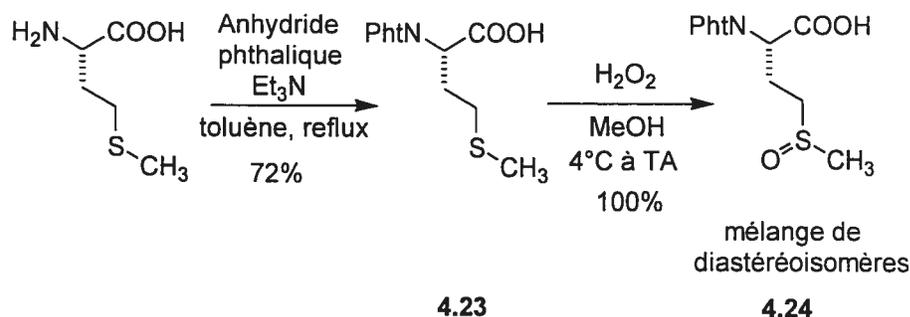


Schéma 4.4 : Synthèse du composé phthalylé **4.24**.

Nous avons obtenu le composé **4.24** en deux étapes à partir de la L-méthionine (Schéma 4.4). La première étape consiste en la protection du groupement amine libre par un groupement phthalyle avec un bon rendement. Ensuite, la L-méthionine est oxydée en sulfoxyde par le peroxyde d'hydrogène dans le méthanol pour donner le composé **4.24**. Si le mélange réactionnel est laissé à 4°C, l'oxydation est minime, donc la température est ramenée à celle de la pièce. Une autre solution serait d'utiliser des biocatalyseurs comme *Beauveria bassiana* ou *Beauveria caledonica* qui assurent des excès diastéréoisomériques supérieurs à 60% dans le cas d'une protection phthalyle pour cette dernière étape¹²⁶.

Une fois oxydé, le mélange 50/50 de diastéréoisomères obtenu est séparé en utilisant une technique de recristallisation dans le méthanol décrite dans la littérature¹²⁷ pour finalement obtenir le produit enrichi **4.24a** avec un excès diastéréoisomérique (e.d.) de 95% déterminé par RMN ¹³C (Schéma 4.5). Une différence appréciable des déplacements chimiques des carbones adjacents au soufre (exemple : $\delta(\text{CH}_3, \text{S}_\text{C}\text{S}_\text{S}) = 38.3$ ppm, $\delta(\text{CH}_3, \text{S}_\text{C}\text{R}_\text{S}) = 38.0$ ppm) permet ce calcul. Le filtrat est purifié par chromatographie par gravitation et un excès diastéréoisomérique (e.d.) de 50% pour l'autre diastéréoisomère **4.24b** est obtenu. Cependant, dans la littérature, des e.d. de 95% ont été obtenus après chromatographie. Les réactions de déprotection se font en présence d'hydrazine dans de l'éthanol 95% suivies d'une précipitation à l'acétone pour

donner le composé pur **4.21a** (>95%) et un mélange 76%/24% de **4.21b**/**4.21a**. La structure des composés **4.21a** et **4.21b** a été déterminée avec certitude dans la littérature¹²⁸. Le pouvoir rotatoire de la molécule **4.21a** synthétisée est comparable à ceux de la littérature, nous assurant ainsi de la bonne stéréochimie obtenue¹²⁷.

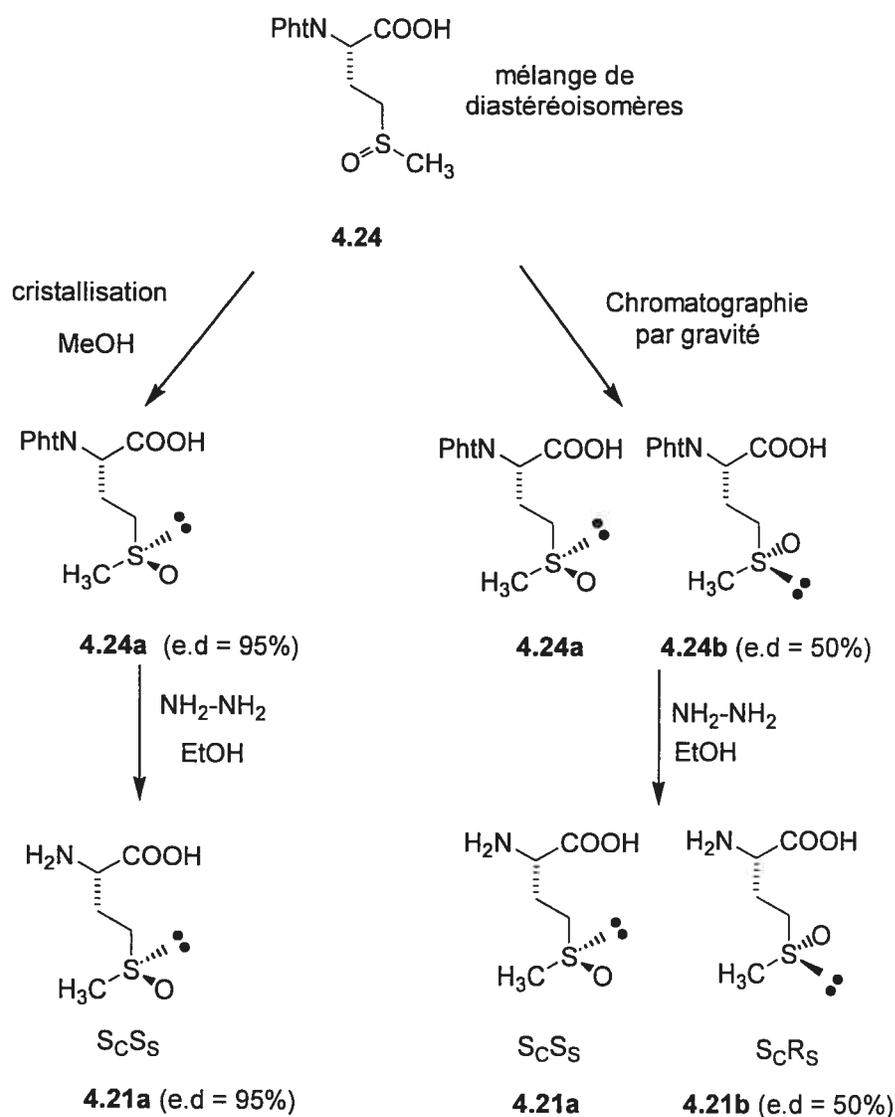


Schéma 4.5 : Séparation des deux diastéréoisomères **4.21a** et **4.21b** de la L-méthionine sulfoxyde¹²⁷.

Le composé **4.21a** et le mélange (76/24 : **4.21b/4.21a**, R_S/S_S) seront testés en présence de la GGT en compétition dans la réaction de transpeptidation. Seulement, le dérivé S_CR_S n'a pas été obtenu avec une pureté suffisamment élevée pour déterminer sa constante d'inhibition (K_i) avec précision. Aussi une méthode indirecte a été conçue pour déterminer son K_i.

4.3.3.2. Analyse cinétique d'un mélange de deux diastéréoisomères

Il n'existe pas dans la littérature de moyen cinétique simple pour trouver le K_i de chaque diastéréoisomère dans un mélange en compétition pour le même site de liaison. Dans notre cas, un diastéréoisomère, cristallisable, a été obtenu avec une pureté satisfaisante, l'autre non. Alors, nous avons élaboré une méthode indirecte à partir des équations couramment utilisées en enzymologie.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

$$K_M^{\text{app}} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (2)$$

L'équation (1) représente la formule d'une courbe de Lineweaver-Burk pour une réaction simple catalysée par une enzyme en présence d'un inhibiteur de type compétitif : v représente la vitesse de réaction, K_M la constante de Michaelis pour le substrat donneur, $[S]$ la concentration de substrat donneur, V_{\max} la vitesse maximale de la réaction enzymatique, $[I]$ la concentration de l'inhibiteur compétitif et K_i la constante d'inhibition⁶¹.

La constante apparente de Michaelis K_M^{app} est la constante de Michaelis observée en présence d'un inhibiteur et diffère de la vraie valeur de K_M normalement obtenue en son absence. Elle varie selon la concentration d'inhibiteur et la constante d'inhibition telle que présentée dans l'équation (2).

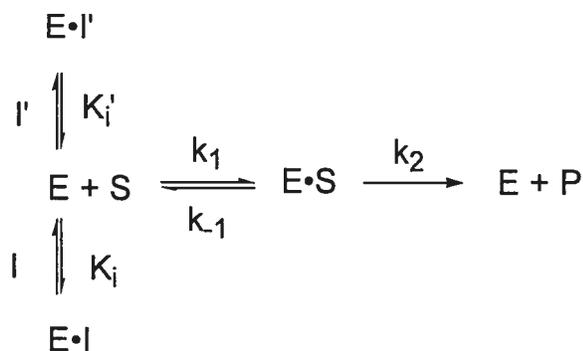


Schéma 4.6 : Inhibition de type compétitif par un mélange de deux inhibiteurs distincts (I et I'). k_1 , k_{-1} et k_2 représentent des constantes de vitesse.

Quand un second inhibiteur compétitif est ajouté au schéma d'inhibition (Schéma 4.6), l'équation de Lineweaver-Burk est modifiée par l'ajout d'un second terme comme montré dans l'équation (3), après application de l'hypothèse de l'approximation de l'état stationnaire ($k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[E \cdot S]$) et l'équation ($[E]_0 = [E] + [E \cdot S] + [E \cdot I] + [E \cdot I']$)

et en considérant les définitions suivantes $K_i = \frac{[E][I]}{[E \cdot I]}$ et $K_i' = \frac{[E][I']}{[E \cdot I']}$:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[I']}{K_i'} \right)}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (3)$$

Ceci est possible seulement si les deux inhibiteurs se ressemblent beaucoup et font de la compétition efficacement pour le même site de liaison sur l'enzyme libre. Dans l'équation (3), K_i et K_i' représentent les constantes d'inhibition pour les inhibiteurs I (composé 4.21a ($S_C S_S$)) dans ce cas) et I' (composé 4.21b ($S_C R_S$)) dans l'autre cas), respectivement. Avec ce modèle, nous pouvons transformer l'équation (2) en équation (4).

$$K_M^{\text{app}} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[I']}{K_i'} \right) \quad (4)$$

De l'équation (4), il est à noter que l'effet combiné des deux inhibiteurs compétitifs pour augmenter le K_M^{app} peut être généralement défini comme une fonction de la concentration totale d'inhibiteurs $[I]_{tot}$ selon :

$$\frac{[I]_{tot}}{K_i^{app}} = \left(\frac{[I]}{K_i} + \frac{[I']}{K_i'} \right) \quad (5)$$

où K_i^{app} est la constante d'inhibition apparente. La fraction de la concentration totale d'inhibiteurs correspondant au diastéréoisomère **4.21a**, f , peut être écrit comme :

$$f = \frac{[I]}{[I] + [I']} \quad (6)$$

L'équation (6) peut être utilisée pour réécrire l'équation (5) en isolant la variable $[I]$ pour donner l'équation linéaire suivante (7) :

$$\frac{1}{K_i^{app}} = f \cdot \left(\frac{1}{K_i} - \frac{1}{K_i'} \right) + \frac{1}{K_i'} \quad (7)$$

De cette équation, la courbe représentant l'inverse de la constante apparente d'inhibition compétitive (observée) $\left(\frac{1}{K_i^{app}} \right)$ en fonction de la fraction f de **4.21a** dans

le mélange d'inhibiteurs diastéréoisomériques donnera une pente $\left(\frac{1}{K_i} - \frac{1}{K_i'} \right)$ et

l'ordonnée à l'origine $\frac{1}{K_i'}$, ce qui permettra de déterminer les constantes d'inhibition

des deux diastéréoisomères sans nécessiter une grande pureté pour chacun des diastéréoisomères isolés. Il suffit de connaître la fraction de chacun des diastéréoisomères, ce qui est identifiable par RMN ^{13}C .

4.3.3.3. Résultats et discussion

Afin de mesurer la stéréosélectivité de la GGT pour la position δ de la molécule **4.21**, nous avons synthétisé et séparé les deux diastéréoisomères selon la procédure décrite plus haut. Les deux diastéréoisomères **4.21a** ($S_C S_S$) et **4.21b** ($S_C R_S$) ont été obtenus, mais seulement le composé **4.21a** était pur, avec un excès diastéréoisomérique e.d. supérieur à 95 %, comme déterminé par RMN ^{13}C ¹²⁷. La molécule $S_C S_S$ donne une valeur de K_i de 3.4 mM lorsque placée en compétition avec le L-GPNA dans la réaction de transpeptidation de la GGT, ce qui représente environ la moitié de la valeur obtenue pour le mélange diastéréoisomérique 50/50. Aussi, cela suggère que l'enzyme montrerait une faible affinité pour l'autre diastéréoisomère $S_C R_S$ **4.21b**.

Bien que la purification de **4.21b** avec un e.d. de 95 % ait été rapportée dans la littérature¹²⁷, nous avons toujours obtenu un mélange de diastéréoisomères. Notre plus grand enrichissement a donné un mélange de 76 % **4.21b** et 24 % **4.21a**. Avec l'impossibilité d'obtenir **4.21b** pur, nous avons utilisé une méthode indirecte décrite dans la section 4.3.2.2.

En utilisant l'équation représentant $f = \frac{[I]}{[I] + [I']}$ où I est le composé **4.21a** et I'

4.21b, la constante apparente d'inhibition K_i^{app} varie en fonction de la fraction molaire f dans l'équation (7). Aussi, en utilisant des mélanges de diastéréoisomères avec des fractions de **4.21a** connues, le graphique représentant les données d'inhibition en fonction des différentes fractions de **4.21a** a été obtenu (Figure 4.6) avec une corrélation linéaire satisfaisante ($r^2 = 0.987$).

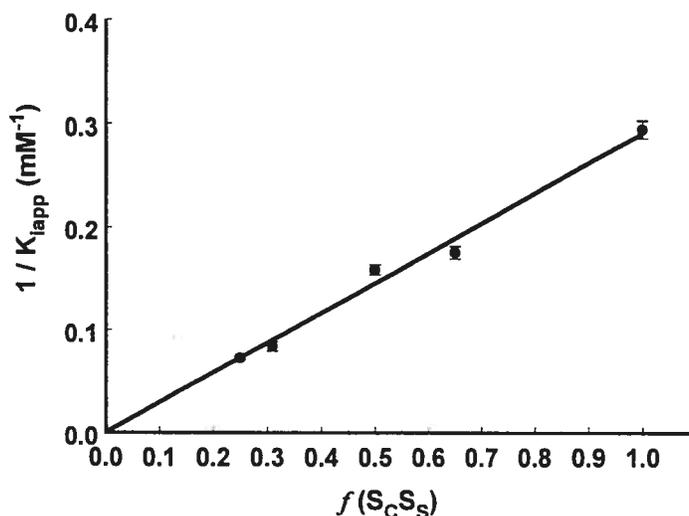


Figure 4.6 : Courbe $\frac{1}{K_{app}}$ vs f où f représente la fraction de L-méthionine sulfoxyde $S_C S_S$ **4.21a** dans le mélange des diastéréoisomères **4.21a** et **4.21b** utilisé en compétition avec le L-GPNA.

Selon l'équation (7), l'ordonnée à l'origine représente l'inverse de la constante K_i' pour l'inhibiteur **4.21b**. L'extrapolation des données de la Figure 4.6 sur l'axe des Y est près de zéro et indique clairement que la valeur de K_i' représentant **4.21b** est très élevée dans la Figure 4.6, ce qui représente une affinité très faible pour l'enzyme. La pente de la Figure 4.6 permet de déterminer la constante d'inhibition K_i de **4.21a** comme étant 3.4 mM ce qui correspond à la valeur déterminée en utilisant seulement le composé **4.21a** en compétition. Cette reconnaissance différente de la GGT pour l'isomère **4.21b** $S_C R_S$ en contraste avec **4.21a** illustre bien la stéréospécificité des interactions possibles à la position δ des analogues de l'acide L-glutamique. Ces interactions peuvent être de type électrostatique entre une charge positive d'un acide aminé du site actif de la GGT et la charge partielle négative de l'oxygène du sulfoxyde et/ou une interaction dipôle-dipôle entre le nucléophile du site actif (possiblement un groupement hydroxyle d'une thréonine) et la charge partiellement positive du soufre, comme représenté dans la Figure 4.7. Cette différente reconnaissance pourrait être due aussi à de l'encombrement stérique au site actif créé par le composé **4.21b**.

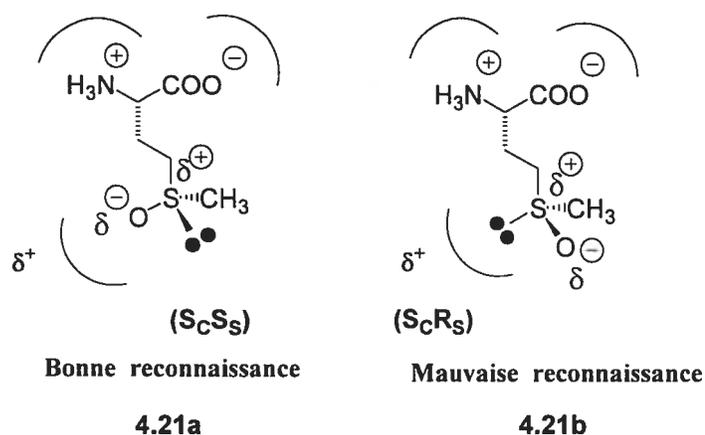


Figure 4.7 : Reconnaissance différente par la GGT pour les deux diastéréoisomères **4.21a** et **4.21b**.

Des études de mutagenèse dirigée sur deux sérines (Ser-451 et Ser-452) remplacées par des alanines dans la GGT humaine ont mené à une perte d'activité importante et une diminution de l'inhibition par l'acivicine, un puissant inhibiteur de la GGT⁴². Le complexe sérine-borate inhibant la GGT interagit efficacement avec des sérines ou des groupements hydroxyles de l'enzyme. Là aussi, la double mutation des sérines affecte l'activité de l'enzyme, mais aussi l'effet du borate. Ces sérines de la petite sous-unité peuvent jouer un rôle dans sa liaison. Il est envisageable de considérer qu'elles agissent non comme nucléophile mais comme résidus stabilisant l'état de transition, analogue au trou oxyanionique existant pour certaines hydrolases¹²⁹. La Figure 4.8 représente cette possibilité.

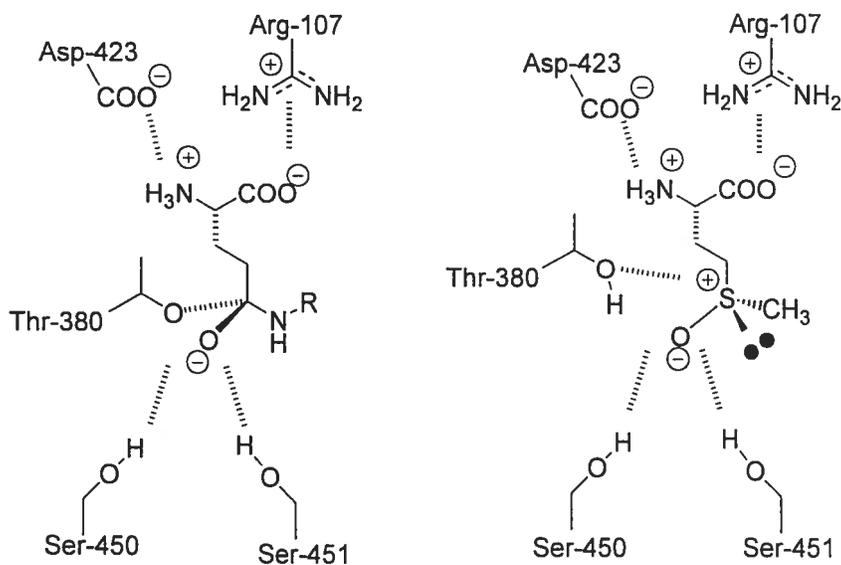


Figure 4.8 : Parallèle entre l'intermédiaire tétraédrique formé lors de l'attaque du nucléophile sur le substrat donneur et l'inhibition par le sulfoxyde **4.21a** montrant les différentes interactions possibles pour stabiliser chacune des espèces. R représente une chaîne alkyle ou un groupe aromatique. Les résidus sont numérotés selon leur position dans la GGT de rat⁶.

La stéréospécificité de ces interactions présente une intéressante perspective pour la conception de futurs inhibiteurs démontrant une haute affinité pour la GGT. En effet, avec cette information en main accompagnée des autres caractéristiques déterminées aux sections précédentes, nous avons maintenant une bonne idée des éléments nécessaires à la bonne reconnaissance des substrats donneurs pour la GGT. Ces travaux ont fait l'objet d'un article¹³⁰.

4.3.3.4. Autre application de la méthode cinétique déterminée à la section 4.3.3.2

La méthode déterminée à la section 4.3.2.2 a été utilisée pour deux diastéréoisomères. Elle pourrait possiblement être utilisée pour deux molécules assez similaires agissant au niveau du même site de liaison sur la GGT. En testant l'acide (D,L)-2-amino-4-phosphonobutyrique en compétition avec le L-GPNA, nous avons

obtenu un K_i de 35.5 mM à pH 8.0. Cette faible affinité peut être due à la présence de charges sur la chaîne latérale. Le pK_a des groupements α -ammonium et α -carboxylate ne varie pas de manière significative selon la nature de la chaîne latérale. Un des groupements hydroxyles sur l'atome de phosphore a un pK_a autour de 2.4 et sera toujours ionisé au pH utilisé pour nos cinétiques¹³¹. Par contre, le pK_a du second groupement hydroxyle peut varier avec la longueur de la chaîne latérale et la nature des substituants environnants. Le composé **4.22** a été titré avec du NaOH selon la procédure indiquée au chapitre 7, afin de déterminer la valeur du second pK_a de l'acide phosphonique comme étant 7.022 ± 0.002 . Aussi, durant les tests d'inhibition à pH 8.0, les deux oxygènes sont majoritairement négativement chargés.

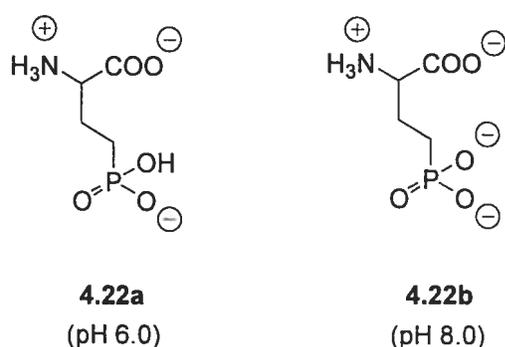


Figure 4.9 : Acide (D,L)-2-amino-4-phosphonobutyrique **4.22** représenté sous leurs deux états de protonation majoritaires (**4.22a** et **4.22b**) selon le pH en solution.

Vers le pH physiologique, la molécule **4.22** sera environ 50 % sous la forme **4.22a** et 50 % sous la forme **4.22b** représentée à la Figure 4.9. À un pH de 6, la molécule sera majoritairement sous la forme **4.22a**.

Une des hypothèses pour la faible affinité de ce composé pour le site de liaison du substrat donneur à un pH de 8.0 serait les répulsions électrostatiques. En répétant les mêmes expériences d'inhibition à des pH de 7.0 et 6.0, nous avons trouvé, respectivement, des valeurs de K_i de 5.91 mM et 0.6 mM tel que représenté dans le Tableau 4.3.

Tableau 4.3 : Différents paramètres cinétiques obtenus pour l'inhibition du L-GPNA par l'acide phosphonique 4.22, en présence de GlyGly à 37°C à différents pH. La fraction f représente la fraction de l'état déprotoné sur la quantité totale du composé 4.22.

pH	f (fraction)	K_M (L-GPNA) (mM)	K_i^{app} Objects cannot be created from editing field codes. (4.22) (mM)
6.0	0.09	0.12 ± 0.01	0.6
7.0	0.49	0.47 ± 0.03	5.9
8.0	0.90	0.59 ± 0.02	35.8

La fraction f a été calculée en tenant compte de l'équation d'Henderson-Hasselbach permettant de connaître la concentration d'une espèce à un pH donné en connaissant son pK_a ¹. Une courbe représentant le $\frac{K_M}{K_i^{app}}$ en fonction de la fraction (f) de 4.22b dans le mélange de 4.22 a été tracée et est représentée à la Figure 4.10 selon l'équation (7).

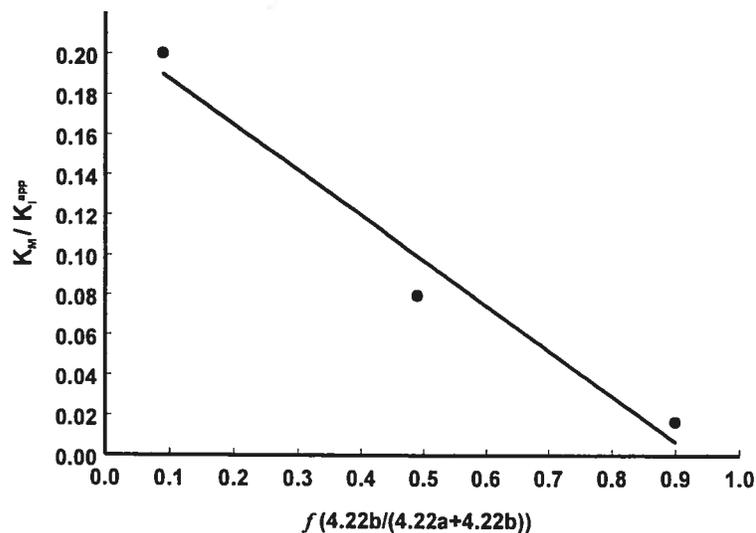


Figure 4.10 : Courbe représentant K_M / K_i^{app} en fonction de la fraction de **4.22b** dans le mélange de **4.22a** et **4.22b** où K_M représente la constante d'affinité du L-GPNA selon le pH et K_i^{app} la constante d'inhibition compétitive du mélange de **4.22**.

La correction par rapport au K_M est nécessaire pour éliminer l'effet du pH sur la liaison du substrat L-GPNA à l'enzyme. En effet, le pH peut changer l'état d'ionisation de certains acides aminés au site de liaison du substrat donneur et donc modifier la liaison. L'inhibition effectuée par le composé **4.22** serait donc difficile à analyser sans cette correction.

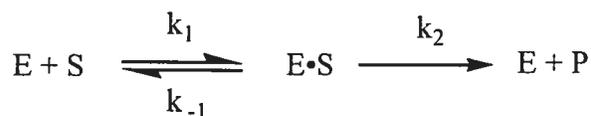


Schéma 4.7 : Schéma d'une réaction enzymatique typique.

Le Schéma 4.7 est celui d'une réaction enzymatique typique. En fait, le K_M correspond à $K_s + \frac{k_2}{k_1}$ avec $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$ où K_s est la constante de dissociation du

complexe enzyme-substrat. Normalement, pour faire la correction de l'effet du pH, il faudrait utiliser la valeur de K_S et non celle du K_M qui est modifiée par le facteur k_2 . Cependant le K_S est difficile à obtenir et le K_M est généralement utilisé en littérature comme approximation de la valeur⁶¹.

Une corrélation de 0.967 est obtenue, ce qui confirme la relation entre la fraction de **4.22b** dans le mélange des deux espèces **4.22** en solution et le K_i obtenu. Il serait possible de déterminer précisément le K_i de chaque espèce en connaissant le K_M du L-GPNA à des pH plus importants que 8.0 ou plus faibles que 6.0. La méthode peut donc être utilisée avec succès, pour divers mélanges de composés semblables comme le démontre ce deuxième exemple, après celui des dérivés sulfoxydes.

Le K_i^{app} déterminé à pH 6.0, où le second oxygène sera majoritairement protoné, est 60 fois plus bas qu'à pH 8.0, où l'oxygène sera majoritairement sous forme ionisée. Bien sûr, ces résultats peuvent être aussi dû à l'ionisation d'un ou plusieurs acides aminés dans, ou près du site de liaison des substrats donneurs de la GGT mais une correction par rapport au pH a été effectuée. Il est clair qu'à bas pH, l'affinité entre le composé **4.22** sous forme protonée et le site de liaison du substrat donneur est augmentée. Cela suggère que les interactions électrostatiques vis-à-vis l'entité γ -glutamyle jouent un rôle important dans l'affinité de l'inhibiteur. Cela peut apporter une autre raison, en plus de la géométrie préférentielle du sulfoxyde pour la bonne affinité pour la GGT. Toutes ces informations pourront servir à la synthèse d'inhibiteurs efficaces de la GGT.

Chapitre 5
Synthèse d'inhibiteurs réversibles de
l'étape d'acylation de la GGT

5.1. Introduction

Il existe plusieurs inhibiteurs réversibles de l'étape d'acylation de la GGT. Deux inhibiteurs de type compétitif mimant l'état de transition de cette étape se sont révélés très efficaces pour la GGT (Figure 5.1). Le premier est un complexe entre la L-sérine et l'acide borique formé *in situ*. Le complexe borate mime l'intermédiaire attendu après l'attaque du nucléophile sur le substrat donneur ou l'état de transition formé dans le site actif de l'enzyme¹¹⁸.

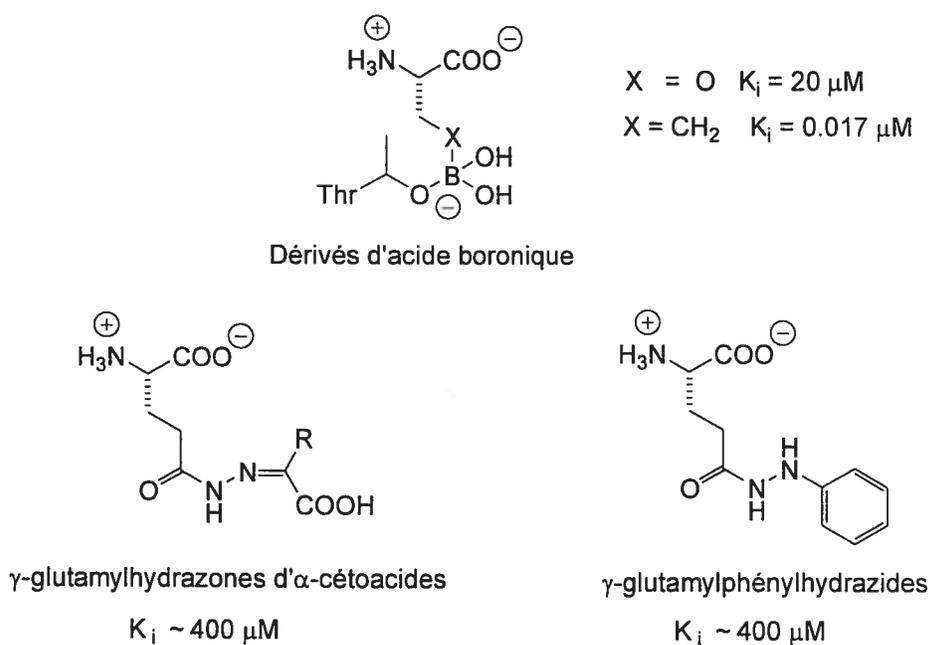


Figure 5.1 : Différents inhibiteurs réversibles de la GGT : Complexe sérine-borate¹¹⁸, l'acide L-2-amino-4-boronobutanoïque¹¹⁷ liés au groupement hydroxyle d'une thréonine du site de liaison du substrat donneur de la GGT de rat, les γ -glutamylhydrazones d' α -cétoacides et les γ -glutamylphénylhydrazides.

La D-sérine est aussi un inhibiteur en présence d'acide borique. Les K_i mesurés pour les L- et D-sérines en présence de 10 mM d'acide borique sont, respectivement, 20 et 170 μM en présence de GGT de rat¹¹⁸. La sérine et un acide aminé du site actif comportant un groupement hydroxyle sont liés au bore de manière covalente. La réaction se produit de la même manière avec le deuxième inhibiteur, l'acide L-2-amino-

4-boronobutanoïque (ABBA), un puissant inhibiteur réversible de la GGT^{117,132}. Un K_i de 17 nM *in vitro* a été obtenu pour ce composé; *in vivo*, c'est un inhibiteur avec un K_i de l'ordre du millimolaire¹¹⁷.

D'autres inhibiteurs de type compétitif dérivés de γ -glutamylhydrazones ont été synthétisés et testés avec la GGT pour obtenir des K_i avoisinant 400 μ M pour les γ -glutamylhydrazones de pyruvate et de α -cétoglutarate²⁵. Une autre série d'inhibiteurs a été créée avec les γ -glutamylphénylhydrazides¹³³. Les plus importants et aussi les plus puissants d'entre eux sont les isomères de configurations (L) et (D) de la γ -glutamyl-(*O*-carboxy)phénylhydrazide avec des valeurs de K_i de 8 et 23 μ M, respectivement. Le problème réside dans le fait que ces composés sont toxiques à des doses supérieures à 0.5 et 1.25 mmol/kg sur les souris. La toxicité est due en partie au groupement *O*-carboxyphénylhydrazine relâché lors de l'hydrolyse lente de l'inhibiteur²⁷.

Ces inhibiteurs réversibles ont permis d'obtenir beaucoup d'informations sur le mécanisme de l'étape d'acylation de la GGT. Cependant, afin d'être utilisés *in vivo*, ceux-ci doivent être spécifiques à une enzyme, avoir une bonne constante d'inhibition et ne pas causer d'effets secondaires néfastes.

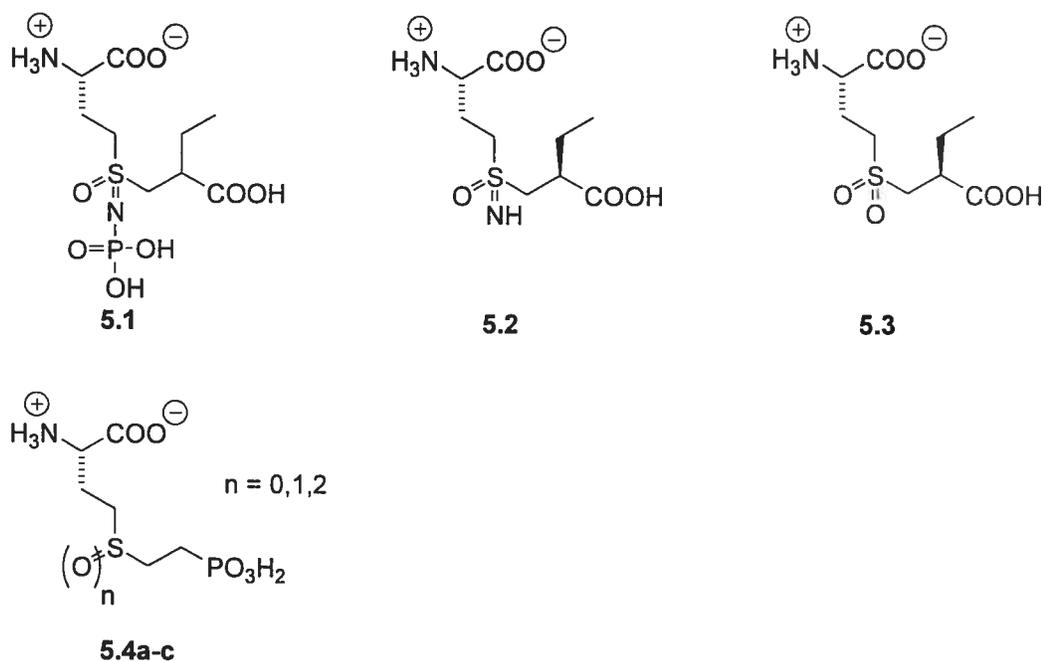


Figure 5.2 : Quelques exemples d'inhibiteurs soufrés utilisés avec différentes enzymes, mimant l'état de transition lors de l'hydrolyse de peptides^{134,135,136}.

Dans la littérature, il existe de nombreux inhibiteurs analogues de l'état de transition de type phosphinate^{137,138,139} et boronate¹⁴⁰, mais assez peu de dérivés sulfoxydes^{141,142}. Dans la Figure 5.2, sont présentés quelques inhibiteurs soufrés analogues de dipeptides L- γ -glutamyl-acide aminé. Les inhibiteurs **5.1**, **5.2** et **5.3** se sont montrés efficaces pour des enzymes comme la γ -glutamylcystéine synthétase^{134,135}. Les dérivés **5.4** ont été synthétisés et testés en présence de la glutamine synthétase¹³⁶. Le meilleur inhibiteur des trois molécules est la sulfone avec un K_i de l'ordre du mM *in vitro*.

Aussi, nous avons voulu vérifier si des composés de type sulfoxyde pourraient représenter une nouvelle classe d'inhibiteurs pour la GGT selon les résultats très prometteurs du chapitre 4. Pour cela, nous avons synthétisé des molécules qui miment le glutathion, substrat naturel de la GGT.

5.2. Synthèse et études cinétiques d'inhibiteurs soufrés analogues au glutathion

5.2.1. Synthèse de dérivés sulfoxydes ressemblant au glutathion

5.2.1.1. Molécules envisagées comme inhibiteurs réversibles

Nous nous sommes appuyés sur les résultats du chapitre précédent pour créer une nouvelle gamme d'inhibiteurs capables d'être aussi performants, voire plus, que ceux déjà existants pour la GGT. Des inhibiteurs supposés réversibles, mimant le glutathion, ont été envisagés. Ainsi une bonne ressemblance avec ce substrat naturel devrait pouvoir mener à une grande affinité pour l'enzyme représentée par un faible K_i .

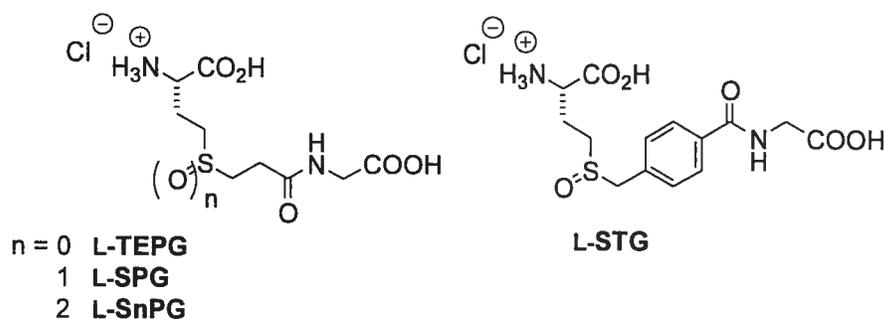


Figure 5.3 : Inhibiteurs réversibles envisagés pour la GGT.

Les premières molécules visées (Figure 5.3) comportent une chaîne alkyle rattachée à un squelette γ -glutamyle avec un atome de soufre à la place d'un groupement carbonyle. Le squelette γ -glutamyle assure la bonne reconnaissance dans le site de liaison du substrat donneur, tel qu'observé au chapitre 4. De plus, la partie cystéinyne du glutathion est remplacée par une partie propionyle dépourvue de chaîne latérale, pour des facilités de synthèse. Cet analogue d'une entité glycyle devrait bien être reconnue par la GGT car le dipeptide Gly-Gly, le substrat accepteur, est reconnu au même endroit. La glycine est conservée à l'extrémité de la molécule pour une meilleure affinité²⁶.

Les composés avec les entités thioéther propionylglycine (L-TEPG), sulfoxyde propionylglycine (L-SPG) et sulfone propionylglycine (L-SnPG) ont été synthétisés afin de vérifier les résultats du chapitre précédent; de plus, ces isostères miment bien le lien amide en position γ entre les deux premiers acides aminés du GSH. Ceci devrait permettre d'obtenir des inhibiteurs plus puissants que le composé **4.21a**.

Un deuxième type de molécule (L-STG) a été envisagé où la partie alkyle mimant la glycine est remplacée par un groupement aromatique. D'une part, cette molécule est un analogue du L-GPNA, un bon substrat donneur de la GGT. D'autre part, la partie 4-méthylène-benzoylglycine dans ce dérivé ressemble à l'hippurate, un des meilleurs activateurs d'hydrolyse de la GGT qui est reconnu pour se lier dans le site de liaison du substrat accepteur¹⁴³, donc au même endroit que la partie Cys-Gly du GSH. Ce résidu confère plus de rigidité au composé. La glycine est conservée à la fin de la molécule pour une meilleure affinité.

5.2.1.2. Méthodologie employée

Dans la littérature, deux méthodes existent pour la synthèse d'un dérivé thioéther, précurseur d'un sulfoxyde ou une sulfone (Schéma 5.1)^{135,136}.

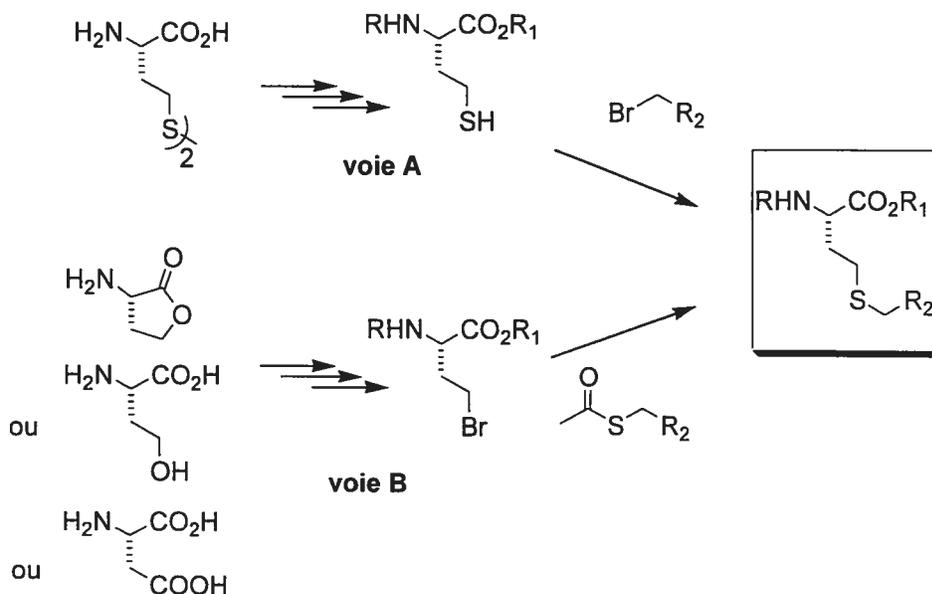


Schéma 5.1 : Deux voies possibles pour la synthèse d'un dérivé thioéther.

La voie A consiste en la condensation d'un thiol sur un dérivé bromé pour arriver au dérivé thioéther. Le composé soufré peut être synthétisé à partir de la L-homocystine comme il est décrit dans la littérature, soit par l'utilisation de triphénylphosphine¹⁴⁴, de triéthylphosphine¹⁴⁵ ou tri(*n*-butyl)phosphine¹³⁵. La réaction peut se faire en deux étapes avec clivage du pont disulfure, dans un premier temps, puis réaction avec un dérivé comportant un bon groupe partant (ici le brome). Une autre méthode consiste à faire la condensation du composé avec le pont disulfure en présence de triéthylphosphine avec l'alcool correspondant au dérivé bromé dans un ratio molaire de 3/6/1, respectivement (Schéma 5.2)¹⁴⁵ pour donner le dérivé thioéther 5.5 dans des rendements très acceptables. Le désavantage reste la grande quantité d'homocystine utilisée.

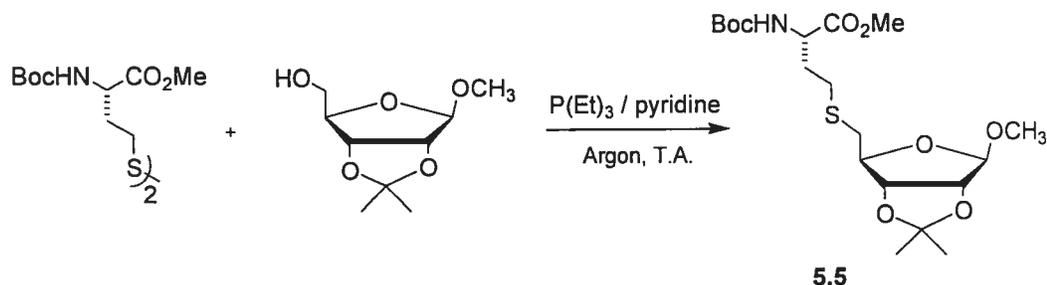


Schéma 5.2 : Synthèse en une étape d'un dérivé ribosylhomocystéine **5.5**¹⁴⁵.

La voie B (Schéma 5.1) consiste, quant à elle, à condenser un thioacétate sur le dérivé de l'acide aminé γ -bromé en présence d'une base nucléophile comme le méthanolate de sodium. Donc, *in situ*, celle-ci réagit sur le thioacétate et ainsi le thiol peut réagir avec le dérivé bromé pour effectuer une réaction de type S_N2 . Le principal désavantage est la possibilité de racémisation due à l'utilisation d'une base forte avec le dérivé bromé et surtout la difficulté d'obtenir le dérivé bromé dans de bons rendements. En effet, le dérivé bromé peut être obtenu à partir de la 4-aminobutyrolactone, elle-même facilement synthétisable à partir de la méthionine, ou bien à partir de l'homosérine ou encore l'acide aspartique. Le problème reste la possibilité de lactonisation selon le groupement protecteur ester présent sur l'acide carboxylique en position α ¹⁴⁶.

La voie A a donc été privilégiée pour la synthèse d'analogues du glutathion. Elle exige le moins d'étapes et elle génère très peu de réactions secondaires (comme la formation de lactone dans la voie B). De plus, les rendements pour arriver à des dérivés thioéthers de cette façon sont relativement bons¹³⁵.

5.2.1.3. Synthèse de l'analogue sulfoxyde **5.14** du glutathion

Le synthon mimant la partie cystéinyglycine du GSH a été synthétisé en une étape à partir du chlorure de 3-bromopropionyle et de la glycine *tert*-butyl ester en présence de triéthylamine dans des conditions strictement anhydres. Le rendement moyen de 66%

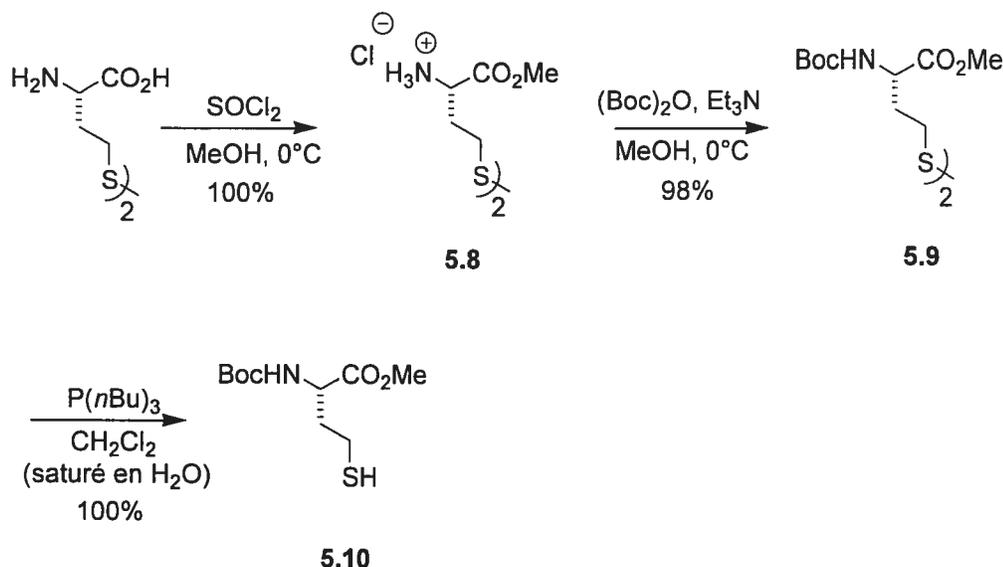


Schéma 5.4 : Synthèse de la Boc-L-homocystéine méthyl ester **5.10**.

Ensuite, l'homocystéine obtenue est condensée avec le synthon analogue au Gly-Gly (**5.6**) avec un bon rendement pour donner **5.11** (Schéma 5.5). Le produit secondaire de la réaction est le dérivé de la L-homocystine dû à la régénération du pont disulfure en milieu basique. L'oxydation du thioéther se fait en présence de NaIO_4 avec un bon rendement pour donner le sulfoxyde **5.12**. Le contrôle de la réaction d'oxydation se fait beaucoup mieux qu'avec l'eau oxygénée où la sulfone est observée due à l'excès d'agent oxydant employé. La séparation des diastéréoisomères **5.12** n'a pu être effectuée puisque les deux produits migrent de la même façon par chromatographie sur couche mince. Le groupement méthyl ester est déprotégé en milieu basique avec de la soude à 0°C pour arriver à l'acide carboxylique correspondant **5.13**. Le produit désiré **5.14** (L-SPG) est obtenu après déprotection du groupement Boc sur l'amine et du *tert*-butyl ester en présence d'acide trifluoroacétique à 0°C . Le contre-ion trifluoroacétate est remplacé par l'ion chlorure en présence d'une solution aqueuse HCl (0.1N) avec une vérification effectuée par RMN ^{19}F . Les deux diastéréoisomères sont présents avec un même ratio, visible par RMN ^{13}C .

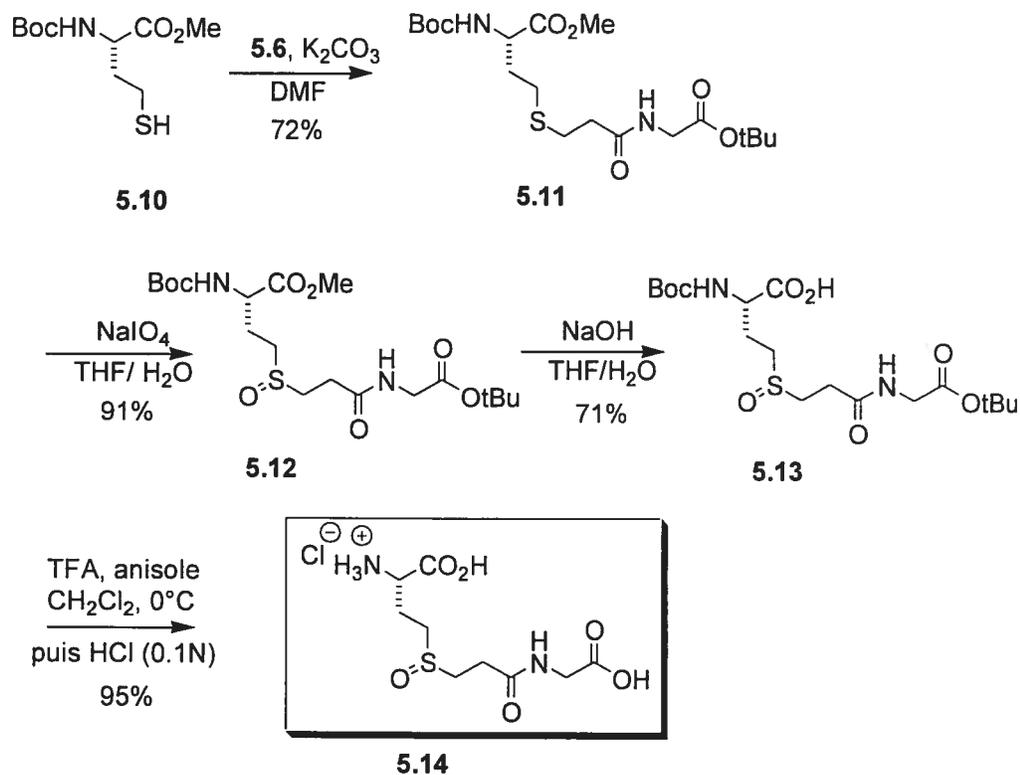


Schéma 5.5 : Synthèse du dérivé sulfoxyde 5.14 analogue au glutathion.

5.2.1.4. Synthèse de l'analogue thioéther 5.16 du glutathion

La synthèse du thioéther 5.16 (L-TEPG) est effectuée à partir du dérivé 5.11 (Schéma 5.6). La première étape consiste en la déprotection du groupement méthyl ester pour obtenir le dérivé 5.15. Finalement, la déprotection des groupements protecteurs Boc et du *tert*-butyl ester en présence d'acide trifluoroacétique puis l'échange du contre-ion par un chlorure en milieu acide HCl (0.1N) sont effectués dans un excellent rendement.

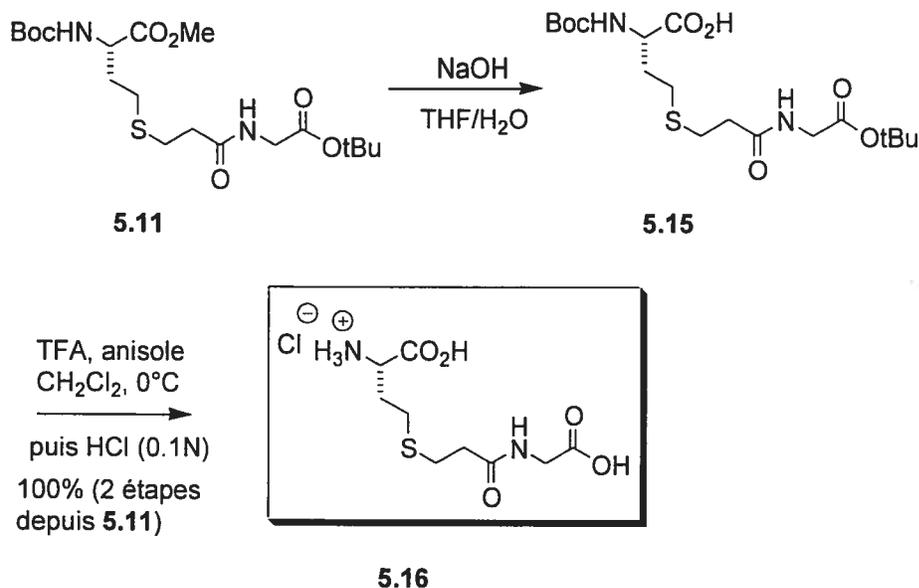


Schéma 5.6 : Synthèse du dérivé thioéther **5.16**.

5.2.1.5. Synthèse de l'analogue sulfone **5.19** du glutathion

La sulfone **5.18**, précurseur du produit désiré **5.19** (L-SnPG), a été synthétisée par deux voies différentes (Schéma 5.7). La première voie consiste à oxyder le dérivé sulfoxyde en présence de peroxyde d'hydrogène dans le méthanol, à partir du dérivé **5.12** (un des intermédiaires pour arriver au dérivé **5.14**), pour arriver à la sulfone **5.17**. Ensuite, le groupement méthyl ester a été déprotégé en présence de soude pour obtenir l'acide carboxylique **5.18**. Ce composé peut être aussi obtenu à partir du dérivé thioéther **5.15** par oxydation avec du peroxyde d'hydrogène en présence d'acide acétique. Les rendements globaux des deux voies possibles sont quasiment identiques. Finalement, la déprotection des groupements Boc et *tert*-butyl ester se fait en présence d'acide trifluoroacétique suivie par un échange du contre-ion avec HCl pour obtenir le composé **5.19** dans un bon rendement.

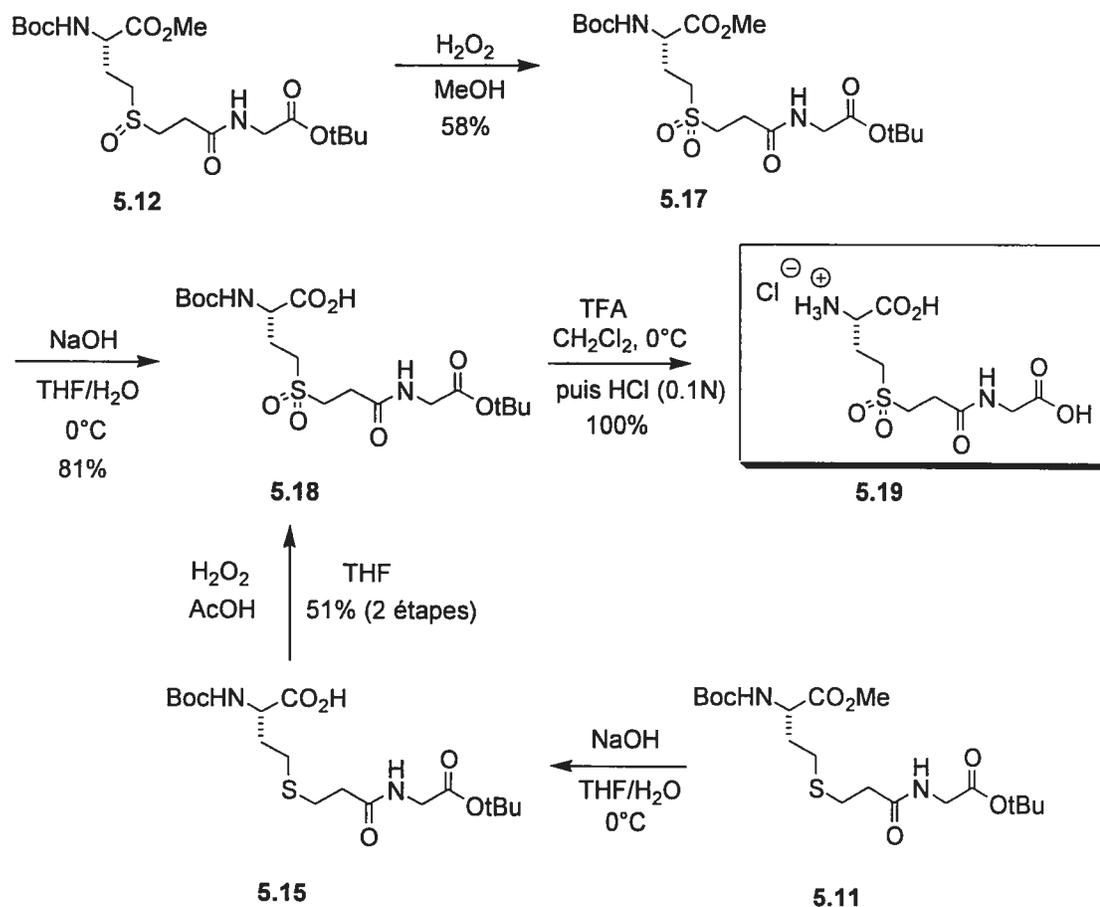


Schéma 5.7 : Synthèse du dérivé sulfone 5.19.

5.2.1.6. Synthèse du dérivé sulfoxyde 5.23 comportant une partie aromatique

La synthèse du dérivé sulfoxyde 5.23 comportant une partie aromatique à la place de l'entité propyle est effectuée de la même façon que le L-SPG (5.14) en partant du dérivé de la L-homocystéine 5.10 (Schéma 5.8). La première étape consiste en la condensation de ce dérivé avec l'acide α -bromo-*p*-toluique pour donner le thioéther correspondant 5.20a. Sans purification supplémentaire, la synthèse est poursuivie par un couplage de l'acide obtenu avec la glycine *tert*-butyl ester pour donner le composé 5.20 dans un rendement global de 44%. Ensuite, le soufre est oxydé par le périodate de sodium pour donner le sulfoxyde 5.21 dans un bon rendement. Les prochaines étapes

ont été réalisées de la même façon que dans le Schéma 5.6 en commençant par la déprotection du méthyl ester pour donner le composé **5.22** puis la déprotection des fonctionnalités Boc et *tert*-butyl ester pour obtenir le produit désiré **5.23** avec des rendements respectifs de 94% et 93%.

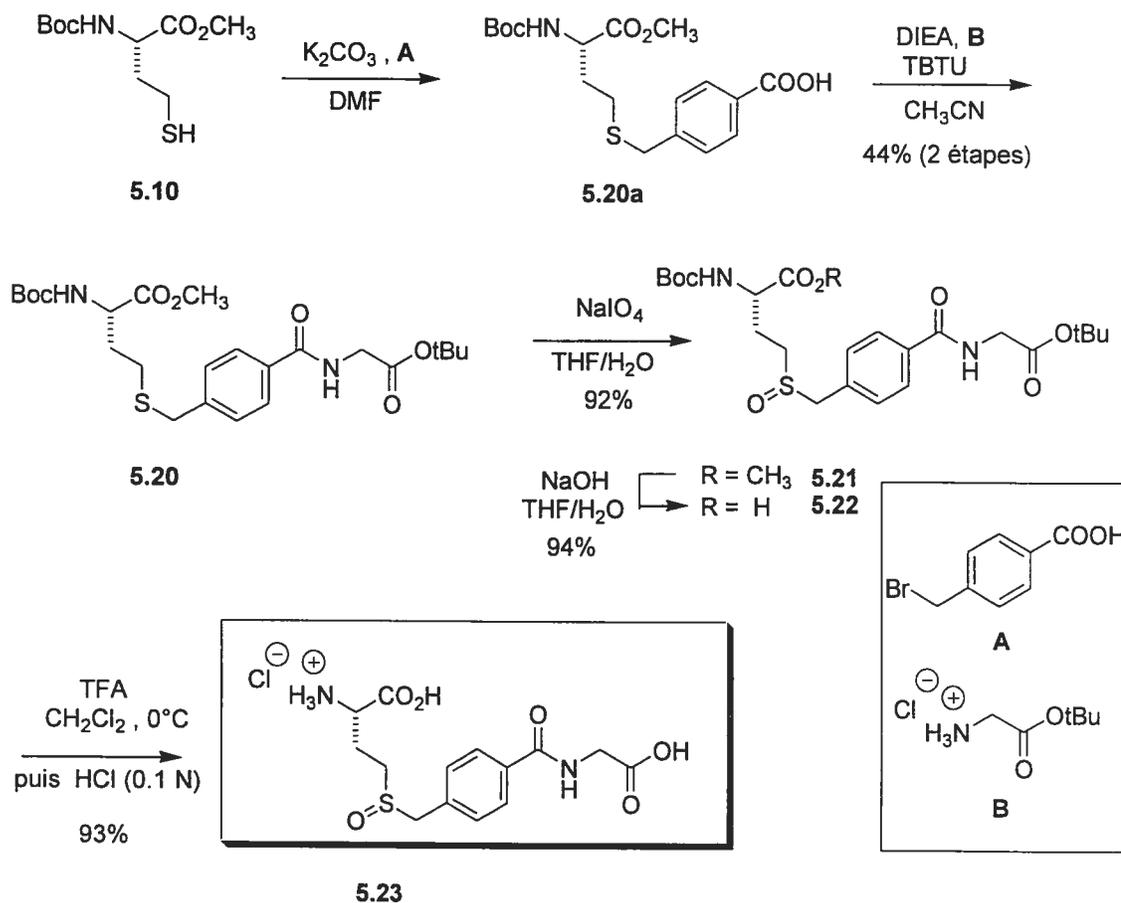


Schéma 5.8 : Synthèse du dérivé sulfoxyde L-STG (**5.23**) analogue au composé **5.14**.

5.2.2. Résultats et discussion

Les différents composés synthétisés (L-SPG, **5.14**; L-TEPG, **5.16**; L-SnPG, **5.19**; L-STG, **5.23**) ont été testés en compétition avec le L-GPNA en présence de Gly-Gly comme substrat accepteur en concentration saturante, à 37°C et à pH 8.0. En prenant différentes concentrations fixes de ces molécules supposément inhibitrices, il est

possible de tracer des courbes de Lineweaver-Burk (Figure 5.4) pour obtenir graphiquement les constantes cinétiques K_M^{app} et V_{max}^{app} pour chacune d'entre elles et pour identifier le type d'inhibition. À partir de ces courbes, il est possible de déterminer le K_i en rapportant dans un graphique secondaire les pentes des droites obtenues en fonction des différentes concentrations d'inhibiteur (Figure 5.5). Un exemple typique est donné pour l'inhibiteur L-SPG (5.14). L'intersection avec l'axe des abscisses donne le K_i . Plus la valeur de K_i est petite, plus la molécule est inhibitrice.

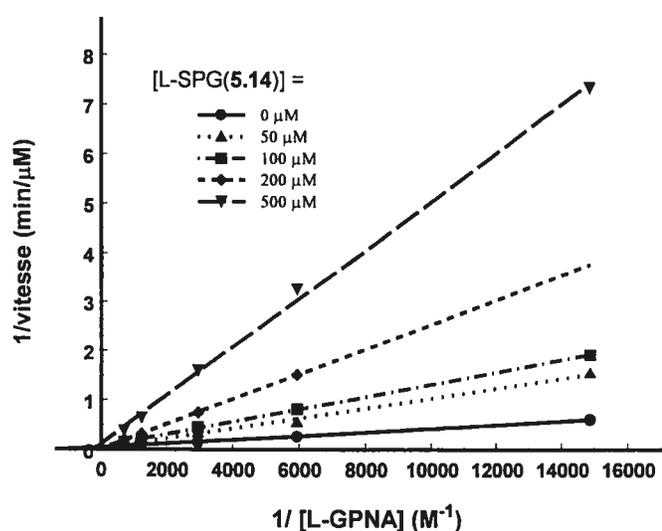


Figure 5.4 : Courbe Lineweaver-Burk pour la transpeptidation de la GGT en présence de L-GPNA, de Gly-Gly et différentes concentrations de L-SPG 5.14 à 37°C et pH 8.0.

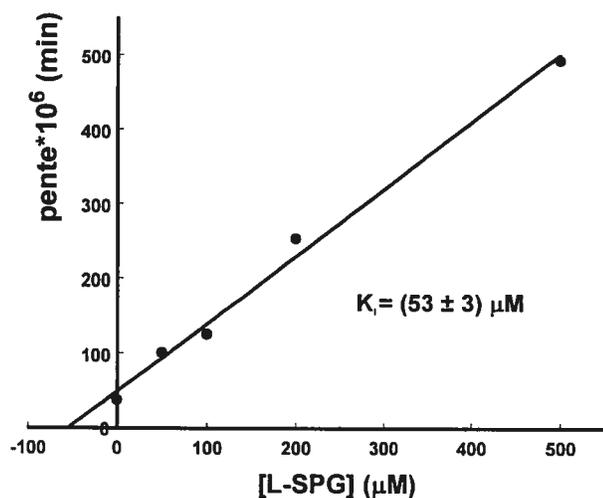


Figure 5.5 : Courbe secondaire pour la détermination du K_i pour l'inhibiteur réversible L-SPG 5.14.

Les mêmes procédures ont été effectuées pour tous les composés finaux synthétisés. Nous avons déterminé les types d'inhibition et les K_i pour ces molécules et ces données sont rapportées dans le Tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Détermination des types d'inhibition et des K_i pour les molécules soufrées testées en présence de GGT à 37°C et à pH 8.0.

Molécule testée	Type d'inhibition	K_i (μM)
L-SPG (5.14)	compétitive	53 \pm 3
L-TEPG (5.16)	compétitive	520 \pm 40
L-SnPG (5.19)	non déterminée	3500 \pm 600 ^a
L-STG (5.23)	compétitive	225 \pm 30

^a K_i calculé à partir du IC_{50} en supposant une inhibition compétitive avec le L-GPNA (concentration fixe de 400 μM) et un K_M de 590 μM .

Tous les composés présentent une inhibition de type compétitive par rapport au L-GPNA sauf le composé **5.19** pour lequel cela n'a pas été déterminé, dû à la faible quantité de produit obtenue en fin de synthèse. Le composé sulfoxyde L-SPG présente un K_i très bas de $(53 \pm 3) \mu\text{M}$, ce qui est bien inférieur aux autres inhibiteurs testés dans le chapitre précédent comme le composé L-méthionine sulfoxyde **4.21** qui avait une affinité environ 100 fois moins bonne. Aussi, la présence d'un groupement propionylglycine, analogue à la partie cystéinylglycine du glutathion, à la place d'un simple groupement méthyle contribue énormément à la grande affinité observée de cette molécule pour l'enzyme, ce qui classe ces composés contenant une fonctionnalité sulfoxyde parmi les meilleurs inhibiteurs pour la GGT. Un fait important à noter est la présence d'un mélange 50/50 de deux diastéréoisomères qui donnent cette valeur de K_i pour le composé **5.14**, ces derniers étant impossibles à purifier par les mêmes techniques que pour le composé **4.21**. Il est envisageable, d'après la stéréospécificité de **4.21**, que le K_i du diastéréoisomère $S_S S_S$ puisse être plus bas que $53 \mu\text{M}$, voire aussi bas que $27 \mu\text{M}$, mais ceci reste à prouver en séparant les deux diastéréoisomères par différentes méthodes.

D'autres analogues du glutathion contenant des hétéroatomes^{88,89} sur la chaîne latérale en position γ ou avec des modifications structurales de la chaîne de la cystéine ou de la glycine ont été synthétisés⁹⁰. Ces composés sont relativement de bons inhibiteurs, probablement dû à la haute affinité de la chaîne analogue à la partie Cys-Gly, mais ils ne sont pas aussi efficaces. La synthèse d'un analogue γ -sulfonamide du glutathion oxydé a été rapportée, mais aucune donnée cinétique n'a été publiée¹⁴⁷.

Pour confirmer que les dérivés thioéther et sulfone sont bien reconnus par la GGT tel que démontré au chapitre 4, ils ont été synthétisés et testés. Le dérivé thioéther **5.16** montre une inhibition de $520 \mu\text{M}$, mais il n'est pas aussi efficace que le dérivé sulfoxyde **5.14**. Ceci appuie le fait que la fonctionnalité sulfoxyde est nécessaire pour obtenir une bonne affinité pour la GGT et qu'elle constitue probablement un meilleur analogue de l'état de transition de la réaction d'acylation en raison de ses charges partielles. Le dérivé sulfone **5.19**, quant à lui, est beaucoup moins efficace, ce qui est montré par l'extrapolation de son IC_{50} de $(5.8 \pm 0.1) \text{mM}$. Ceci, encore une fois,

confirme l'importance de la fonctionnalité sulfoxyde et les résultats obtenus par la fonctionnalité sulfone au chapitre 4.

Une autre molécule avec un squelette aromatique a été synthétisée et testée de la même façon. Les dérivés acylglycines aromatiques ont la propriété de se lier au site du substrat accepteur de par leur ressemblance à la cystéinyglycine du glutathion ou la Gly-Gly, le meilleur substrat accepteur de la GGT. Cette ressemblance est probablement due à la géométrie commune pouvant être adoptée par tous ces dérivés¹⁴³. Donc, le groupement aromatique se lierait dans le deuxième sous-site (site de liaison de la cystéine). Ces dérivés comme le 3-benzoylpropionate, l'hippurate et le *p*-aminohippurate sont des activateurs de l'hydrolyse meilleurs que le maléate, très employé comme tel avec la GGT¹⁴³. Ces molécules servent aussi à accélérer l'inactivation de la GGT par des inhibiteurs comme le 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON)³⁶. Cependant, le mécanisme de cette activation demeure obscur. Le dérivé sulfoxyde **5.23** (L-STG) comportant un groupement aromatique remplaçant l'entité propyle du sulfoxyde L-SPG (**5.14**) donne un K_i de $(225 \pm 30) \mu\text{M}$. Cette molécule est moins bien reconnue que le dérivé L-SPG (**5.14**) probablement du fait de la présence du groupement aromatique qui est relativement différent de la partie cystéinyle du glutathion, substrat naturel de la GGT. De plus, il est probable que la géométrie adoptée par ce composé ne soit pas aussi bien reconnue par la GGT. Cependant, son K_i reste inférieur au K_M du glutathion, donc ce dérivé a une meilleure affinité pour la GGT que son substrat *in vivo*.

5.2.3. Conclusion

Les dérivés comportant un squelette γ -glutamyle contenant une fonctionnalité sulfoxyde en position δ forment une nouvelle classe d'inhibiteurs qui offrent de nombreuses possibilités avec la GGT. De plus, ils sont comparables en efficacité par rapport à des composés comme le complexe sérine-borate. En effet, ces analogues du glutathion démontrent la nécessité d'incorporer une partie mimant le dipeptide cystéinyglycine reconnue dans les deuxième et troisième sous-sites du glutathion

(Figure 5.6) pour augmenter l'affinité de la GGT pour ce dérivé. De plus, la fonctionnalité sulfoxyde s'avère être la meilleure pour synthétiser un puissant inhibiteur. Des études sont en cours pour essayer d'améliorer cette affinité en mimant la chaîne latérale de la cystéine avec la bonne stéréochimie. Ces chaînes latérales avec la bonne stéréochimie peuvent être incorporées en utilisant des auxiliaires chiraux comme décrit dans la littérature¹³⁵.

De plus, nous avons vu que la GGT présentait une grande stéréospécificité pour un diastéréoisomère au niveau de la fonctionnalité du sulfoxyde. Il serait intéressant de synthétiser un seul diastéréoisomère pour confirmer l'impact de la stéréochimie du sulfoxyde, vérifier la cartographie effectuée au chapitre 4 et obtenir, probablement, un meilleur inhibiteur (Figure 5.6).

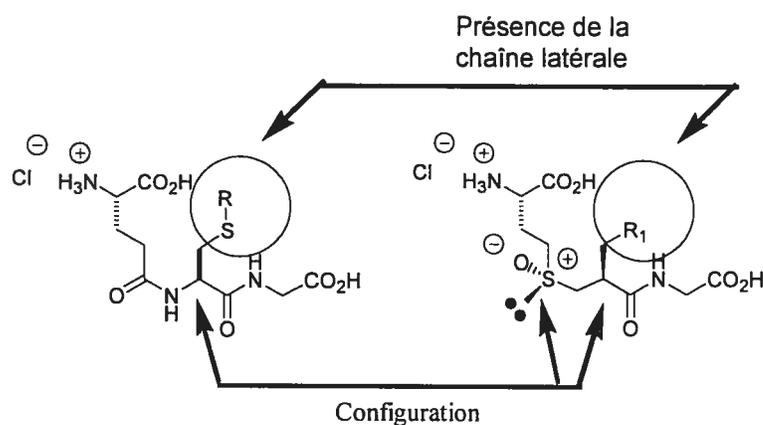


Figure 5.6 : Future approche de la synthèse d'inhibiteurs sulfoxyde de la GGT.

5.3. Études cinétiques d'un inhibiteur de type phosphinate

Les phosphinates sont de bons inhibiteurs d'enzyme utilisés entre autres contre la leucine aminopeptidase et la spermidine acétyltransférase^{137,148}. Ce sont aussi de puissants et très sélectifs inhibiteurs de métalloprotéases à zinc¹⁴⁹. Aucun inhibiteur phosphinate montrant une inhibition réversible n'a été synthétisé et testé pour la GGT. Ces inhibiteurs pourraient s'avérer aussi efficaces (voire meilleurs) que les dérivés sulfoxydes synthétisés et testés à la section 5.2.

Nous avons obtenu l'inhibiteur **5.24** de type phosphinate grâce à un don généreux du professeur Coward (Université du Michigan) qui travaille sur des analogues de L-glutamyl- γ -glutamate comme inhibiteurs de la foyllypoly- γ -glutamate synthétase¹⁵⁰ (Figure 5.7).

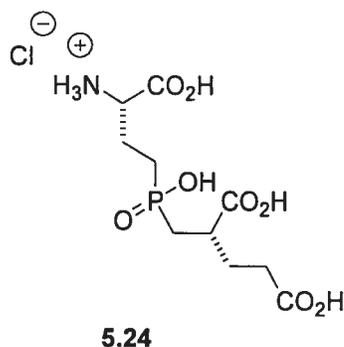


Figure 5.7 : Inhibiteur **5.24** fourni par le professeur Coward.

Cet acide phosphinique **5.24** a été testé avec la GGT de la même manière que les composés précédents dans la section 5.2, afin de vérifier si ces types de composés pourraient agir contre notre enzyme. Contrairement à l'acide 2-amino-4-phosphobutyrique **4.22**, une seule charge négative est présente sur l'atome d'oxygène lié au phosphore. Ceci devrait aider à obtenir une bonne affinité du composé **5.24** pour la GGT.

Cette molécule présente une inhibition compétitive contre la GGT en présence de différentes concentrations de L-GPNA, tel que démontré par le graphique à la Figure 5.8.

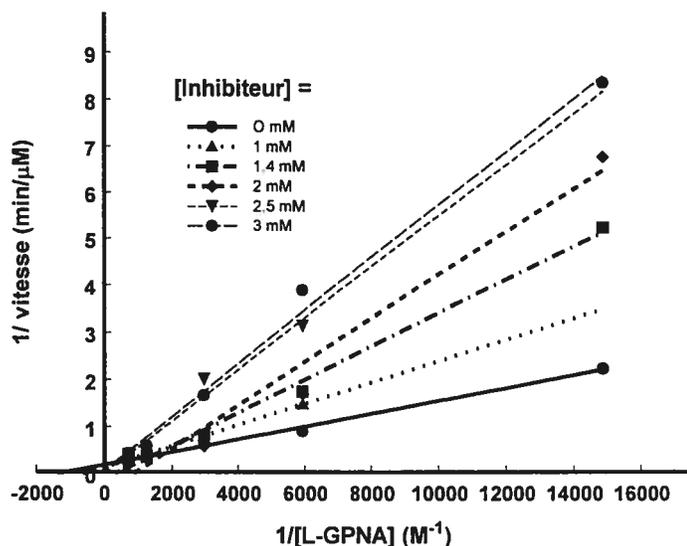


Figure 5.8 : Courbe Lineweaver-Burk pour la transpeptidation du L-GPNA par la GGT en présence de 20 mM de Gly-Gly à 37°C et à pH 8.0, en présence de différentes concentrations fixes de l'inhibiteur 5.24.

En traçant un graphique secondaire avec les pentes du graphique Lineweaver-Burk en fonction des concentrations d'inhibiteur utilisées, nous avons obtenu un K_i de (760 ± 70) μM . Avec une chaîne non adaptée aux deuxième et troisième sous-sites de la GGT, cet inhibiteur présente tout de même un K_i en deçà du millimolaire. Cependant, le sulfoxyde L-SPG 5.14 est 16 fois plus efficace. Aussi, la synthèse d'un dérivé comportant une partie analogue au dipeptide Gly-Gly comme pour le dérivé sulfoxyde L-SPG et leurs études cinétiques permettraient d'obtenir plus d'informations sur le potentiel de ces inhibiteurs (Figure 5.9).

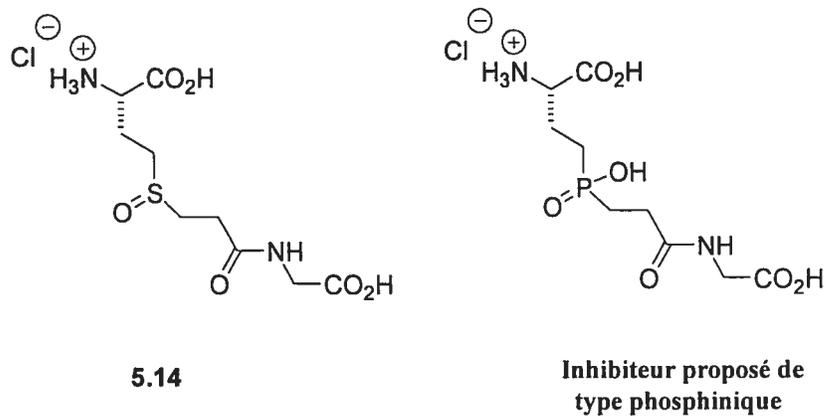


Figure 5.9 : Inhibiteur réversible de type phosphinique proposé (à droite) contre la GGT en raison de sa ressemblance avec le dérivé sulfoxyde L-SPG 5.14.

Selon les résultats obtenus avec le composé 5.24, les acides phosphiniques sont bien reconnus par la GGT. Les dérivés du phosphore pourraient constituer une nouvelle classe d'inhibiteurs pour la GGT où les phosphinates pourraient agir comme inhibiteurs réversibles et les phosphonamides, comme inhibiteurs irréversibles. Une discussion de ce type de composé est faite au chapitre suivant.

Chapitre 6
Synthèse et études cinétiques
d'inhibiteurs irréversibles de la GGT

6.1. Introduction

Les techniques généralement employées pour vérifier quels sont les acides aminés importants dans le site actif d'une enzyme sont la mutagenèse dirigée et le marquage chimique en utilisant des petites molécules spécifiques ou non au site de liaison du substrat de l'enzyme.

Dans le premier cas, il s'agit d'un outil très puissant mais il est impossible, pour l'instant, de l'utiliser dans notre laboratoire avec la GGT puisqu'elle est purifiée directement de l'organe. Un système efficace d'expression à partir du gène est actuellement mis au point et permettra ensuite de faire de la mutagenèse dirigée (résultats non-publiés). Dans le deuxième cas, un inhibiteur irréversible donne beaucoup d'informations sur le mécanisme d'une enzyme. Deux types d'inhibiteurs existent : d'une part, les inhibiteurs « suicides » réagissent non spécifiquement avec un ou des nucléophiles de l'enzyme, mais pas nécessairement dans le site actif. D'autre part, les inhibiteurs basés sur le mécanisme réagissent avec le nucléophile du site actif de l'enzyme et sont plus spécifiques à l'enzyme étudiée⁸⁰.

Le chlorure de phénylméthane sulfonyle (PMSF)¹⁵¹, l'iodoacétamide¹⁵², le *N*-acétylimidazole¹⁵³ et bien d'autres se classent dans la première catégorie. Ils servent à marquer des acides aminés accessibles dans le site actif d'une enzyme. Le PMSF, spécifique aux protéases avec des groupements hydroxyles, a été utilisé avec la GGT. Celui-ci agit comme inhibiteur seulement en présence de maléate qui induirait un changement de conformation chez la GGT pour découvrir le nucléophile⁴¹. L'iodoacétamide a également été testé pour identifier des résidus importants dans le site de liaison du substrat donneur de la GGT⁷⁶. Le *N*-acétylimidazole a été utilisé avec succès par Elce et Meister^{75,76}.

Dans la deuxième classe, les inhibiteurs doivent être synthétisés en tenant compte des éléments de reconnaissance nécessaires à une bonne liaison avec la protéine. Aussi ils peuvent apporter des informations spécifiques sur l'enzyme. Celle-ci peut être co-cristallisée avec l'inhibiteur et cela permet de vérifier la conformation de l'enzyme lorsqu'elle lie un substrat.

De nombreux inhibiteurs irréversibles de la GGT, faisant partie de cette dernière catégorie, existent. La γ -glutamyltranspeptidase est inhibée par incubation avec le 6-diazo-5-oxonorleucine (DON, **6.1a**)¹⁵⁴, la *O*-dialzo-acétyl-L-sérine (L-azasérine, **6.1b**), ou l'acide L-(α S,5S)- α -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazolacétique appelé aussi AT-125 ou acivicine (**6.2**)^{155,156} (Figure 6.1). Ces composés se lient au site de liaison du substrat donneur grâce à leur partie γ -glutamyle (ou analogue) et forment un lien covalent avec le nucléophile de la GGT.

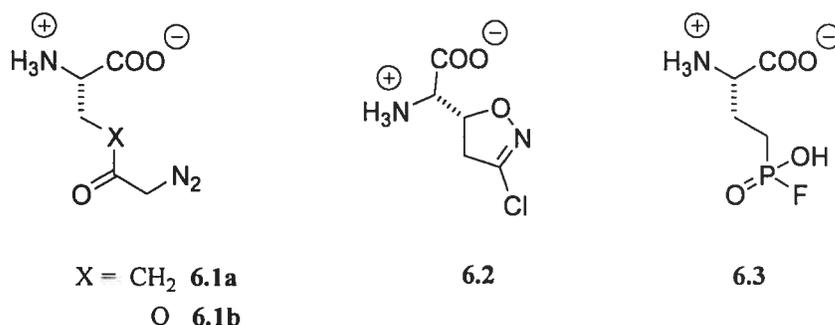


Figure 6.1 : Inhibiteurs supposément irréversibles de la GGT : le DON (**6.1a**), l'azasérine (**6.1b**), l'acivicine (AT-125, **6.2**) et le dérivé fluoré de l'acide 2-amino-4-phosphonobutyrique (**6.3**).

Parmi ces trois inhibiteurs, l'acivicine (**6.2**) est un inhibiteur irréversible hautement actif pour la GGT de l'ordre du micromolaire. L'activité enzymatique est cependant rétablie en incubant l'enzyme inhibée par l'acivicine avec de l'hydroxylamine (l'acivicine se comporte alors comme un inhibiteur réversible non-compétitif)^{155,156}. Un dérivé de l'acivicine, le thréo- β -hydroxy-L- γ -glutamyl hydroxamate, est alors relâché. De plus, c'est un inhibiteur non spécifique capable de se lier à différents acides aminés selon la source de l'enzyme. Le résidu marqué par l'acivicine, sur la GGT de rat, est la Thr-523¹⁵⁶, sur la GGT de porc, le résidu Ser-405 et sur la GGT humaine, la Ser-406 (correspondant au résidu Ser-405 des GGT de porc et de rat). Il semblerait aussi que l'acivicine puisse se lier à différents acides aminés par transestérification¹⁵⁶.

Avec la transpeptidase purifiée de reins de rat, les vitesses relatives d'inactivation par les L-azasérine, DON et acivicine sont dans un rapport 2 :5 :100². *In*

vitro, l'inhibition par le DON et l'acivicine est irréversible jusqu'à un certain point mais *in vivo*, l'inhibition apparaît être lentement réversible¹⁵⁷. Ces deux composés ont aussi le désavantage d'être non spécifiques, les deux inhibant plusieurs glutamine amidotransférases^{158,159,160}.

Cependant, ces inhibiteurs ne ressemblent pas à l'état de transition adopté par le substrat et l'enzyme lors de la réaction d'acylation. Des analogues de cet état sont connus pour être d'efficaces inhibiteurs d'enzyme⁸⁰. Ainsi, un autre inhibiteur de type irréversible **6.3** a été synthétisé récemment et utilisé avec la GGT de *E. coli* afin d'identifier son nucléophile⁴³. C'est un analogue d'état de transition avec une partie phosphonate. Le fluorure, bon groupe partant, rend l'inhibiteur très efficace, mais en contre-partie très instable dû à la possibilité d'une cyclisation intramoléculaire de l'azote. En effet, il a dû être testé à un pH de 5.7 ce qui n'est pas du tout le pH optimal pour la GGT. Après digestion de l'enzyme, inhibée irréversiblement, par des protéases et séparation des peptides par spectrométrie de masse, un résidu thréonine 391 en position *N*-terminale de la petite sous-unité a été identifié comme étant le nucléophile de la GGT de *E. coli*⁴³. Celui-ci est conservé dans toutes les GGT bactériennes et de mammifères (Annexe 1).

Aussi, un inhibiteur spécifique au site actif de la GGT, beaucoup plus stable que le dérivé fluoré, serait intéressant d'une part pour marquer l'enzyme de manière irréversible afin d'identifier le nucléophile chez la GGT de rat, mais aussi apporter des informations concernant son mécanisme. De plus, différents inhibiteurs irréversibles connus dans la littérature pour inhiber des protéases seront testés avec la GGT de rat.

6.2. Inhibiteurs de protéase à sérine ou cystéine

6.2.1. Introduction

Lors d'une collaboration avec le professeur Badet (chercheur au CNRS, Gif-sur-Yvette, France), des inhibiteurs potentiellement irréversibles mimant la structure d'une L-glutamine nous ont été offerts généreusement pour les tester avec la GGT de rat¹⁶¹. Leur structure est représentée à la Figure 6.2.

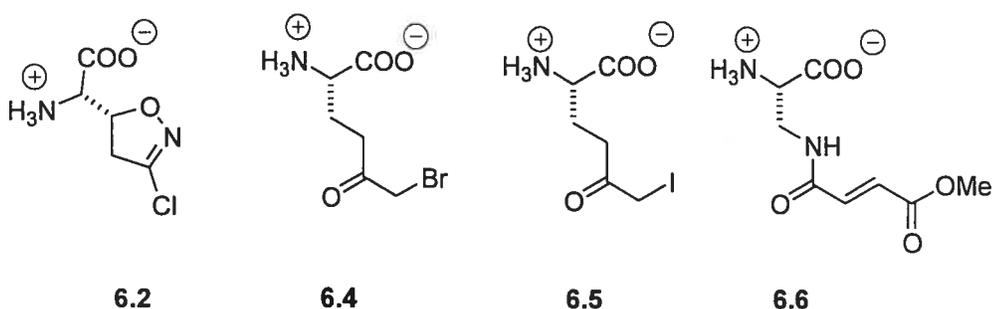


Figure 6.2 : Inhibiteurs irréversibles de la glucosamine synthétase¹⁶¹ (enzyme étudiée par le professeur Badet) : l'acivicine **6.2**, l'acide L-2-amino-6-bromo-5-oxo-hexanoïque **6.4**, l'acide L-2-amino-6-iodo-5-oxo-hexanoïque **6.5**, l'acide L-3-(2-amino-2-carboxyéthylcarbamoyl)-acrylique méthyl ester **6.6**.

L'acivicine **6.2** a été testée avec la GGT de reins de rat afin de déterminer sa constante d'inhibition irréversible K_i et sa constante d'inactivation k_{inact} , puisque, dans la littérature, le K_i n'est pas explicitement donné pour la GGT de rat dans les conditions normalement utilisées pour les tests d'activité.

Les inhibiteurs **6.4** et **6.5** sont utilisés contre des protéases à sérine ou cystéine¹⁶¹. Les cétones α -halogénées sont une des premières classes d'inhibiteurs existantes à avoir été utilisées contre les enzymes chymotrypsine et trypsine¹⁶². Ces composés sont comparables de par leur structure au DON **6.1**, efficace contre la GGT. Le composé **6.6** est un inhibiteur de type Michael, reconnu pour inhiber irréversiblement uniquement les protéases à cystéine. Néanmoins, il a été testé avec la GGT.

6.2.2. Résultats obtenus et discussion

6.2.2.1. L'acivicine 6.2

L'acivicine est un analogue hétérocyclique de la glutamine avec une activité anti-cancéreuse et anti-tumorale reconnue¹⁶³. Cet antagoniste de la glutamine inactive irréversiblement la plupart des glutamine amidotransférases incluant la formylglycinamide ribonucléotide synthétase¹⁶⁴, la 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate amidotransférase¹⁶⁵, la CTP synthétase¹⁶⁶, la GMP synthétase et la carbamoyl phosphate synthétase¹⁵⁸. Cet inhibiteur non spécifique est capable aussi d'inhiber différentes GGT comme décrit dans la littérature¹⁵⁶.

Deux méthodes principales existent pour déterminer les constantes d'inhibition irréversibles d'un composé. Une première méthode nécessite la mise en compétition de l'inhibiteur avec un composé libérant un produit chromophore comme le L-GPNA. La réaction d'acylation de la GGT est suivie par spectrométrie visible pour une concentration fixe de L-GPNA, mais avec différentes concentrations de l'inhibiteur testé. À partir des courbes de pseudo-premier ordre obtenues, des constantes de vitesse observée k_{obs} sont déterminées pour l'inactivation de l'enzyme à chaque concentration d'inhibiteur. En prenant l'inverse de ces constantes en fonction des diverses concentrations d'inhibiteur, il est possible de trouver la constante de vitesse d'inactivation k_{inact} et la constante d'inhibition K_I ¹⁶⁷. L'avantage de cette méthode est le suivi de manière continue de la réaction d'inactivation et le faible nombre de manipulations. Une deuxième méthode nécessite la préincubation de l'enzyme avec différentes concentrations de l'inhibiteur. À différents temps, des aliquots sont prélevés et des tests d'activité sont effectués, permettant d'évaluer l'activité résiduelle de l'enzyme. Des courbes sont ainsi tracées pour chaque concentration d'inhibiteur en fonction du temps. Une constante k_{obs} est obtenue à partir de chacune de ces courbes et le même calcul que la première méthode est effectué. Cette méthode nécessite plus de manipulations mais ne nécessite pas de compétition avec un substrat chromophore.

La première méthode a été choisie. Aussi, nous avons déterminé le K_I de l'acivicine pour la GGT de reins de rat, en présence de 400 μM de L-GPNA (correspondant environ au K_M de ce substrat en absence d'inhibiteur) et de 20 mM de Gly-Gly (en concentration saturante) à pH 8.0 et 37°C afin de la comparer aux autres inhibiteurs supposément irréversibles testés avec la GGT. Les résultats finaux sont montrés à la Figure 6.3.

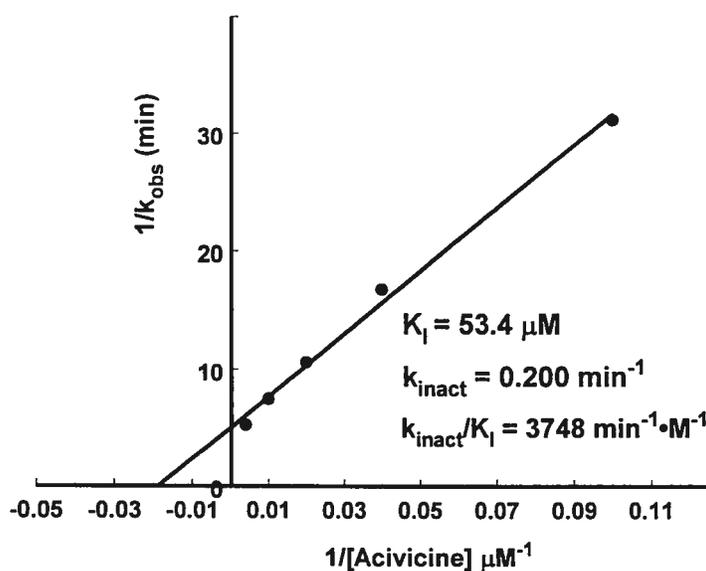


Figure 6.3 : Courbe d'inactivation pour l'acivicine en présence de 400 μM de L-GPNA et 20 mM de Gly-Gly à pH 8.0 et à 37°C pour la GGT de reins de rat.

La valeur du K_I est l'inverse de l'abscisse à l'origine et le k_{inact} , l'inverse de l'ordonnée à l'origine. Un K_I de 53 μM a été trouvé avec un k_{inact} de 0.200 min^{-1} , ce qui est comparable avec les valeurs trouvées dans la littérature^{168,169}. Ces valeurs démontrent que l'acivicine est de loin un bien meilleur inhibiteur que le KCNO présenté au chapitre 2. Un K_I de 420 μM et un k_{inact} de 0.18 min^{-1} ont été trouvés lors de l'inhibition irréversible de la GGT d'*Ascaris suum* par l'acivicine¹⁶⁸. Par contre, pour la GGT de reins de rat, un K_I de 0.6 mM a été constaté à un pH de 7.5 avec une méthode

expérimentale différente¹⁶⁹. Ces résultats seront comparés aux composés **6.4**, **6.5** et **6.6** de la section suivante.

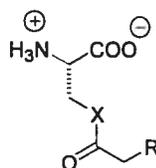
6.2.2.2. Les composés **6.4**, **6.5** et **6.6**

6.2.2.2.1. Résultats

Ces inhibiteurs ont été testés en présence de 20 mM de Gly-Gly (en concentration saturante) en compétition avec 400 μM de L-GPNA avec la GGT de rat à pH 8.0 et à 37°C de la même manière que pour l'acivicine. Aucune inhibition irréversible n'a été observée pour des concentrations allant jusqu'à 5 mM pour les trois composés après 45 min de réaction. Cependant, une baisse de la pente initiale a été observée pour la libération de *p*-nitroaniline à partir du L-GPNA.

Aussi, des IC_{50} ont été mesurés pour chacun des inhibiteurs afin de voir s'ils sont reconnus par la GGT grâce aux pentes obtenues. Les résultats se trouvent dans le Tableau 6.1.

Tableau 6.1 : IC_{50} déterminés pour les inhibiteurs **6.4**, **6.5** et **6.6** contre la GGT en présence de 400 μM de L-GPNA.



Inhibiteurs (X, R)	IC_{50} (mM)
DON (CH_2, N_2) 6.1a	2 ^a
(CH_2, Br) 6.4	7
(CH_2, I) 6.5	8.4
(NH, $\text{CH}=\text{CHCOOMe}$) 6.6	6.4

^a K_1^{app} déterminé dans la littérature¹⁶⁹.

Les IC_{50} trouvés sont de l'ordre du mM pour les trois produits **6.4**, **6.5** et **6.6**, testés en présence de GGT. Ils ne sont donc pas très efficaces surtout lorsqu'ils sont comparés à l'acivicine **6.2**, mais les valeurs trouvées restent du même ordre de grandeur que le DON **6.1a**¹⁵⁴. Nous avons voulu vérifier par une deuxième méthode (*cf* section 6.2.2.1) si ces composés sont des inhibiteurs irréversibles de la GGT. Pour cela, des préincubations avec la GGT ont été faites durant 30 min avec 5 mM du composé **6.4**. Aucune variation d'activité spécifique n'a été observée par rapport à l'expérience témoin sans inhibiteur. Il est normal de penser que ce résultat aurait été obtenu avec les autres composés dû à leur ressemblance. Donc, ces inhibiteurs ne sont pas irréversibles, mais semblent être reconnus par la GGT. Il est difficile d'affirmer si leur site de liaison est plutôt celui du donneur ou de l'accepteur, les quantités rendues disponibles grâce au professeur Badet ne permettant pas de le vérifier. Cependant, ils comportent tous un squelette γ -glutamyle et ceci pourrait faciliter vraisemblablement leur liaison dans le site de liaison du substrat donneur.

6.2.2.2.2. Interprétation des résultats

Il est à noter que le DON **6.1a**, une diazométhyl cétone, est un inhibiteur irréversible de la GGT contrairement aux dérivés cétones α -halogénées, malgré leur ressemblance. Les composés α -diazo cétones sont connus pour être des inhibiteurs irréversibles des protéases à cystéine¹⁷⁰, mais certaines protéases à sérine^{171,172} et le protéasome peuvent être aussi inhibés¹⁷³. Le mécanisme d'inhibition n'est pas bien élucidé. Dans le cas des protéases à cystéine, il impliquerait le transfert d'un proton d'un résidu histidine de l'enzyme sur le carbone α et un réarrangement avec élimination d'azote pour inhiber de manière irréversible l'enzyme⁸⁰ (Schéma 6.1).

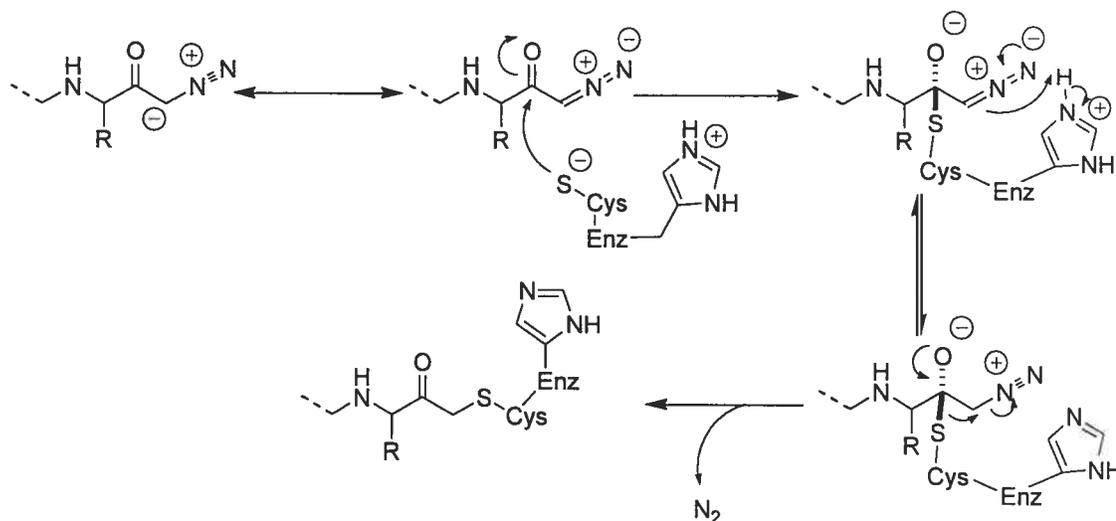


Schéma 6.1 : Mécanisme d'inhibition proposé d'une diazométhyl cétone en présence de protéase à cystéine⁸⁰. R représente une chaîne latérale d'un acide aminé.

Cependant, l'inhibition des enzymes thermitase et subtilisine, des protéases à sérine, par des dérivés diazométhanes peptidiques suivie d'une dénaturation des complexes résultants, montrent un résidu histidine marqué dans le site actif de l'enzyme¹⁷⁴. Il semblerait donc que ce n'est pas toujours le nucléophile principal qui soit marqué par l'inhibiteur irréversible.

Ceci rejoint le mécanisme décrit pour les inhibiteurs cétones α -halogénées dont le mécanisme pour les protéases à sérine est montré au Schéma 6.2⁸⁰. Un des intermédiaires du mécanisme est un époxyéther. L'addition du nucléophile sérine génère une halohydrine transitoire qui s'époxyde spontanément. L'ouverture de cet époxyde par le noyau imidazole de l'histidine inactive irréversiblement l'enzyme par une alkylation de l'azote. Pour les protéases à cystéine, le mécanisme n'est pas bien connu et il existe deux possibilités. La première est l'attaque de la cystéine directement sur le carbone portant l'halogène pour former un thioéther. La deuxième possibilité implique la formation d'un thiohémicétal par attaque du soufre sur le carbonyle suivie d'un réarrangement pour donner l'adduit final thioéther. Donc les protéases à cystéine et à sérine offrent deux mécanismes différents et l'acide aminé marqué n'est pas le

même. Pour les protéases à sérine, le mécanisme implique la présence d'un résidu histidine à proximité pour inhiber l'enzyme (Schéma 6.2).

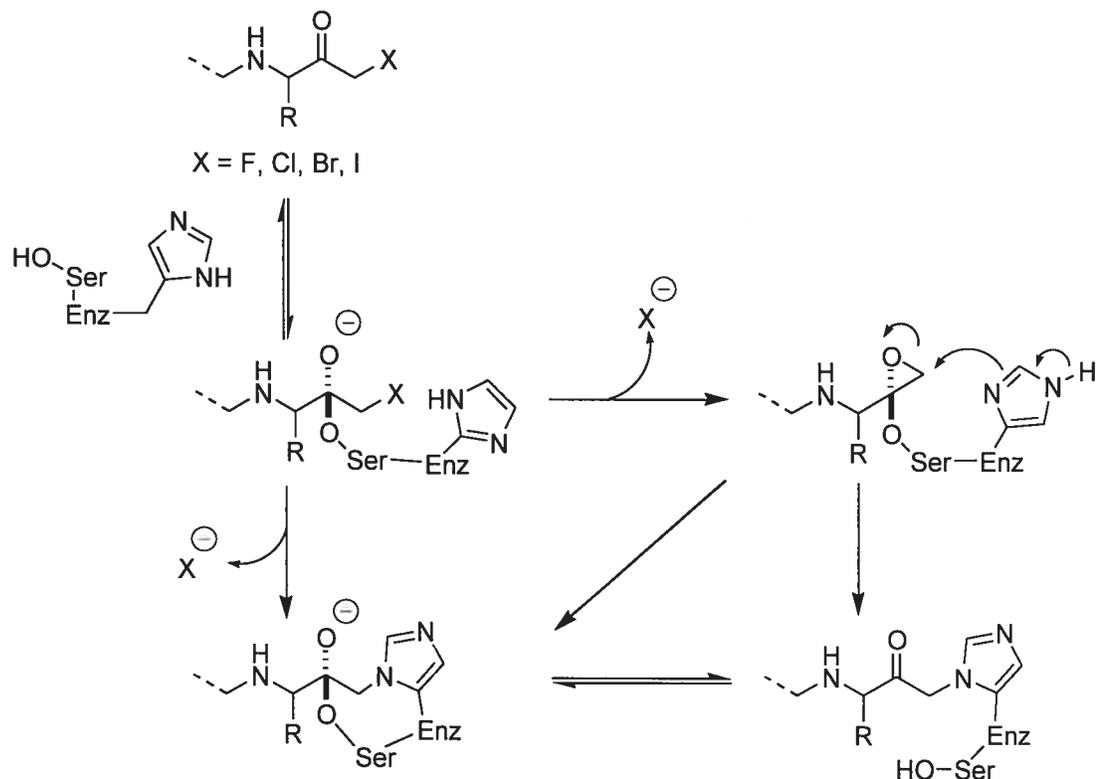


Schéma 6.2 : Inactivation des protéases à sérine par des inhibiteurs de type cétone α -halogénée *via* un résidu histidine⁸⁰. R représente une chaîne latérale d'un acide aminé.

Dans le cas de la GGT, la courbe de van't Hoff (chapitre 2) a montré qu'une histidine pourrait être l'acide général qui permettrait la protonation du groupe partant lors de l'étape d'acylation, donc cet acide aminé serait sous sa forme protonnée. En considérant le Schéma 6.1, le mécanisme d'inactivation d'une enzyme par un dérivé diazo-cétone implique une histidine possiblement présente dans un transfert de proton sur le groupement méthylène ou l'histidine pourrait être impliquée dans une attaque nucléophile comme décrit dans le Schéma 6.2. Aussi, pour la GGT qui possède une histidine protonnée, un transfert de proton serait possible sur le DON 6.1a après avoir réagi avec l'enzyme, mais une inhibition par attaque de l'histidine serait impossible avec les composés 6.4 et 6.5. Ceci pourrait être une explication pourquoi le DON 6.1a fonctionne comme inhibiteur irréversible et non les dérivés halogénés 6.4 et 6.5. Ceci

reste hypothétique; dans la littérature, aucun acide aminé marqué par le DON n'a été identifié. Le DON [^{14}C] a permis de marquer de manière covalente et stœchiométrique la petite sous-unité de la GGT humaine³⁶.

Le composé **6.6** fonctionne plutôt pour des protéases à cystéine, un thiolate étant plus nucléophile qu'un alcool d'une sérine ou une thréonine tel que démontré dans la littérature¹⁷⁵. Le mécanisme se fait selon une addition de type Michael sur le carbone en β par un résidu cystéine suivi d'une protonation par une histidine pour former un thioéther (Schéma 6.3)^{176,177}. Or, la mutation de la seule cystéine sur la petite sous-unité de la GGT n'a pas modifié l'activité de l'enzyme³⁹.

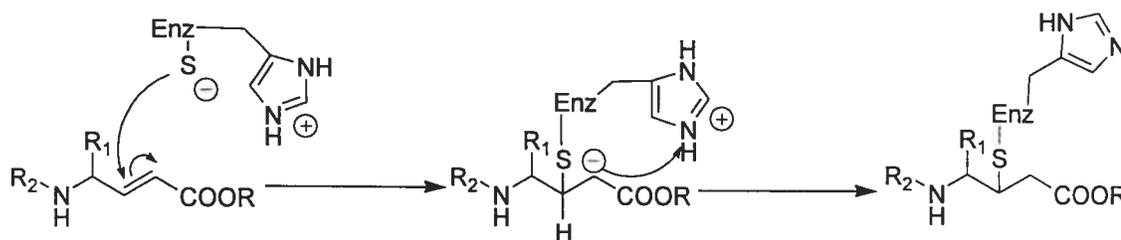


Schéma 6.3 : Mécanisme d'inhibition des protéases à cystéine par des dérivés α,β -insaturés. R, R₁ et R₂ représentent des chaînes alkyles¹⁷⁶.

Ces composés ne sont donc pas des inhibiteurs irréversibles de la GGT. Celle-ci les reconnaît en tant qu'inhibiteurs réversibles. Ils possèdent les éléments de reconnaissance essentiels, mais aucun lien covalent ne se forme aux concentrations utilisées. Aussi, une autre génération d'inhibiteurs, comportant une fonction phosphonamide analogue à l'état de transition et mimant le glutathion, a été synthétisée afin d'identifier le nucléophile.

6.3. Inhibiteurs de type phosphonamide

6.3.1. Introduction

L'inhibiteur phosphoré le plus utilisé est le diisopropylfluorophosphate (DFP). Il inhibe irréversiblement la plupart des protéases à sérine^{80,178}. Les phosphonates sont aussi très utilisés comme inhibiteurs irréversibles pour les protéases à sérine tels les diphenyl esters d'un acide phosphonique¹⁷⁹. Ils sont stables et suffisamment réactifs vis-à-vis du groupement hydroxyle de la sérine, tel que démontré au Schéma 6.4.

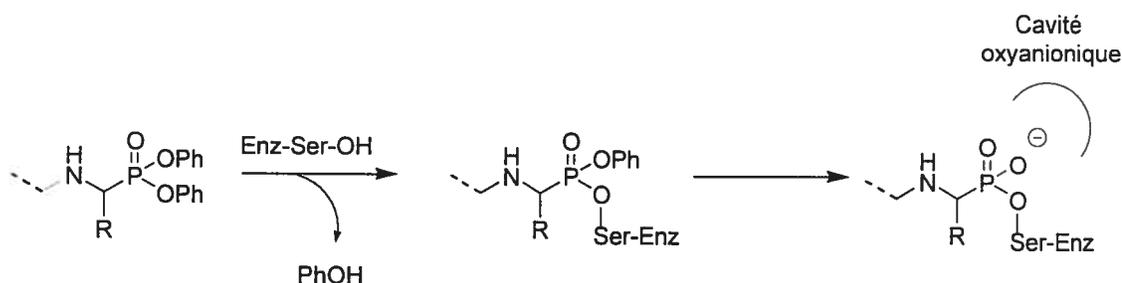


Schéma 6.4 : Inhibition des protéases à sérines par des phosphonates. R représente la chaîne latérale d'un acide aminé⁸⁰.

Cependant, la GGT n'a pas une activité estérase très importante²⁶. Des substrats donneurs contenant une fonction ester ont été testés, comme l'acide glutamique γ -éthyl ester et de grandes quantités de GGT sont nécessaires pour libérer l'éthanol, mais cette faible réactivité reste à étudier.

Un inhibiteur fluoré **6.3** avec une forte réactivité et une faible stabilité chimique a été utilisé avec la GGT de *E. coli* pour identifier le nucléophile⁴³. Dû à son manque de stabilité, le marquage a été effectué à bas pH (environ 5.5). À ce pH, selon la courbe pH-vitesse du chapitre 2, l'enzyme montre une très faible activité et peut présenter des changements de conformation. Pour éliminer ce problème et pour marquer de manière efficace la GGT de rat ressemblant beaucoup plus à la GGT humaine que la GGT de *E. coli*, nous avons donc voulu synthétiser une molécule plus stable à pH physiologique et

ressemblant au substrat naturel de la GGT, le glutathion. Notre attention s'est donc portée sur les phosphonamides comme analogue de l'état de transition comme montré au Schéma 6.5.

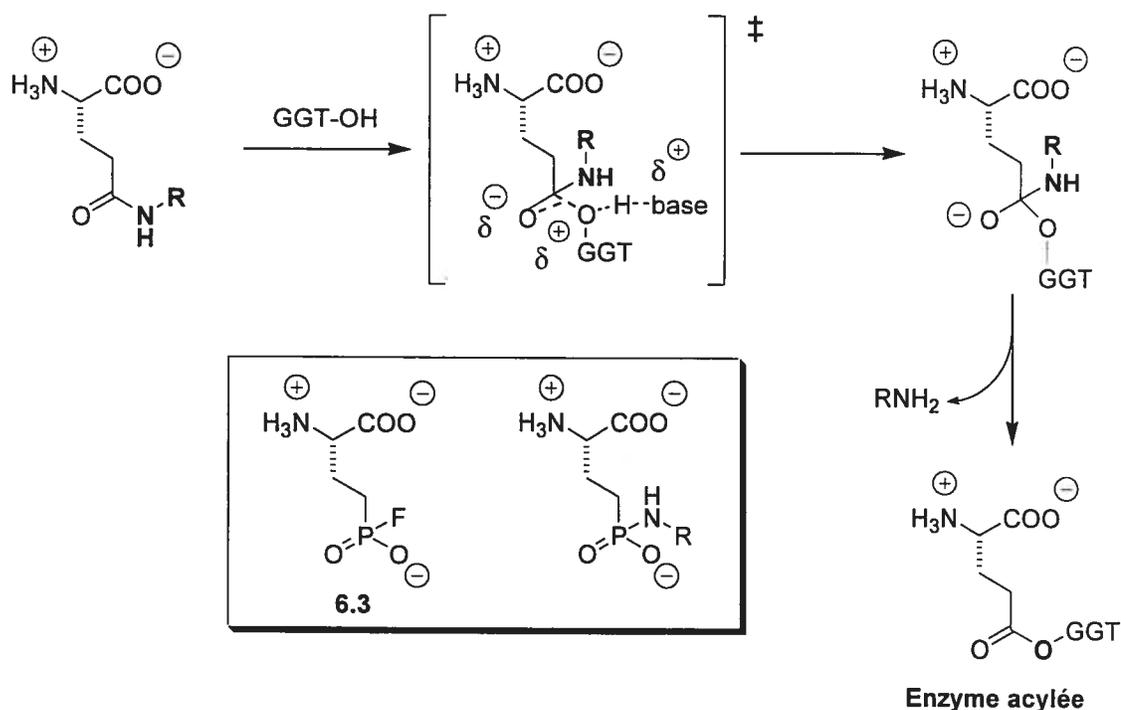


Schéma 6.5 : Mécanisme d'acylation de la GGT et analogues de l'état de transition (fluorophosphonate existant (6.3)⁴³ et phosphonamide proposé) pouvant agir comme inhibiteurs irréversibles de la GGT. R représente une chaîne alkyle.

Les phosphonamides¹⁸⁰ sont de puissants inhibiteurs d'enzymes comme les métalloprotéases¹⁸¹ et sont donc très intéressants pour élucider des mécanismes d'enzymes et dans le design d'haptènes¹⁸². Ce sont des isostères de peptides peu utilisés¹⁸³, leur synthèse étant assez difficile^{184,185,186}. Cependant, les phosphonamides sont entreposables et stables à bas pH : Janda et ses collaborateurs ont observé une décomposition d'un phosphonamide de moins de 2% après une semaine, à pH 3.5¹⁸⁷. Cependant, ils sont moins stables qu'un phosphonate : en effet, une liaison P-O dans un phosphonate est plus stable d'une énergie supérieure ou égale à 20 kcal/mol qu'une liaison P-N dans un phosphonamide¹⁸⁸.

Nous avons vu au chapitre 4 que les groupements ammonium et carboxylate de la L-glutamine étaient nécessaires pour une bonne affinité de l'enzyme sur ces substrats. De plus, dans le chapitre 5, l'analogue sulfoxyde du glutathion contenant une partie propionylglycine **5.14** a montré une très bonne affinité ($K_i = 53 \mu\text{M}$). La fonctionnalité sulfoxyde de L-SPG (**5.14**) pourrait être remplacée par une fonction phosphonamide avec une entité glycyglycine analogue à la partie cystéinyglycine du glutathion pour une meilleure reconnaissance dans les deuxième et troisième sous-sites de la GGT.

Ainsi, en combinant ces résultats, deux molécules pouvant agir comme inhibiteur irréversible de la GGT ont été envisagées, comme présenté à la Figure 6.4.

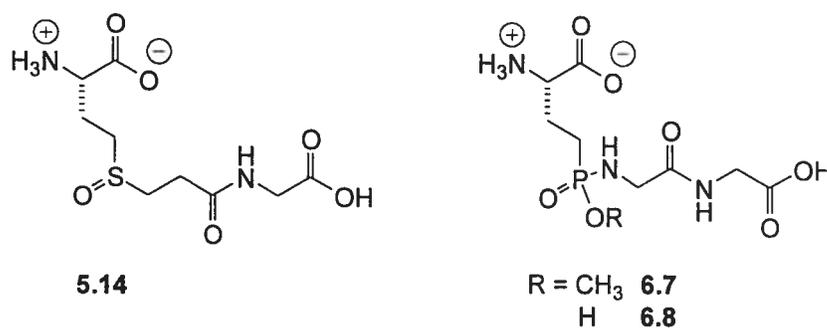


Figure 6.4 : Phosphonamides **6.7** et **6.8** proposés pouvant agir comme analogues du glutathion et du sulfoxyde L-SPG **5.14**.

Le méthyl ester sur la fonction phosphonamide rend la molécule beaucoup plus stable et moins sujette à l'hydrolyse que dans le cas d'un phosphonamide ne comportant pas d'ester, comme le suggère le Schéma 6.6¹⁸³. Cependant, la présence d'un méthyl ester peut empêcher une bonne reconnaissance par l'enzyme, puisqu'il y aurait encombrement stérique et/ou un manque d'interactions au niveau de la cavité oxyanionique.

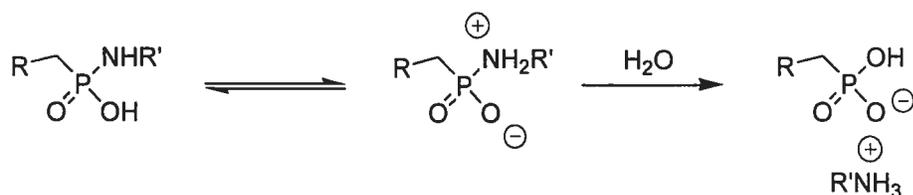


Schéma 6.6 : Dégradation d'un phosphonamide¹⁸³ en présence d'eau. R et R' représentent des groupements alkyles.

Donc, la molécule comportant un méthyl ester de l'acide phosphonique a été synthétisée afin d'être testée avec la GGT comme inhibiteur irréversible afin d'identifier le nucléophile de la GGT d'un mammifère pour la première fois.

6.3.2. Rétrosynthèses proposées

Les phosphonamides peuvent être synthétisés à partir de l'acide phosphonique ou d'un phosphonate comme décrit dans la littérature¹⁸⁵. Pour synthétiser des phosphonates ou des acides phosphoniques, précurseurs de phosphonamides, il existe différentes méthodes, les deux principales sont présentées dans le Schéma 6.7.

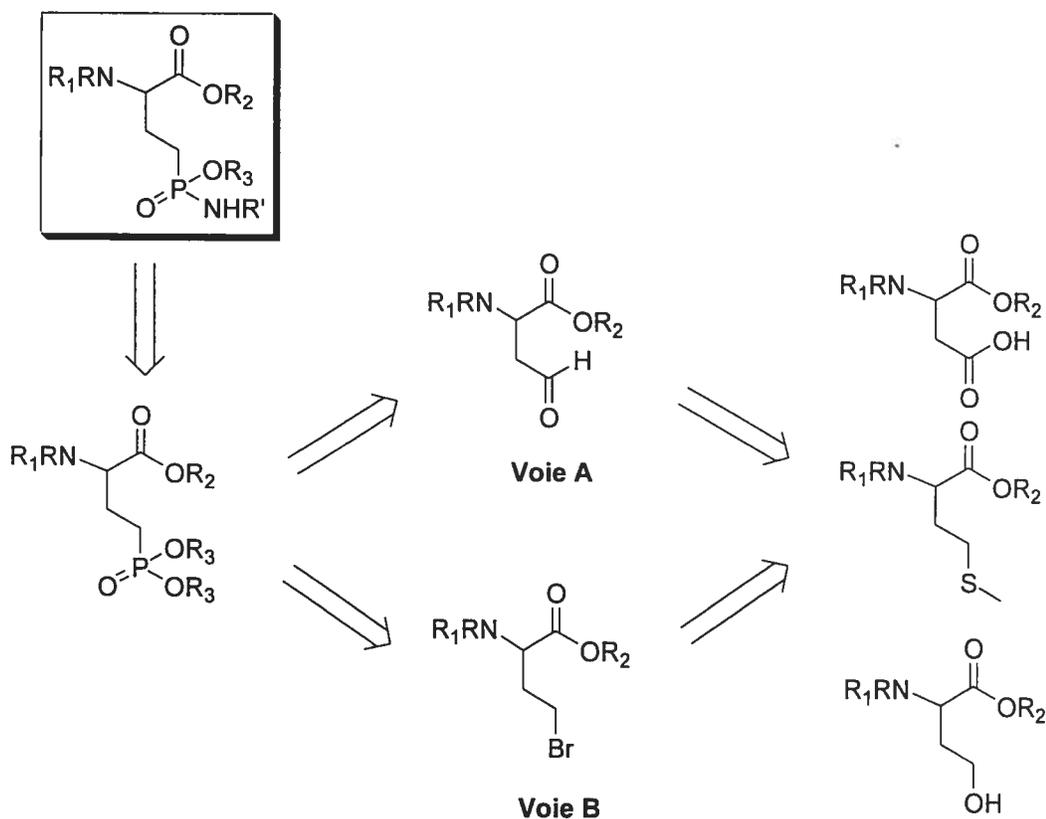


Schéma 6.7 : Deux rétrosynthèses possibles pour la synthèse du diméthyl ester de l'acide phosphonique, précurseur de phosphonamides. R, R₁ et R₂ représentent des groupements protecteurs de l'amine et de l'acide carboxylique, R₃ des groupements méthyles ou éthyles et R' un squelette d'acide aminé.

La première méthode (voie A) implique la synthèse d'un aldéhyde, précurseur du phosphonate, à partir de dérivés de l'homosérine¹⁸⁹, l'acide aspartique¹⁹⁰, la méthionine¹⁹¹ voire l'allylglycine¹⁹². Le dérivé α -hydroxyphosphonate peut être obtenu en condensant l'aldéhyde sur le diméthyl triméthylsilylphosphite. L'énorme avantage de cette méthode reste l'utilisation d'une grande variété de groupements protecteurs sur le groupement ammonium. En effet, des dérivés avec des groupements protecteurs Boc^{193,194} et Cbz^{195,196} ont pu être synthétisés avec succès. Le clivage du groupement hydroxyle pour se rendre au dérivé phosphonate désiré nécessite néanmoins deux étapes supplémentaires dont une réaction de Barton (ou apparenté)^{197,198}.

La deuxième méthode (voie B), la plus utilisée, consiste à obtenir le dérivé dialkylphosphonate par une réaction d'Arbuzov à partir de trialkyl phosphite et d'un dérivé bromé^{199,200}. Ce dernier peut être obtenu à partir de l'homosérine convenablement protégée¹⁴⁶ ou de la 2-aminobutyrolactone¹⁹⁹. L'homosérine et la lactone correspondante sont commerciales ou peuvent être obtenues à partir d'un acide aspartique²⁰¹ ou de la L-méthionine²⁰². Un des désavantages avec cette méthode est le groupement protecteur sur l'amine. S'il s'agit d'un groupement phthalyle, les rendements sont relativement bons¹⁹⁹. Par contre, si un groupement Cbz est utilisé, les rendements baissent considérablement dû à des réactions secondaires possibles. Une de celles-ci, décrite dans la littérature²⁰³, est le réarrangement présenté au Schéma 6.8. Le phosphite attaque le méthylène du groupement benzyle pour former le diméthyl benzylphosphonate.

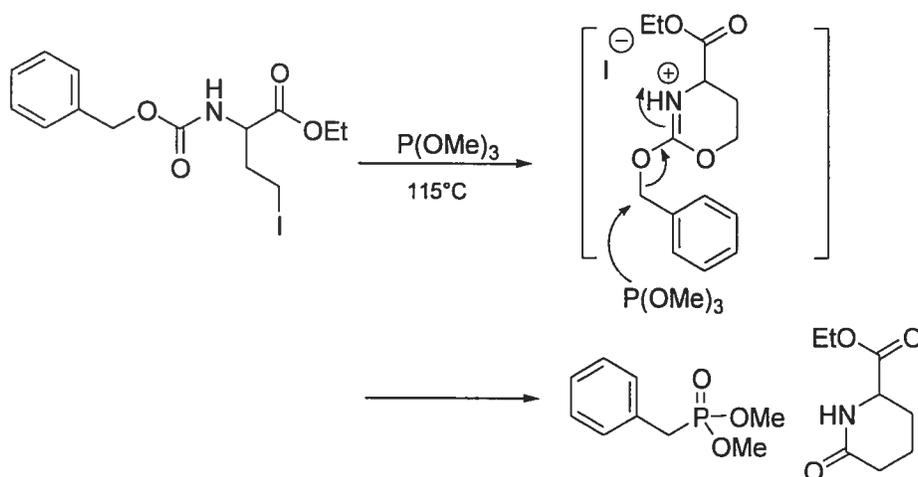


Schéma 6.8 : Réaction secondaire possible lors de la réaction d'Arbuzov en présence d'un groupement protecteur Cbz²⁰³.

Cette dernière méthode par une réaction d'Arbuzov, bien décrite dans la littérature, a été privilégiée. Des inhibiteurs de foylpolypoly- γ -glutamase synthétase ont été synthétisés par Coward et ses collaborateurs comme des dérivés γ -glutamyles²⁰⁴ (Schéma 6.9). Les dérivés phosphonates synthétisés en utilisant la réaction de Michaelis-Arbuzov permettent d'obtenir des γ -dipeptides phosphonates et phosphonamides.

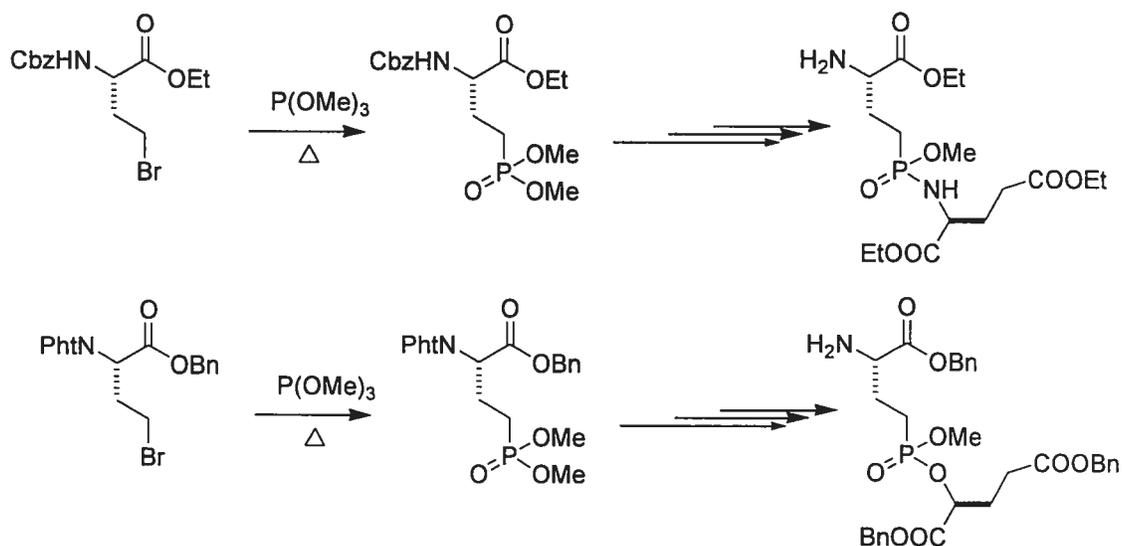


Schéma 6.9 : Synthèses de dérivés phosphonate et de phosphonamide selon la méthodologie de Coward et ses collaborateurs²⁰⁴.

Nous avons adopté cette méthodologie à nos phosphonamides puisqu'il existe une grande similarité des composés impliqués.

6.3.3. Résultats

6.3.3.1. Synthèses de bromoalcanes

Il faut, pour débiter, synthétiser un composé bromé donnant accès à un dérivé phosphonate de l'acide glutamique. Plusieurs méthodes existent pour la synthèse de bromoalcanes. Ils peuvent être synthétisés à partir de l'homosérine en présence de triphénylphosphine et du tétrabromure de carbone¹⁴⁶ ou du *N*-bromosuccinimide²⁰⁵. L'alcool de l'homosérine peut être aussi activé sous forme d'un mésylate pour être ensuite déplacé par le bromure de lithium dans l'acétone²⁰⁶. Une synthèse par voie radicalaire à partir de dérivés de l'acide glutamique basée sur le travail de Barton peut être possible²⁰⁷. Il est également envisageable d'obtenir le dérivé bromé par ouverture

d'une lactone en présence d'acide bromhydrique et d'acide acétique¹⁹⁹. Cette dernière technique a été utilisée permettant d'obtenir le composé désiré facilement.

La première étape consiste à obtenir la 2-aminobutyrolactone **6.9** à partir de la L-méthionine²⁰² tel que montré au Schéma 6.10. L'amine de la lactone est ensuite protégée par un groupement phthalyle avec l'anhydride phthalique en présence de triéthylamine à reflux pour donner le composé **6.10**. Cette lactone est ensuite ouverte en utilisant l'acide bromhydrique dans l'acide acétique pour obtenir notre dérivé bromé **6.11** avec un bon rendement.

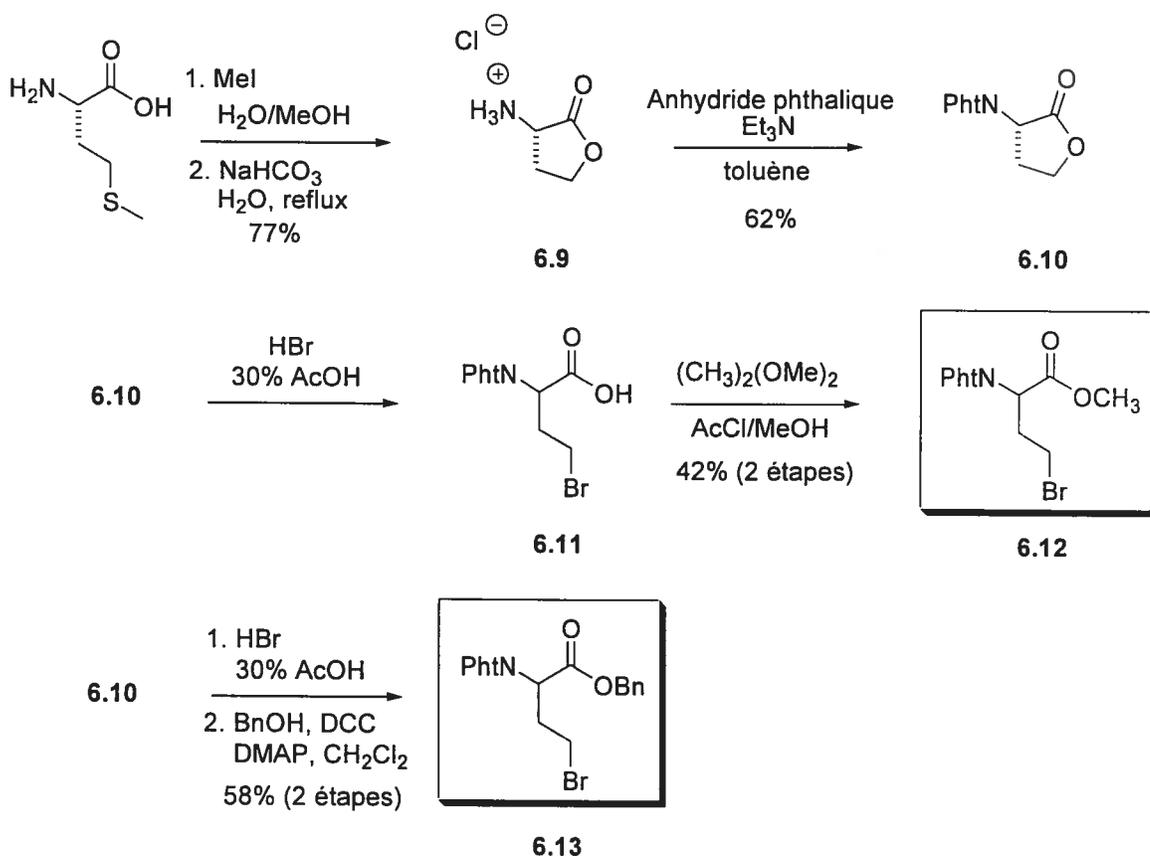


Schéma 6.10 : Synthèse des dérivés bromés méthyl ester **6.12** et benzyl ester **6.13**.

En mesurant le pouvoir rotatoire de cette molécule, nous nous sommes aperçus de la racémisation du stéréocentre en position α . La synthèse d'un dérivé de la vinylglycine, non racémique, a été rapportée avec le même intermédiaire **6.11** préparé de la même façon²⁰⁸. Aucun détail expérimental n'est cependant donné. Une solution commerciale et non fraîche d'acide bromohydrique dans l'acide acétique pourrait être la cause de cette racémisation. La synthèse a été poursuivie avec la molécule racémique de ce composé, la configuration du centre α -aminé n'étant pas très importante pour la GGT. En effet, tel que discuté dans le chapitre 1, les configurations (L) et (D) sont acceptées au niveau du substrat donneur, en position α , sans grande différence de reconnaissance et/ou de réactivité. L'estérification du dérivé **6.11** a été faite en présence de 2,2-diméthoxypropane et d'acide généré *in situ* pour donner le composé **6.12** comme un méthyl ester. Le dérivé **6.13** comportant un benzyl ester a été synthétisé en présence d'alcool benzylique et de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide avec racémisation.

De la même façon, nous avons synthétisé le dérivé bromé **6.16** à partir de la lactone **6.9** comme présenté au Schéma 6.11. Le dérivé **6.16** offre l'avantage de posséder tous les éléments de protection requis pour une déprotection finale par hydrogénéolyse.

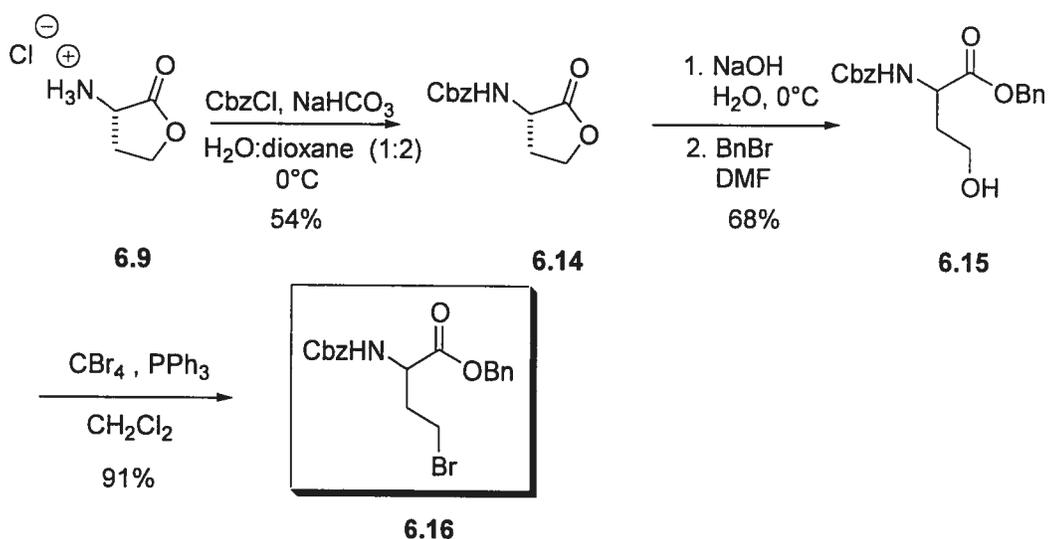


Schéma 6.11 : Synthèse du dérivé bromé **6.16** protégé par un groupement protecteur Cbz.

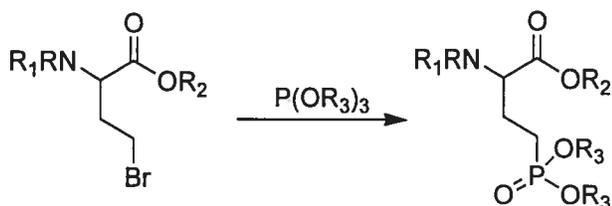
La première étape consiste en une protection du groupement ammonium libre de la lactone **6.9** par le chloroformate de benzyle. L'ouverture de la lactone **6.14** est faite en milieu basique pour former le carboxylate, qui est lui-même piégé sans purification supplémentaire par le bromure de benzyle pour donner le benzyl ester de l'homosérine **6.15** dans un rendement de 68%. Un des produits secondaires est la formation de la lactone. L'homosérine est ensuite transformée en un dérivé bromé **6.16** avec un rendement de 91%. La même séquence de synthèse a été effectuée pour obtenir le composé **6.15** comme un précurseur de la L-carnaline et aucun α_D n'a été rapporté²⁰⁹. Le seul pouvoir rotatoire rapporté pour le dérivé **6.16**, synthétisé dans la littérature²⁰⁷ à partir d'un dérivé de l'acide glutamique, est de -35° sans spécification du solvant, et nous avons trouvé un α_D de -1.6 . Avec ces informations en main, il est difficile d'affirmer si la molécule a été racémisée lors de la réaction d'ouverture de la lactone **6.14**.

Nous avons donc les dérivés **6.12**, **6.13** et **6.16** disponibles pour effectuer la réaction d'Arbuzov.

6.3.3.2. Réaction d'Arbuzov

La dernière étape permettant d'obtenir le dérivé phosphonate passe par la réaction d'Arbuzov. Celle-ci se fait généralement en présence de triméthylphosphite à $110-120^\circ\text{C}$. Cette réaction est bien décrite dans la littérature et a été réalisée en présence de différents groupements protecteurs, sur le groupement ammonium mais aussi sur l'acide, et avec différents phosphites^{199,203}. L'halogène en position γ est généralement un brome voire un iode²⁰³. La réaction d'Arbuzov a été faite avec les produits **6.12**, **6.13** et **6.16**. Nos résultats et ceux de la littérature sont rapportés dans le Tableau 6.2.

Tableau 6.2 : Réactions d'Arbuzov réalisées sur des dérivés possédant divers groupes protecteurs R, R₁ et R₂.



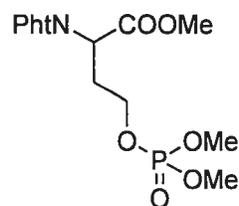
#	R, R ₁	R ₂	R ₃	Rendement (%)
1	Pht	CH ₃	CH ₃	79 (6.17)
2	Pht	Bn	CH ₃	71 (6.19)
3	Pht	Bn	C ₂ H ₅	61 ^a
4	Cbz, H	CH ₃	CH ₃	30 ^b
5	Cbz, H	C ₂ H ₅	CH ₃	64 ^b
6	Cbz, H	Bn	CH ₃	Mélange

^a Référence 200.

^b Référence 203.

Les réactions les plus efficaces ont été obtenues avec les dérivés phthalyles avec des rendements au-delà de 70% lorsque le triméthylphosphite est utilisé. Dans la littérature (entrées 4 et 5), des rendements assez faibles sont obtenus avec une protection Cbz du groupement aminé, des sous-produits sont souvent observés²⁰³. La réaction avec le composé bromé 6.16, après purification par chromatographie flash, a donné un mélange de composés difficiles à séparer avec un taux de conversion estimé inférieur à 30% par RMN ¹H. Les prochaines étapes ont donc été effectuées avec un groupement phthalyle comme groupement protecteur de l'amine, donc avec les composés 6.17 et 6.19.

Lors de la synthèse du composé 6.17, un produit secondaire très minoritaire (10%) a été observé et identifié notamment par spectroscopie RMN ³¹P et ¹H comme un phosphate diméthyl ester 6.18 (Figure 6.5).



6.18

Figure 6.5 : Produit secondaire de la réaction de 6.12 avec le triméthylphosphite.

Dans la littérature, une méthode de préparation douce est exposée pour la synthèse de phosphate 6.20 à partir d'alcool. Celui-ci réagirait avec une des deux espèces présentes en solution, soit le bromophosphate de diméthyle 6.22 (voie II, Schéma 6.12) ou son précurseur 6.21 (voie I, Schéma 6.12)²¹⁰.

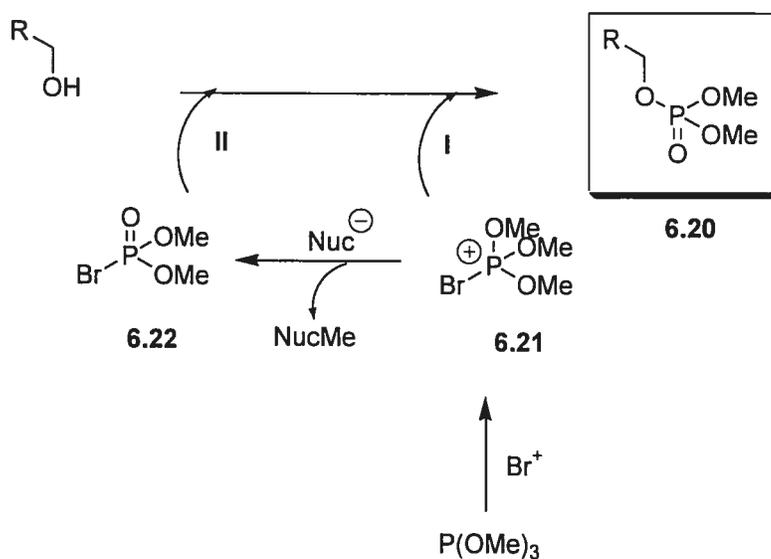


Schéma 6.12 : Synthèse possible du trialkylphosphate où Nuc représente un nucléophile présent en solution²¹⁰.

Le précurseur 6.21 est synthétisé à partir du triméthylphosphite en présence d'une source de Br^+ comme le tétrabromure de carbone. Le nucléophile permet d'éliminer un groupement méthyle pour former le phosphate 6.22. Cependant, dans le milieu réactionnel de notre étude, aucune source de Br^+ n'est disponible.

Aussi, une autre possibilité pour la synthèse du phosphate **6.18** dans notre système impliquerait la présence de triméthylphosphate dans le milieu réactionnel. En fait, une bouteille commerciale neuve de triméthylphosphite, vendue chez Aldrich, contient 0.5% de ce réactif et cette quantité peut augmenter avec l'utilisation.

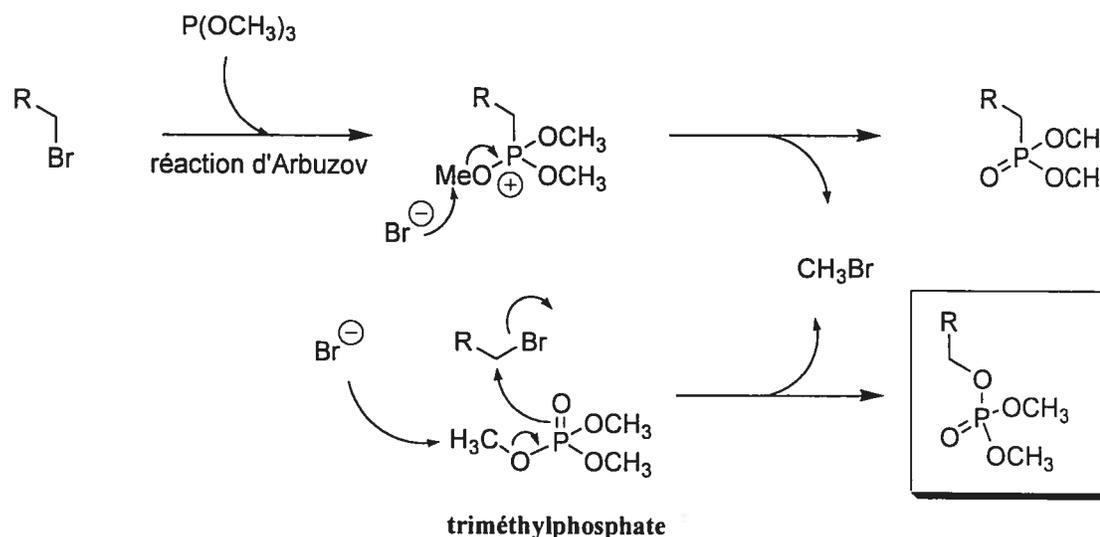


Schéma 6.13 : Synthèse possible du phosphate en partant du triméthylphosphite.

Cette voie (Schéma 6.13) demande la présence de triméthylphosphite oxydée en triméthylphosphate. De plus, la réaction d'Arbuzov implique une source de Br⁻ dans le milieu qui catalyserait l'attaque de l'oxygène du triméthylphosphate sur le dérivé bromé pour former le dérivé phosphate observé **6.18**. Ce mécanisme reste spéculatif, des expériences sont en cours au laboratoire pour en vérifier la pertinence.

6.3.3. Synthèse des dérivés phosphonamides

6.3.3.3.1. Synthèse du monoester de l'acide phosphonique

Nous avons maintenant en notre possession deux dérivés phosphonates **6.17** et **6.19**. Pour arriver à synthétiser un dérivé phosphonamide, il nous faut déprotéger un seul des esters de l'acide phosphonique et ensuite effectuer un couplage avec une amine de notre choix.

Différentes méthodes sont utilisées pour déprotéger sélectivement un méthyle ester de l'acide phosphonique diester sans toucher à l'autre ester ou bien aux groupements protecteurs sur le reste de la molécule. Ceci peut être fait en présence de NaI dans l'acétone à reflux¹⁸⁸, de 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane (DABCO) à reflux dans un mélange acétone/toluène²¹¹, de l'azoture de lithium²¹² ou de sodium²¹³ dans le DMF à 100°C. D'autres méthodes d'hydrolyse existent comme le thiophénol en présence de triéthylamine²⁰⁴. Ces techniques ont permis d'obtenir de bons rendements mais dépendent beaucoup du phosphonate.

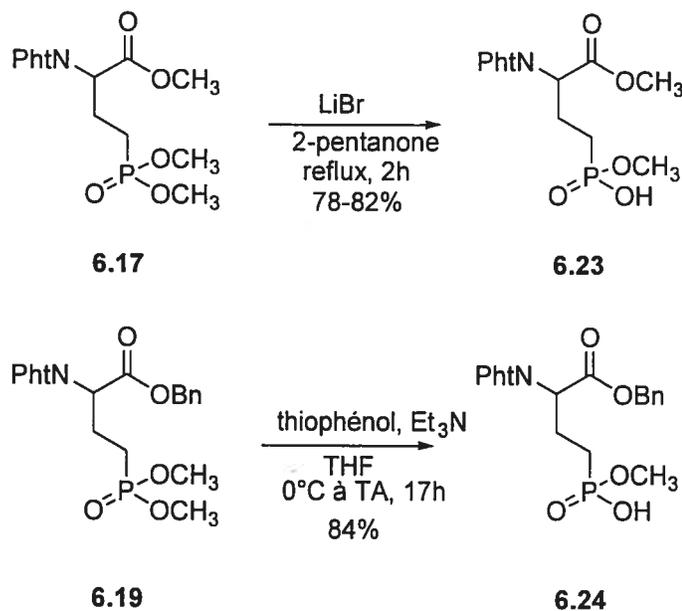


Schéma 6.14 : Synthèse des monoesters de l'acide phosphonique **6.23** et **6.24**.

Parmi toutes les techniques énumérées précédemment, la meilleure méthode pour obtenir le monométhyl ester de l'acide phosphonique **6.23** est le bromure de lithium à reflux dans le 2-pentanone pendant deux heures pour aboutir à des rendements autour de 80% (Schéma 6.14). En utilisant le DABCO, un mélange de composés très difficilement séparables est obtenu. Lorsque le groupement protecteur de l'acide carboxylique est un benzyl ester comme pour le dérivé **6.19**, la meilleure méthode est le thiophénol avec la triéthylamine²⁰⁴ pour obtenir le composé **6.24** avec un rendement de 84%. Lorsque d'autres méthodes sont utilisées comme le bromure de lithium ou le DABCO, les composés obtenus restent difficiles à séparer.

6.3.3.3.2. Synthèse des amines analogues (ou non) de la cystéinyglycine

Nous avons en main le dérivé monoester de l'acide phosphonique, il faut maintenant synthétiser l'amine qui sera couplée avec ce dernier pour obtenir le dérivé phosphonamide. Afin d'avoir une bonne reconnaissance par l'enzyme, des dérivés de la cystéinyglycine (présente dans le GSH) sont synthétisés. Il a été décidé de travailler sur des composés dérivés de la cystéine comme les dérivés cystine et *S*-acétamido-Boc-L-cystéine.

Le dérivé **6.27** a été synthétisé en trois étapes à partir de la cystine (Schéma 6.15). Celle-ci a été protégée au niveau de l'amine libre par un groupement Boc avec le di-*tert*-butyl dicarbonate en milieu basique pour donner le composé **6.25** dans un bon rendement. La méthode pour coupler l'acide **6.25** à la glycine benzyl ester utilise le tétrafluoroborate de benzotriazol-1-yl-oxy-1,1,3,3-tétraméthyluronium (TBTU)²¹⁴ comme agent de couplage pour donner le composé **6.26** dans un excellent rendement. Le benzyl ester a été choisi pour sa facilité de déprotection par hydrogénolyse.

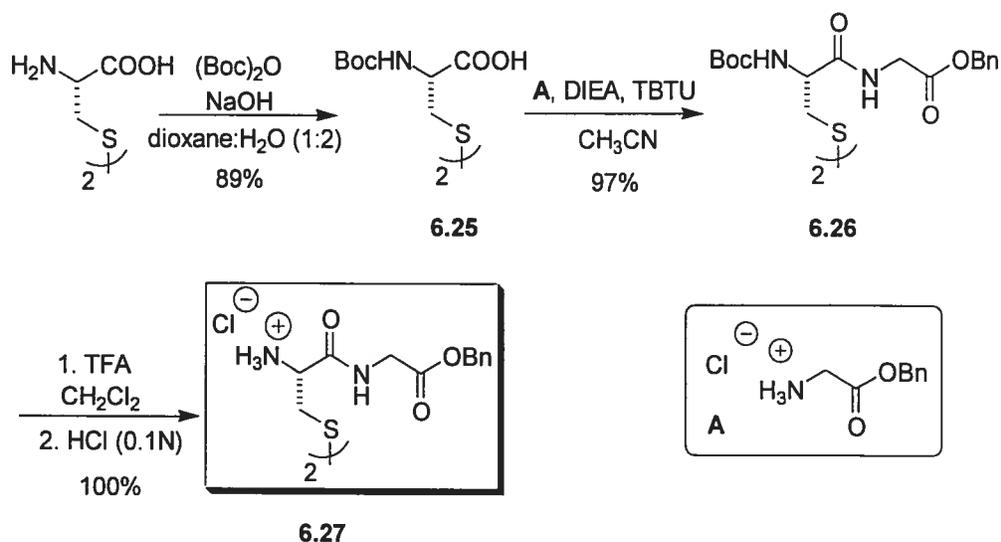


Schéma 6.15 : Synthèse du dérivé de la cystéinyglycine **6.27**.

La dernière étape consiste en la déprotection du groupement protecteur Boc par l'acide trifluoroacétique pour obtenir quantitativement le produit désiré **6.27**. Cependant, un désavantage possible de ce composé est la nécessité de le coupler avec 2 équivalents de dérivé phosphonate puisque le pont disulfure est présent. Des problèmes possibles d'encombrement stérique et les faibles rendements décrits¹⁸⁸ pour obtenir une fonction phosphonamide nous ont convaincus de synthétiser un autre dérivé **6.30** (Schéma 6.16).

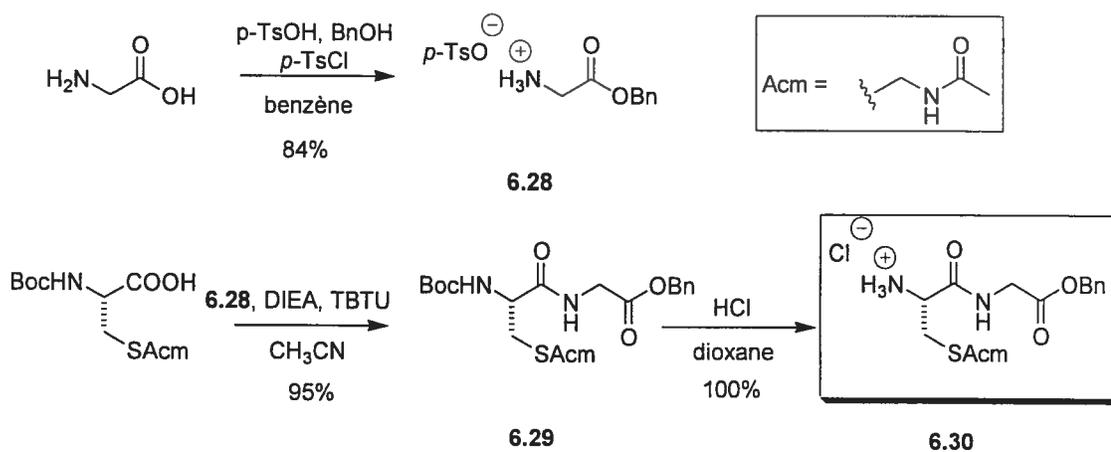


Schéma 6.16 : Synthèse du précurseur du dipeptide cystéinyglycine **6.30**.

Un autre précurseur de la cystine, la *S*-acétamido-Boc-L-cystéine, est disponible commercialement. Celui-ci est couplé avec la glycine benzyl ester **6.28** synthétisée dans le laboratoire selon un protocole déjà connu²¹⁵. La glycine benzyl ester est faite en présence d'alcool benzylique et d'acide *p*-toluène sulfonique anhydre pour obtenir le composé désiré **6.28** dans un bon rendement. Cette amine est couplée en présence du *S*-acétamido Boc-L-cystéine en présence de TBTU pour donner le composé désiré **6.29**. La dernière étape consiste en la déprotection en présence de HCl dans le dioxane de **6.29** permettant d'obtenir le dérivé **6.30** avec un excellent rendement.

Le groupement protecteur acétamdate peut être déprotégé en présence d'iode dans le méthanol avec de très bons rendements²¹⁶ pour obtenir un pont disulfure comme présenté dans le Schéma 6.17. Cette réaction pourra être répétée avec le phosphonamide correspondant. Ce pont disulfure peut être réduit pour obtenir la cystéine sous forme de thiol.

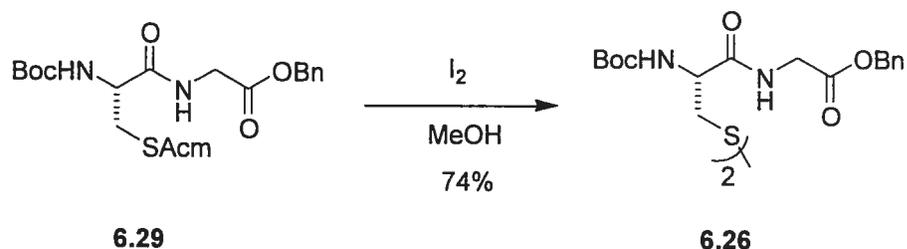


Schéma 6.17 : Synthèse du dérivé **6.26** à partir de **6.29**.

La glycyglycine benzyl ester que nous voulons aussi coupler au monoester de l'acide phosphonique, dans le but d'avoir un analogue du dérivé sulfoxyde **5.14**, est commerciale.

6.3.3.3. Synthèse du phosphonamide

Nous pouvons maintenant coupler les amines synthétisées et celle commerciale avec l'acide phosphonique monoester. Généralement, les phosphonates ou les phosphonamides sont synthétisés à partir des phosphonochloridates ou les phosphonodichloridates.

À partir des phosphonodichloridates, il est possible de synthétiser des phosphonamides mono ester avec un équivalent d'amine, un équivalent d'alcool en présence de base. Les principales modifications viennent de la base ajoutée. Cela peut être la pyridine à -20°C avec des rendements de 40%²¹⁷ ou bien la triéthylamine²¹⁸. Finalement, la diisopropyléthylamine en présence de 1H-tétrazole en quantité catalytique s'est avérée la meilleure méthode dans la littérature avec des rendements autour de 60%²¹⁹.

Dans notre cas, les monochloridates peuvent être synthétisés à partir des diesters de l'acide phosphonique par réaction avec le pentachlorure de phosphore²²⁰, à partir du monoester avec du chlorure de thionyle¹³⁷ ou en utilisant le chlorure d'oxalye²⁰³.

Tableau 6.3 : Synthèse des dérivés phosphonamides à partir du monoester de l'acide phosphonique et de diverses amines analogues à la cystéinylglycine.

R	R_1NH_2	Rendement (%)
CH ₃	 6.27	N/O ^a
Bn	---	--- ^b
CH ₃	 6.30	62 (6.32)
Bn	---	--- ^b
CH ₃	 6.31	52-58 (6.33)
Bn	---	74 (6.34)

^aN/O : non observé avec 3 éq. de l'acide 6.23 et 1 éq. de l'amine 6.27.

^bRéaction non essayée.

Nous avons synthétisé les phosphonamides par activation de l'acide phosphonique monométhyl ester en présence de chlorure d'oxalyle et d'une quantité catalytique de DMF pour accélérer la réaction. L'amine (2 équivalents) est ensuite canulée sur le chlorure de l'acide phosphonique en présence de triéthylamine (8 équivalents). La réaction est laissée une nuit sous agitation à température ambiante. Ces conditions ont été optimisées et les rendements demeurent autour de 50-60% (Tableau 6.3). En

répétant la réaction avec 3 équivalents d'amine, le rendement pour obtenir le composé **6.33** reste toujours autour de 60%. Ces rendements moyens peuvent être attribués à la formation d'anhydride de l'acide phosphonique à la suite de la décomposition du phosphonochloridate²²¹. La réaction a été essayée avec le chlorure de thionyle mais n'a donné aucun résultat satisfaisant puisqu'elle donne un mélange de composés non purifiables et indistinguables par RMN ¹H. Dans la littérature, les rendements sont toujours meilleurs en présence de chlorure d'oxalyle qu'en présence de chlorure de thionyle¹⁸⁵. Lorsque l'amine **6.27** comportant un pont disulfure est utilisée, le couplage ne fonctionne pas, ceci étant peut-être dû à l'encombrement stérique.

Pour optimiser les réactions à suivre, la synthèse a été poursuivie avec le phosphonamide **6.34** qui comporte des groupements benzyliques labiles par hydrogénation. De plus, ce composé une fois déprotégé est un bon analogue du dérivé sulfoxyde **5.14** et donc possiblement un bon inhibiteur irréversible.

6.3.3.3.4. Déprotection du dérivé phosphonamide **6.34**

Il reste maintenant à déprotéger le dérivé **6.34**. Cependant, certaines étapes peuvent s'avérer plus difficiles et l'ordre des déprotections peut alors devenir important.

Plusieurs méthodes existent pour cliver le groupement phthalyle, telles l'hydrazine²⁰⁴ ou le borohydrure de sodium en présence d'acide acétique^{222,223}. Le groupe de Coward a effectué la déprotection du groupement amino, en présence d'hydrazine dans le méthanol, d'un phosphonate monométhyl ester (Schéma 6.18)²⁰⁴.

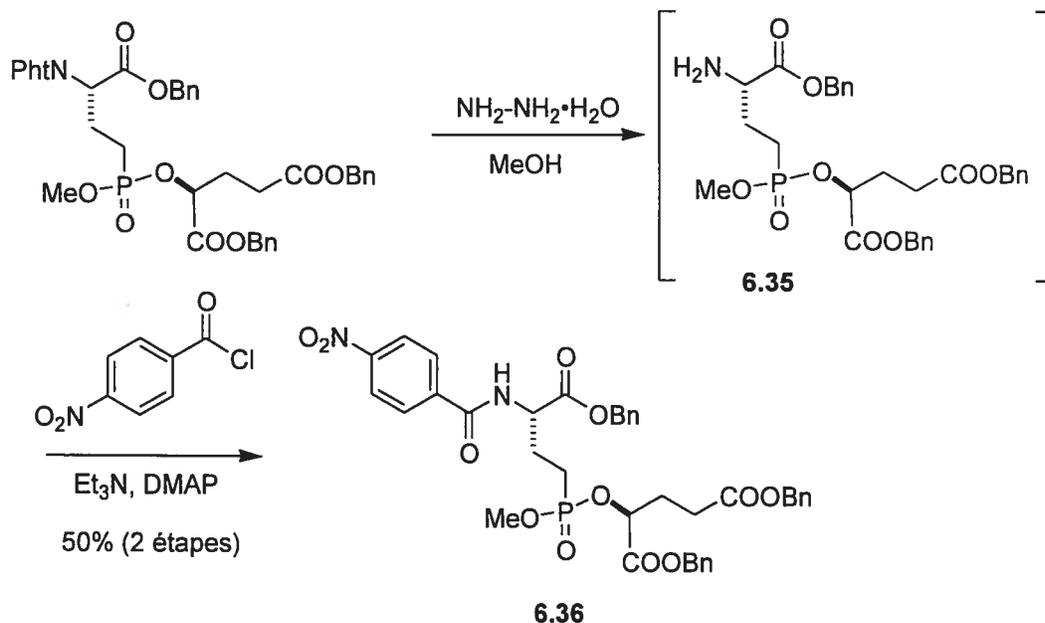


Schéma 6.18 : Synthèse du phosphonate **6.36** d'après le groupe de Coward²⁰⁴.

Le même protocole que celui utilisé dans le Schéma 6.18 a été suivi pour le composé **6.34**²⁰⁴. La réaction a été réalisée à 70°C comme il est décrit. Dans notre cas, cela a entraîné une décomposition complète du produit, visible par RMN ^1H et surtout par RMN ^{31}P . La même réaction a été effectuée en présence d'hydrazine (1 éq.) à 4°C puis à température ambiante pendant plusieurs jours avec un suivi par CCM. Ensuite, l'amine a été directement protégée par un groupement Cbz (Schéma 6.19) afin de purifier efficacement le produit obtenu.

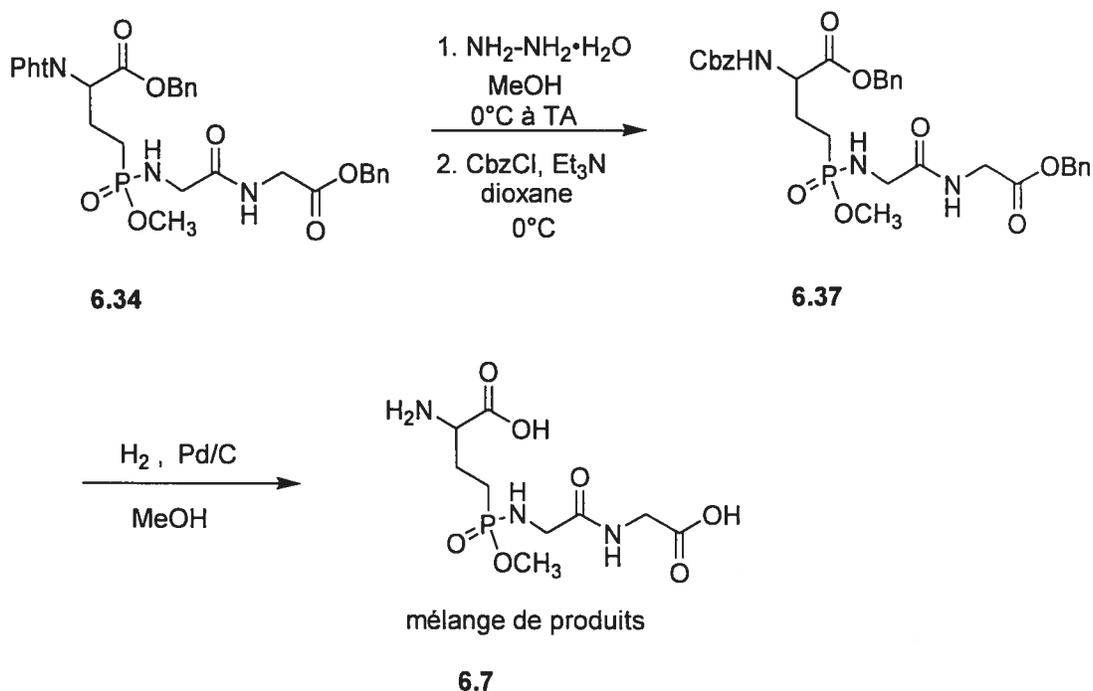


Schéma 6.19 : Essai de synthèse du dérivé phosphonamide **6.7**.

Cette réaction menant à la synthèse de **6.37** donne plusieurs produits secondaires. Cependant, la purification laborieuse par chromatographie flash des différents produits présents dans le milieu a permis d'obtenir le dérivé voulu majoritaire **6.37** avec quelques impuretés. Ensuite, celui-ci a été hydrogéné, mais a donné un mélange de produits non identifiables par RMN ^1H et ^{31}P . L'hydrogénation semble avoir causé un clivage direct ou indirect du lien phosphonamide. Les mêmes conditions que celles utilisées dans la littérature pour un composé similaire ont pourtant été utilisées pour hydrogéner le groupement protecteur Cbz avec un très bon rendement²⁰³ (Schéma 6.20).

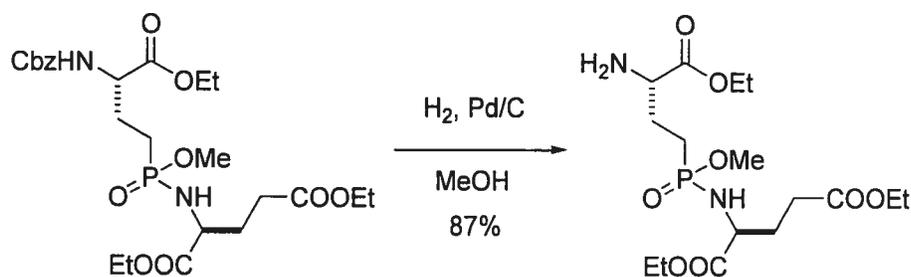


Schéma 6.20 : Synthèse d'un phosphonamide par hydrogénation (Coward *et coll.*)²⁰³.

Une explication possible pour ce résultat est une dégradation du produit avec participation des groupements acides carboxyliques libres après hydrogénation.

Aussi, pour vérifier cette idée, les réactions de déprotection du dérivé **6.34** ont été inversées. Il s'agit de déprotéger, dans un premier temps, les groupements esters benzyliques du composé **6.34** par hydrogénation et ensuite le groupement phthalyle (Schéma 6.21). Le produit désiré a été obtenu avec une pureté assez grande après hydrogénation, donc la dernière étape de déprotection a été faite en présence d'hydrazine (3 éq.) à température ambiante. Un mélange de produits a été obtenu et confirmé par des spectres RMN ^{31}P et ^1H très complexes et il a été impossible de séparer efficacement les produits. La réaction en présence de NaBH_4 et d'acide acétique a été faite et a, elle aussi, entraîné la décomposition complète du composé.

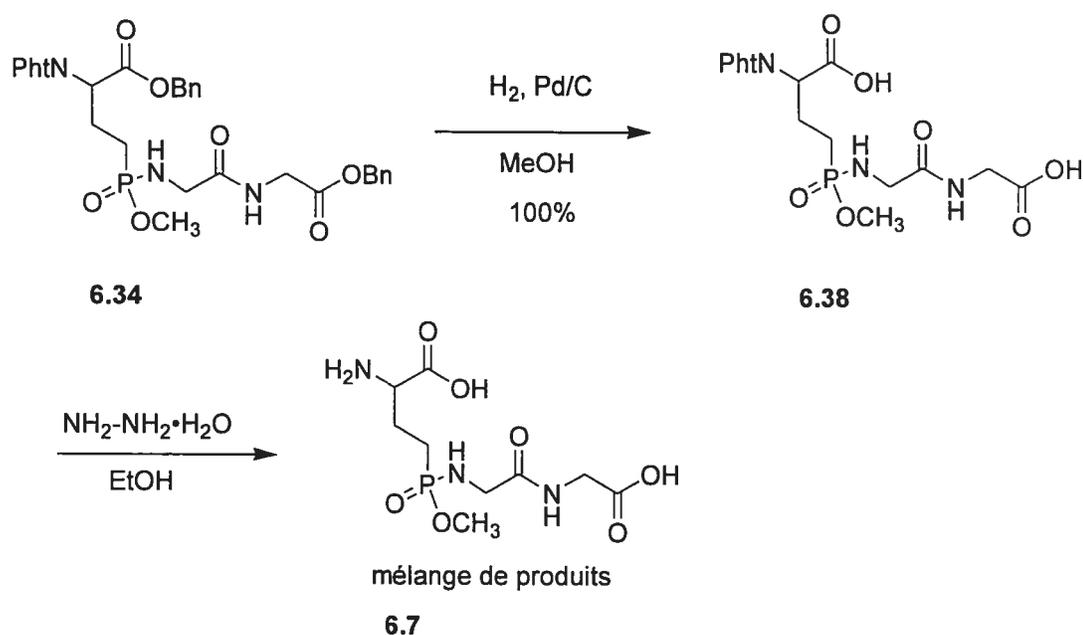


Schéma 6.21 : Essai de synthèse du phosphonamide **6.7**.

Dans la littérature, aucune déprotection complète de phosphonamide ressemblant au nôtre n'a été entreprise. Dans le cas bien précis de la synthèse d'un analogue de la glutathionylspermidine, les déprotections finales ont été effectuées avec succès, dépendamment de la molécule¹⁸⁶. Dans notre cas, les déprotections de l'amine et des

acides carboxyliques ne peuvent être complètes sur la même molécule sans décomposition de celle-ci. De plus, la faible solidité de la liaison P-N, comme montré dans la section 6.3.1, peut expliquer le mélange obtenu lors des déprotections finales du composé **6.34**. Il semble que la stabilité du lien P-N aux conditions de déprotection dépend en grande partie de la structure du composé synthétisé.

6.4. Conclusion

Afin d'inhiber la GGT de manière irréversible, la synthèse des dérivés phosphonamides analogues au glutathion et au L-SPG **5.14** a été entreprise. La voie utilisant la réaction d'Arbuzov impliquant la protection du groupement aminé en position α avec un groupe phthalyle a été choisie. La synthèse de phosphonamides a été réalisée avec succès. Seulement, plusieurs problèmes ont été rencontrés lors des déprotections du composé **6.34**, malgré les travaux récents réalisés sur des composés phosphorés analogues aux nôtres^{203,204}. Il est difficile de conclure si la molécule **6.7** peut être synthétisée sans une certaine décomposition due à la faiblesse du lien P-N. Aucune étude dans la littérature n'a montré la synthèse de dérivés γ -glutamyles totalement déprotégés.

Cependant, quelques améliorations peuvent être apportées afin d'arriver plus efficacement au composé final hautement instable. Une voie impliquant la protection initiale de l'amine en position α par un groupement Cbz et non un phthalyle est envisageable¹⁹⁶. Aussi, le diméthyl ester de l'acide phosphonique peut être obtenu à partir d'un aldéhyde par réaction avec le diméthyltriméthylsilylphosphite (Schéma 6.22), correspondant à la voie A à la section 6.3.2¹⁹⁶. Le composé phosphonamide pourra être synthétisé à partir du dérivé phosphonate selon le même protocole utilisé dans ce chapitre.

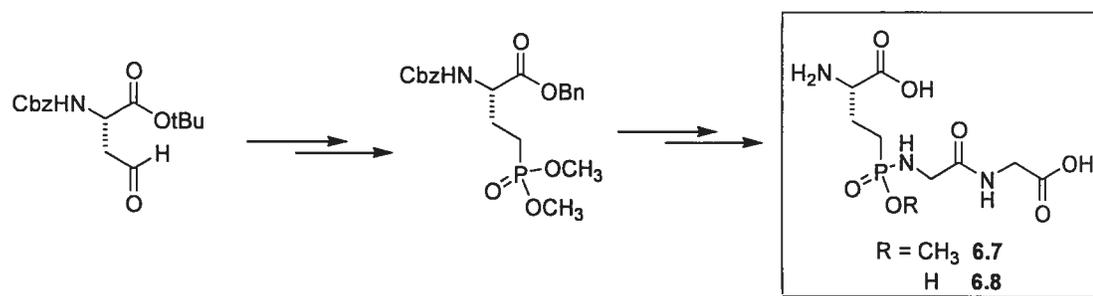


Schéma 6.22 : Autre voie possible pour la synthèse des phosphonamides **6.7** et **6.8**.

Aussi, une étude exhaustive impliquant différentes méthodes douces de déprotection de groupements Cbz et benzyl esters sans dégradation du lien phosphonamide peut être envisagée. Par contre, la synthèse du composé **6.7** et les différentes tentatives d'obtenir des phosphonamidates dans la littérature laissent suggérer des difficultés à venir lors de la synthèse du produit final **6.8**. Des expériences sont en cours.

Chapitre 7
Conclusion

La γ -glutamyl transpeptidase (GGT) est une enzyme impliquée dans l'apoptose, les maladies cardiovasculaires et le métabolisme du glutathion. Son mécanisme d'action n'est pas bien connu. Aussi, cette thèse montre les différents travaux effectués afin de l'élucider.

Afin d'obtenir de plus amples renseignements sur le mécanisme d'acylation de la GGT, une série de substrats analogues au glutathion (*gamma*-glutamylanilides *para*-substitués) a été synthétisée et testée comme substrat donneur en présence d'une concentration saturante en substrat accepteur Gly-Gly. Ainsi, en variant la force du lien amide grâce à différents substituants (électrodonneurs ou électroattracteurs) en position *para* sur l'anilide, des études de chimie physico-organique (courbes de Hammett, Eyring et van't Hoff) ont été effectuées. Un mécanisme concerté suggérant un état de transition très ordonné a ainsi pu être proposé pour l'étape critique de l'acylation. Des études de marquage par le cyanate de potassium ont été faites pour identifier des acides aminés importants dans la réaction de transpeptidation. Nous avons montré dans cette étude que la GGT est inhibée en présence de KCNO. Des analyses de l'enzyme inhibée ont permis d'identifier un peptide correspondant à la partie *N*-terminale de la grosse sous-unité jouant un rôle dans la réaction de transpeptidation. L'impact de cette découverte a permis de proposer un mécanisme plus complet pour cette réaction et ceci permettra de concevoir des nouveaux substrats ou inhibiteurs efficaces pour la GGT. D'autre part, l'expression de la GGT humaine dans la levure et sa purification ont été entreprises dans le laboratoire, ce qui permettrait d'envisager sa cristallisation à long terme afin de confirmer structurellement les acides aminés proposés ici comme étant importants dans la catalyse.

La nucléophilie de l'acide aminé attaquant le substrat donneur dans la GGT n'est pas bien connue. Aussi, de nouveaux analogues du *L*- γ -glutamyl-*p*-nitroanilide, avec des hétéroatomes en position *gamma* sur la chaîne latérale, ont été synthétisés. Ces composés ont été testés comme substrats et inhibiteurs de la GGT de rat. Les résultats ont montré que l'électrophilie du groupement carbonyle était faible et que la nucléophilie de l'acide aminé de la GGT (thréonine ou sérine) réagissant sur le substrat

donneur n'était pas assez grande pour faire la catalyse. Cependant, ces composés pourraient agir comme inhibiteurs réversibles, voire irréversibles, avec d'autres enzymes possédant un acide aminé plus nucléophile dans le site actif, ce qui en ferait un outil puissant pour obtenir des intermédiaires enzymatiques réactionnels. De plus, ces informations seront d'une grande utilité pour la synthèse future d'inhibiteurs spécifiques à la GGT.

Une meilleure compréhension des éléments nécessaires à la reconnaissance des substrats ou des inhibiteurs par l'enzyme est primordiale, d'où la nécessité d'effectuer une cartographie du site actif de la GGT avec des analogues de la L-glutamine. Ces résultats ont démontré l'importance des groupements ammonium et carboxylate en position α . Une étude similaire a été faite avec des analogues de l'acide glutamique comportant différentes fonctionnalités inhibitrices en position δ sur la chaîne latérale. L'importance de la stéréochimie du site actif de la GGT a notamment été prouvée grâce aux différents diastéréoisomères de la L-méthionine sulfoxyde. Ceci a été possible grâce à la dérivation d'équations mathématiques menant au calcul de la constante d'inhibition réversible de chacun des diastéréoisomères dans un mélange.

En s'appuyant sur cette cartographie, un inhibiteur sulfoxyde analogue au glutathion a été synthétisé, testé et a montré une très bonne affinité avec la GGT grâce à un K_i autour de 50 μM , ce qui est excellent par comparaison avec les inhibiteurs réversibles déjà existants pour la GGT. Ceci ouvre la porte à la synthèse d'une nouvelle famille d'analogues soufrés plus puissants. Ces inhibiteurs seraient très pertinents en considérant les rôles physiologiques impliquant la GGT.

Un inhibiteur phosphonamide analogue au glutathion a également été envisagé afin de piéger le nucléophile de manière irréversible et de l'identifier pour la première fois sur une GGT de mammifère. La synthèse a été menée avec succès jusqu'à la déprotection finale des groupements protecteurs. Ces premiers essais ont malheureusement montré la difficulté de synthétiser des phosphonamides avec un squelette glutamyle totalement déprotégé mais aussi en présence d'une liaison P-N

extrêmement fragile. Des solutions impliquant la modification de la synthèse sont proposées.

Une meilleure compréhension du mécanisme de la GGT et de la structure de celle-ci a été possible grâce à ces études. D'autre part, les nombreuses informations obtenues grâce à la synthèse d'inhibiteurs réversibles seront très importantes pour la synthèse future de médicaments servant à lutter contre des désordres physiologiques impliquant la GGT.

Chapitre 8
Partie expérimentale

8.1. Synthèse des substrats ou inhibiteurs

8.1.1. Matériel utilisé

8.1.1.1. Caractérisation des composés synthétisés

Les spectres RMN (^1H , ^{13}C , ^{31}P) ont été enregistrés sur des appareils Bruker AV-300 et AMX-300 (300 MHz) et AV-400 et AMX-400 (400 MHz).

Les spectres de masse ont été obtenus grâce au Centre Régional de Spectrométrie de Masse de l'Université de Montréal.

Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés à l'aide d'un polarimètre Perkin-Elmer 241 à 25°C dans une cellule de 10 cm de longueur ayant un volume total de 1 mL. Les valeurs de $[\alpha]$ sont rapportées sans unité, ces dernières, $(\text{deg}\times\text{mL})/(\text{g}\times\text{dm})$, étant implicites.

Les points de fusion ont été obtenus avec l'appareil Uni-melt Thomas-Hoover Melting point apparatus. La valeur obtenue a été corrigée.

8.1.1.2. Purification des produits

Les chromatographies sur couche mince (ccm) sont réalisées sur des plaques commerciales sur support d'aluminium, couvertes de gel de silice Kieselgel 60 F₂₅₄.

Les chromatographies sur colonne sont réalisées avec un gel de silice de la compagnie Silicycle avec des mailles de 230-400 Mesh.

8.1.1.3. Produits chimiques

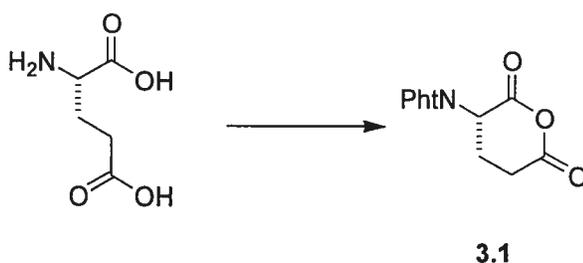
Les solvants usuels sont de qualité spectroscopique et ont été utilisés sans purification supplémentaire. Les solvants anhydres tels CH_2Cl_2 , THF, MeOH, benzène, éther et DMF sont purifiés avec une colonne asséchante de type GlassContour system (Irvine CA.). La triéthylamine et le toluène ont été distillés sous CaH_2 .

Les réactifs ont été achetés chez Sigma-Aldrich et Novabiochem et ont été utilisés sans autre purification supplémentaire.

8.1.2. Méthode expérimentale

8.1.2.1. Préparation des composés du chapitre 3

Anhydride de l'acide N,N-phthaloyl-L-glutamique (3.1)



À une solution d'acide L-glutamique (3 g, 20.4 mmol), de l'anhydride phthalique (3 g, 20.3 mmol) est ajouté. Les composés sont chauffés et agités à 180 °C, jusqu'à ce que les deux solides soient complètement fondus et bien mélangés. La température est alors diminuée à 140-145°C pour une durée de 30 min. Le mélange réactionnel est ramené à la température de 100-105°C. Ensuite, un volume d'anhydride acétique (6 mL) est additionné au mélange réactionnel en gardant cette température durant une période de 10 min. Et enfin, un volume d'*o*-xylène (15 mL) est ajouté. Le mélange réactionnel est alors laissé à la température de la pièce pour quelques instants puis mis à 4°C pour la nuit pour laisser précipiter le produit désiré. Un solide blanc est récupéré par filtration sous vide (2.88 g, 54%).

p.f. (191-193) °C [litt.²²⁴ (194-197) °C]

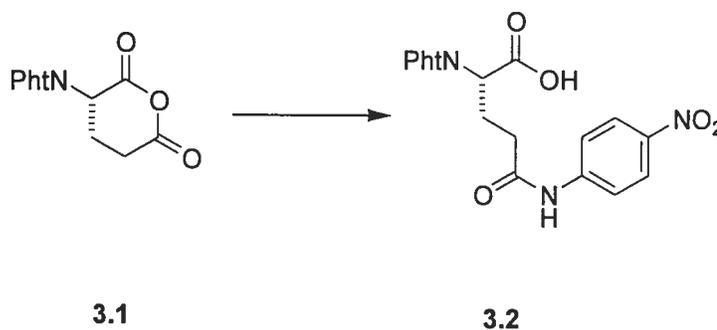
[α]_D -36.6 (c 0.86, dioxane) (litt.²²⁴ -41.2, c 3.32, dioxane)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 2.20 (1H, m), 2.95(2H, m), 3.20(1H, m), 5.15 (1H, q, $J = 4.5$ Hz), 7.88 (4H, m).

RMN ^{13}C (DMSO, 100 MHz) δ (ppm) : 21.5, 30.5, 48.8, 124.6, 132.3, 136.0, 167.3, 167.7, 171.4, 174.8.

SMHR (FAB, MH^+) 260.0572. $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NO}_5$ calculé : 260.0559.

Acide N,N-phthaloyl-L-glutamique γ -p-nitroanilide (3.2)



À un mélange du composé **3.1** (0.996 g, 3.84 mmol) et de 4-nitroaniline (0.531 g, 3.84 mmol), 15 mL de benzène et 1 mL d'acide acétique sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité et chauffé à une température de 65°C. Après une nuit d'agitation, la réaction est terminée et le mélange est évaporé sous pression réduite. Le solide obtenu est lavé avec du *n*-propanol (3×10 mL) afin d'éliminer les traces d'acide acétique. Le composé désiré, un solide jauneâtre **3.2** (0.492 g, 32 %) est obtenu.

p.f. (152-155) °C

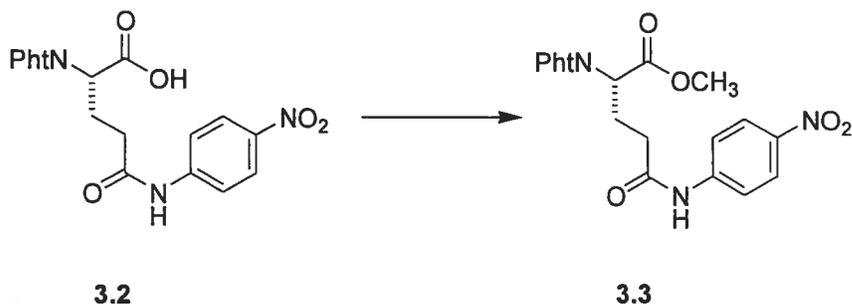
$[\alpha]_{\text{D}} +30.7$ (c 0.475, MeOH)

RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) δ (ppm) : 2.53 (2H, m), 2.68 (2H, m), 4.92 (1H, m), 7.80 (2H, dd, $J = 1.5\text{Hz}$, $J = 9.5\text{Hz}$), 7.81 (4H, m), 8.20 (2H, dd, $J = 1.5\text{Hz}$, $J = 9.5\text{Hz}$).

RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm) : 25.3, 34.8, 52.8, 120.0, 124.3, 125.6, 133.1, 135.6, 144.3, 146.0, 169.1, 172.1, 173.3.

SMHR (FAB, MH^+) 398.0989. $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_7$: calculé 398.0988.

Acide N,N-phthaloyl-L-glutamique γ -p-nitroanilide méthyl ester (3.3)



À une solution du composé **3.2** (0.081 g, 0.205 mmol), 20 mL d'éther et un minimum de méthanol sont ajoutés. Ensuite, du diazométhane est additionné à 0°C jusqu'à ce qu'il y ait persistance d'une couleur jaune. Le solvant est évaporé sous vide pour donner un solide jaune pâle (0.084 g, 100%).

p.f. (135-137) °C

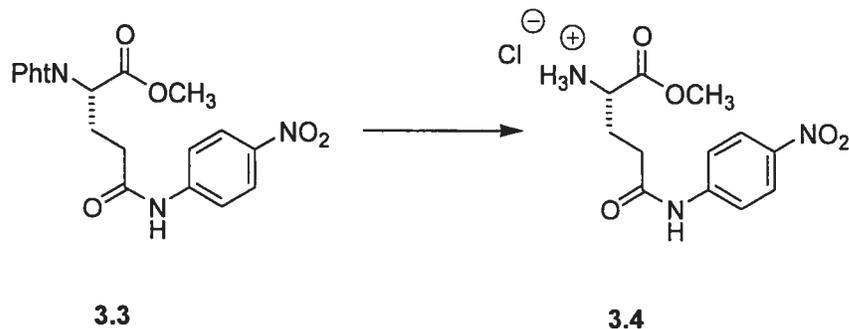
$[\alpha]_D$ -57.1 (c 0.28, MeOH)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) : 2.51 (2H, m), 2.61 (2H, m), 3.73 (3H, s), 4.96 (1H, m), 7.64 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.76 (4H, m), 8.12 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 8.20 (1H, s);

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) : 25.1, 34.4, 51.4, 53.1, 119.0, 123.8, 125.1, 131.6, 134.6, 143.4, 143.8, 167.9, 169.3, 170.5.

SMHR (FAB, MH^+) 412.1150. $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_7$: calculé 412.1145.

Acide L-glutamique γ -p-nitroanilide méthyl ester•HCl (3.4)



À une solution du composé **3.4** (0.075 g, 0.183 mmol) dissout dans 10 mL de méthanol, de l'hydrazine hydratée (9 μ L, 0.274 mmol) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité à la température de la pièce durant une période de 3 jours. Après évaporation sous pression réduite, le résidu est dissout dans 15 mL d'éthanol. Le solide formé, dérivé phthalyle, est filtré et le filtrat évaporé sous vide. Le solide obtenu est alors dissout dans 20 mL d'AcOEt et des extractions avec du HCl (1N) (20 mL) sont effectuées. La phase aqueuse est évaporée sous pression réduite pour donner le produit désiré sous forme d'un solide jaune (0.025 g, 43%).

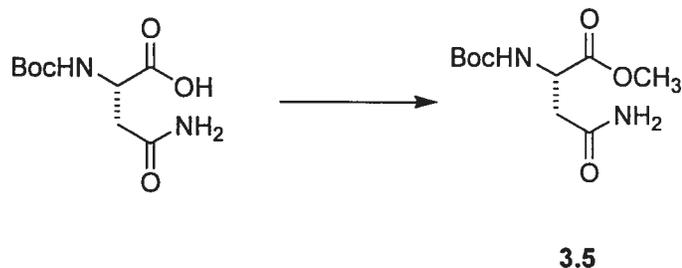
p.f. (149-152) °C

$[\alpha]_D$ +13.3 (c 1, MeOH)

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) : 2.22 (2H, m), 2.62 (2H, m), 3.71 (3H, s), 4.14 (1H, t, $J = 6.8$ Hz), 7.59 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.70 (2H, d, $J = 9.0$ Hz).

RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm) : 26.6, 33.1, 53.5, 53.8, 120.3, 125.8, 144.6, 146.0, 170.7, 172.6.

SMHR (FAB, MH^+) 282.1097. $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_5$ calculé : 282.1090.

Acide tert-butoxycarbonyl-L-asparagine méthyl ester (3.5)

À une solution contenant 0.807 g (3.70 mmol) de Boc-L-asparagine dissout dans 30 mL d'éther diéthylique anhydre et un minimum de MeOH à 0°C, du diazométhane éthéré est ajouté jusqu'à persistance de la coloration jaune. La solution est évaporée sous pression réduite. L'huile obtenue est dissoute dans AcOEt (20 mL), puis des lavages de la phase organique sont effectués avec 15 mL NaHCO₃ 5% et 20 mL H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour donner un solide blanc (0.802 g, 94 %).

p.f. (74-77) °C

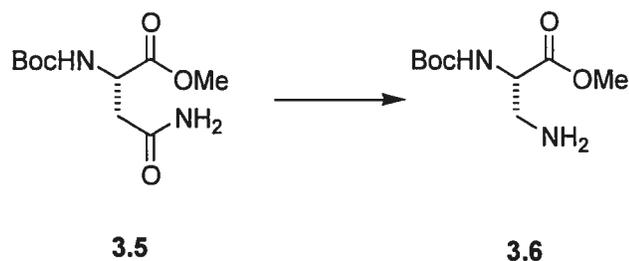
[α]_D -7.4 (c 0.7, MeOH)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.44 (9H, s), 2.74 (1H, dd, *J* = 16.1 Hz, *J* = 4.4 Hz), 2.94 (1H, dd, *J* = 16.0 Hz, *J* = 4.6 Hz), 3.75 (3H, s), 4.53 (1H, m), 5.76 (2H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 28.4, 37.5, 50.2, 52.8, 80.2, 156.2, 172.1, 172.5.

SMLR (FAB, MH⁺) 247.0. C₁₀H₁₉N₂O₅ calculé : 247.1294.

Acide L-3-amino-2-tert-butoxycarbonylaminopropionique méthyl ester (3.6)



À une solution de 0.898 g (3.65mmol) d'amide **3.5** dans 6 mL d'un mélange (1:1) de DMF/H₂O, le bis[trifluoroacétoxy]-iodobenzène (2.36 g, 5.48 mmol) est ajouté. Après 15 minutes d'agitation à l'abri de la lumière, un volume de 0.60 mL (7.30 mmol) de pyridine est additionné au mélange réactionnel qui est agité à température ambiante toute une nuit. La solution est ensuite évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié à l'aide d'une chromatographie flash (20% méthanol dans du chloroforme) pour donner une huile jaune (0.692 g, 87 %).

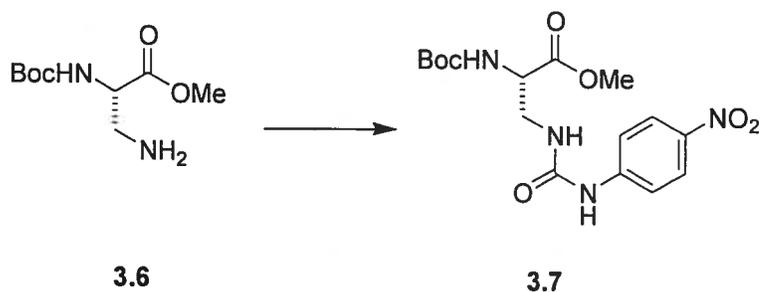
R_f 0.17 (20% MeOH dans CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.40 (9H, s), 3.45 (2H, m), 3.75 (3H, s), 4.56 (1H, m), 6.26 (1H, m), 8.33 (2H, s large).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 28.1, 40.8, 51.6, 53.3, 80.9, 156.3, 170.2.

SMHR (FAB, MH⁺) 219.1355. C₉H₁₉N₂O₄ calculé : 219.1345.

Acide *L*-tert-butoxycarbonylamino-3-[3-(4-nitrophényl)uréido]-propionique méthyl ester (3.7)



À une solution de 0.462 g (2.12 mmol) du composé **3.6** dissout dans 10 mL d'un mélange (1:1) THF/CH₂Cl₂, de l'isocyanate de *p*-nitrophényle 0.321 g (1.95 mmol) est ajouté. La réaction est agitée à température ambiante durant une nuit et le mélange est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissout dans 5mL de MeOH et le solide non dissout (isocyanate de *p*-nitrophényle restant) est alors filtré sous vide puis est évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie flash avec un éluant 50% AcOEt dans l'hexane pour donner un solide jaune (0.457 g, 56 %).

p.f. (168-170) °C

R_f 0.27 (50% AcOEt dans l'hexane)

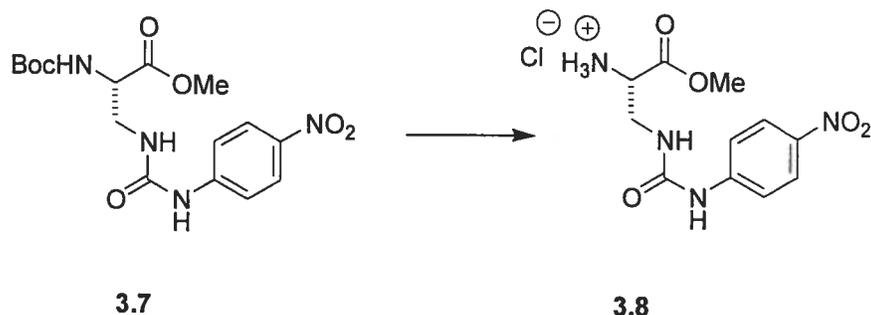
[α]_D -17.8 (c 0.23, MeOH)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 1.39 (9H, s), 3.63 (2H, m), 3.71 (3H, s), 4.35 (1H, m), 6.01 (1H, s), 6.23 (1H, t, *J* = 5.9 Hz), 7.51 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.05 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 8.36 (1H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 28.3, 41.6, 52.9, 54.7, 80.7, 117.7, 125.1, 141.8, 145.8, 155.6, 156.2, 171.7.

SMHR (FAB, MH⁺) 383.1578. C₁₆H₂₃N₄O₇ calculé : 383.1567.

Acide L-2-amino-3-[3-(4-nitro-phényl)-uréido]-propionique méthyl ester•HCl (3.8)



À une solution de 0.138 g (0.361 mmol) du composé **3.7** dissout dans 8 mL de CH₂Cl₂ de l'anisole (0.039 mL, 0.361 mmol) ainsi que de l'acide trifluoroacétique (TFA) (0.056 mL (0.722 mmol) sont ajoutés. La réaction est suivie par ccm et 3 autres équivalents de TFA sont additionnés au cours de la déprotection. La réaction est agitée à 0°C puis à température ambiante pendant 36 h. Ensuite, le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 10 mL de cyclohexane et les produits volatiles sont évaporés sous vide. Le processus est répété trois fois. Un volume de 5 mL HCl (0.1N) est ajouté et des lavages avec AcOEt (2×15 mL) sont effectués. La phase aqueuse est évaporée sous pression réduite pour donner le produit désiré comme un solide de couleur jaune (0.104 g, 91 %)

p.f. (160-163) °C

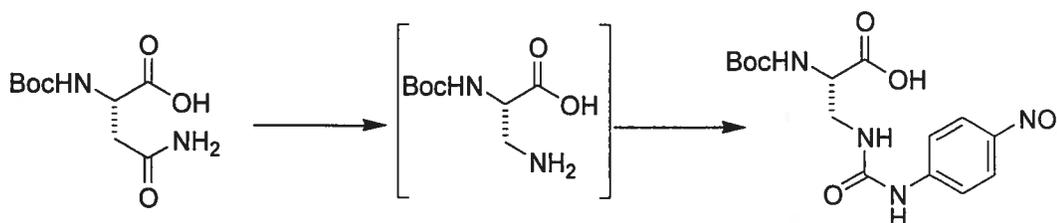
[α]_D -26.1 (c 1, MeOH)

RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) : 3.71 (2H, m), 3.76 (3H, s), 4.19 (1H, t, *J* = 4.9 Hz), 7.41 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.09 (2H, d, *J* = 9.2 Hz).

RMN ¹³C (D₂O, 75 MHz) δ (ppm) : 39.7, 53.7, 54.1, 118.5, 125.5, 142.1, 145.6, 157.0, 169.3.

SMHR (MAB, M⁺) 282.0969. C₁₁H₁₄N₄O₅ calculé : 282.0964.

Acide L-2-tert-butoxycarbonylamino-3-[3-(4-nitrophényl)-uréido]-propionique (3.9)



3.9

À une solution de Boc-L-asparagine (0.410 g, 1.765 mmol) dans 6 mL d'un mélange 1:1 de DMF/H₂O, 1.138 g (2.647 mmol) de bis[trifluoroacétoxy]iodobenzène est ajouté. Après 15 minutes de réaction à l'abri de la lumière, 0.288 mL (3.530 mmol) de pyridine est additionné au mélange réactionnel qui est agité à température ambiante toute une nuit. La solution est évaporée sous pression réduite et laissée sous la pompe à vide plusieurs jours. Le produit est utilisé pour la prochaine étape sans purification supplémentaire.

Le résidu est dissout dans 10 mL d'un mélange THF : CH₂Cl₂ (1 : 1) puis l'isocyanate de *p*-nitrophényle (0.289 g, 1.765 mmol) est ajouté. La réaction est agitée pendant une nuit, puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie flash (20% MeOH dans AcOEt) pour donner un solide jaune (0.362 g, 56%).

R_f 0.16 (20% MeOH dans AcOEt)

p.f. >220°C

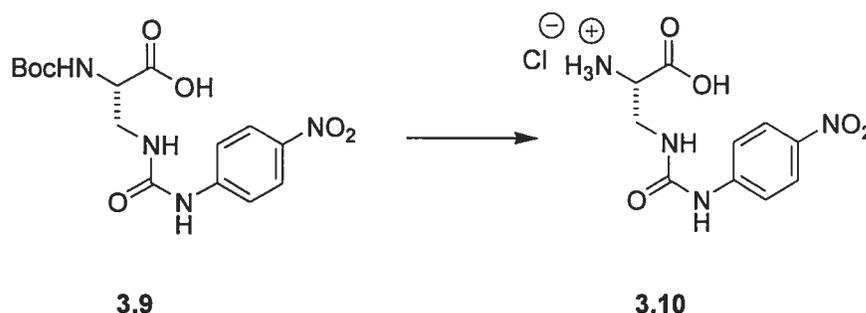
[α]_D +11.1 (c 0.42, MeOH)

RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm) : 1.41 (9H, s), 3.49 (1H, dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 5.5 Hz), 3.71 (1H, dd, *J* = 13.9 Hz, *J* = 4.9 Hz), 4.28 (1H, t, *J* = 5.0 Hz), 7.59 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.14 (2H, d, *J* = 9.3 Hz).

RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm) : 28.7, 43.0, 56.5, 80.6, 118.7, 125.9, 143.1, 147.5, 157.4, 157.9, 178.6.

SMBR (FAB, MH⁺) 369.1425. C₁₅H₂₁N₄O₇ calculé 369.1410.

Acide L-2-amino-3-[3-(4-nitrophényl)-uréido]-propionique•HCl (3.10)



À une solution du carbamate **3.9** (0.145 g, 0.394 mmol) dans 5 mL de CH₂Cl₂ à 0°C, l'anisole (0.043 mL, 0.394 mmol) puis le TFA (0.152 mL, 1.970 mmol) sont ajoutés. La réaction est agitée à température ambiante pendant deux jours puis est évaporée sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 10 mL de cyclohexane et les produits volatiles sont évaporés sous vide. Le processus est répété trois fois. Ensuite un volume de 5 mL de HCl (1N) est ajouté et évaporé sous pression réduite. Un solide jaune est obtenu (0.096 g, 81%).

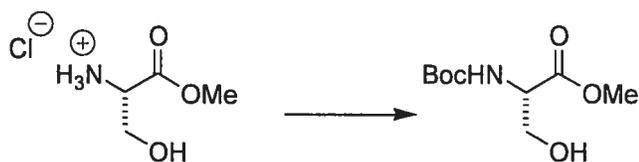
p.f. (134-136) °C

[α]_D -27.7 (c 1, MeOH)

RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm) : 3.58 (1H, d large, *J* = 14.1 Hz), 3.76 (1H, d large, *J* = 14.3 Hz), 4.19 (1H, t), 7.65 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.12 (2H, d, *J* = 8.7 Hz).

RMN ¹³C (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm) : 40.9, 54.0, 118.7, 125.8, 143.1, 147.3, 157.6, 169.9.

SMBR (FAB, MH⁺) 269.0. C₁₀H₁₃N₄O₅ calculé : 269.0886.

***tert*-Butoxycarbonyl-L-sérine méthyl ester (3.11) :****3.11**

À une solution de L-sérine méthyl ester (0.600 g, 3.86 mmol) dissout dans 5 mL de MeOH à 0°C, le (Boc)₂O (0.884 g, 4.05 mmol) et la Et₃N (1.13 mL, 8.10 mmol) sont ajoutés. La réaction est agitée à 0°C pendant 3 h. Ensuite, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissout dans 25 mL AcOEt puis des lavages sont faits avec HCl (1M) puis H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis est évaporée sous pression réduite pour donner une huile incolore (0.570 g, 68%).

R_f 0.18 (50% AcOEt dans hexane)

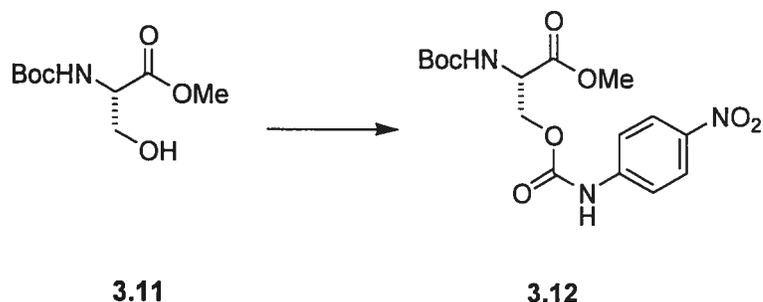
[α]_D +16.9 (c 0.31, MeOH) [litt.²²⁵ -17.5, c 0.5, MeOH]

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 1.45 (9H, s), 2.36 (1H, s large), 3.79 (3H, s), 3.94 (2H, ddd, *J* = 20.1 Hz, *J* = 11.2 Hz, *J* = 3.5 Hz), 4.42 (1H, m), 5.45 (1H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 28.2, 52.5, 55.7, 63.1, 80.2, 155.7, 171.5.

SMHR (FAB, MH⁺) 220.1195. C₉H₁₈NO₅ calculé : 220.1185.

Acide *L*-2-*tert*-butoxycarbonylamino-3-(4-nitrophénylcarbamoyloxy)-propionique méthyl ester (3.12)



À une solution du composé **3.11** (0.570 g, 2.60 mmol) dissout dans 10 mL d'un mélange de THF/CH₂Cl₂ (1/1), 0.43 g (2.60 mmol) d'isocyanate de *p*-nitrophényle et 0.210 mL (2.60 mmol) de pyridine sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité toute une nuit. Ensuite, en ajoutant du MeOH (10 mL), l'isocyanate de *p*-nitrophényle qui n'a pas réagi est précipité et enlevé par filtration sous vide. Le filtrat est évaporé sous pression réduite et est purifié par une chromatographie flash (40% AcOEt dans hexane) pour donner un solide jaune (0.588 g, 59 %).

R_f 0.32 (50% AcOEt dans hexane)

p.f. (106-108) °C

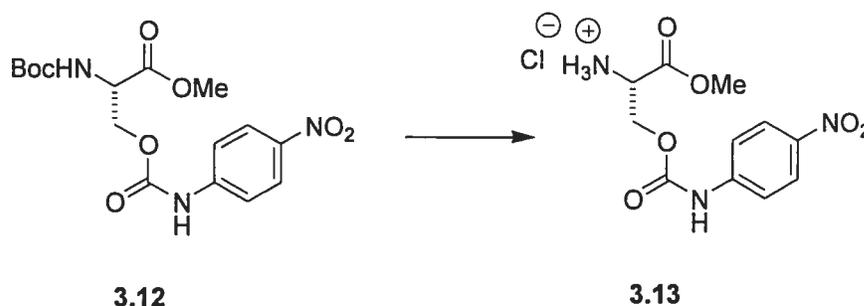
[α]_D +5.1 (c 0.43, MeOH)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 1.34 (9H, s), 3.70 (3H, s), 4.57 (3H, m), 5.61 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.11 (1H, m), 8.14 (2H, d, *J* = 9.0 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 28.1, 52.9, 53.1, 65.0, 80.5, 117.9, 125.0, 142.7, 144.3, 152.5, 155.4, 170.7.

SMBR (FAB, MH⁺) 384.1. C₁₆H₂₂N₃O₈ calculé : 384.1407.

Acide L-2-amino-3-(4-nitro-phénylcarbamoyloxy)-propionique méthyl ester•HCl
(3.13)



À une solution du composé **3.12** (0.630 g, 1.65 mmol) dissout dans 30 mL de CH_2Cl_2 à 0°C , 0.179 mL (1.65 mmol) d'anisole ainsi que 0.254 mL (3.30 mmol) de TFA sont ajoutés. La réaction est agitée toute la nuit à température ambiante puis 2 autres équivalents de TFA sont additionnés. Après 6 h d'agitation, le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est co-évaporés trois fois sous pression réduite avec 15 mL de cyclohexane, dissout dans 5 mL de H_2O et extrait avec de l'AcOEt (2×15 mL). La phase aqueuse est évaporée et le résidu est traité avec 5 mL HCl (0.1N) et évaporée sous pression réduite pour donner le produit désiré comme un solide de couleur jaune (0.461 g, 88 %).

p.f. (145-147) $^\circ\text{C}$

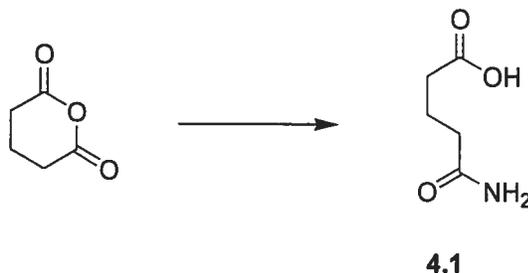
$[\alpha]_{\text{D}}$ -16.0 (c 1.00, MeOH)

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) : 3.78 (3H, s), 4.48 (1H, m), 4.62 (2H, dd, $J = 12.5$ Hz, $J = 3.1$ Hz), 7.44 (2H, d, $J = 9.1$ Hz), 8.09 (2H, d, $J = 9.1$ Hz).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz) δ (ppm) : 52.7, 54.3, 62.8, 118.9, 125.5, 143.2, 144.3, 153.8, 168.3.

SMBR (FAB, MH^+) 283.9. $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_6$ calculé : 284.0883.

8.1.2.2. Préparation des composés du chapitre 4

4-carboxybutyramide (4.1)

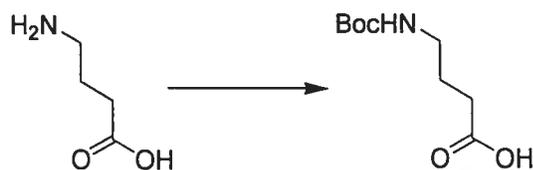
De l'ammoniac (NH_3) gazeux, généré à partir de l'hydroxyde de sodium et du chlorure d'ammonium, est barboté à une solution d'anhydride glutarique (500 mg, 4.38 mmol) dans 10 mL de CH_2Cl_2 . Ce gaz est formé jusqu'à ce que la réaction soit complète (environ 4 jours). Le précipité formé est filtré. Celui-ci est lavé avec du CH_2Cl_2 . Un solide blanc (0.190 g, 34 %) a été obtenu.

p.f. (89-90) °C

RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) δ (ppm) : 1.88 (2H, qu, $J = 7.3$ Hz), 2.25 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 2.33 (2H, t, $J = 7.4$ Hz).

RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm) : 22.1, 34.1, 35.5, 176.9, 178.3.

SMBR (FAB, MH^+) 132.1. $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_3$ calculé : 132.0661.

Acide tert-butoxycarbonyl-4-aminobutyrique (4.4)**4.4**

À une solution d'acide γ -aminobutyrique (2 g, 19.4 mmol) dans 20 mL de MeOH, de la Et_3N (11.8 g, 116.4 mmol) et $(\text{Boc})_2\text{O}$ (8.89 g, 40.7 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité à une température de 60 °C. La réaction est suivie par ccm (99:1 AcOEt:AcOH) et laissée pour la nuit. Le solvant est évaporé sous pression réduite et l'huile ainsi obtenue est dissoute dans 20 mL de NaHCO_3 saturé. Des extractions avec l'hexane (3×40 mL) sont effectuées et la phase aqueuse est acidifiée avec du HCl 1N jusqu'à un pH de 2-3. Des extractions de la phase aqueuse avec AcOEt (3×30 mL) sont effectuées et la phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis évaporée pour donner un solide blanc (3.81 g, 97 %).

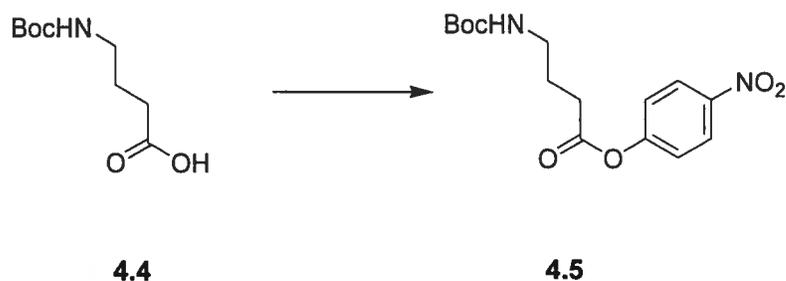
p.f. 58 °C [litt.²²⁶ (50-51)°C]

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 1.45 (9H, s), 1.83 (2H, q, $J = 7.0$ Hz), 2.41 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 3.19 (2H, m), 4.70 (1H, s large).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 25.0, 28.3, 31.2, 39.7, 79.4, 156.1, 178.3.

SMHR (FAB, MH^+) 204.1230. $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_4$ calculé : 204.1236.

Acide tert-butoxycarbonyl-4-aminobutyrique *p*-nitrophényl ester (4.5)



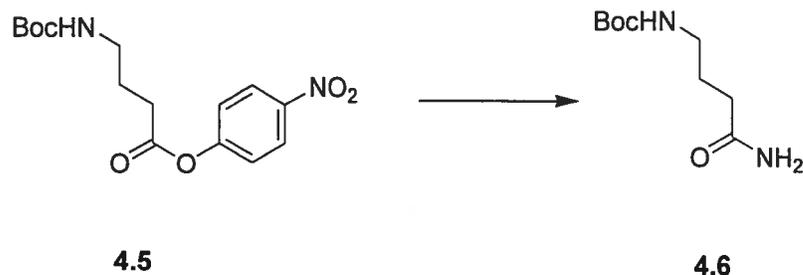
L'acide Boc-4-aminobutyrique **4.4** (3.8 g, 18.7 mmol) est dissout dans 75 mL de AcCN, traité avec la Et₃N (2.08 g, 20.6 mmol), le chloroformate de *p*-nitrophényle (4.15 g, 20.6 mmol) et le DMAP (0.23 g, 1.87 mmol). Le mélange réactionnel est laissé à la température de la pièce toute la nuit. Le solide blanc formé (triéthylamine protonée) est filtré. Ensuite, de l'eau est ajoutée au filtrat et un solide jaune pâle, le composé désiré, a précipité et a été filtré (5.72 g, 95 %).

p.f. 120 °C

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 1.46 (9H, s), 1.96 (2H, qu, *J* = 6.8 Hz), 2.67 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.28 (2H, m), 4.63 (1H, s large), 7.31 (2H, d, *J* = 9.3 Hz), 8.29 (2H, d, *J* = 9.3 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 25.4, 28.5, 31.6, 39.7, 79.6, 122.6, 125.4, 145.5, 155.5, 156.3, 171.0.

SMHR (FAB, MH⁺) 325.1389. C₁₅H₂₁N₂O₆ calculé : 325.1399.

***tert*-Butoxycarbonyl-4-aminobutyramide (4.6)**

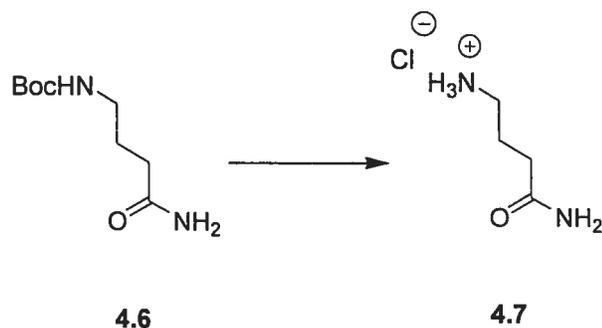
Le composé **4.5** (0.350 g, 1.08 mmol) est dissout dans CH₂Cl₂ (15 mL). De l'ammoniac gazeux, généré à partir de NH₄OH et NH₄Cl, est barbotté dans le milieu réactionnel jusqu'à ce que la réaction soit complète (environ 24 heures). La réaction est suivie par ccm (99:1 AcOEt:AcOH). Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par une chromatographie flash (100 % AcOEt). Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est co-évaporé avec du *n*-propanol et laissé sur la pompe à vide pour une nuit. Un solide jaune pâle (0.200 mg, 91 %) est obtenu.

p.f. 125 °C [litt.²²⁶ 127°C]

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 1.44 (9H, s), 1.81 (2H, q, *J* = 6.5 Hz), 2.28 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.19 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 4.88 (1H, s large), 5.84 (1H, s large), 6.41 (1H, s large).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 26.2, 28.3, 32.7, 39.6, 79.4, 156.5, 175.4.

SMHR (FAB, MH⁺) 203.1387. C₉H₁₉N₂O₃ calculé : 203.1396.

4-aminobutyramide•HCl (4.7)

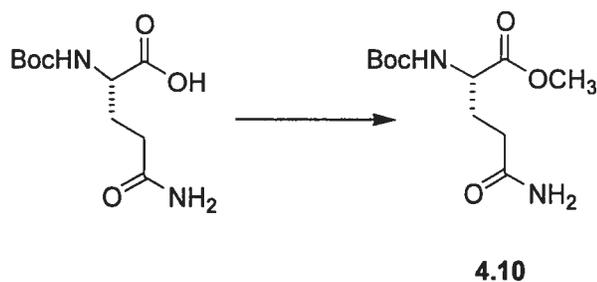
Le composé **4.6** (0.130 g, 0.64 mmol) est dissout dans 10 mL de CHCl_3 . Du HCl généré à partir de H_2SO_4 et de NH_4Cl , est barbotté dans le milieu réactionnel pendant 1 h puis la solution est agitée toute la nuit. Une filtration sous vide du solide formé a permis d'obtenir un solide jaune pâle (0.089 g, 100 %).

p.f. (98-100) °C

RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) δ (ppm) : 1.90 (2H, qu, $J = 7.2$ Hz), 2.37 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.96 (2H, t, $J = 7.3$ Hz).

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) δ (ppm) 24.3, 32.9, 40.3, 178.0.

SMHR (FAB, MH^+) 103.0868. $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$ calculé : 103.0871.

***tert*-Butoxycarbonyl-L-glutamine méthyl ester (4.10)**

À une solution de Boc-L-glutamine (1.135 g, 6.95 mmol) dans 20 mL d'un mélange Et₂O:MeOH (10 :1), une solution de diazométhane dans le diéthyléther est ajoutée jusqu'à persistance de la couleur jaune. La solution est évaporée sous pression réduite pour donner un solide jaune (1.198 g, 100%).

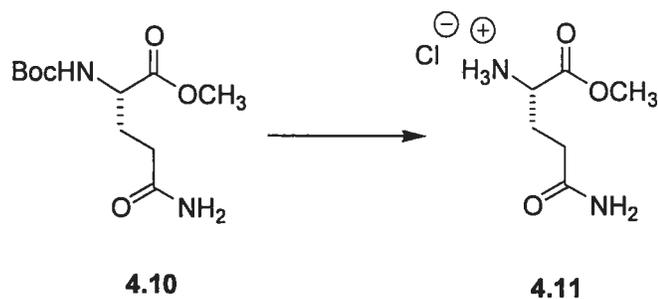
p.f. (183-185) °C

[α]_D -10.3 (c 0.36, MeOH)

RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm) : 1.44 (9H, s), 1.91 (1H, m), 2.10 (1H, m), 2.32 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 3.73 (3H, s), 4.14 (1H, t, *J* = 8.5 Hz).

RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm) : 28.3, 28.7, 32.5, 52.7, 54.5, 80.5, 157.9, 170.4, 171.4.

SMHR (FAB, MH⁺) 261.1458. C₁₁H₂₁N₂O₅ calculé : 261.1450.

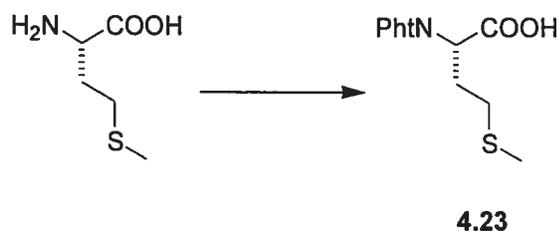
***L*-glutamine méthyl ester (4.11)**

À une solution du composé **4.10** (0.560 g, 2.15 mmol) dans 10 mL de CHCl_3 à 4°C , du HCl (g) généré comme décrit auparavant est ajouté. La solution est agitée à cette température pendant 1 h puis 1 h supplémentaire à la température ambiante. Le solvant est évaporé et une huile visqueuse est obtenue (0.419 g, 100%).

RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) δ (ppm) : 2.12 (2H, m), 2.41 (2H, m), 3.74 (3H, s), 4.07 (1H, t, $J = 7.8$ Hz).

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) δ (ppm) : 25.6, 30.6, 52.5, 53.9, 170.4, 171.1.

SMBR (FAB, MH^+) 161.1. $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$ calculé 161.0926.

N-Phthalyl-L-méthionine (4.23)

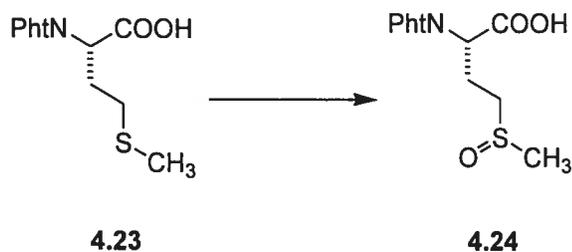
À une solution de L-méthionine (1 g, 6.702 mmol) dans le toluène (30 mL), l'anhydride phthalique (0.993 g, 6.702 mmol) puis la Et₃N (2.803 mL, 20.1 mmol) sont ajoutés. La solution est portée à reflux pendant 2.5h puis est évaporée sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans AcOEt (25 mL), lavé avec HCl (1N) et H₂O, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit désiré **4.23** est obtenu comme une huile marron (solide dans la littérature) (4.02 g, 72%).

$[\alpha]_D$ -37.8 (c 1.22, MeOH) (litt.¹²⁷ -47.5 (c 5.0, MeOH))

RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm) : 2.05 (3H, s), 2.51 (2H+2H, m), 5.07 (1H, m), 7.85 (4H, m).

RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm) : 15.1, 29.0, 31.8, 52.1, 124.4, 133.1, 135.6, 169.3, 172.4.

SMHR (MAB, M⁺) 279.0570. C₁₃H₁₃NO₄S calculé : 279.0565.

N-Phthalyl-L-méthionine sulfoxyde (mélange 50/50 de diastéréoisomères) (4.24)

À une solution du dérivé *N*-phthalyl-L-méthionine **4.23** (1.32 g, 4.730 mmol) dans le MeOH (25 mL), est ajouté 30% H₂O₂ (2.2 éq.) à température ambiante. La solution est agitée pendant 2 jours puis est évaporée sous pression réduite. Un ratio de diastéréoisomères de 50/50 est obtenu de manière quantitative (1.40 g) (visible par RMN ¹³C). Les deux diastéréoisomères sont purifiés et séparés selon un protocole déjà établi¹²⁷.

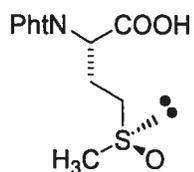
Séparation des diastéréoisomères 4.19a et 4.19b (méthode générale) :

Le mélange de diastéréoisomères *N*-phthalyl-L-méthionine sulfoxyde **4.24** est dissout dans du MeOH chaud puis est refroidi à température ambiante. Un mélange enrichi en dérivé S_CS_S **4.24a** non soluble est filtré. L'opération est recommencé trois fois afin d'obtenir le dérivé S_CS_S **4.24a** pur par RMN ¹³C (e.d. > 95 %).

Le filtrat est purifié par chromatographie par gravitation (100% AcOEt à 10% MeOH dans AcOEt) pour obtenir le composé **4.24b**, comme suggéré dans la littérature¹²⁷. Un ratio maximum de 76/24 (**4.19b**, S_CR_S / **4.19a**, S_CS_S) est obtenu.

Pour obtenir différentes proportions des deux diastéréoisomères, le nombre des cristallisations du composé **4.19a** a été varié et le ratio des diastéréoisomères a été déterminé par RMN ¹³C.

N-phthalyl-*L*-méthionine sulfoxyde (*S*_C*S*_S) (**4.24a**) :



4.24a

Le dérivé **4.24a** est obtenu généralement avec un rendement de 25 % environ à partir du composé **4.23**.

R_f 0.13 (10% MeOH dans AcOEt)

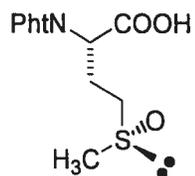
p.f (210-213) °C [litt.¹²⁷ (215-217) °C]

[α]_D +12.8 (c 0.61 EtOH) (litt.¹²⁷ +12.5 , EtOH)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm) : 2.62 (3H, s), 2.66 (2H, m), 2.90 (2H, m), 5.01 (1H, dd, *J* = 10 Hz, *J* = 4.9 Hz), 7.88 (4H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm) : 23.9, 38.3, 51.8, 52.4, 124.5, 133.1, 135.8, 169.1, 171.5.

SMHR (MAB, M⁺) 295.0518. C₁₃H₁₃NO₅S calculé : 295.0514.

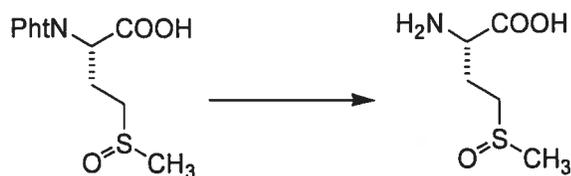
***N*-phthalyl-L-méthionine sulfoxyde (*S_cR_s*) (4.24b)****4.24b**

Les caractérisations suivantes ont été déduites des différents mélanges de **4.24a** et **4.24b** obtenus après chromatographie et d'après la littérature¹²⁷.

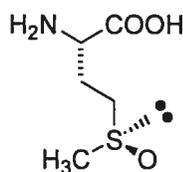
R_f 0.13 (10% MeOH dans AcOEt)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) : Identique à **4.24a**.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) : 23.6, 38.0, 51.4, 52.1, 124.5, 133.1, 135.8, 169.1, 171.6.

***L*-méthionine sulfoxyde (méthode typique) :**

À une solution de *N*-phthalyl-*L*-méthionine sulfoxyde **4.24** (0.133 g, 0.451 mmol) dans l'éthanol (95 %) (5 mL), de l'hydrazine ($\text{N}_2\text{H}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.031 mL, 0.631 mmol) est ajoutée. La solution est agitée sous reflux pendant 2 h, laissée à température ambiante pendant 1 h et évaporée sous pression réduite. Le résidu formé est dissout dans 4 mL H_2O , le précipité est filtré (filtre 20 μm) puis le filtrat est évaporé à nouveau. L'opération est répétée 2 fois. Le résidu est dissout dans 4 mL H_2O puis de l'acétone est ajoutée pour faire précipiter le produit désiré comme un solide blanc (0.053 g, 72%). Le rendement (70-75 %) reste toujours du même ordre de grandeur pour les composés **4.21a** et **4.21b**.

***L*-méthionine sulfoxyde (*S_CS_S*) (4.21a) :****4.21a**

p.f. >220 °C (litt.¹²⁷ >260 °C)

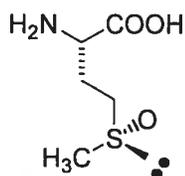
$[\alpha]_D$ +83.7. (c 0.37, H_2O) (litt.¹²⁷ +98.2, c 0.5 H_2O)

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) : 2.15 (2H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.58 (3H, s), 2.85 (2H, m), 3.72 (1H, t, $J = 6.3$ Hz).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz) δ (ppm) : 24.09, 36.82, 48.54, 53.61, 173.56. (Les deux chiffres après la virgule sont significatifs).

SMHR (MAB, M^+) 165.0458. $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}$ calculé 165.0460.

L-méthionine sulfoxyde ($S_C R_S$) (4.21b) :



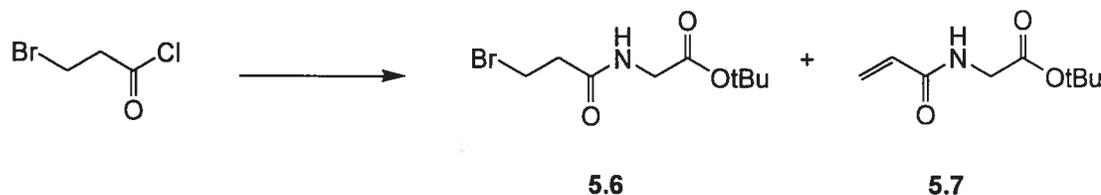
4.21b

Les caractérisations suivantes ont été déduites des différents mélanges de 4.21a et 4.21b obtenus et d'après la littérature.

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) : Identique à 4.21a.

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz) δ (ppm) : 24.12, 36.68, 48.50, 53.80, 173.61. (Les deux chiffres après la virgule sont significatifs).

8.1.2.3. Préparation des composés du chapitre 5

Acide (3-bromopropionylamino)-acétique tert-butyl ester (5.6)

À une solution de glycine *tert*-butyl ester•HCl (0.978 g, 5.833 mmol) et de Et₃N (1.626 mL, 11.67 mmol) dans CH₂Cl₂ (10 mL) à 0 °C, une solution de chlorure de 3-bromopropionyle (0.588 mL, 5.833 mmol) dans CH₂Cl₂ (5 mL) est ajoutée sous atmosphère inerte. Le mélange réactionnel est agité pendant 4 h, évaporé sous pression réduite et purifié par chromatographie flash (20 % EtOAc dans l'hexane) pour donner un solide blanc **5.6** (1.026 g, 66 %).

R_f 0.20 (35 % EtOAc dans l'hexane)

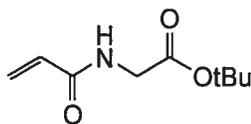
p.f. (104-106) °C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.43 (9H, s), 2.81 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.60 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.92 (2H, d, *J* = 5.0 Hz), 6.49 (1H, s large).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 27.2, 28.1, 39.3, 42.2, 82.5, 169.1, 170.0.

SMHR (MAB, MH⁺) 266.0404. C₉H₁₇NO₃Br calculé : 266.0392.

Acide acryloylamino-acétique tert-butyl ester (5.7)



5.7

Produit secondaire de la réaction.

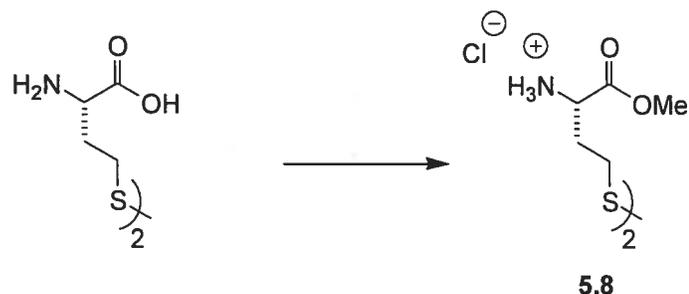
R_f 0.47 (50 % AcOEt dans l'hexane)

p.f. (152-154) °C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.43 (9H, s), 3.97 (2H, d, *J* = 5.2 Hz), 5.61 (1H, dd, *J* = 9.2 Hz, *J* = 1.9 Hz), 6.23 (2H, m), 6.50 (1H, s large).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 28.1, 42.1, 82.4, 127.0, 130.4, 165.6, 169.2.

SMLR (FAB, MH⁺) 186.2. C₉H₁₆NO₃ calculé : 186.1130

L-Homocystine méthyl ester•HCl (5.8)

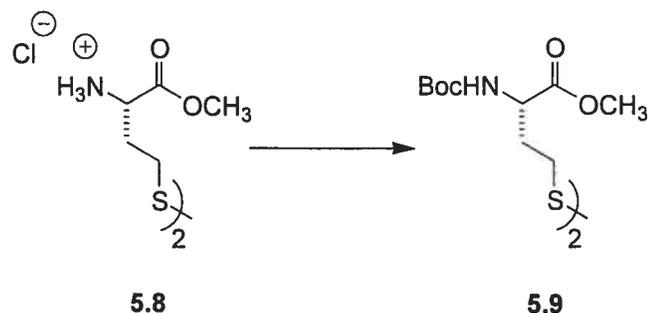
À une solution de L-homocystine (0.607g, 2.262 mmol) dans le méthanol (15 mL) à 0°C, du chlorure de thionyle (0.988 mL, 13.6 mmol) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité toute la nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Pour enlever les traces de SOCl₂ restantes, l'huile obtenue est diluée dans du CHCl₃ et concentrée de nouveau pour donner une gomme hygroscopique **5.8** (0.833 g, 100 %). Ce composé est utilisé pour la prochaine étape sans purification supplémentaire.

[α]_D +52.6 (c 0.63, MeOH)

RMN ¹H (MeOD, 400 MHz) δ (ppm) : 2.32 (4H, m), 2.85 (4H, m), 3.82 (6H, s), 4.18 (2H, t, $J = 5.4$ Hz).

RMN ¹³C (MeOD, 100 MHz) δ (ppm) : 30.6, 33.4, 52.4, 53.7, 170.2.

SMHR (MAB, M⁺) 296.0876. C₁₀H₂₀N₂O₄S₂ calculé : 296.0865.

***tert*-Butoxycarbonyl *L*-homocystine méthyl ester (5.9) :**

À une solution du composé **5.8** (0.300 g, 0.815 mmol) dans le MeOH (10 mL) à 0°C, du Boc₂O (0.534 g, 2.445 mmol) et de la triéthylamine (0.454 mL, 3.261 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée toute une nuit à température ambiante, évaporé sous pression réduite et le résidu est dilué dans 30 mL de CHCl₃ et lavé avec du HCl (0.1 N). La phase organique est séchée sur du MgSO₄, filtrée et évaporé sous pression réduite pour donner un solide, lequel est purifié par chromatographie flash (30 % EtOAc dans l'hexane) pour donner un solide blanc (0.396 g, 98 %).

R_f 0.5 (50 % EtOAc dans l'hexane)

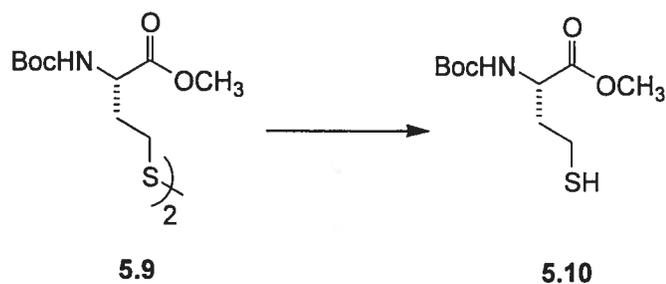
p.f. (99-101) °C

[α]_D +30.4 (c 0.53, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 1.38 (18H, s), 1.95 (2H, m), 2.25 (2H, m), 2.66 (4H, t, *J* = 7.4 Hz), 3.74 (6H, s), 4.34 (2H, m), 5.22 (2H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 28.4, 32.6, 34.6, 52.5, 52.6, 80.2, 155.5, 172.8.

SMHR (MAB, M⁺) 496.1910. C₂₀H₃₆N₂O₈S₂ calculé : 496.1913.

***tert*-Butoxycarbonyl-*L*-homocystéine méthyl ester (5.10) :**

À une solution du composé **5.9** (0.390 g, 0.786 mmol) dans du CH₂Cl₂ saturé en H₂O (6 mL), de la tri-(*n*-butyl)phosphine (0.197 mL, 0.786 mmol) est ajoutée doucement. Le mélange réactionnel est agité pendant 30 minutes et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie flash (75 % hexane dans EtOAc) pour donner le thiol **5.10** (0.392 g, 100 %) sous forme d'huile.

R_f 0.5 (33 % EtOAc dans l'hexane)

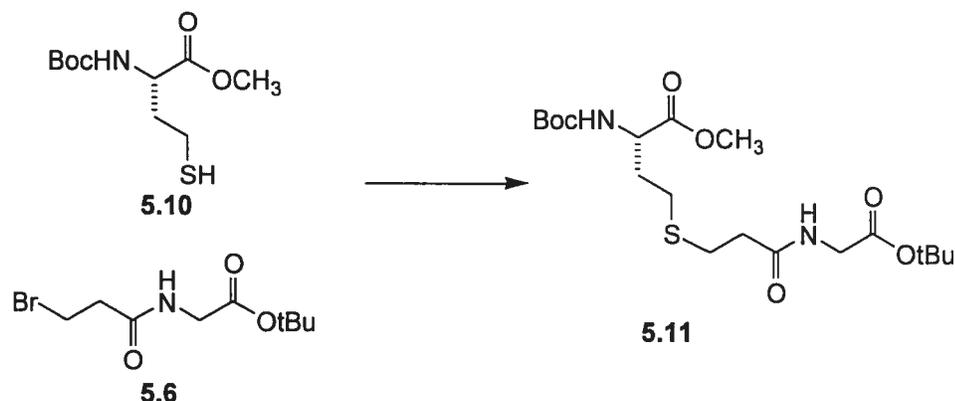
[α]_D +13.0 (c 0.60, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 1.42 (9H, s), 1.56 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 1.87-2.09 (2H, m), 2.55 (2H, m), 3.73 (3H, s), 4.43 (1H, m), 5.09 (1H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 20.8, 28.4, 37.3, 52.3, 52.6, 80.2, 155.5, 172.9.

SMHR (MAB, M⁺) 249.1035. C₁₀H₁₉NO₄S calculé : 249.1035.

Acide L-2-tert-butoxycarbonylamino-4-[2-(tert-butoxycarbonylméthyl-carbamoyl)-éthylsulfanyl]-butyrique méthyl ester (5.11):



À une solution du thiol **5.10** (0.390 g, 1.570 mmol) dans du DMF (7 mL) à 0°C, le **5.6** (0.5 g, 1.883 mmol) et ensuite du K₂CO₃ (0.239 g, 1.727 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est ramené à température ambiante. Après une agitation durant toute une nuit, la solution est diluée avec de l'eau et le produit désiré est extrait avec de l'AcOEt (5×10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, concentrée sous pression réduite et purifié par une chromatographie flash (35 % EtOAc dans l'hexane) pour obtenir une huile incolore (0.489 g, 72 %).

R_f 0.27 (35 % EtOAc dans l'hexane)

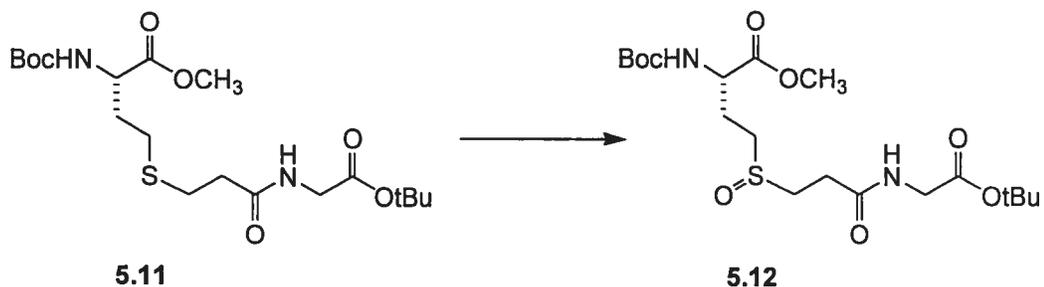
[α]_D +6.6 (c 0.43, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 1.42 (9H, s), 1.45 (9H, s), 1.87-2.09 (2H, m), 2.50 (4H, m), 2.75 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.72 (3H, s), 3.93 (2H, d, *J* = 5.1 Hz), 4.38 (1H, m), 5.28 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.55 (1H, t, *J* = 4.7 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 27.4, 28.1, 28.4, 32.5, 36.5, 42.1, 52.5, 52.7, 80.1, 82.4, 155.5, 169.1, 171.2, 172.9.

SMHR (FAB, MH⁺) 435.2161. C₁₉H₃₅N₂O₇S calculé : 435.2165.

Acide L-2-tert-butoxycarbonylamino-4-[2-(tert-butoxycarbonylméthyl-carbamoyl)-éthylsulfanyl]-butyrique méthyl ester (5.12)



À une solution de **5.11** (0.163 g, 0.375 mmol) dans un mélange THF/H₂O (7/2, 6 mL) à 0°C, 2 mL de H₂O contenant 0.073 g de NaIO₄ (0.342 mmol) sont ajoutés. Après un jour de réaction, le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite et l'huile résultante est purifiée par chromatographie flash (gradient 100 % EtOAc à 80 % EtOAc dans MeOH) pour donner une huile incolore (0.154 g, 91 %).

R_f 0.2 (100% EtOAc)

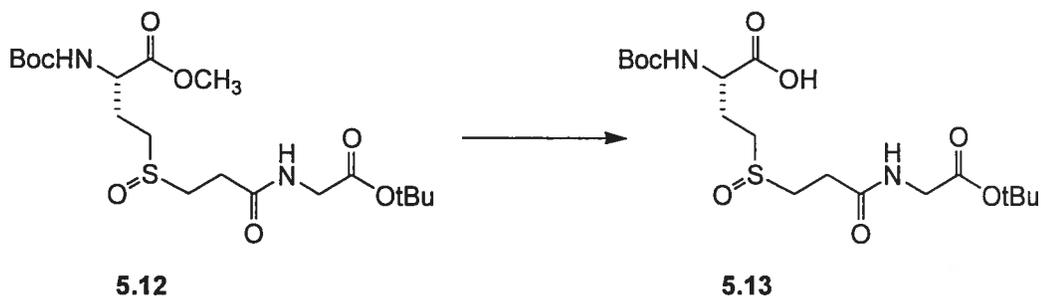
[α]_D +12.7 (c 0.29, CHCl₃, mélange de diastéréoisomères)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 1.40 (9H, s), 1.42 (9H, s), 2.01-2.37 (2H, m), 2.75 (4H, m), 2.84-3.12 (2H, m), 3.71 (3H, s), 3.88 (2H, dd, *J* = 5.1 Hz, *J* = 2.3 Hz), 4.36 (1H, m), 5.58 (1H, m), 7.00 (1H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 26.0 (2×s, mélange de diastéréoisomères 50/50), 28.1, 28.3, 28.5, 42.2, 47.0 (2×s), 48.4 (2×s), 52.6, 52.7, 80.2, 82.2, 155.6, 169.0, 170.3, 172.2.

SMHR (FAB, MH⁺) 451.2127. C₁₉H₃₅N₂O₈ calculé : 451.2114.

Acide L-2-tert-butoxycarbonylamino-4-[2-(tert-butoxycarbonylméthyl-carbamoyl)-éthylsulfinyl]-butyrique (5.13) :



Une solution du composé **5.12** (0.163 g, 0.361 mmol) et de NaOH (0.022 g, 0.543 mmol) dans un mélange THF/H₂O (7/2) (5 mL) à 0°C est agitée pendant 2 h, concentré sous pression réduite, dilué dans le CHCl₃ puis extrait avec H₂O. La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à un pH de 2-3 et EtOAc (3×10 mL) est ajouté pour extraire le composé désiré **5.13**. La phase organique est séchée avec MgSO₄, filtrée et concentrée pour obtenir une huile incolore (0.112 g, 71 %).

R_f 0.13 (75 % EtOAc dans MeOH)

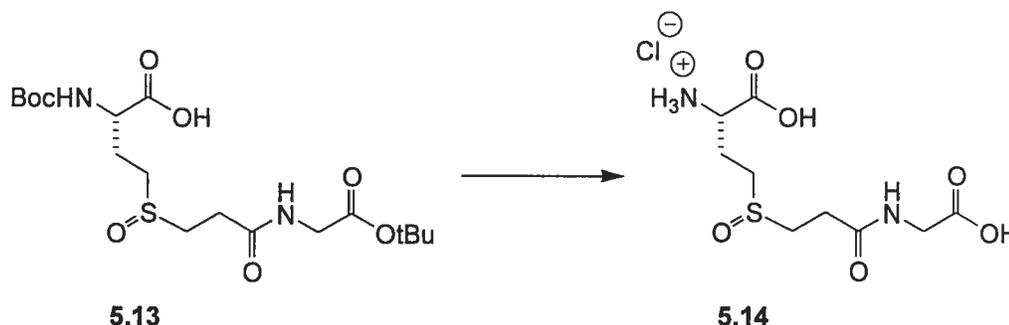
[α]_D +21.0 (c 0.56, CHCl₃, mélange de diastéréoisomères)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.42 (9H, s), 1.44 (9H, s), 2.26 (m, 2H), 2.78-2.90 (4H, m), 3.00-3.18 (2H, m), 3.92 (2H, *s large*), 4.38 (1H, m), 5.80 (1H, dd, *J* = 6.4 Hz, *J* = 30 Hz), 7.19 (1H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 25.9 (2×s), 28.2, 28.5, 30.4, 42.3 (2×s), 47.2 (2×s), 52.5, 77.2, 80.3, 82.5, 155.9, 169.2 (2×s), 170.8, 174.5 (2×s).

SMHR (FAB, MH⁺) 437.1953. C₁₈H₃₃N₂O₈S calculé : 437.1958.

Acide L-2-amino-4-[2-carboxyméthyl-carbamoyl]-éthanesulfinyl]-butyrique•HCl
(5.14)



À une solution du composé **5.13** (0.108 g, 0.248 mmol) dans CH_2Cl_2 (5 mL) à 0°C , de l'anisole (0.027 mL, 0.248 mmol) et du TFA (0.572 mL, 7.428 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité toute la nuit à température ambiante. Un volume supplémentaire de 0.190 mL (2.476 mmol) de TFA est ajouté et la solution est agitée de nouveau pour 5 h. Le solvant est enlevé sous pression réduite. Du cyclohexane est ajouté (3×5 mL) au résidu pour coévaporer les produits volatiles sous pression réduite. L'huile résultante est dissoute dans du CHCl_3 et le produit désiré est extrait avec du HCl (0.1N). La phase aqueuse est concentrée sous pression réduite pour obtenir une gomme jaune pâle très hygroscopique (0.074 g, 95 %).

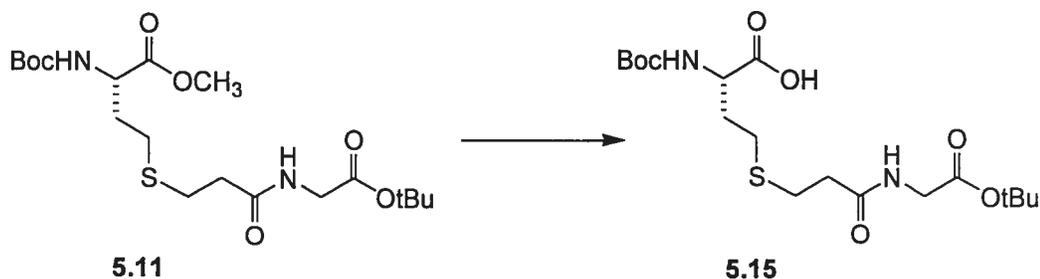
$[\alpha]_{\text{D}} +13.1$ (c 0.30, MeOH, mélange de diastéréoisomères)

RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) δ (ppm) : 2.32 (2H, m), 2.73 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 2.80-3.22 (4H, m), 3.90 (2H, s), 4.07 (1H, t, $J = 6.6$ Hz).

RMN ^{13}C (D_2O , 75 MHz) δ (ppm) : 23.6 (2×s, 50/50 mélange de diastéréoisomères), 28.3, 41.4, 46.5 (2×s), 46.6 (2×s), 51.8 (2×s), 171.0, 173.6. (Les deux carbones correspondant aux acides sont confondus).

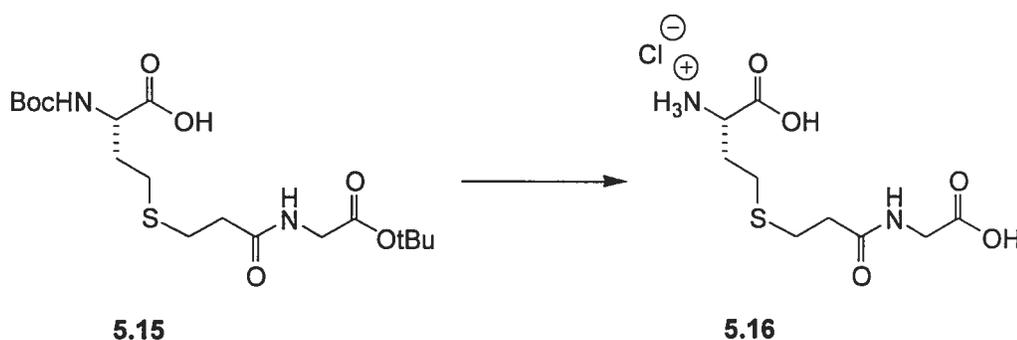
SMHR (FAB, MH^+) 281.1817. $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{S}$ calculé : 281.0807.

Acide L-2-tert-butoxycarbonylamino-4-[2-tert-butoxycarbonylméthyl-carbamoyl]-éthylsulfanyl]-butyrique (5.15)



À une solution du dérivé méthyl ester **5.11** (0.267 g, 0.615 mmol) dans un mélange THF/H₂O (7/2) à 0°C, une solution de NaOH (1 mL, 1.2 éq.) est ajoutée. La consommation de **5.11** est suivie par ccm (R_f 0.27, 35% AcOEt dans l'hexane) et est évaporée sous pression réduite après environ 1 h. Du HCl (1N) est ajouté et des extractions avec AcOEt (3×10 mL) sont faites. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour donner un résidu incolore. Le produit est utilisé tel quel pour la prochaine réaction.

Acide L-2-amino-4-[2-carboxyméthyl-carbamoyl]-éthylsulfanyl]-butyrique•HCl (5.16)



À une solution du composé **5.15** (0.092 g, 0.219 mmol) dans du CH₂Cl₂ (5 mL) à 0°C, du TFA (0.338 mL, 4.393 mmol) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité toute la nuit à température ambiante. Le solvant est enlevé à chaque fois sous pression

réduite. Du cyclohexane est ajouté (3×5 mL) au résidu et concentré sous pression réduite. L'huile résultante est dissoute dans du CHCl₃ et extrait avec du HCl (0.1N). La phase aqueuse est concentrée sous pression réduite pour obtenir une gomme jaune pâle très hygroscopique (0.066 g, 100 %).

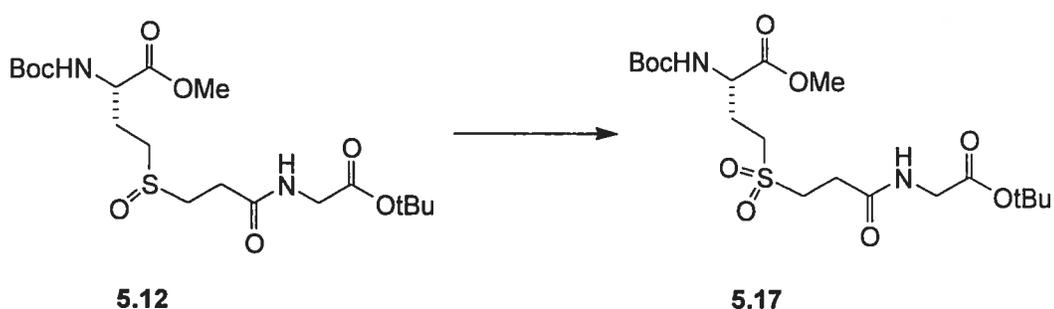
$[\alpha]_D -3.0$ (c 0.32, MeOH)

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) δ (ppm) : 2.07-2.20 (2H, m), 2.54 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 2.65 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.75 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.90 (2H, s), 4.13 (1H, t, $J = 6.5$ Hz).5

RMN ¹³C (D₂O, 75 MHz) δ (ppm) : 26.7, 26.8, 29.7, 35.5, 41.3, 51.9, 171.9, 173.6, 175.3.

SMBR (FAB, MH⁺) 265.1. C₉H₁₇N₂O₅S calculé : 265.0858.

Acide *L*-2-*tert*-butoxycarbonylamino-4-[2-*tert*-butoxycarbonylméthyl-carbamoyl]-*é*thanesulfonyl]-butyrique méthyl ester (5.17)



À une solution du dérivé sulfoxyde **5.12** (0.161g, 0.358 mmol) dans du MeOH (5 mL), du H₂O₂ (30 %, 8 éq.) est ajouté. La solution est agitée pendant 2 jours à 50°C et évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash (20 % hexane dans AcOEt puis 100 % AcOEt) pour donner une huile incolore (0.096g, 58 %).

R_f 0.70 (100 % AcOEt)

[α]_D -7.9 (c 0.32, MeOH)

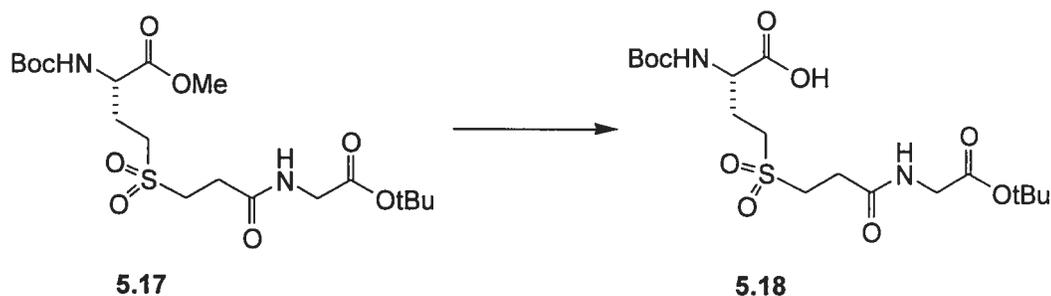
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.42 (9H, s), 1.45 (9H, s), 2.10-2.48 (2H, m), 2.79 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.09 (2H, m), 3.35 (2H, m), 3.74 (3H, s), 3.92 (2H, d, *J* = 5.0 Hz), 4.33 (1H, m), 5.51 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.61 (1H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 25.4, 28.1, 28.4, 28.5, 42.3, 48.1, 49.9, 52.2, 52.8, 80.5, 82.6, 155.6, 168.9, 169.4, 171.9.

SMHR (FAB, MH⁺) 467.2063. C₁₉H₃₅N₂O₉S calculé : 467.2063.

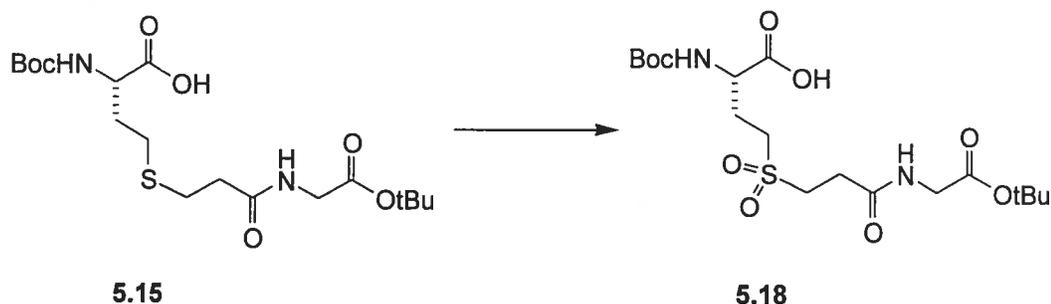
Acide L-2-tert-butoxycarbonylamino-4-[2-tert-butoxycarbonylméthyl-carbamoyl]-éthanesulfonyl]-butyrique (5.18) :

Méthode 1 :



À une solution du dérivé sulfone **5.17** (0.088g, 0.189 mmol) dans un mélange THF/H₂O (7/2), du NaOH (1 mL, 1.2 éq.) est ajouté à 0°C. Le mélange réactionnel est agité pendant 1.5 h. La solution est évaporée sous pression réduite. Le résidu est dissout dans AcOEt (5 mL) puis des extractions avec H₂O (2×5mL) sont réalisées. La phase aqueuse est acidifiée avec du HCl (0.1 N) puis des extractions sont faites avec AcOEt (3×5 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et finalement évaporée sous pression réduite. Une huile incolore (0.069 g, 81 %) est obtenue.

Méthode 2 :



À une solution du dérivé thioéther **5.15** (0.156 g, 0.341 mmol) dans du THF (1mL), H₂O₂ (30%, 0.300 mL, 8 éq.) puis AcOH (0.300 mL) sont ajoutés. La solution est agitée à 50°C pendant 2 jours, est évaporée sous pression réduite, dissout dans

AcOEt (10 mL) et lavé avec H₂O. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et finalement évaporée sous pression réduite pour donner un solide blanc (0.086 g, 51% à partir de **5.11**).

p.f. (138-140) °C

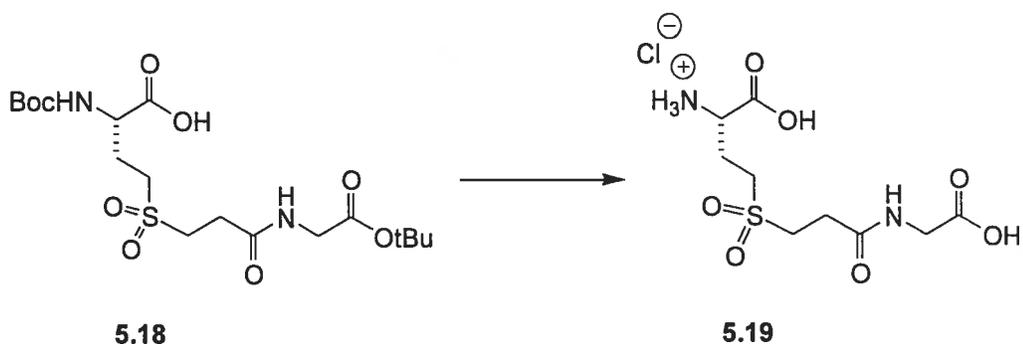
[α]_D -3.2 (c 0.34, MeOH)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.43 (9H, s), 1.44 (9H, s), 2.22-2.38 (2H, m), 2.79 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 3.14 (2H, m), 3.41 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.93 (2H, d, *J* = 7.1 Hz), 4.39 (1H, m), 5.81 (1H, d, *J* = 7.1 Hz), 7.06 (1H, s large).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 25.1, 28.1, 28.4, 29.5, 42.4, 48.2, 49.6, 52.0, 80.8, 82.9, 156.1, 169.2, 170.4, 173.7.

SMHR (FAB, MH⁺) 453.1882. C₁₈H₃₃N₂O₉S calculé : 453.1907.

Acide **2-amino-4-[2-carboxyméthyl-carbamoyl]-éthanesulfonyl]-butyrique•HCl**
(5.19) :



À une solution du dérivé **5.18** (0.068 g, 0.150 mmol) dans 5 mL de CH_2Cl_2 , du TFA (0.232 mL, 3.01 mmol) est ajouté à 0°C . Le mélange réactionnel est agité toute la nuit à température ambiante puis est évaporé sous pression réduite. Du cyclohexane (3×10 mL) puis du HCl (0.1N) sont ajoutés puis évaporés à chaque fois. Une huile jaunâtre (0.051 g, 100 %) est obtenue.

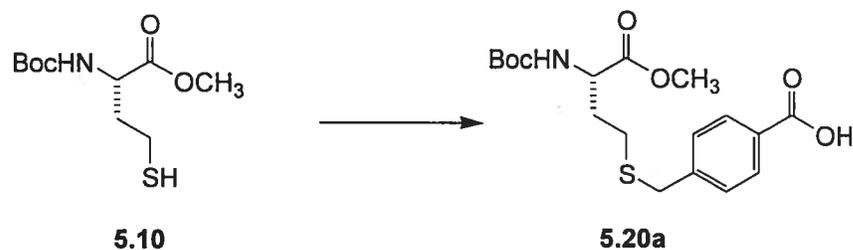
$[\alpha]_{\text{D}} -3.7$ (c 0.28, MeOH)

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) : 2.36-2.47 (2H, m), 2.85 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 3.39-3.52 (m, 2H), 3.56 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 3.97 (2H, s), 4.21 (1H, t, $J = 6.6$ Hz).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz) δ (ppm) : 22.5, 27.7, 41.5, 48.3, 48.7, 51.5, 170.9, 172.7, 173.6.

SMBR (FAB, MH^+) 297.0. $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ calculé : 297.0756.

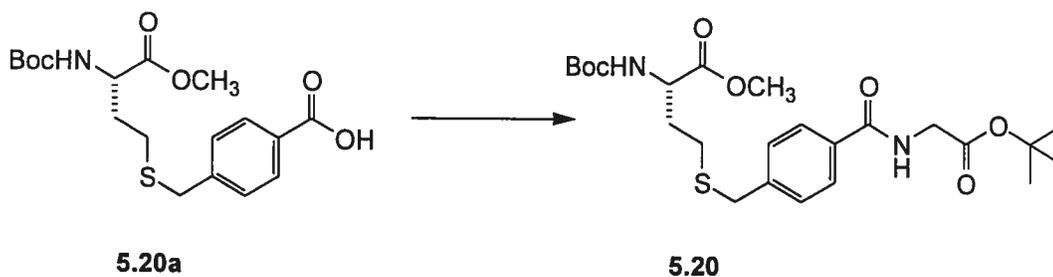
Acide L-4-(3-tert-butoxycarbonylamino-3-méthoxypropylsulfanylméthyl)-benzoïque (5.20a)



Une solution de L-homocystéine **5.10** (0.166 g, 0.666 mmol) dans du DMF (3 mL) à 0°C, est traitée avec de l'acide α -bromotoluïque (0.215 g, 1 mmol) suivi par le K_2CO_3 (0.230 g, 1.666 mmol) qui est doucement additionné. Le mélange réactionnel est agité pendant 22 h à température ambiante, traité avec de l'eau distillée (5 mL) et 5 mL de HCl (1 N) et extrait avec AcOEt (3×10 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner une huile, qui est purifié par chromatographie sous gravitation (35 % AcOEt dans l'hexane) pour donner une huile incolore. Des traces du dérivé bromé (ayant le même R_f) subsistent. Le produit **5.20a** est directement utilisé pour l'étape suivante.

R_f 0.25 (40 % AcOEt dans l'hexane)

Acide L-2-tert-butoxycarbonylamino-4-[4-(tert-butoxycarbonylméthyl-carbamoyl)-benzylsulfanyl]-butyrique méthyl ester (5.20):



À une solution du composé **5.20a** (0.195 g, 0.509 mmol) dans CH₃CN (10 mL) à 0 °C, le DIEA (0.443 mL, 2.545 mmol) et la glycine *tert*-butyl ester•HCl (0.121 g, 0.611 mmol) sont ajoutés. Le tout est agité jusqu'à dissolution complète de l'amine. Ensuite, le TBTU (0.327 g, 1.018 mmol) est additionné. La solution est ramenée doucement à température ambiante et est laissée sous agitation toute la nuit. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est dissout dans AcOEt (20 mL) et des lavages sont effectués avec HCl (0.1 N) (10 mL), avec NaHCO₃ 5 % (10 mL) puis finalement avec H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le composé désiré est purifié par chromatographie flash (35 % AcOEt dans Hexane) pour donner une huile incolore (0.148 g, 44 % à partir de **5.10**).

R_f 0.25 (35 % AcOEt dans l'hexane)

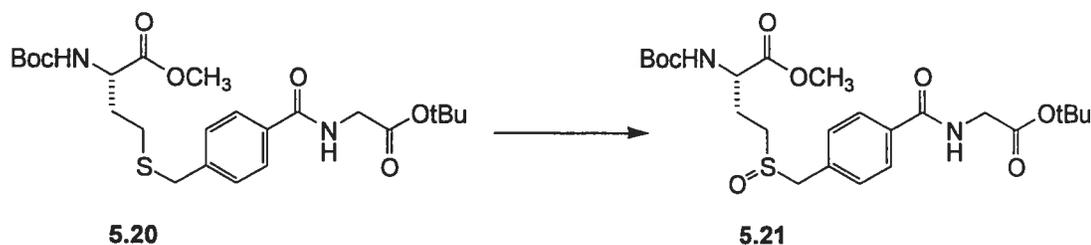
[α]_D +9.2 (c 0.22, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.39 (9H, s), 1.46 (9H, s), 1.85 (1H, m), 2.04 (1H, m), 2.39 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 3.69 (3H, s), 3.70 (2H, s), 4.10 (2H, d, *J* = 1.9 Hz), 4.36 (1H, m), 5.13 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 6.75 (1H, m), 7.34 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.74 (2H, d, *J* = 8.3 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 27.1, 28.1, 28.3, 32.3, 35.8, 42.5, 52.5, 52.7, 80.1, 82.2, 127.4, 129.1, 132.7, 142.2, 155.4, 167.0, 171.2, 172.8.

SMBR (FAB, MH⁺) 497.2. C₂₄H₃₇N₂O₇S calculé : 497.2321

Acide *L*-2-*tert*-butoxycarbonylamino-4-[4-(*tert*-butoxycarbonylméthyl-carbamoyl)-benzylsulfinyl]-butyrique méthyl ester (5.21)



À une solution du dérivé thioéther **5.20** (0.122 g, 0.246 mmol) dans 5 mL de THF/H₂O (7:2), une solution de NaIO₄ (0.052 g, 0.242 mmol) dans 1 mL H₂O est ajoutée. Le mélange réactionnel est porté à 60°C pendant 8 h puis la solution est agitée toute la nuit à température ambiante. Une fois la réaction complétée selon la ccm (disparition du produit de départ, R_f 0.25, 35 % AcOEt dans l'hexane), la solution est évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est dissout dans AcOEt (10 mL) puis des lavages sont effectués avec H₂O (10 mL) et NaCl sat. (5 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie flash (100 % AcOEt) pour donner une huile incolore (0.116 g, 92 %).

R_f 0.56 (100 % AcOEt)

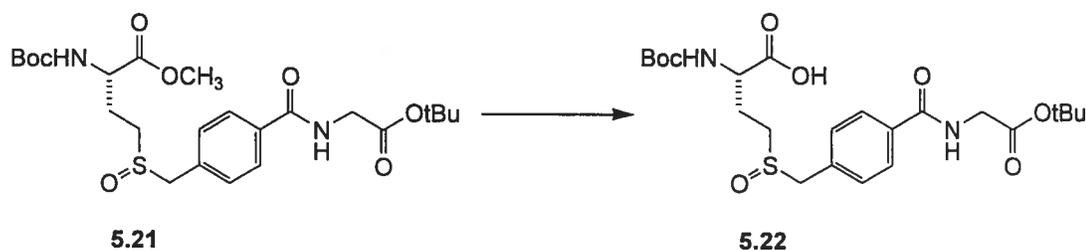
[α]_D +5.7 (c 0.28, CHCl₃, mélange de diastéréoisomères)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.40 (9H, s), 1.46 (9H, s), 2.06 (1H, m), 2.27 (1H, m), 2.55-2.69 (2H, m), 3.70 (3H, 2×s, mélange de diastéréoisomères : 50/50), 3.97 (2H, s), 4.09 (2H, d, *J* = 5.0 Hz), 4.35 (1H, m), 5.41 (1H, 2×d, *J* = 7.8 Hz), 6.90 (1H, s large), 7.32 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.78 (2H, d, *J* = 8.0 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 26.1 (2×s, mélange de diastéréoisomères : 50/50), 28.1, 28.3, 42.5, 47.3 (2×s), 52.4, 52.8, 57.7 (2×s), 80.3, 82.6, 127.8 (2×s), 130.4 (2×s), 133.5, 134.0, 155.6, 166.8, 169.3, 172.1.

SMBR (FAB, MH⁺) 513.2. C₂₄H₃₇N₂O₈S calculé : 513.2271.

Acide *L*-2-*tert*-butoxycarbonylamino-4-[4-(*tert*-butoxycarbonylméthyl-carbamoyl)-benzylsulfinyl]-butyrique (5.22)



À une solution du dérivé sulfoxyde **5.21** (0.105 g, 0.205 mmol) dans 5 mL d'un mélange THF/H₂O (7:2) à 0°C, est ajouté du NaOH (1 mL, 1.3 éq.). Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 1h jusqu'à disparition complète du produit de départ par ccm (R_f 0.56, 100% AcOEt), puis le volume est réduit sous pression réduite. La phase aqueuse est acidifiée avec du HCl (0.1N), puis le produit désiré est extrait avec AcOEt (5×10 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner le produit voulu comme une huile légèrement orangée (0.096g, 94 %).

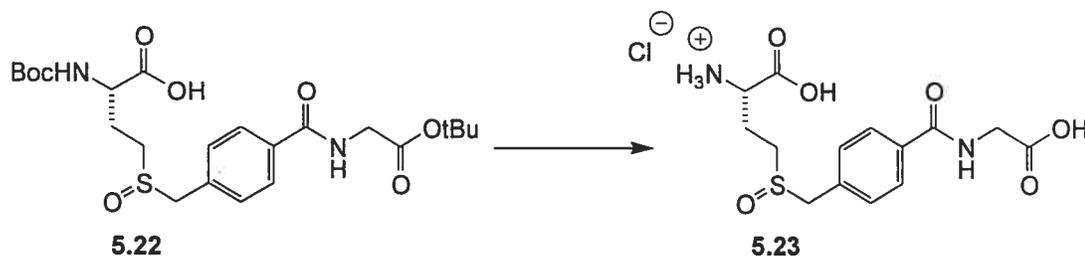
$[\alpha]_D +41.1$ (c 0.22, CHCl₃, mélange de diastéréoisomères)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 1.41 (9H, s), 1.47 (9H, s), 2.08-2.25 (2H, m), 2.77 (2H, m), 4.08 (2×2H, m), 4.35 (1H, m), 5.66 (1H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.12 (1H, s large), 7.32 (2H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.77 (2H, d, *J* = 7.6 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 26.0 (2×s, mélange de diastéréoisomères : 50/50), 28.3, 28.4, 42.6, 46.4 (2×s), 52.4 (2×s), 56.7 (2×s), 80.4, 82.7 (2×s), 128.0, 130.6, 133.2 (2×s), 134.0 (2×s), 155.8, 167.3, 169.5 (2×s), 173.3.

SMBR (FAB, MH⁺) 499.2. C₂₃H₃₅N₂O₈S calculé : 499.2114.

Acide L-2-amino-4-[4-(carboxyméthyl-carbamoyl)-phénylméthanesulfinyl]-butyrique (5.23)



À une solution de **5.22** (0.088 g, 0.177 mmol) dans 5 mL CH_2Cl_2 à 0 °C, est ajoutée du TFA (0.340 mL, 4.416 mmol). La solution est lentement ramenée à température ambiante et est agitée toute la nuit. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est lavé au cyclohexane (3×5 mL) et évaporé sous pression réduite à chaque fois. Du HCl (0.1 N) est ajouté et la solution est à nouveau évaporée sous pression réduite pour donner une gomme orangée (0.062 g, 93 %).

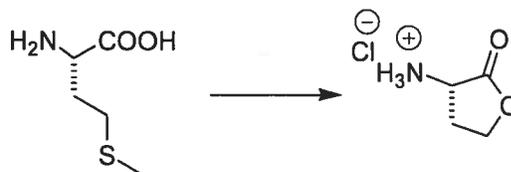
$[\alpha]_{\text{D}}$ -4.4 (c 0.32, MeOH, mélange de diastéréoisomères)

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) : 2.33 (2H, m), 2.93-3.08 (2H, m), 4.11 (2H, s), 4.15-4.22 (1H+1H, m), 4.27 (1H, dd, $J = 13.2$ Hz, $J = 3.0$ Hz), 7.40 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.75 (2H, d, $J = 8.1$ Hz).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz) δ (ppm) : 24.1 (2×s, mélange de diastéréoisomères : 50/50), 42.3, 46.1 (2×s), 52.2 (2×s), 56.2 (2×s), 128.5, 131.6, 133.6, 134.2, 171.0, 171.4, 174.1.

SMHR (FAB, MH^+) 343.0964. $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ calculé : 343.0948.

8.1.2.4. Préparation des composés du chapitre 6

L-2-aminobutyrolactone•HCl (6.9)**6.9**

À une solution de L-méthionine (10 g, 67.02 mmol) dans un mélange MeOH/H₂O 1/7 (200 mL), du MeI (10.1 mL, 162 mmol) est ajouté puis la solution est agitée pendant 48 h. Un tiers de la solution est évaporé sous pression réduite. Une solution de NaHCO₃ (5.63 g, 67.02 mmol) dans H₂O (100 mL) est ajouté au milieu réactionnel. Le tout est agité sous reflux pendant 24 h, et évaporée sous pression réduite pour donner une huile. Du HCl (6N) (100 mL), puis 5 mL H₂O₂ sont ajoutés et des lavages à l'éther sont faits. La solution acide est mise sous reflux pendant 2 jours. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit désiré est recristallisé dans un mélange EtOH/H₂O (9/1) pour donner des cristaux blancs (7.07 g, 77 %).

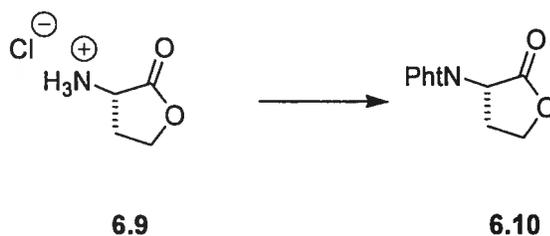
p.f. (218-220) °C [litt.²⁰² (220-221) °C]

[α]_D -29.7 (c 0.67, H₂O) (litt.²⁰² -27.7, c 0.2, H₂O)

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) δ (ppm) : 2.45 (1H, m), 2.80 (1H, m), 4.46 (2H, m), 4.61 (1H, t, *J* = 9.3 Hz).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz) δ (ppm) : 27.1, 48.9, 67.7, 174.9.

SMHR (MAB, M⁺) 101.0461. C₄H₇NO₂ calculé : 101.0477.

***N*-Phthaloyl-L-2-aminobutyrolactone (6.10)**

À une solution de 2-aminobutyrolactone **6.9** (5 g, 36.5 mmol) dans le toluène (100 mL), est ajouté l'anhydride phthalique (5.405 g, 36.5 mmol) puis la triéthylamine (14.75 mL, 105.8 mmol). Le mélange réactionnel est mis à reflux pendant une nuit. La solution est lavée avec du HCl (1N) et H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et filtrée sous vide. Le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner un solide blanchâtre **6.10** (6.407 g, 76 %).

R_f 0.24 (35 % AcOEt dans l'hexane)

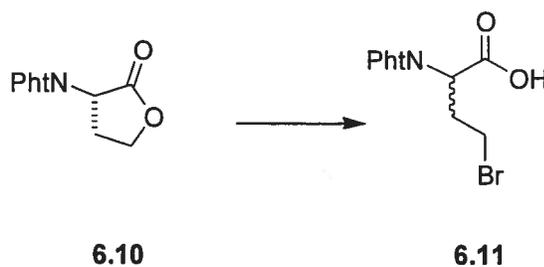
p.f. (169-172) °C [litt.²⁰⁸ (174-176) °C]

[α]_D -11.0 (c 1.0, CHCl₃) (litt.²⁰⁸ -39.5, c 1.0 CH₃CN)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 2.62 (1H, m), 2.80 (1H, m), 4.41 (1H, m), 4.67 (1H, m), 5.11 (1H, t, *J* = 9.6 Hz), 7.78 (2H, m), 7.88 (2H, m).

RMN ¹³C (DMSO, 100 MHz) δ (ppm) : 26.2, 47.2, 66.2, 123.6, 131.2, 135.0, 167.1, 173.3.

SMHR (MAB, M⁺) 231.0531. C₁₂H₉NO₄ calculé : 231.0532.

Acide 4-bromo-2-phthalimidobutyrique (6.11)

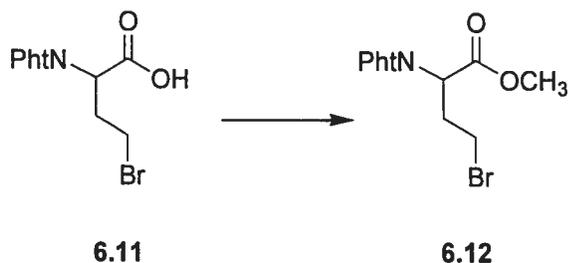
À une solution de la *N*-phthaloyl-L-2-aminobutyrolactone **6.10** (1.0 g, 4.328 mmol), de l'acide bromohydrique dans du AcOH (5 mL) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité toute la nuit. La solution est évaporée sous pression réduite pour donner le dérivé bromé comme une huile visqueuse orangée. De l'éther est ajouté et le produit désiré précipite et est filtré et séché pour donner une poudre légèrement orangée (0.922 g, 69 %).

$[\alpha]_D$ pouvoir rotatoire nul (c 0.8, MeOH)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) : 2.81 (2H, m), 3.32 (1H, m), 3.53 (1H, m), 5.23 (1H, m), 7.77 (2H, m), 7.88 (2H, m).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) : 29.3, 31.6, 50.3, 124.0, 131.6, 134.6, 167.6, 174.6.

SMHR (MAB, M^+) 310.9781. $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrNO}_4$ calculé : 310.9793.

Acide 4-bromo-2-phthalimidobutyrique méthyl ester (6.12)

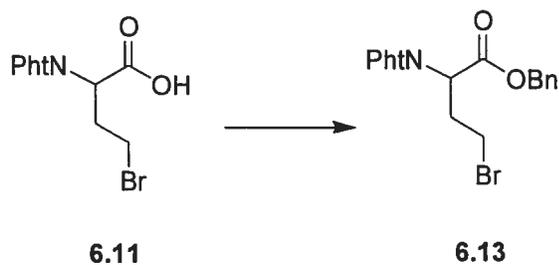
À une solution du dérivé bromé **6.11** (0.722 g, 2.315 mmol) dans le 2,2-diméthoxypropane (30 mL), un mélange MeOH/AcCl (9/1) est ajouté. La solution est agitée toute la nuit puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est dissout dans 30 mL AcOEt puis lavé avec une solution de NaHCO₃ (5 %). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis filtrée et finalement évaporée sous pression réduite. Le produit désiré **6.12** (0.320 g, 42 % depuis la *N*-phthalyl-2-aminobutyrolactone **6.10**) est obtenu comme une huile incolore.

R_f 0.41 (35 % AcOEt dans l'hexane).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 2.77 (2H, m), 3.31 (1H, m), 3.50 (1H, m), 3.71 (3H, s), 5.13 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.75 (2H, m,), 7.84 (2H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 29.4, 31.8, 50.4, 53.0, 123.7, 131.7, 134.4, 167.5, 169.1.

SMHR (MAB, M⁺) 324.9948. C₁₃H₁₂BrNO₄ calculé : 324.9950.

Acide 4-bromo-2-phthalimidobutyrique benzyl ester (6.13)

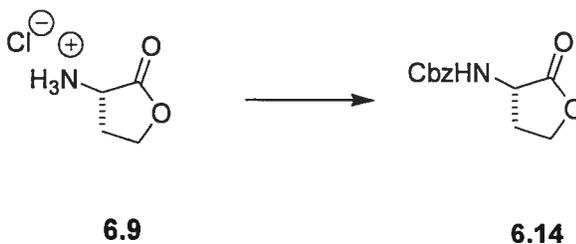
À une solution du composé **6.11** (4.4 g, 14.15 mmol) dans CH_2Cl_2 (40 mL), l'alcool benzylique (1.610 mL, 15.56 mmol), le DCC (3.210 g, 15.56 mmol) puis le DMAP (0.173 g, 1.415 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée pendant toute la nuit. Le précipité formé est filtré. La solution est évaporée sous pression réduite puis le résidu est purifiée par chromatographie flash (35 % AcOEt dans l'hexane puis 50 % AcOEt dans l'hexane). Une huile incolore est obtenue (3.450 g, 58 % depuis la *N*-phthalyl-2-aminobutyrolactone **6.10**).

Rf 0.49 (35% AcOEt dans l'hexane)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) : 2.84 (2H, m), 3.34 (1H, m), 3.52 (1H, m), 5.19 (2H, d, $J = 2.1$ Hz), 5.21 (1H, t, $J = 6.4$ Hz), 7.29 (5H, m), 7.74 (2H, m), 7.86 (2H, m).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) : 29.3, 31.8, 50.7, 67.8, 123.7, 128.1, 128.4, 128.5, 131.7, 134.4, 135.0, 167.6, 168.6.

SMBR (FAB, MH^+) 402.1. $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{BrNO}_4$ calculé : 402.0341.

Carbobenzyloxy-2-aminobutyrolactone (6.14)

À une solution de 2-aminobutyrolactone **6.9** (1g, 7.298 mmol) dans 20 mL d'un mélange H₂O : dioxane (1 :2) à 0°C, du NaHCO₃ (1.349 g, 16.056 mmol) puis le chloroformate de benzyle (1.125 mL, 7.882 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité ainsi toute la nuit puis est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissout dans 20 mL CHCl₃ puis est lavé avec 10 mL HCl (1N) puis 20 mL H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et finalement concentrée sous pression réduite pour donner un solide. Celui-ci est recristallisé en présence d'un minimum d'AcOEt et d'hexane pour donner des cristaux blancs (0.926 g, 54 %).

R_f 0.41 (60 % AcOEt dans l'hexane)

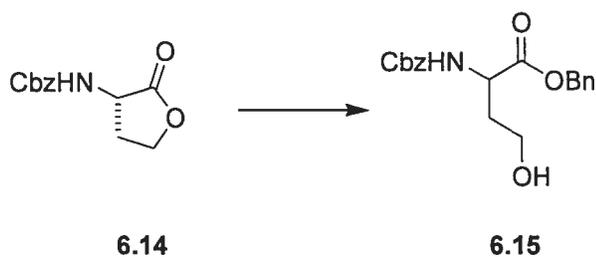
p.f. (127-129) °C [litt.²⁰⁹ (129-130) °C]

[α]_D -22.5 (c 0.33, MeOH) [litt.²²⁷ -30.5, (c 1.2 MeOH)]

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 2.21 (1H, m), 2.78 (1H, m), 4.20 (1H, m), 4.41 (2H, m), 5.12 (2H, s), 5.43 (1H, s large), 7.35 (5H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 30.5, 50.6, 65.9, 67.5, 128.3, 128.4, 128.7, 136.0, 156.2, 175.1.

SMHR (FAB, MH⁺) 236.0916. C₁₂H₁₄NO₄ calculé : 236.0923.

Acide 2-benzyloxycarbonylamino-4-hydroxy-butrique benzyl ester (6.15)

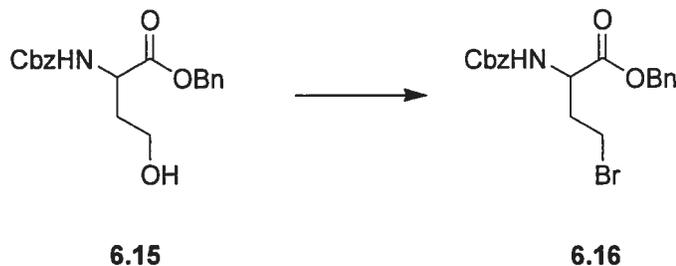
À une solution du composé **6.14** (0.290 g, 1.234 mmol) dans de EtOH (4 mL) à 0°C, une solution de NaOH (1.305 mmol) dans 1 mL H₂O est ajoutée. Après ½ h de réaction, la solution est évaporée sous pression réduite et mise sous la pompe à vide. Le résidu est ensuite dissout dans 2 mL de DMF et le BnBr (0.180 mL, 1.505 mmol) est ajouté. La solution est agitée pendant 48 h dans le noir puis est évaporée sous pression réduite. Le résidu est dissout dans 20 mL d'AcOEt et des lavages sont faits avec 10 mL d'une solution de NaHCO₃ saturée puis avec H₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et finalement évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie flash (50 % AcOEt dans l'hexane) pour donner une huile incolore (0.288 g, 68 %).

Rf 0.35 (60 % AcOEt dans l'hexane)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.75 (1H, m), 2.15 (1H, m), 3.00 (1H, m), 3.67 (2H, m), 4.59 (1H, m), 5.11 (2H, s), 5.18 (2H, s), 5.84 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.35 (10H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 35.5, 51.5, 58.4, 67.3, 67.4, 128.2, 128.3, 128.6, 128.7, 135.2, 136.1, 156.8, 172.5.

SMHR (FAB, MH⁺) 344.1487. C₁₉H₂₂NO₅ calculé : 344.1498.

Acide 2-benzyloxycarbonylamino-4-bromobutyrique benzyl ester (6.16)

À une solution du dérivé **6.15** (0.186 g, 0.542 mmol) dans 10 mL CH_2Cl_2 à 0°C , le CBr_4 (0.225 g, 0.678 mmol) puis la triphénylphosphine (0.198 g, 0.754 mmol) sont ajoutés en deux portions. La solution, sous agitation, est lentement ramenée à température ambiante. Au bout de 1.5 h de réaction, la solution est évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie flash (33 % AcOEt dans l'hexane) pour donner une huile incolore **6.16** (0.201 g, 91 %).

Rf 0.62 (60 % AcOEt dans l'hexane)

$[\alpha]_{\text{D}}$ -1.6 (c 1, CHCl_3) (litt.²⁰⁷ -35.0, c 1, solvant non spécifié)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) : 2.23-2.47 (2H, m), 3.39 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 4.57 (1H, m), 5.12 (2H, s), 5.19 (2H, s), 5.48 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.37 (10H, m).

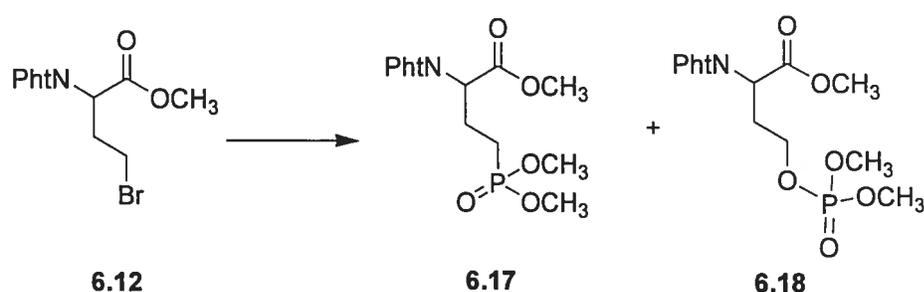
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) : 28.2, 35.7, 53.0, 67.4, 67.7, 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 128.8, 129.2, 135.1, 136.1, 156.3, 171.5.

SMBR (FAB, MH^+) 406.7. $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrNO}_4$ calculé : 406.0654.

Protocole général pour la réaction d'Arbuzov :

À une solution de dérivé bromé (1 éq.) est ajouté le triméthyl phosphite (10 éq.). Le mélange réactionnel est agité pendant une nuit à reflux puis est refroidi et évaporé sous pression réduite. Le produit désiré est purifié par chromatographie flash (100 % AcOEt).

Acide 4-(diméthoxy-phosphoryl)-2-phthalimidobutyrique méthyl ester (6.17)



Le protocole général pour la réaction d'Arbuzov est suivi avec 2.201 g (6.773 mmol) de dérivé bromé **6.12**. Une huile incolore cristallisant sous la pompe pour donner un solide blanc **6.17** (1.906 g, 79 %) est obtenue. Le produit secondaire **6.18** a été obtenu comme un solide blanc (0.241 g, 10 %).

R_f 0.23 (100 % AcOEt)

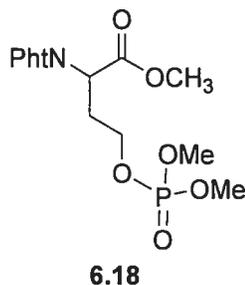
p.f. (82-84) °C

RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.79 (2H, m), 2.51 (2H, m), 3.6-3.75 (9H, m), 4.83 (1H, m), 7.71-7.84 (4H, m).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 21.9 (d, $J = 142.8$ Hz), 22.6, 52.1, 52.5 (t, $J = 6.5$ Hz), 53.0, 123.7, 131.7, 134.5, 167.6, 169.0.

RMN ^{31}P (CDCl₃, 121.5 MHz) 33.8.

SMHR (MAB, M^+) 355.0823. C₁₅H₁₈NO₇P calculé : 355.0821.

Acide 4-(diméthoxy-phosphoryloxy)-2-phthalimidobutyrique méthyl ester (6.18)

R_f 0.39 (100 % AcOEt)

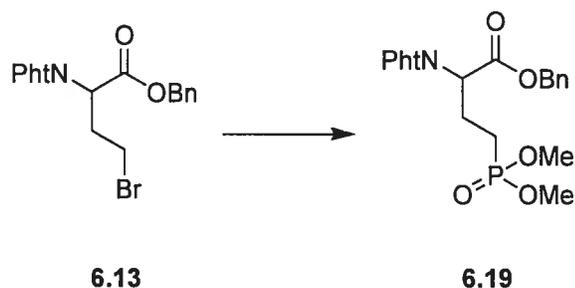
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 2.61 (2H, m), 3.62 (6H, dd, *J* = 11.1 Hz, *J* = 3.1 Hz), 3.67 (3H, s), 3.90-4.16 (2H, m), 5.03 (1H, dd, *J* = 10.1 Hz, *J* = 5.0 Hz), 7.70 (2H, m), 7.79 (2H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 29.4 (d, *J* = 7.4 Hz), 48.4, 52.9, 54.3 (d, *J* = 5.6 Hz), 64.0 (d, *J* = 6.3 Hz), 123.5, 131.6, 134.3, 167.4, 169.2.

RMN ³¹P (CDCl₃, 121.5 MHz) δ (ppm) : 2.1

SMBR (FAB, MH⁺) 372.2. C₁₅H₁₉NO₈P calculé : 372.0848.

Acide 4-(diméthoxy-phosphoryl)-2-phthalimidobutyrique benzyl ester (6.19)



Le protocole général pour la réaction d'Arbuzov est suivi avec 1.089 g (2.715 mmol) de dérivé bromé **6.13**. Une huile incolore cristallisant sous la pompe pour donner une huile incolore (0.736 g, 71 %) est obtenue.

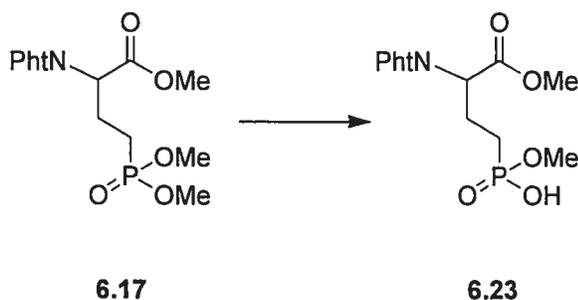
R_f 0.23 (100 % AcOEt)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) : 1.77-1.82 (2H, m), 2.48-2.59 (2H, m), 3.68-3.72 (6H, m), 4.91 (1H, q, $J = 5.5$ Hz, $J = 9.8$ Hz), 5.19 (2H, s), 7.30 (5H, m), 7.75 (2H, m), 7.86 (2H, m).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) : 21.2, 22.6 (d, $J = 3.5$ Hz), 52.4 (d, $J = 6.3$ Hz), 52.6, 67.9, 123.8, 128.3, 128.5, 128.7, 131.7, 134.5, 135.1, 167.7, 168.5.

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121.5 MHz) 33.9.

SMHR (FAB, MH^+) 432.1214. $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_7\text{P}$ calculé : 432.1212.

Acide 4-(hydroxyl-méthoxy-phosphoryl)-2-phthalimidobutyrique benzyl ester (6.23)

Une solution du diméthylphosphonate **6.17** (0.100g, 0.282 mmol) en présence de bromure de lithium (0.029g, 0.338 mmol, 1.2 éq.) dans la 2-pentanone (3 mL) est portée à reflux pendant deux heures, évaporé sous pression réduite, dissout dans 5 ml de HCl (1N) et extrait au chloroforme (2×10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner une huile incolore (0.081g, 82 %).

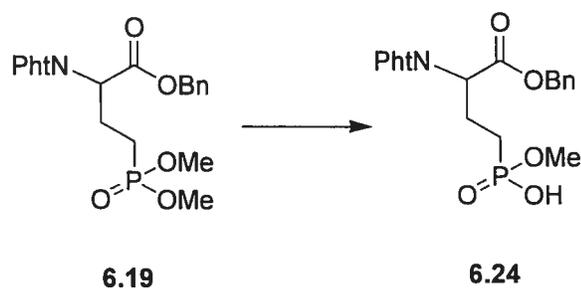
R_f 0.2 (33 % MeOH dans EtOAc)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.69-1.83 (2H, m), 2.38-2.56 (2H, m), 3.64 (3H, d, *J* = 11.1 Hz), 3.71 (3H, s), 4.90 (1H, dd, *J* = 5.2 Hz, *J* = 10.1 Hz), 7.75 (2H, m), 7.85 (2H, m), 10.75 (1H, s large).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 22.5, 22.7 (d, *J* = 146.2 MHz), 29.9, 52.1 (d, *J* = 6.9 Hz), 53.1, 123.9, 131.9, 134.5, 167.7, 169.3.

RMN ³¹P (CDCl₃, 121.5 MHz) 35.7.

SMBR (FAB, MH⁺) 342.1. C₁₄H₁₇NO₇P calculé : 342.0743.

Acide 4-(hydroxyl-méthoxy-phosphoryl)-2-phthalimidobutyrique benzyl ester (6.24)

À une solution du composé **6.19** (0.130 g, 0.301 mmol) dans le THF à 0°C, la Et₃N (0.488 mL, 3.498 mmol) et le thiophénol (0.359 mL, 3.498 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité pendant 15 min à cette température puis est ramené et laissé à température ambiante pendant 17 h. La solution est évaporée sous pression réduite et est dissoute dans 10 mL H₂O puis un lavage avec 10mL AcOEt est effectué. La solution aqueuse est acidifiée avec 5 mL de HCl (1N) puis des extractions avec AcOEt (3×10 mL) sont faites. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour donner une huile incolore (0.106 g, 84 %).

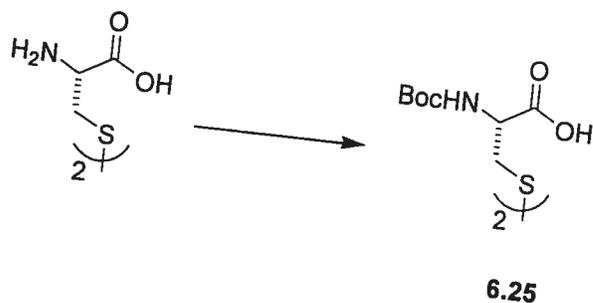
R_f 0.2 (33 % MeOH dans EtOAc)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 1.75-1.85 (2H, m), 2.48-2.60 (2H, m), 3.63 (3H, d, *J* = 11.1 Hz), 4.90 (1H, dd, *J* = 5.6 Hz, *J* = 9.8 Hz), 5.17 (2H, s), 7.29 (5H, m), 7.74 (2H, m), 7.85 (2H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 22.3 (d, *J* = 3.3 Hz), 22.4 (d, *J* = 145.9 Hz), 51.7 (d, *J* = 6.9 Hz), 52.0 (d, *J* = 18.5 Hz), 67.8, 123.7, 128.2, 128.4, 128.6, 131.7, 134.4, 135.1, 167.6, 168.4.

RMN ³¹P (CDCl₃, 121.5 MHz) δ (ppm) : 35.2.

SMHR (FAB, MH⁺) 418.1077. C₂₀H₂₁NO₇P calculé : 418.1056.

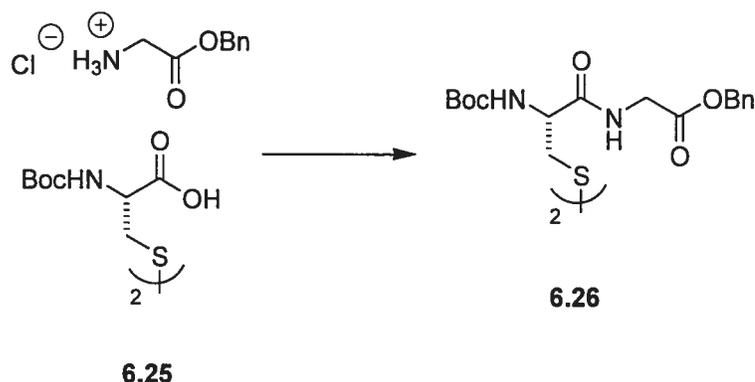


À une solution de cystine (1 g, 4.10 mmol) dans le dioxane (40 mL), à 4°C, du $(\text{Boc})_2\text{O}$ (1.910 g, 8.74 mmol) puis une solution de NaOH (1M) (17 mL) sont ajoutés. La solution est agitée toute la nuit à température ambiante. Du NaOH (1M) (9 mL) est ajouté à nouveau, à 4°C, puis le mélange réactionnel est agité pendant 6 h supplémentaire. Puis la solution est évaporée sous pression réduite. Un volume de 30 mL d'AcOEt est ajouté au résidu obtenu, puis des extractions sont effectuées avec H_2O . La phase aqueuse est acidifiée avec du HCl (1N). Le produit est extrait avec AcOEt (3×20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis évaporée sous pression réduite pour donner un solide blanc **6.25** (1.630 g, 89 %).

p.f. (132-135) °C. [litt.²²⁸ (140-142)°C]
 $[\alpha]_D^{25}$ -121.8 (c 0.8, AcOH) (litt.²²⁸ -112.0, c 0.7, AcOH)

RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) δ (ppm) : 1.46 (18H, s), 2.97 (2H, dd, $J = 5.2$ Hz, $J = 13.7$ Hz), 3.24 (2H, dd, $J = 4.6$ Hz, $J = 14.0$ Hz), 4.42 (2H, m).
 RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm) : 28.7, 41.4, 54.2, 80.7, 157.9, 174.2.

SMHR (FAB, MH^+) 441.1364. $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$ calculé : 441.1365.

Boc-L-cystinylglycine benzyl ester (6.26)

À une solution de Boc-L-cystine **6.25** (0.829 g, 1.883 mmol) dans 20 mL d'acétonitrile à 0°C, le DIEA (1.641 mL, 9.420 mmol), puis la glycine benzyl ester•HCl (0.950 g, 4.710 mmol) et enfin le TBTU (1.815 g, 5.652 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est ramené à température ambiante et agité ainsi toute la nuit. La solution est évaporée sous pression réduite. Le résidu est dissout dans AcOEt (20 mL) et des lavages avec des solutions de HCl (1N), NaHCO₃ 5 % et H₂O sont effectués. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour donner un solide légèrement orangé **6.26** (1.343 g, 97 %).

R_f : 0.62 (30 % hexane dans AcOEt)

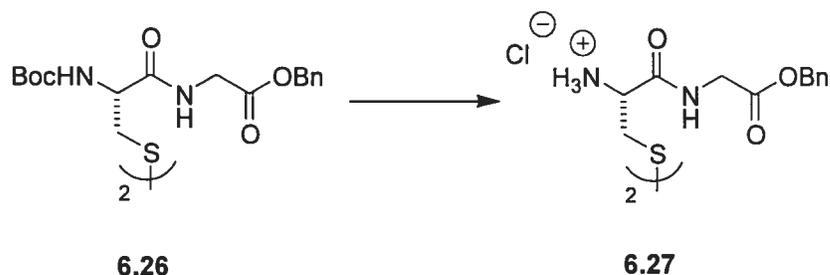
p.f. (107-110) °C

[α]_D +38.3 (c 0.62, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.38 (18H, s), 2.86 (2H, m), 3.02 (2H, dd, *J* = 14.6 Hz, *J* = 3.6 Hz), 3.90 (2H, dd, *J* = 17.6 Hz, *J* = 5.3 Hz), 4.23 (2H, dd, *J* = 17.7 Hz, *J* = 6.7 Hz), 4.94 (2H, m), 5.15 (4H, m), 5.55 (2H, d, *J* = 9.4 Hz), 7.34 (10H, m), 8.21 (2H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 28.4, 41.2, 47.0, 54.7, 67.2, 80.5, 128.5, 128.6, 128.8, 135.4, 156.1, 169.3, 171.0.

SMHR (MAB, M⁺) 735.2751. C₃₄H₄₆N₄O₁₀S₂ calculé : 735.2734.

L-Cystinylglycine benzyl ester•HCl (6.27)

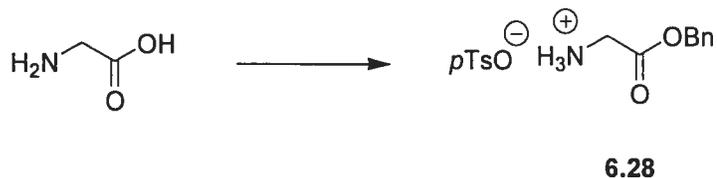
À une solution du dérivé **6.26** (1.258 g, 1.702 mmol) dans le CH_2Cl_2 (20 ml) à 0°C , le TFA (2.62 mL, 34.04 mmol) est ajouté. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation toute la nuit puis est évaporé sous pression réduite. Une huile est obtenue après co-évaporation sous pression réduite des produits volatiles, avec du cyclohexane (3×25 mL). Ensuite, du HCl (0.1N) (5 mL) est ajouté et est évaporé à nouveau sous pression réduite. Une huile légèrement orangée est obtenue (1.030 g, 100 %).

$[\alpha]_{\text{D}} -101.4$ (c 0.26, MeOH)

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm) : 3.18 (2H, m), 3.46 (2H, m), 4.12 (4H, m), 4.39 (2H, m), 5.19 (4H, m), 7.38 (10H, m).

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) δ (ppm) : 39.1, 42.2, 52.7, 68.1, 129.3, 129.5, 129.6, 137.0, 169.2, 170.8.

SMHR (MAB, M^+) 534.1660. $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$ calculé : 534.1685.

Glycine benzyl ester•acide *p*-toluène-sulfonique (6.28)

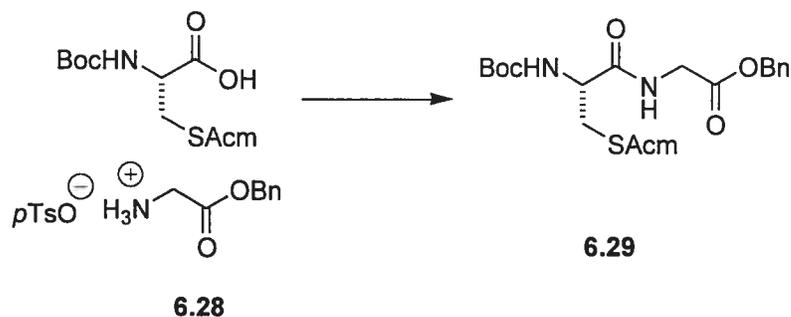
À une solution de glycine (3 g, 40 mmol) dans le BnOH (80 mL), de l'acide *p*-toluène-sulfonique (6.873 g, 40 mmol) est ajouté. Le tout est chauffé à 80°C jusqu'à ce que tous les composés du mélange réactionnel soient tous solubles. Ensuite, du chlorure de *p*-toluènesulfonyle (8.533 g, 44.8 mmol) est ajouté. La solution est agitée à 80°C pendant 2h30 puis est ramenée à température ambiante. Du diéthyl éther est ajouté jusqu'à ce que le composé précipite. La solution est placée à 4°C puis le sel est filtré comme un solide blanc **6.28** (11.31 g, 84 %).

p.f. (125-127) °C. [litt.²¹⁵ (131-132) °C]

RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) δ (ppm) : 2.37 (3H, s), 3.93 (2H, s), 5.28 (2H, s), 7.34 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.44 (5H, m), 7.67 (2H, d, *J* = 7.6 Hz).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz) δ (ppm) : 20.8, 40.4, 68.7, 125.6, 128.9, 129.2, 129.3, 129.8, 134.9, 139.6, 142.8, 168.3.

SMHR (MAB, M⁺) 165.0788. C₉H₁₁NO₂ calculé : 165.0788.

S-Acétamidate *tert*-butoxycarbonyl-*L*-cystéinyglycine benzyl ester (6.29)

À une solution de *S*-acétamidate-Boc-*L*-cystéine (1 g, 3.42 mmol) dans l'acétonitrile (20 mL) à 0°C, le DIEA (2.980 mL, 17.1 mmol), la glycine benzyl ester•pTsOH **6.28** (1.731 g, 5.130 mmol) et enfin le TBTU (2.196 g, 6.84 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est ramené à température ambiante et est agité ainsi toute la nuit. La solution est évaporée sous pression réduite. Le résidu est dissout dans AcOEt (20 mL) et des lavages avec des solutions de HCl (1N), NaHCO₃ (5%) et H₂O sont effectués. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour donner un solide jaunâtre **6.29** (1.421 g, 95 %).

R_f 0.69 (30% hexane dans AcOEt)

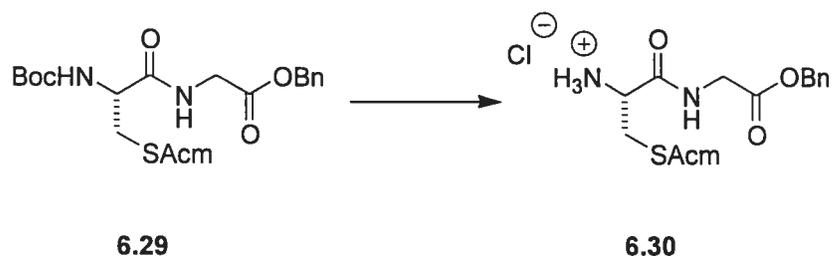
p.f. (79-80) °C

[α]_D +24.2 (c 0.81, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.42 (9H, s), 1.98 (3H, s), 2.77 (1H, m), 2.93 (1H, dd, *J* = 14.6 Hz, *J* = 5.1 Hz), 4.20 (3H, m), 4.51 (2H, m), 5.13 (2H, s), 5.75 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.31 (5H, m), 7.34 (1H, m), 7.55 (1H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 23.1, 28.3, 34.4, 41.0, 41.4, 53.4, 67.2, 80.3, 128.4, 128.5, 128.6, 135.2, 156.1, 169.5, 171.2, 171.5.

SMHR (FAB, MH⁺) 440.1875. C₂₀H₃₀N₃O₆S calculé : 440.1855.

S-Acétamidate-L-cystéinyglycine benzyl ester (6.30)

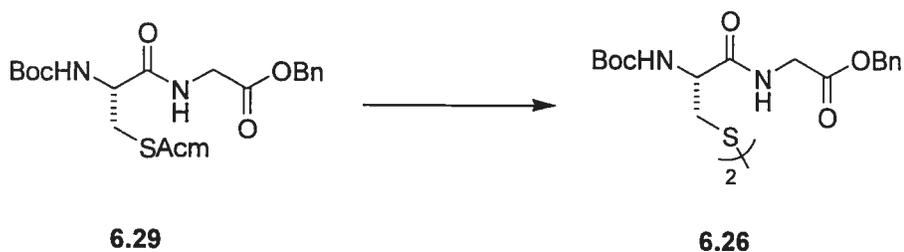
À une solution du composé **6.29** (0.300 g, 0.683 mmol) dans 2 mL de CH_2Cl_2 à 0°C , du HCl (4N, 3 éq.) dans du dioxane est ajouté. La réaction est suivie par ccm. Une fois la réaction terminée (après environ 3 h), le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite. Sous la pompe, l'huile obtenue devient un solide très hygroscopique (0.225 g, 100 %).

$[\alpha]_{\text{D}} +10.5$ (c 0.55, MeOH)

RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) δ (ppm) : 1.99 (3H, s), 2.87 (1H, m), 3.21 (1H, dd, $J = 14.9$ Hz, $J = 4.2$ Hz), 4.27 (4H, m), 4.51 (1H, d, $J = 14.0$ Hz), 5.17 (2H, s), 7.34 (5H, m).

RMN ^{13}C (D_2O , 75 MHz) δ (ppm) : 22.7, 32.7, 41.1, 42.1, 53.2, 68.1, 129.3, 129.4, 129.5, 137.0, 169.5, 170.7, 174.1.

SMHR (MAB, M^+) 339.1258. $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ calculé : 339.1253.

tert-Butoxycarbonyl-L-cystinylglycine benzyl ester (6.26)

À une solution du composé **6.29** (0.100 g, 0.228 mmol) dans 2 mL MeOH, de l'iode (0.116 g, 0.457 mmol) dans 2 mL MeOH est ajouté par canulation. La solution est agitée 3 h à température ambiante puis est évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie flash (50% AcOEt dans l'hexane) pour donner le produit désiré **6.26** (0.062 g, 74%).

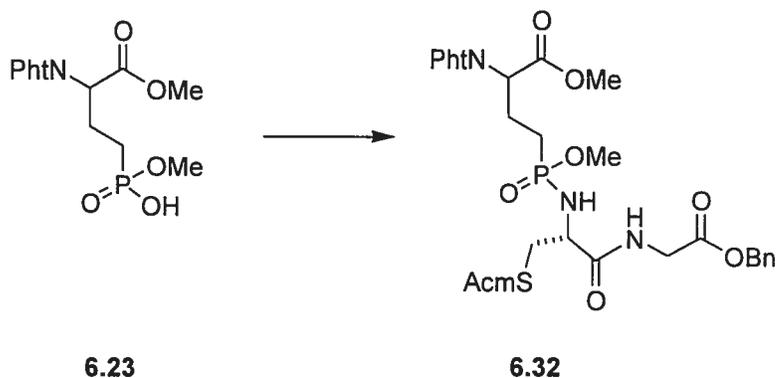
Les caractérisations sont identiques à celles du composé **6.26** obtenu à partir du dérivé **6.25**.

Protocole général pour la synthèse de phosphonamide :

À une solution d'acide phosphonique monométhyl ester (1 éq.) dans du CH_2Cl_2 anhydre à 0°C , le chlorure d'oxalyle (2 éq.) puis le DMF (0.1 éq.) sont ajoutés. La solution est laissée $\frac{1}{2}$ h à 4°C puis 2 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est par la suite évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissout dans du CH_2Cl_2 anhydre puis évaporé à nouveau pour donner un résidu légèrement orangé, qui est laissé sur une pompe à vide pendant 2 h.

Par la suite, l'amine•HCl (2 éq.) est dissoute à 4°C dans du CH_2Cl_2 en présence de la Et_3N distillée (8 éq.). La solution est agitée jusqu'à dissolution complète de l'amine. Le chlorure de phosphonyl est ajouté par canulation à 0°C , sur la solution de l'amine. Le mélange réactionnel est ramené progressivement à température ambiante et est laissé ainsi toute la nuit. La solution est ensuite évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est dissout dans du AcOEt, lavé avec du HCl (1N, 2×) et avec H_2O . La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sous gravitation avec 20% MeOH dans du AcOEt.

Acide **2-[[3-méthoxyoxy-3-phthalimidopropyl]-méthoxyphosphinyl]amino-2-(acétylamino-méthylsulfanyl)-acétyl-aminoacétique benzyl ester (6.32)**



Le protocole général pour la synthèse de phosphonamide est suivi avec le composé **6.23** (0.160 g, 0.469 mmol) dans 5 mL de CH₂Cl₂. Après purification par chromatographie flash et évaporation sous vide du solvant, une huile orangée **6.32** (0.193 g, 62 %) est obtenue.

R_f 0.40 (20 % MeOH dans AcOEt)

$[\alpha]_D +6.10$ (c 0.53, CHCl₃)

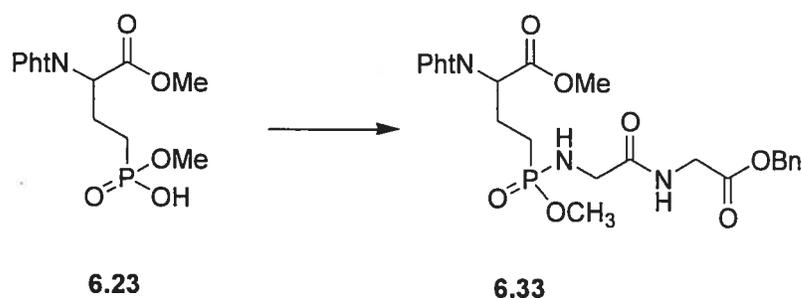
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.80 (2H, m), 1.94 (3H, s), 2.52 (2H, m), 2.72 (1H, m), 2.93 (2H, m), 3.70 (6H, m), 3.99 (2H, m), 4.20 (1H, m), 4.38 (1H, m), 4.96 (1H, m), 5.12 (2H, m), 7.34 (5H, m), 7.84 (4H, m), 8.24 (1H, m), 8.43 (1H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 22.7, 22.8, 23.5, 25.5 (d, $J = 135.2$ Hz), 36.4, 42.0, 51.5 (dd, $J = 22.3$ Hz, $J = 7.0$ Hz), 53.3, 53.5, 55.6, 67.9, 124.5, 129.3, 129.6, 132.9, 133.0, 135.8, 137.1, 169.0, 170.8, 173.4, 173.5, 174.6.

RMN ³¹P (CDCl₃, 121.5 MHz) δ (ppm) : 41.31, 41.36, 41.42, 41.43. (2 décimales significatives).

SMBR (FAB, MH⁺) 663.1867. C₂₉H₃₆N₄O₁₀PS calculé : 663.1890.

Acide **2-[[3-méthoxy-3-phthalimidopropyl]-méthoxyphosphinyl]aminoacétyl-
aminoacétique benzyl ester (6.33)**



Le protocole général pour la synthèse de phosphonamide est suivi avec le composé **6.23** (0.072 g, 0.211 mmol) dans 5 mL de CH₂Cl₂. Après purification par chromatographie flash et évaporation sous pression réduite du solvant, une huile légèrement colorée **6.33** (0.064 g, 56 %) est obtenue.

R_f 0.47 (20 % MeOH dans AcOEt)

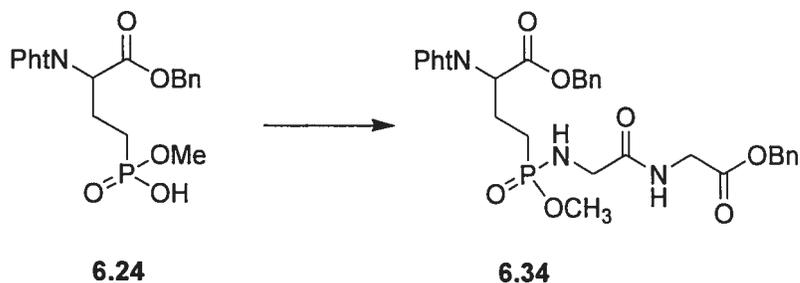
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 1.82 (2H, m), 2.54 (2H, m), 3.59 (3H, d, *J* = 2.2 Hz), 3.61 (2H, m), 3.66 (3H, d, *J* = 2.2 Hz), 4.03 (3H, m), 4.89 (1H, m), 5.08 (2H, d, *J* = 3.9 Hz), 7.31 (5H, m), 7.58 (1H, m), 7.71 (2H, m), 7.83 (2H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) : 22.1, 23.5 (d, *J* = 131.0 Hz), 40.7, 43.6, 50.5 (d, *J* = 7.0 Hz), 51.7 (d, *J* = 17.1 Hz), 52.5, 66.6, 123.2, 127.9, 128.1, 128.2, 131.3, 133.9, 134.8, 167.2, 168.7, 169.3, 170.5.

RMN ³¹P (CDCl₃, 162 MHz) δ (ppm) : 35.9 (d, *J* = 11.4 Hz).

SMHR (FAB, MH⁺) 546.1785. C₂₅H₂₉N₂O₉P calculé : 546.1767.

Acide 2-[[3-carbobenzyloxy-3-phthalimidopropyl]-méthoxyphosphinyl]-aminoacétyl-aminoacétique benzyl ester (6.34)



Le protocole général pour la synthèse de phosphonamide est suivi avec le composé **6.24** (0.340 g, 0.815 mmol) dans 10 mL de CH₂Cl₂. Après purification par chromatographie flash et évaporation sous pression réduite du solvant, une huile orangée **6.34** (0.375 g, 74 %) est obtenue.

R_f 0.57 (20 % MeOH dans AcOEt)

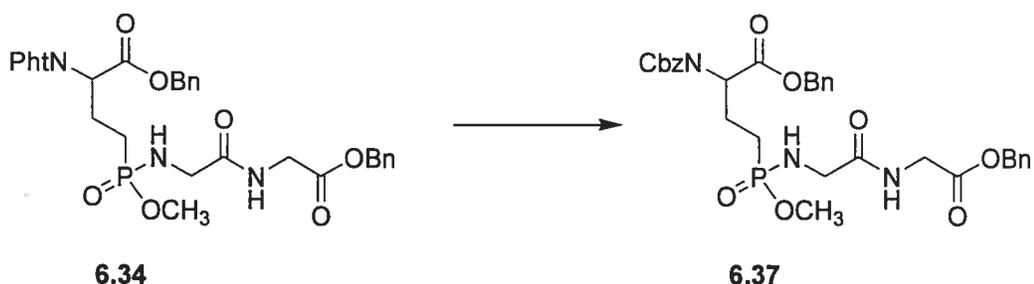
RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm) : 1.81 (2H, m), 2.55 (2H, m), 3.78 (3H, dd, *J* = 11.2 Hz, *J* = 3.5 Hz), 3.80 (2H, m), 3.94 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 5.00 (1H, m), 5.10 (2H, s), 5.15 (2H, s), 7.25 (5H, m), 7.33 (5H, m), 7.81 (4H, m).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) : 22.9 (d, *J* = 131.5 Hz), 24.5, 41.1, 44.1, 50.8, 52.3 (d, *J* = 21.2 Hz), 67.0, 67.7, 123.6, 128.1, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 132.7, 134.4, 135.1, 135.3, 167.7, 168.6, 169.8, 171.0.

RMN ³¹P (CDCl₃, 162 MHz) δ (ppm) : 35.9 (d, *J* = 12.1 Hz).

SMHR (FAB, MH⁺) 622.1955. C₃₁H₃₃N₃O₉P calculé : 622.1954

Acide **2-[[3-carbobenzyloxy-3-carbobenzyloxyaminopropyl]-méthoxyphosphinyl]aminoacétyl-aminoacétique benzyl ester (6.37)**



À une solution du composé **6.34** (0.073 g, 0.118 mmol) dans 2 mL d'éthanol, est ajouté à 0°C, de l'hydrazine ($N_2H_4 \cdot 6H_2O$) (6 mL, 0.123 mmol). La réaction est suivie par ccm. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 jours puis est évaporé sous pression réduite. L'hydrazine restant est co-évaporé avec de l'éthanol (3×5 mL) et le résidu obtenu est laissé sous la pompe à vide une nuit.

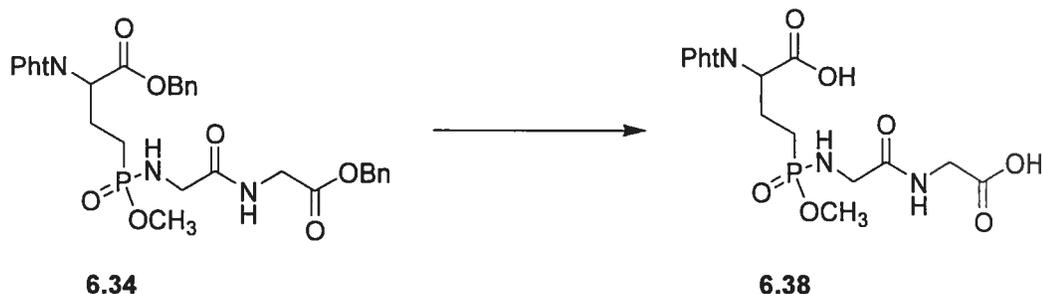
Le résidu est ensuite dissout dans du dioxane (3 mL) à 0°C, traité avec du chloroformate de benzyle (50 μ L, 0.352 mmol) et de la Et_3N (18 μ L, 0.129 mmol), agité à cette température pendant 1.5 h et évaporé. Le résidu est dissout dans de l'AcOEt (10 mL) et est lavé avec HCl (0.1N) (2×5 mL) et H_2O (5 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée sous pression réduite pour donner une huile. Le résidu est purifié deux fois par chromatographie flash (100 % AcOEt puis 10 % MeOH dans AcOEt) pour donner une huile incolore.

R_f 0.39 (100 % AcOEt)

RMN 1H (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm) : 1.82-2.39 (4H, m), 3.61 (5H, m), 3.94 (2H, d, $J = 14.0$ Hz), 4.72 (1H, m), 5.09 (2H, m), 5.21 (2H, m), 5.27 (2H, s), 7.29-7.51 (15H, m).

RMN ^{31}P (CD_3OD , 121.5 MHz) δ (ppm) : 39.5 (d, $J = 28.4$ Hz).

Acide *2-[3-carboxy-3-phthalimidopropyl]-méthoxyphosphinyl]aminoacétyl-aminoacétique (6.38) :*



À une solution du composé **6.34** (0.066 g, 0.106 mmol) dans 5 mL de MeOH, du palladium sur charbon (10 wt. %) (6 mg) est ajouté. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant une nuit à 50 psi d'hydrogène dans une bombe d'hydrogénation. La solution est ensuite filtrée sur Celite® et lavée avec MeOH. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner un solide blanc (0.046 g, 100%). Le produit **6.38** est utilisé sans purification supplémentaire pour la prochaine réaction en présence d'hydrazine (chapitre 6).

RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm) : 1.82 (2H, m), 2.51 (2H, m), 3.72 (3H, d, *J* = 10.9 Hz), 3.73 (2H, m), 3.91 (2H, m), 4.79 (1H, m), 7.83-7.89 (4H, m).

RMN ³¹P (CDCl₃, 121.5 MHz) δ (ppm) : 36.2.

8.2. Études cinétiques des substrats ou inhibiteurs

8.2.1. Matériel utilisé pour les cinétiques

Les composés contenant un lien amide ont été dissouts, lorsque c'est nécessaire, dans des solvants organiques achetés aux endroits indiqués à la section 7.1. Les tampons MOPS, CHES et la glycylglycine ont été achetés chez Sigma. Le tampon Tris a été acheté chez Bio-rad. L'acide trichloroacétique provient de la compagnie Anachemia. Les différents L- γ -glutamyl-*p*-substitués-anilide ont été synthétisés selon un protocole déjà établi³⁴. Des cuvettes de 1.5 mL jetables achetées chez Bio-Rad ont été utilisées pour les tests cinétiques. Les solutions aqueuses ont été préparées à partir d'eau déionisée et purifiée par le système Millipore Milli-Q BioCell.

Les reins de rat servant à obtenir la GGT proviennent de chez Rockland. L'enzyme a été purifiée, selon un protocole déjà établi² (impliquant une digestion à la papaïne achetée chez Sigma), pour donner finalement une activité spécifique de 750 U/mg et une concentration environ de 0.06 mg/mL. Tous les composés servant à la purification viennent de chez Sigma. La GDH provient de Roche diagnostics.

8.2.2. Appareils pour les études cinétiques des composés synthétisés

Les mesures d'absorbance ont été prises, pour les tests d'activité enzymatique, sur un spectrophotomètre Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 et pour les tests cinétiques, sur un Cary 100 Bio ou sur un lecteur de plaques Perkin Elmer HTS 7000 (Bio Assay Reader). Les pK_a sont déterminés en utilisant un autotitrateur Mettler Toledo DL53.

Les valeurs de pH ont été ajustées avec un pH-mètre Accumet modèle 15 et une électrode combinée MI-410 (Microélectrodes, Inc) et une électrode combinée constituée d'une électrode de référence Ag/AgCl (Fisher).

Les données cinétiques ont été traitées à partir du logiciel Axum 5.0 et Microcal Origin 6.0. Les données cinétiques ont été obtenues par analyse de régression non-

linéaire en utilisant la formule $v = (V_{\max} * \text{Sub}) / (K_M + \text{Sub})$ pour les courbes de type Michaelis-Menten, où v est la vitesse initiale obtenue, V_{\max} , la vitesse maximale, Sub , la concentration de substrat et K_M , la constante de Michaelis. Les paramètres du modèle sont $V_{\max} = 10$, $K = 1$. Les autres courbes ont été tracées avec une régression linéaire.

8.2.3. Détermination de l'activité spécifique

L'activité spécifique de l'enzyme doit être évaluée avant chaque test de cinétique enzymatique avec la GGT. La procédure à suivre est tirée de la littérature²⁷. Des solutions mères de 0.1 M de Gly-Gly et de 5 mM de L-GPNA sont préparées dans le tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0.

Des concentrations de 20 mM de Gly-Gly (substrat accepteur) et 1 mM de L-GPNA (substrat donneur) sont placées dans des tubes à essai et du tampon 0.1M Tris-HCl pH 8.0 est ajouté pour compléter à 1 mL. Une quantité d'environ 3.4 mU de GGT est ajoutée afin de démarrer la réaction enzymatique. L'absorbance est lue après 10 minutes d'incubation à 37°C à une longueur d'onde de 410 nm. L'activité spécifique est calculée en fonction du ϵ de la *p*-nitroaniline libérée de manière linéaire durant ce délai ($8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et de la concentration de GGT.

8.2.4. Études cinétiques réalisées au chapitre 2

8.2.4.1. Courbe de Eyring

8.2.4.1.1. Cinétiques avec le L-GPNA

Les tests cinétiques ont été effectués dans une cuvette, avec différentes concentrations (67.2 μM à 1680 μM) du substrat donneur L-GPNA en présence de 20 mM de Gly-Gly (en conditions saturantes) à partir des solutions mères préparées à la section 8.2.3. Le volume final est complété à 1 mL avec du tampon 0.1M Tris•HCl à pH 8.0 à une température précise. Une quantité de 4.1 mU de GGT initialise la réaction enzymatique. Des cuvettes sans enzyme sont utilisées comme témoin pour chaque

concentration. Les températures choisies (15 à 50°C dans le bloc) sont contrôlées par le spectrophotomètre. Après 15 min de réaction, la pente du graphique de l'absorbance *versus* le temps, après correction pour l'hydrolyse chimique observée dans les cuvettes témoins, est mesurée et convertie en vitesse en la divisant par le coefficient d'extinction molaire de la *p*-nitroaniline. La vitesse obtenue (en $M \cdot \text{min}^{-1}$) est tracée en fonction des différentes concentrations en substrat donneur utilisées pour donner une courbe de Michaelis-Menten avec l'aide du logiciel Axum 5.0. Les paramètres cinétiques V_{max} et K_M sont ainsi déterminés. Le V_{max} est transformé en k_{cat} , en tenant compte de la concentration de l'enzyme. Ensuite, les k_{cat} obtenus sont normalisés en les multipliant par une activité spécifique choisie de 837 U/mg et en divisant par l'activité spécifique de l'enzyme utilisée pour les tests. Les mêmes expériences sont effectuées pour chacune des températures choisies. Par la suite, la courbe de Eyring est tracée selon l'équation 1 de la section 2.2.1 du chapitre 2. Les paramètres ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger sont déterminés.

8.2.4.1.2. Cinétiques avec les substrats donneurs L- γ -glutamyl-*p*-méthoxyanilide et L- γ -glutamylanilide

Des solutions-mères de 5 mM des substrats donneurs sont préparées dans du tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0. Un tube réactionnel est préparé avec des concentrations variées de substrat donneur (0.125-2.5 mM) et complété à 1 mL avec du tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0. Ensuite, 1 mL d'une solution mère de 0.1 M Gly-Gly est ajouté pour une concentration finale de 20 mM. Un volume de 3 mL de tampon, moins la quantité d'enzyme à utiliser, est ajouté. Le tube est placé à la température désirée (15 à 50°C) pendant 10 min. Si un ajustement de pH est nécessaire, celui-ci est réalisé. La réaction est débutée avec environ 5 mU de GGT.

Des aliquots de 375 μL sont prélevés du tube réactionnel à différents temps de réaction (0, 5, 10, 15, 25, 35, 45 et 60 min) et sont placés dans un autre tube contenant 125 μL d'acide trichloroacétique (40% dans l'eau) pour arrêter la réaction. La dérivation par diazotation est alors débutée par l'ajout d'un volume de 125 μL de nitrite

de sodium (4 mg/mL dans l'eau, fraîchement préparé) avec un temps d'attente de 3 min. Ensuite, un volume de 125 μ L de sulfamate d'ammonium (20 mg/mL dans l'eau) est ajouté avec un temps d'attente de 2 min. Enfin, un volume de 250 μ L de *N*-(1-naphthyl)éthylènediamine•2 HCl (1.5 mg/mL dans EtOH, 4°C à l'abri de la lumière) est ajouté. Dépendamment du substrat donneur, le temps d'attente sera de 30 min à température ambiante pour le L- γ -glutamyl-*p*-méthoxyanilide et 15 min à 37°C pour le L- γ -glutamylanilide. L'absorbance est mesurée, respectivement, à 583 nm et 560 nm pour chacun des substrats donneurs.

Des valeurs d'absorbance en fonction du temps sont ainsi obtenues. Les pentes des droites obtenues sont divisées par le coefficient d'extinction molaire (15 000 M⁻¹•cm⁻¹ pour le L- γ -glutamyl-*p*-méthoxyanilide et 45 000 M⁻¹•cm⁻¹ pour le L- γ -glutamylanilide)³⁴ pour obtenir des vitesses. Celles-ci sont divisées par 0.375 mL pour ramener à la vitesse réelle de l'aliquot, l'absorbance étant due à un aliquot de 0.375 mL dilué dans 1 mL au total. Des courbes de Michaelis-Menten sont faites à partir de ces vitesses en fonction de la concentration en substrat donneur. Le traitement cinétique est le même que pour la section 8.2.4.1.1. Les mêmes expériences sont effectuées à chaque température.

8.2.4.2. Courbe de van't Hoff

La méthode utilisée est celle de la section 2.3.1.1 mais à différents pHs. Différents tampons ont été utilisés pour la courbe pH-vitesse. Le tampon 0.1 M MOPS a été utilisé pour les pH 7.0 et 7.5, le tampon 0.1M Tris•HCl pour les pH 8.0, 8.5, 8.75 et 9.0 et le 0.1 M CHES pour les pH 9.25 et 9.5. Des courbes pH-vitesse sont obtenues à chaque température. Le *pKa* de la courbe du côté des pH basiques est déterminé selon la description faites à la section 2.3.2 du chapitre 2.

8.2.4.3. Identification de la base générale par le KCNO

8.2.4.3.1. Tests d'inhibition

Une solution-mère de 5 M de KCNO est préparée dans du tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0. Une quantité de la solution-mère de KCNO permettant d'obtenir des concentrations de 0 à 1 M est placée dans un eppendorf. Du tampon 0.1M Tris•HCl à pH 8.0 est ajouté pour compléter le volume à 157.5 μ L. La réaction est débutée par l'ajout d'un volume de 17.5 μ L de GGT pour un volume final de 175 μ L.

Des aliquots de ces solutions sont prélevés à différents temps et un test d'activité est effectué. L'activité déterminée à chaque temps permet de tracer une courbe de pseudo-premier ordre de l'activité spécifique résiduelle en fonction du temps. Une régression non-linéaire de premier ordre est faite et permet de déterminer la constante observée d'inactivation de l'enzyme à chacune des concentrations d'inhibiteur. L'inverse de cette constante en fonction de l'inverse de la concentration en inhibiteur permet d'obtenir une droite dont l'abscisse à l'origine donne l'inverse de la constante d'inhibition K_i et l'ordonnée à l'origine donne l'inverse de la constante d'inactivation réelle de l'enzyme (k_{inact}).

8.2.4.3.2. Marquage de la GGT et spectrométrie de masse

Deux échantillons ont été préparés et envoyés chez le professeur Withers (Département de chimie, University of British Columbia) pour identifier l'acide aminé marqué de la GGT. Le premier échantillon contient environ 0.1 mg d'enzyme préincubée avec une concentration de 1 M de KCNO pour une concentration finale d'enzyme de 0.952 mg/mL. Un test d'activité comme décrit à la section 7.2.3 a été effectué à différents temps et a montré qu'après 60 h de préincubation, l'enzyme n'était plus active. Le deuxième échantillon contient l'enzyme dans de l'eau déionisée.

La digestion par l'endoprotéase Lys-C se fait de la façon suivante : un échantillon (0.0015 mg) de l'enzyme dans 50 μ L d'eau est ajouté à un volume de 2 μ L d'un tampon 1.0 M de bicarbonate d'ammonium à pH 8.5 plus 5 μ L de la Lys-C dans

l'eau (50 ng, 1 : 30, poids/volume) dans un vial en propylène. La GGT est digérée pendant 24h à 37°C. La digestion est arrêtée avec 5 µL d'une solution 10% de TFA.

Le spectre de masse est obtenu selon un protocole présenté dans la littérature⁷³.

8.2.4.3.3. Courbe log k_{cat} -pH avec KCNO

Pour faire l'étude du pH, la GGT (activité spécifique initiale : 518 U/mg) est préincubée 45 min en présence d'une concentration de 100 mM de KCNO pour une concentration finale d'enzyme de 0.0026 mg/mL (activité spécifique après incubation : 313 U/mg). Une quantité de 7.3 mU de GGT (avec KCNO) initialise la réaction enzymatique comme cela est montré à la section 7.2.4. La courbe log k_{cat} -pH avec KCNO a été faite de la même façon qu'en absence de KCNO aux pHs 7.0, 7.5, 8.0, 8.25, 8.5, 8.75, 9.0, 9.25 et 9.5.

8.2.4.3.4. Activité transpeptidase versus hydrolase

Des solutions-mères de KCNO (500 mM) et de maléate (250 mM) sont faites dans du tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0. Un eppendorf est préparé pour chacune des expériences effectuées : sans KCNO, avec KCNO, avec maléate sans KCNO et avec maléate et KCNO. Selon l'expérience effectuée, la GGT (10 µL d'une concentration de 0.058 mg/mL), du KCNO ($C_f = 100$ mM) et du maléate ($C_f = 50$ mM) sont placés dans l'eppendorf. Le volume est complété à 100 µL avec du tampon 0.1M Tris•HCl à pH 8.0. Des expériences témoins sans GGT sont faites. La GGT est placée en dernier pour démarrer la réaction enzymatique. La préincubation est faite à 37 °C pendant 45 min. Au bout de ce délai, des aliquots sont prélevés et utilisés immédiatement pour des tests d'activités comme présenté à la section 8.2.3 avec ou sans 20 mM Gly-Gly pour vérifier les réactions de transpeptidation ou d'hydrolyse, respectivement.

8.2.5. Études cinétiques pour les dérivés du chapitre 3

8.2.5.1. Tests enzymatiques en présence de GDH

La procédure utilisée pour ces tests est basée sur un protocole issu de la littérature²⁸. Une solution-mère contenant 0.2 M de α -cétoglutarate de sodium, 40 mM de ADP, 20 mM de EDTA est préparée et peut être conservée à -20°C pour plusieurs mois.

Dans une cuvette pouvant contenir 1 mL de solution, un mélange réactionnel est préparé avec différentes concentrations de L-glutamine (1-15 mM) d'une solution-mère de 200 mM, 10 mM de sodium α -cétoglutarate, 2 mM de ADP, 1 mM EDTA, 20 mM de Gly-Gly et est complété à 1 mL avec du tampon Tris-HCl (0.1 M) à pH 8.0. Le zéro est effectué sur le spectrophotomètre et une solution fraîche contenant 0.25 mM de NADH et 48 U de GDH est additionnée. Finalement, une quantité de 3.38 mU de GGT est ajoutée pour démarrer la réaction. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 340 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible et la consommation de NADH est suivie. Après 40 min, la pente décroissante en absorbance *versus* le temps est mesurée. La valeur absolue est divisée par le coefficient d'extinction molaire de 6220 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ²⁸. Les vitesses ainsi obtenues sont utilisées pour faire une courbe de Michaelis-Menten.

8.2.5.2. Cinétiques enzymatiques avec les composés analogues au L-GPNA

Pour chaque composé à tester (3.4, 3.8 et 3.10), une solution-mère de 15 mM est préparée avec du tampon Tris•HCl 0.1 M à pH 8.0.

Quand les composés ont été testés comme substrat donneur, des concentrations de 168 à 2000 μM de ceux-ci ont été utilisées en présence de 20 mM de Gly-Gly comme substrat accepteur et le volume a été complété à 1 mL avec du tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0. Pour le dérivé 3.13, une solution est faite avec du tampon 0.1 M MOPS à un pH

7.0 dû à l'instabilité de ce substrat à pH 8.0. Finalement, pour débiter la réaction enzymatique, une quantité de 3.38 mU de GGT est additionnée. Comme indiqué auparavant, la libération de *p*-nitroaniline est suivie à 410 nm et le traitement des données cinétiques est fait comme à la section 8.2.4.1.

Quand les composés sont testés comme substrat accepteur, une concentration de 1 mM en D-GPNA (substrat donneur) est utilisée pour éviter les réactions d'autotranspeptidation. Des concentrations de 1 à 8 mM des composés d'intérêt sont choisies et l'étude de ces molécules se fait dans les mêmes conditions que pour le substrat donneur.

Pour les études d'inhibition, différentes concentrations de L-GPNA et une concentration saturante (20 mM) de Gly-Gly sont utilisées en présence de concentrations constantes (100 à 1200 μ M) des composés **3.8** et **3.10**. Les constantes cinétiques k_{cat} et K_M sont déterminées par des courbes de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk ou Dixon pour chaque composé à chaque concentration fixe utilisée. Ensuite, le K_i peut être déterminé selon la description faite au chapitre 2⁶¹.

8.2.6. Études cinétiques pour les composés du chapitre 4

8.2.6.1. Composés contenant un lien amide primaire

Les composés contenant un lien amide primaire ont été dissouts dans différents solvants. L'acétamide **4.1**, le butyramide **4.2**, la L-glutamine **4.8**, la L-glutamine amide **4.9** et la L-glutamine méthyl ester **4.11** ont été solubilisés dans le tampon 0.1 M MOPS pH 7.0 afin de donner des solutions-mères de 0.1, 0.2, 0.025, 0.1 et 0.5 M respectivement. Le 4-carboxybutyramide **4.3** et le 4-aminobutyramide **4.7** ont été solubilisés dans du méthanol pour donner une solution-mère de 0.255 et 0.4 M respectivement. La *N*-acétyl-L-glutamine **4.13** a été dissoute dans un mélange de 19 % acétonitrile-tampon MOPS pour donner une solution-mère de 0.156 M. La concentration finale de solvant organique dans la cuvette lors de la cinétique ne dépasse

jamais 10%. La L- β -homoglutamine **4.12** a été solubilisée dans du tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0 pour une solution-mère de 0.2 M.

Les tests cinétiques ont été faits dans des cuvettes, en présence de différentes concentrations (50 à 1680 μ M) de L-GPNA, de 20 mM de Gly-Gly et d'une concentration fixe d'inhibiteur (0 à 100 mM) avec un volume final de 1 mL complété avec du tampon 0.1 M MOPS pH 7.0. La réaction est débutée par l'ajout de 3.38 mU de GGT. Le suivi de la libération de la *p*-nitroaniline a été effectué à 410 nm avec un spectrophotomètre. Les mêmes tests ont été effectués en utilisant d'autres concentrations fixes d'inhibiteurs. Une valeur de 8200 M⁻¹•cm⁻¹ pour le coefficient d'extinction molaire à pH 7,0 a été utilisée⁶⁵. Le traitement cinétique est le même qu'à la section 7.2.5.2. Les valeurs des K_i ont été déterminées par des courbes de Lineweaver-Burk et/ou des courbes de Dixon tracées grâce au logiciel Axum 4.0.

8.2.6.2. Étude de composés analogues à la L-glutamine modifiée en position γ

Des solutions-mères pour le L-GPNA (5 mM), la glycylglycine (0.1 M), la L-glutamine nitrile **4.15** (50 mM), la 5-hydroxy-DL-lysine **4.16** (200 mM), la L-méthionine sulfoximine **4.18** (200 mM), la L-méthionine sulfone **4.19** (200 mM), l'acide DL-homocystéique **4.20** (200 mM), la L-méthionine sulfoxyde **4.21** (200 mM), l'acide DL-2-amino-4-phosphonobutyrique **4.22** (200 mM) ont été toutes préparées dans 0.1 M Tris-HCl à pH 8.0.

Toutes les expériences cinétiques d'inhibition ont été faites en utilisant un mélange réactionnel dans une cuvette comprenant différentes concentrations de L-GPNA (67.2 à 1400 μ M), de Gly-Gly (20 mM) et des concentrations fixes d'inhibiteurs (0 à 20 mM) complété à 1 mL par du tampon 0.1 M Tris-HCl à pH 8.0. Les réactions sont initiées par l'addition approximative de 7.8 mU de GGT.

Après 15 min de réaction, la pente du graphique de l'absorbance *versus* le temps est mesurée et le traitement cinétique est effectué comme décrit à la section 2.3.1.1. Les

concentrations en inhibiteur sont choisies pour être bien réparties sur le tracé du graphique Lineweaver-Burk obtenu, minimisant ainsi les erreurs sur la pente.

8.2.6.3. Configuration du site actif

Différentes fractions de diastéréoisomères ont été préparées comme décrit à la section 8.1.2.4. Les constantes d'inhibition réversibles ont été déterminées comme présenté dans la section ci-dessus.

Selon l'équation (1) du chapitre 4, le graphique représentant l'inverse de la constante d'inhibition apparente *versus* la fraction molaire (f) en L-méthionine sulfoxyde $S_C S_S$ peut être tracé pour trouver le K_i' , la constante d'inhibition réversible de la L-méthionine sulfoxyde $S_C R_S$.

Différentes fractions molaires (f) de **4.21a** ont été testées avec la GGT (0.24, 0.31, 0.5, 0.65, 1.0).

8.2.6.4. Application de la méthode cinétique au composé **4.22**

Pour déterminer le pK_a , une solution de **4.22** (concentration finale de 1.5 mM) dans 55 mM de KCl plus 4 mM de HCl est titrée avec une solution de 0.1 M de NaOH sur une échelle de pH de 2 à 12.0. L'expérience a été répétée trois fois et le pK_a a été calculé selon un logiciel fourni avec l'appareil.

Deux solutions mères de ce composé ont été faites à deux pH différents dans du tampon 0.1 M MOPS à pH 7.0 et 0.1 M MES à pH 6.0.

Une courbe d'étalonnage pour le coefficient d'extinction molaire de la *p*-nitroaniline à pH 6.0 a été faite, puisque le coefficient d'extinction molaire montre une dépendance au pH. Une solution-mère de 5 mM pour la *p*-nitroaniline a été faite dans du tampon 0.1 M MES à pH 6.0. Des concentrations de 0 à 100 μ M ont été utilisées et leurs absorbances à 410 nm ont été mesurées pour tracer une courbe en duplicata Absorbance *versus* concentration donnant un coefficient d'extinction molaire de 8440

$M^{-1}\cdot cm^{-1}$. Les mêmes expériences ont été faites à pH 7.0 avec du tampon 0.1 M MOPS, donnant un coefficient d'extinction molaire de $8110 M^{-1}\cdot cm^{-1}$ à pH 7.0.

Les expériences de compétition entre ce composé et le L-GPNA à différents pH ont été faites suivant le protocole décrit à la section 8.2.6.2. Le K_i de chacun des états de protonation a été déterminé selon la technique décrite à la section 8.2.6.3.

8.2.7. Études cinétiques pour les composés du chapitre 5

8.2.7.1. Dérivés soufrés

Des solutions-mères pour les dérivés L-SPG **5.14** (10 mM), L-TEPG **5.16** et L-STG **5.23** (50 mM) et L-SnPG **5.19** (80 mM) sont faites dans le tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0. Pour les études d'inhibition, différentes concentrations (67 à 1400 mM) de L-GPNA et une concentration saturante (20 mM) de Gly-Gly sont utilisées en présence de concentrations constantes (0 à 1000 μM) de L-SPG **5.14**, L-TEPG **5.16** et L-STG **5.23** dans du tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0. Des expériences témoins, sans la GGT, ont été faites pour chaque cinétique. Les réactions sont initiées avec 3.38 mU de GGT. Le suivi des cinétiques est fait comme à la section 8.2.6.2.

Les K_i ont été déterminés par des courbes de Lineweaver-Burk ou par des courbes de Dixon qui ont été analysées en utilisant des logiciels comme Origin 6.0 ou Axum 4.0. Les droites du graphique Lineweaver-Burk ont été tracées pour chacune des concentrations d'inhibiteur. Un IC_{50} a été déterminé avec différentes concentrations (0 à 10 mM) du dérivé sulfone L-SnPG **5.19** en présence d'une concentration fixe de L-GPNA (400 μM) et une concentration saturante (20 mM) de Gly-Gly. Le IC_{50} est calculé en déterminant la concentration d'inhibiteur nécessaire pour obtenir la moitié de la vitesse initiale de la réaction enzymatique en absence d'inhibiteur. Le K_i du composé **5.19** a été calculé du IC_{50} en considérant le K_M du L-GPNA à pH 8.0 comme 590 μM et en se basant sur une inhibition compétitive⁶¹.

8.2.7.2. Dérivé phosphonique

Une solution-mère de 20 mM a été faite dans du tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0 pour le composé **5.24**. Les cinétiques ont été faites avec un lecteur de plaque dans des plaques de 96 puits.

Des concentrations fixes (0 à 3 mM) du composé **5.24** ont été utilisées en présence de différentes concentrations de L-GPNA (67.2 à 1400 μM) et de Gly-Gly (20 mM) en concentration saturante. Le tout est complété à 200 μL avec le tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0. La réaction est initiée avec 1.65 mU de GGT.

Le traitement des données est fait de la même manière que pour les composés soufrés à la section 8.2.7.1. Le coefficient d'extinction molaire a été calculé comme étant $6533 \text{ M}^{-1} \cdot \text{distance}^{-1}$ pour un volume de 200 μL ²²⁹ pour le lecteur de plaques.

8.2.8. Études cinétiques pour les dérivés du chapitre 6

Des solutions-mères pour l'acivicine **6.2** (5 mM) et les composés **6.4**, **6.5** et **6.6** (50 mM) sont faites avec du tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0 et 10 % de DMSO pour aider à la solubilité.

Pour le composé **6.2**, différentes concentrations d'acivicine (0 à 500 μM) avec une concentration de L-GPNA (400 μM) et de 20 mM de Gly-Gly sont utilisées. Le volume de la cuvette est complété à 1 mL avec du tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0. Les réactions sont initiées avec 3.38 mU de GGT. Des constantes de pseudo-premier ordre pour la libération de la p-nitroaniline sont obtenues. Ensuite, tel que décrit au chapitre 6, l'inverse des constantes en fonction de la concentration de l'acivicine est tracé pour donner une courbe permettant d'obtenir les valeurs de k_{inact} et de K_{I} . Aussi, le composé **6.4** ($C_{\text{f}} = 5 \mu\text{M}$) a été préincubé en présence de 84 mU de GGT dans un volume total de 150 μL de tampon 0.1 M Tris•HCl à pH 8.0 contenant 5 % de DMSO. Des aliquots ont été prélevés et l'activité spécifique a été mesuré (en considérant une quantité finale de 10 % de DMSO), tel que décrit à la section 8.2.4.3.1.

Pour les composés **6.4** à **6.6**, un IC_{50} a été déterminé en utilisant différentes concentrations d'inhibiteur (0 à 5 mM), une concentration fixe de L-GPNA (400 μ M) et une concentration saturante (20 mM) de Gly-Gly. Ensuite la détermination du IC_{50} se fait comme présenté à la section 8.2.7.1.

Références

- ¹ Voet, D., Voet, J.G., "Biochemistry", John Wiley and Sons Inc, New York, **1995**.
- ² Tate, S.S., Meister, A. "*Gamma*-Glutamyl Transpeptidase from Kidney", *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 400-419.
- ³ Meister, A. "On the Enzymology of Amino Acid Transport", *Science* **1973**, *180*, 33-39.
- ⁴ Nemesansky, E., Lott, J.A. "*Gamma*-Glutamyltransferase and its Isoenzymes: Progress and Problems", *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 797-803.
- ⁵ Hanigan, M.H., Pitot, H.C. "*γ*-Glutamyl Transpeptidase : Its Role in Hepatocarcinogenesis", *Carcinogenesis* **1985**, *6*, 165-172.
- ⁶ Taniguchi, N., Ikeda, Y. "*γ*-Glutamyl Transpeptidase: Catalytic Mechanism and Gene Expression", *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1998**, *72*, 239-278.
- ⁷ Kasai, T., Larsen, P.O. "Chemistry and Biochemistry of *γ*-Glutamyl Derivatives from Plants Including Mushrooms (Basidiomycetes)", *Proc. Chem. Org. Nat. Prod.* **1980**, *39*, 173-285.
- ⁸ Suzuki, H. Kumagai, H., Echigo, T., Tochikura, T. "DNA Sequence of the *Escherichia coli* K-12 *γ*-Glutamyltranspeptidase Gene GGT", *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 5169-5172.
- ⁹ <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
- ¹⁰ Huguey, R.P., Curthoys, N.P. "Comparison of the Size and Physical Properties of *γ*-Glutamyltranspeptidase Purified from Rat Kidney Following Solubilization with Papain or with Triton X-100", *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 7863-7870.
- ¹¹ Meister, A., "The *γ*-Glutamyl Cycle", *Ann. Int. Med.* **1974**, *81*, 247-253.
- ¹² Takahashi, Y., Oakes, S.M., Williams, M.C., Takahashi, S., Miura, T., Joyce-Brady M. "Nitrogen Dioxide Exposure Activates *Gamma*-Glutamyl Transferase Gene Expression in Rat Lung", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1997**, *143*, 388-396.
- ¹³ Emdin, M., Passino, C., Pompella, A., Paolicchi, A. "Serum *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase: a Prognostic Marker in Cardiovascular Diseases", *Biofactors* **2003**, *17*, 199-205.

-
- ¹⁴ Lee, D.-H., Ha, M.-H., Kim, J.-H., Christiani, D.C., Gross, M.D., Steffes, M., Blomkoff, R., Jacobs, D.R. "Gamma-glutamyltranspeptidase and Diabetes – A 4 Year Follow-up Study", *Diabetologia* **2003**, *46*, 359-364.
- ¹⁵ Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Jenner, P., Marsden, C.D. "Glutathione-related Enzymes in Brain in Parkinson's Disease", *Ann. Neurology*, **1994**, *36*, 356-361.
- ¹⁶ Del Bello, B., Paolicchi, A., Comporti, M., Pompella, A., Maellaro, E. "Hydrogen Peroxide Produced During γ -Glutamyl Transpeptidase Activity is Involved in Prevention of Apoptosis and Maintenance of Proliferation in U937 Cells", *FASEB J.* **1999**, *13*, 69-79.
- ¹⁷ Pieri, L., Dominici, S., Del Bello, B., Maellaro, E., Comporti, M., Paolicchi, A., Pompella, A. "Redox Modulation of Protein Kinase/Phosphatase Balance in Melanoma Cells: the Role of Endogenous and Gamma-Glutamyltransferase-Dependent H₂O₂ Production", *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1621*, 76-83.
- ¹⁸ Graber, R., Losa, G.A. "Apoptosis in Human Lymphoblastoid Cells Induced by Acivicin, a Specific γ -Glutamyltransferase Inhibitor", *Int. J. Cancer* **1995**, *62*, 443-448.
- ¹⁹ Jamieson, E.R., Lippard, S.J. "Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts", *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467-2498.
- ²⁰ Hanigan, M.H., Gallagher, B.C., Townsend, D.M., Gabarra, V. "Gamma-Glutamyl Transpeptidase Accelerates Tumor Growth and Increases the Resistance of Tumors to Cisplatin *In Vivo*" *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 553-559.
- ²¹ Misicka, A., Maszczyńska, I., Lipkowski, A.W., Stropova, D., Yamamura, H.I., Hruby, V.J. "Synthesis and Biological Properties of Gamma-Glutamyl-Dermorphin, a prodrug" *Life Sci.* **1996**, *58*, 905-911.
- ²² Antczak, C., Bauvois, B., Monneret, C., Florent, J.C. "A New Acivicin Prodrug designed for Tumor- Targeted Delivery" *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2843-2848.
- ²³ Nishimura, M., Stein, H., Berges, W., Teschke, R. "Gamma-Glutamyltransferase Activity of Liver Plasma Membrane: Induction Following Chronic Alcohol Consumption" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *99*, 142-148.
- ²⁴ Sawabu, N., Nakagen, M., Yoneda, M., Makino, H., Kameda, S., Kobayashi, K., Hattori, N., Ishii, M. "Novel Gamma-Glutamyl Transpeptidase Isoenzyme Specifically Found in Sera of Patients with Hepatocellular Carcinoma" *Gann.* **1978**, *69*, 601-605.

-
- 25 Tate, S.S., Meister, A. "Interaction of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase with Amino Acids, Dipeptides, and Derivatives and Analogs of Glutathione", *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7593-7602.
- 26 Allison, R.D. " γ -Glutamyl Transpeptidase: Kinetics and Mechanism", *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 419-437.
- 27 Meister, A., Tate, S.S., Griffith, O.W. "*Gamma*-Glutamyl Transpeptidase", *Methods Enzymol.* **1981**, *77*, 237-253.
- 28 Thompson, G.A., Meister, A. "Interrelationships Between the Binding Sites for Amino Acids, Dipeptides, and *Gamma*-Glutamyl Donors in *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase", *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 6792-6798.
- 29 McIntyre, T.M., Curthoys, N.P. "Comparison of the Hydrolytic and Transfer Activities of Rat Renal *Gamma*-Glutamyltranspeptidase", *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6499-6504.
- 30 Allison, R. D., Meister, A. "Evidence that Transpeptidation Is a Significant Function of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase", *J. Biol. Chem.* **1980**, *256*, 2988-2992.
- 31 Griffith, O.W., Bridges, R.J., Meister, A. "Formation of *Gamma*-glutamylcyst(e)ine *In Vivo* is Catalyzed by *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1981**, *78*, 2777-2781.
- 32 Orlowski, M., Meister, A. "*Gamma*-Glutamyl-*p*-Nitroanilide: a New Convenient Substrate for Determination and Study of L- and D-*Gamma*-Glutamyltranspeptidase Activities", *Biochim. Biophys. Acta.* **1963**, *73*, 679-681.
- 33 Keillor, J.W., Ménard, A., Castonguay, R., Lherbet, C., Rivard, C. "Pre-Steady State Kinetic Studies of Rat Kidney γ -Glutamyl Transpeptidase Confirms its Ping-Pong Mechanism", *J. Phys. Org. Chem.*, **2003**, sous presse.
- 34 Ménard, A. "Études cinétiques de l'étape d'acylation de la γ -glutamyl transpeptidase des reins de rats à l'aide des dérivés γ -glutamylanilides-*p*-substitués", *Mémoire de maîtrise*, **1999**, Département de chimie, Université de Montréal, Montréal.
- 35 Minami, H., Suzuki, H., Kumagai, H. "A Mutant *Bacillus Subtilis Gamma*-Glutamyltranspeptidase Specialized in Hydrolysis Activity", *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *224*, 169-173.

- ³⁶ Tate, S.S., Ross, M.E. "Human Kidney *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase. Catalytic Properties, Subunit Structure, and Localization of the *Gamma*-Glutamyl Binding Site on the Light Subunit" *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 6042-6045.
- ³⁷ Stole, E., Meister, A. "Interaction of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase with Glutathione Involves Specific Arginine and Lysine Residues of the Heavy Subunit", *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 17850-17857.
- ³⁸ Heisterkamp, N., Rajpert-De Meyts, E., Uribe, L., Forman, H.J., Groffen, J. "Identification of a Human *Gamma*-Glutamyl Cleaving Enzyme Related to, but Distinct from *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1991**, *88*, 6303-6307.
- ³⁹ Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N., Meister, A. "Human *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase Mutants Involving Conserved Aspartate Residues and the Unique Cysteine Residue of the Light Subunit", *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 12471-12475.
- ⁴⁰ Gold, A.M., Fahrney, D.E. "The Mechanism of Reactivation of Phenylmethanesulfonyl *Alpha*-Chymotrypsin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *10*, 55-59.
- ⁴¹ Inoue, M., Horiuchi, S., Morino, Y. "Inactivation of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase by Phenylmethanesulfonyl Fluoride, a Specific Inactivator of Serine Enzymes", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *82*, 1183-1188.
- ⁴² Ikeda, Y., Fujii, J., Anderson, M.E., Taniguchi, N., Meister, A. "Involvement of Ser-451 and Ser-452 in the Catalysis of Human *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase", *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22223-22228.
- ⁴³ Inoue, M., Hiratake, J., Suzuki, H., Kumagai, H., Sakata, K. "Identification of Catalytic Nucleophile of *Escherichia coli Gamma*-Glutamyltranspeptidase by *Gamma*-Monofluorophosphono Derivative of Glutamic Acid: *N*-terminal Thr-391 in Small Subunit is the Nucleophile", *Biochemistry* **2000**, *39*, 7764-7771.
- ⁴⁴ Hiratake, J., Inoue, M., Sakata, K. "*Gamma*-Glutamyltranspeptidase and *Gamma*-Glutamyl Peptide Ligases: Fluorophosphonate and Phosphonodifluoromethyl Ketone Analogs as Probes of Tetrahedral Transition State and *Gamma*-Glutamyl-Phosphate Intermediate", *Methods Enzymol.* **2002**, *354*, 272-295.
- ⁴⁵ Suresh, C.G., Pundle, A.V., SivaRaman, H., Rao, K.N., Brannigan, J.A., McVey, C.E., Verma, C.S., Dauter, Z., Dodson, E.J., Dodson, G.G. "Penicillin V Acylase Crystal Structure Reveals New Ntn-Hydrolase Family Members", *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 414-416.

-
- ⁴⁶ Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., Huber, R. "Structure of 20S Proteasome from Yeast at 2.4 Å Resolution", *Nature* **1997**, *386*, 463-471.
- ⁴⁷ Oinonen, C., Rouvinen, J. "Structural Comparison of Ntn-Hydrolases", *Protein Sci.* **2000**, *9*, 2329-2337.
- ⁴⁸ Saarela, J., Oinonen, C., Jalanko, A., Rouvinen, J., Peltonen, L. "Autoproteolytic Activation of Human Aspartylglucosaminidase", *Biochem. J.* **2003**, sous presse.
- ⁴⁹ Kim, Y., Kim, S., Earnest, T.N., Hol, W.G. "Precursor Structure of Cephalosporin Acylase: Insights into Auto-Proteolytic Activation in a New *N*-Terminal Hydrolase Family", *Scientific World Journal.* **2002**, *2*, 15-16.
- ⁵⁰ Suzuki, H., Kumagai, H., "Autocatalytic Processing of *Gamma*-Glutamyltranspeptidase", *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 43536-43543.
- ⁵¹ PetitClerc, C., Shiele, F., Bagrel, D., Mahassen, A., Siest, G. "Kinetic Properties of *Gamma*-Glutamyltransferase from Human Liver", *Clin. Chem.* **1980**, *26*, 1688-1693.
- ⁵² Cook, N.D., Peters, T.J. "The Effect of pH on the Transpeptidation and Hydrolytic Reactions of Rat Kidney *Gamma*-Glutamyltransferase", *Biochim. Biophys. Acta.* **1985**, *832*, 142-147.
- ⁵³ Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. "Effects of Substitutions of the Conserved Histidine Residues in Human *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase", *J. Biochem.* **1996**, *119*, 1166-1170.
- ⁵⁴ Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. "Significance of Arg-107 and Glu-108 in the Catalytic Mechanism of Human *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase. Identification by Site-Directed Mutagenesis", *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 3980-3985.
- ⁵⁵ Lee, Y.S., Kim, H.W., Park, S.S. "The Role of *Alpha*-amino Group of the *N*-Terminal Serine of *Beta*-Subunit for Enzyme Catalysis and Autoproteolytic Activation of Glutaryl 7-Aminocephalosporanic Acid Acylase", *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39200-39206.
- ⁵⁶ Lowry, T.H., Richardson, K.S. "Mechanism and Theory in Organic Chemistry", Berger, L.S. et MacElree, Eds, Harper and Row, New York, NY, **1987**, 143-159.
- ⁵⁷ Goldberg, J.A., Pineda, E.P., Smith E.E., Friedman, O.M., Rutenburg, A.M. "A Method for the Colorimetric Determination of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase in Human Serum; Enzymatic Activity in Health and Disease", *Gastroenterology* **1963**, *44*, 127-133.

-
- ⁵⁸ Du, W., Risley, J.M. "Acylation is Rate-Limiting in Glycosylasparaginase-Catalyzed Hydrolysis of N^4 -(4'-Substituted Phenyl)-L-Asparagines", *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1900-1905.
- ⁵⁹ Jencks, W.P. "Catalysis in Chemistry and Enzymology", **1969**, U.S.A.
- ⁶⁰ Laidler, K.J., Peterman, B.F. "Temperature Effects in Enzyme Kinetics", *Methods Enzymol.* **1979**, *63*, 234-257.
- ⁶¹ Fersht, A. "Enzyme, Structure and Mechanism", 2nd Edition, *Freemann, W.H. and Company*, N.Y., U.S.A. **1985**, 1-475.
- ⁶² Tipton, K.F., Dixon, H.B. "Effects of pH on Enzymes", *Methods Enzymol.* **1979**, *63*, 183-234.
- ⁶³ Polgar, L. "Oligopeptidase B: A New Type of Serine Peptidase with a Unique Substrate-Dependent Temperature Sensitivity", *Biochemistry* **1999**, *38*, 15548-15555.
- ⁶⁴ Sakai, H., Sakabe, N., Sasaki, K., Hashimoto, W., Suzuki, H., Tachi, H., Kumagai, H., Sakabe, K. "A Preliminary Description of the Crystal Structure of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase from *E. coli* K-12", *J. Biochem.* **1996**, *120*, 26-28.
- ⁶⁵ Castonguay, R. "Études cinétiques des réactions catalysées par la *gamma*-glutamyl transpeptidase purifiée des reins de rats", *Maîtrise de chimie*, **2000**, Département de chimie, Université de Montréal, Montréal.
- ⁶⁶ Blow, D.M., Birktoft, J.J., Hartley, B.S. "Role of a Buried Acid Group in the Mechanism of Action of Chymotrypsin", *Nature* **1969**, *221*, 337-340.
- ⁶⁷ Ménard, A., Castonguay, R., Lherbet, C., Rivard, C., Roupioz, Y., Keillor, J.W. "Nonlinear Free Energy Relationship in the General-Acid-Catalyzed Acylation of Rat Kidney *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase by a Series of *Gamma*-Glutamyl Anilide Substrate Analogues", *Biochemistry* **2001**, *40*, 12678-12685.
- ⁶⁸ Sigler, P.B., Blow, D.M., Matthews, B.W., Henderson, R. "Structure of Crystalline-Chymotrypsin. II. A Preliminary Report Including a Hypothesis for the Activation Mechanism", *J. Mol. Biol.* **1968**, *35*, 143-164.
- ⁶⁹ Dubus, A., Wilkin, J.M., Raquet, X., Normark, S., Frere, J.M. "Catalytic Mechanism of Active-Site Serine Beta-Lactamases: Role of the Conserved Hydroxy Group of the Lys-Thr(Ser)-Gly Triad", *Biochem. J.* **1994**, *301*, 485-494.
- ⁷⁰ Boots, J.W., van Dongen, W.D., Verheij, H.M., de Haas, G.H., Haverkamp, J., Slotboom, A.J. "Identification of the Active Site Histidine in *Staphylococcus hyicus*

-
- Lipase Using Chemical Modification and Mass Spectrometry”, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1248*, 27-34.
- 71 Stone, S.R., Rennex, D., Wikstrom, P., Shaw, E., Hofsteenge, J. “Inactivation of Prolyl Endopeptidase by a Peptidylchloromethane. Kinetics of Inactivation and Identification of Sites of Modification”, *Biochem. J.* **1991**, *276*, 837-840.
- 72 Shaw, E., Springhorn, S. “Identification of the Histidine Residue at the Active Center of Trypsin Labelled by TLCK”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 391-397.
- 73 Hart, D.O., He, S., Chany, C.J. 2nd, Withers, S.G., Sims, P.F., Sinnott, M.L., Brumer, H. 3rd “Identification of Asp-130 as the Catalytic Nucleophile in the Main *Alpha*-Galactosidase from *Phanerochaete chrysosporium*, a Family 27 Glycosyl Hydrolase”, *Biochemistry* **2000**, *39*, 9826-9836.
- 74 Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N., Meister, A. “Expression of an Active Glycosylated Human *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase Mutant that Lacks a Membrane Anchor Domain”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 126-130.
- 75 Elce, J.S. “Active-Site Amino Acid Residues in *Gamma*-Glutamyltransferase and the Nature of the *Gamma*-Glutamyl-Enzyme Bond”, *Biochem. J.* **1980**, *185*, 473-481.
- 76 Smith, T.K., Meister, A. “Chemical Modification of Active Site Residues in *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase. Aspartate 422 and Cysteine 453”, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 12476-12480.
- 77 Thompson, G.A., Meister, A. “Modulation of the Hydrolysis, Transfer, and Glutaminase Activities of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase by Maleate Bound at the Cysteinylglycine Binding Site of the Enzyme”, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 2956-2960.
- 78 Suzuki, H., Kumagai, H., Tochikura, T. “*Gamma*-Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: Purification and Properties”, *J. Bacteriol.* **1986**, *168*, 1325-1331.
- 79 Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. “Significance of Arg-107 and Glu-108 in the Catalytic Mechanism of Human *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase. Identification by Site-Directed Mutagenesis”, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 3980-3985.
- 80 Powers, J.C., Asgian, J.L., Ekici, O.D., James, K.E. “Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases”, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639-4750.

- ⁸¹ Ferraccioli, R., Croce, P.D., Gallina, C., Consalvi, V., Scandurra, R. "Synthesis and Inhibiting Properties Toward Trypsin Like Proteases of *N*-alpha-(*N,N*-Dimethylcarbamoyl)-alpha-Azaornithine and alpha-Azalysine Esters", *Farmaco*. **1991**, *46*, 1517-1531.
- ⁸² Baggio, R., Shi, Y.Q., Wu, Y.Q., Abeles, R.H. "From Good Substrates to Good Inhibitors: Design of Inhibitors for Serine and Thiol Proteases", *Biochemistry* **1996**, *35*, 3351-3353.
- ⁸³ Magrath, J., Abeles, R.H. "Cysteine Protease Inhibition by Azapeptide Esters", *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4279-4283.
- ⁸⁴ Xing, R., Hanzlik, R.P. "Azapeptides as Inhibitors and Active Site Titrants for Cysteine Proteinase", *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1344-1351.
- ⁸⁵ Powers, J.C., Boone, R., Carroll, D.L., Gupton, B.F., Kam, C.M., Nishino, N., Sakamoto, M., Tuhy, P.M. "Reaction of Azapeptides with Human Leukocyte Elastase and Porcine Pancreatic Elastase. New Inhibitors and Active Site Titrants", *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4288-4294.
- ⁸⁶ Kato, M., Agha, B.J., Abdul-Raheem, A.K., Tsuji, K., Banks, W.R., Digenis, G.A. "Peptidyl Carbamates as Novel Elastase Inhibitors: Structure-Activity Relationship Studies", *J. Enzyme Inhib.* **1993**, *7*, 105-130.
- ⁸⁷ Digenis, G.A., Agha, B.J., Tsuji, K., Kato, M., Shinogi, M. "Peptidyl Carbamates Incorporating Amino Acid Isosteres as Novel Elastase Inhibitors", *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1468-1476.
- ⁸⁸ Calcagni, A., Dupre, S., Lucente, G., Luisi, G., Pinnen, F., Rossi, D. "Synthesis and Activity of the Glutathione Analogue *Gamma*-(*L-gamma*-azaglutamyl)-*L*-cysteinylglycine", *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *46*, 434-439.
- ⁸⁹ Calcagni, A., Dupre, S., Lucente, G., Luisi, G., Pinnen, F., Rossi, D., Spirito, A. "Synthesis and Activity of the Glutathione Analogue *Gamma*-(*L-gamma*-oxaglutamyl)-*L*-cysteinylglycine", *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1996**, *329*, 498-502.
- ⁹⁰ Burg, D., Filippov, D.V., Hermanns, R., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Mulder, G.J. "Peptidomimetic Glutathione Analogues as Novel γ -GT Stable GST Inhibitors", *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 195-205.
- ⁹¹ Barnes, A.R., Sugden, J.K. "Comparison of Colourimetric Methods for Ammonia Determination", *Pharm. Acta Helv.* **1990**, *65*, 258-261.
- ⁹² Sheng, S., Kraft, J.J., Schuster, S.M. "A Specific Quantitative Colorimetric Assay for *L*-Asparagine", *Anal. Biochem.* **1993**, *211*, 242-249.

-
- ⁹³ Castonguay, R., Lherbet, C., Keillor, J.W. "Mapping of the Active Site of Rat Kidney *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase Using Activated Esters and their Amide Derivatives", *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 4185-4191.
- ⁹⁴ Lindsay, H., Whitaker, J.F. "Improved Synthesis of L- γ -Glutamyl-4-Nitroanilide", *Org. Prep. Proc. Int.* **1975**, *7*, 89-91.
- ⁹⁵ de Macedo, P., Marrano, C., Keillor, J.W. "Synthesis of Dipeptide-Bound Epoxides and *alpha,beta*-Unsaturated Amides as Potential Irreversible Transglutaminase Inhibitors", *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 355-360.
- ⁹⁶ Moriarty, R.M., Chany II, C.J., Vaid, R.K., Prakash, O., Tulhadar, S.M. "Preparation of Methyl Carbamates from Primary Alkyl- and Arylcarboxamides Using Hypervalent Iodine", *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2478-2482.
- ⁹⁷ Chabra, S.R., Mahajan, A., Chan, W.C. "Homochiral 4-Azalysine Building Blocks: Syntheses and Applications in Solid-Phase Chemistry", *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4017-4029.
- ⁹⁸ Micich, T.J. "Synthesis and Bacteriostatic Properties of Acylarylhureas and Alkylarylhureas", *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1982**, *59*, 448-452.
- ⁹⁹ Lapierre, D. "Synthèse de composés fonctionnalisés (carbonate, carbamate, thiocarbonate) et évaluation, par études cinétiques, de leur réactivité avec et sans la transglutaminase de foies de cochons d'Inde", *Mémoire de maîtrise*, **2003**, Département de chimie, Université de Montréal, Montréal.
- ¹⁰⁰ Lherbet, C., Morin, M., Castonguay, R., Keillor, J.W. "Synthesis of Aza and Oxaglutamyl-*p*-nitroanilide Derivatives and Their Kinetic Studies with *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 997-1000.
- ¹⁰¹ Dave, R., Badet, B., Meffre, P. "*Gamma*-Fluorinated Analogues of Glutamic Acid and Glutamine", *Amino Acids* **2003**, *24*, 245-261.
- ¹⁰² Konas, D.W., Coward, J.K. "Synthesis of L-4,4-Difluoroglutamic Acid via Electrophilic Difluorination of a Lactam", *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2105-2107.
- ¹⁰³ Konas, D.W., Coward, J.K. "Electrophilic Fluorination of Pyroglutamic Acid Derivatives: Application of Substrate-Dependent Reactivity and Diastereoselectivity to the Synthesis of Optically Active 4-Fluoroglutamic Acids", *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8831-8842.
- ¹⁰⁴ Konas, D.W., Pankuch, J.J., Coward, J.K. "The Synthesis of (2*S*)-4,4-Difluoroglutamyl *g*-Peptides Based on Garner's Aldehyde and Fluoro-Reformatsky Chemistry", *Synthesis* **2002**, *17*, 2616-2626.

-
- ¹⁰⁵ Hudlicky, M. "Organic Compounds of Fluorine. II. Fluorinated Amino Acids", *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1961**, *26*, 1414-1421.
- ¹⁰⁶ Avent, A.G., Bowler, A.N., Doyle, P.M., Marchand, C.M., Young, D.W. "Stereospecific Synthesis of 4-Fluoroglutamic Acids", *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1509-1512.
- ¹⁰⁷ Hudlicky, M., "Stereospecific Synthesis of all Four Stereoisomers of 4-Fluoroglutamic Acid", *J. Fluorine Chem.* **1993**, *60*, 193-210.
- ¹⁰⁸ Cook, N.D., Upperton, K.P., Challis, B.C., Peters, T.J. "The Donor Specificity and Kinetics of the Hydrolysis Reaction of *Gamma*-Glutamyltransferase", *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *914*, 240-245.
- ¹⁰⁹ Orłowski, M., Meister, A. "Isolation of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase from Hog Kidney", *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 338-347.
- ¹¹⁰ Griffith, O.W., Meister, A. "Selective Inhibition of *Gamma*-Glutamyl-Cycle Enzymes by Substrate Analogs", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, *74*, 3330-3334.
- ¹¹¹ Kim, S., Lee, J.I., Kim, Y.C. "A Simple and Mild Esterification Method for Carboxylic Acids Using Mixed Carboxylic-Carbonic Anhydrides", *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 560-565.
- ¹¹² Gagnon, P., Huang, X., Therrien, E., Keillor, J.W. "Peptide Coupling of Unprotected Amino Acids Through *in situ* *p*-Nitrophenyl Ester Formation", *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7717-7719.
- ¹¹³ Pauling, L. "Nature of Forces Between Large Molecules of Biological Interest", *Nature* **1948**, *161*, 707-709.
- ¹¹⁴ Wolfenden, R. "Transition State Analogues for Enzyme Catalysis", *Nature* **1969**, *223*, 704-705.
- ¹¹⁵ Venkatesan, N., Kim, B.H., "Synthesis and Enzyme Inhibitory Activities of Novel Peptide Isosteres", *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 2243-2270.
- ¹¹⁶ Thompson, S.A., Andrews, P.R., Hanzlik, R.P. "Carboxyl-Modified Amino Acids and Peptides as Protease Inhibitors", *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 104-111.
- ¹¹⁷ London, R.E., Gabel, S.A. "Development and Evaluation of a Boronate Inhibitor of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase", *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *385*, 250-258.

-
- ¹¹⁹ Dranoff, G, Elion, G.B., Friedman, H.S., Campbell, G.L., Bigner, D.D. "Influence of Glutamine on the Growth of Human Glioma and Medulloblastoma in Culture", *Cancer Res.* **1985**, *45*, 4077-4081.
- ¹²⁰ Manning, J.M., Moore, S., Rowe, W.B., Meister, A. "Identification of L-Methionine S-Sulfoximine as the Diastereoisomer of L-Methionine SR-Sulfoximine that Inhibits Glutamine Synthetase", *Biochemistry* **1969**, *8*, 2681-2685.
- ¹²¹ Masters, D.S. Jr, Meister, A. "Inhibition of Homocysteine Sulfonamide of Glutamate Synthase Purified from *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 8711-8715.
- ¹²² Trotta, P.P., Platzer, K.E., Haschemeyer, R.H., Meister, A. "Glutamine-Binding Subunit of Glutamate Synthase and Partial Reactions Catalyzed by this Glutamine Amidotransferase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *71*, 4607-4611.
- ¹²³ Elliott, W.H., Gale, E.F. "Glutamine-Synthesizing System of *Staphylococcus aureus*. Its Inhibition by Crystal Violet and Methionine-Sulfoxide", *Nature* **1948**, *161*, 129-130.
- ¹²⁴ Karl, R.M., Hupperich, M., Thomer, A., Eggerer, H. "Inhibition of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase and Citrate Synthase by Sulfoxides and Sulfones of Substrate-Analogue CoA-Thioether Derivatives", *Eur. J. Biochem.* **1995**, *227*, 292-295.
- ¹²⁵ Ash, R.J., Flynn, G.A., Liskamp, R.M., Ottenheijm, H.C. "Sulfoxide Configuration in Sparsomycin Determines Time-Dependent and Competitive Inhibition of Peptidyl Transferase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *125*, 784-789.
- ¹²⁶ Holland, H.L., Brown, F.M. "Biocatalytic and Chemical Preparation of all Diastereomers of Methionine Sulfoxide", *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, *10*, 535-538.
- ¹²⁷ Holland, H.L., Andreana, P.R., Brown, F.M. "Biocatalytic and Chemical Routes to all the Stereoisomers of Methionine and Ethionine Sulfoxides" *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 2833-2843.
- ¹²⁸ Christensen, B.W., Kjaer, A. "Absolute Configuration of Methionine Sulfoxide", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1965**, *11*, 225-226.
- ¹²⁹ Robertus, J.D., Kraut, J., Alden, R.A., Birktoft, J.J. "Subtilisin: A Stereochemical Mechanism Involving Transition-State Stabilization", *Biochemistry* **1972**, *11*, 4293-4303.

-
- ¹³⁰ Lherbet, C., Keillor, J.W. "Probing the Stereochemistry of the Active Site of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase Using Sulphur Derivatives of L-Glutamic Acid", *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *2*, 238-245.
- ¹³¹ "Lange's Handbook of Chemistry, 15th Edition", ed. J. A. Dean, McGraw-Hill, New York, **1999**, 8.24-8.72.
- ¹³² Stein, R.L., DeCicco, C., Nelson, D., Thomas, B. "Slow-Binding Inhibition of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase by *Gamma*-BoroGlu", *Biochemistry* **2001**, *40*, 5804-5811.
- ¹³³ Griffith, O.W., Meister, A. "Translocation of Intracellular Glutathione to Membrane-Bound *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase as a Discrete Step in the *Gamma*-Glutamyl Cycle: Glutathionuria After Inhibition of Transpeptidase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, *76*, 268-272.
- ¹³⁴ Hiratake, J., Irie, T., Tokutake, N., Oda, J. "Recognition of a Cysteine Substrate by *E. coli Gamma*-Glutamylcysteine Synthetase Probed by Sulfoximine-Based Transition-State Analogue Inhibitors", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 1500-1514.
- ¹³⁵ Tokutake, N., Hiratake, J., Katoh, M., Irie, T., Kato, H., Oda, J. "Design, Synthesis and Evaluation of Transition-State Analogue Inhibitors of *Escherichia coli Gamma*-Glutamylcysteine Synthetase", *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1935-1953.
- ¹³⁶ Logusch, E.W. "A Simple Preparation of S-Alkyl Homocysteine Derivatives : S-Phosphonomethyl Homocysteines as Inhibitors of Glutamine Synthetase", *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6055-6058.
- ¹³⁷ Grembecka, J., Mucha, A., Cierpicki, T., Kafarski, P. "The Most Potent Organophosphorus Inhibitors of Leucine Aminopeptidase. Structure-Based Design, Chemistry, and Activity", *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2641-2655.
- ¹³⁸ Tanner, M.E., Vaganay, S., van Heijenoort, J., Blanot, D. "Phosphinate Inhibitors of the D-Glutamic Acid-Adding Enzyme of Peptidoglycan Biosynthesis", *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1756-1760.
- ¹³⁹ Bartlett, P.A., Yusuff, N., Rico, A.C., Lindvall, M.K. "Antihydrophobic Solvent Effects: An Experimental Probe for the Hydrophobic Contribution to Enzyme-Inhibitor Binding", *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3853-3857.
- ¹⁴⁰ Decicco, C.P., Nelson, D.J., Luo, Y., Shen, L., Horiuchi, K.Y., Amsler, K.M., Foster, L.A., Spitz, S.M., Merrill, J.J., Sizemore, C.F., Rogers, K.C., Copeland, R.A., Harpel, M.R. "Glutamyl-*Gamma*-Boronate Inhibitors of Bacterial Glu-tRNA(Gln) Amidotransferase", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2561-2564.

- ¹⁴¹ Jin, J.Y., Tian, G.R., Kim, D.H. "Optically Active 2-Benzyl-3-methanesulfinylpropanoic acid: Synthesis and Evaluation as Inhibitors for Carboxypeptidase A", *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4377-4381.
- ¹⁴² Jones, T.R., Webber, S.E., Varney, M.D., Reddy, M.R., Lewis, K.K., Kathardekar, V., Mazdiyasn, H., Deal, J., Nguyen, D., Welsh, K.M., Webber, S., Johnston, A., Matthews, D.A., Smith W.W., Janson, C.A., Bacquet, R.J., Howland, E.F., Booth, C.L., Herrmann, S.M., Ward, R.W., White, J., Bartlett, C.A., Morse, C.A. "Structure-Based Design of Substituted Diphenyl Sulfones and Sulfoxides as Lipophilic Inhibitors of Thymidylate Synthase", *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 677-683.
- ¹⁴³ Thompson, G.A., Meister, A. "Modulation of γ -Glutamyl Transpeptidase Activities by Hippurate and Related Compounds", *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 2109-2113.
- ¹⁴⁴ Overman, L., Smoot, J., Overman, J. "The Reduction of Aryl Disulfides with Triphenylphosphine and Water", *Synthesis* **1974**, 59-60.
- ¹⁴⁵ Zhao, G., Wan, W., Mansouri, S., Alfaro, J.F., Bassler, B.L., Cornell, K.A., Zhou, Z.S. "Chemical Synthesis of *S*-Ribosyl-L-Homocysteine and Activity Assay as a LuxS Substrate", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3897-3900.
- ¹⁴⁶ Nair, S.A., Lee, B., Hangauer, D.G., "Synthesis of Orthogonally Protected L-Homocysteine and L-2-Amino-4-Phosphonobutanoic Acid from L-Homoserine", *Synthesis* **1995**, 810-814.
- ¹⁴⁷ Luisi, G., Calcagni, A., Pinnen, F. " ψ (SO₂-NH) Transition-State Isosteres of Peptides. Synthesis of the Glutathione Disulfide Analog [Glu ψ (SO₂-NH)-Cys-Gly]₂", *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2391-2392.
- ¹⁴⁸ Wu, R., Saab, N.H., Huang, H., Wiest, L., Pegg, A.E., Casero, R.A. Jr., Woster, P.M. "Synthesis and Evaluation of a Polyamine Phosphinate and Phosphonamidate as Transition-State Analogue Inhibitors of Spermidine/Spermine-N¹-Acetyltransferase", *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 825-836.
- ¹⁴⁹ Galardy, R.E., Grobelny, D., Kortylewicz, Z.P., Poncz, L. "Inhibition of Human Skin Fibroblast Collagenase by Phosphorus-Containing Peptides", *Matrix Suppl.* **1992**, *1*, 259-262.
- ¹⁵⁰ Valiaeva, N., Bartley, D., Konno, T., Coward, J.K. "Phosphinic Acid Pseudopeptides Analogous to Glutamyl- γ -Glutamate: Synthesis and Coupling to Pteroyl Azides Leads to Potent Inhibitors of Folylpoly- γ -Glutamate Synthetase", *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5146-5154.
- ¹⁵¹ Pasternack, M.S., Eisen, H.N. "A Novel Serine Esterase Expressed by Cytotoxic T Lymphocytes", *Nature* **1985**, *314*, 743-745.

-
- ¹⁵² Zhang, Z.Y., Davis, J.P., Van Etten, R.L. "Covalent Modification and Active Site-Directed Inactivation of a Low Molecular Weight Phosphotyrosyl Protein Phosphatase", *Biochemistry* **1992**, *31*, 1701-1711.
- ¹⁵³ Vazeux, G., Iturrioz, X., Corvol, P., Llorens-Cortes, C. "A Tyrosine Residue Essential for Catalytic Activity in Aminopeptidase A", *Biochem. J.* **1997**, *327*, 883-889.
- ¹⁵⁴ Tate, S.S., Meister, A. "Affinity Labeling of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase and Location of the *Gamma*-Glutamyl Binding Site on the Light Subunit", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, *74*, 931-935.
- ¹⁵⁵ Stole, E., Smith, T.K., Manning, J.M., Meister, A. "Interaction of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase with Acivicin", *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 21435-21439.
- ¹⁵⁶ Smith, T.K., Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N., Meister, A. "Different Sites of Acivicin Binding and Inactivation of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidases", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 2360-2364.
- ¹⁵⁷ Griffith, O.W., Meister, A. "Excretion of Cysteine and *Gamma*-Glutamylcysteine Moieties in Human and Experimental Animal *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase Deficiency", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, *77*, 3384-3387.
- ¹⁵⁸ Miles, B.W., Thoden, J.B., Holden, H.M., Raushel, F.M. "Inactivation of the Amidotransferase Activity of Carbamoyl Phosphate Synthetase by the Antibiotic Acivicin", *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4368-4373.
- ¹⁵⁹ Chittur, S.V., Klem, T.J., Shafer, C.M., Davisson, V.J. "Mechanism for Acivicin Inactivation of Triad Glutamine Amidotransferases", *Biochemistry* **2001**, *40*, 876-887.
- ¹⁶⁰ Tso, J.Y., Hermodson, M.A., Zalkin, H. "Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase from Cloned *Escherichia coli* PurF. NH₂-terminal Amino Acid Sequence, Identification of the Glutamine Site, and Trace Metal Analysis", *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 3532-3536.
- ¹⁶¹ Walker, B., Brown, M.F., Lynas, J.F., Martin, S.L., McDowell, A., Badet, B., Hill, A.J. "Inhibition of *Escherichia coli* Glucosamine Synthetase by Novel Electrophilic Analogues of Glutamine. Comparison with 6-Diazo-5-oxo-norleucine", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2795-2798.
- ¹⁶² Schoellmann, G., Shaw, E. "Direct Evidence for the Presence of Histidine in the Active Center of Chymotrypsin", *Biochemistry* **1963**, *2*, 252-255.

-
- Analogues of Glutamine. Comparison with 6-Diazo-5-oxo-norleucine", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2795-2798.
- ¹⁶² Schoellmann, G., Shaw, E. "Direct Evidence for the Presence of Histidine in the Active Center of Chymotrypsin", *Biochemistry* **1963**, *2*, 252-255.
- ¹⁶³ Poster, D.S., Bruno, S., Penta, J., Neil, G.L., McGovren, J.P. "Acivicin. An Antitumor Antibiotic", *Cancer Clin. Trials* **1981**, *4*, 327-330.
- ¹⁶⁴ Elliott, W.L., Weber, G., "In vivo Inactivation of Formylglycinamide Ribonucleotide Synthetase in Rat Hepatoma", *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 243-248.
- ¹⁶⁵ Ardalan, B., Arakawa, M., Villacorte, D., Jayaram, H., Cooney, D.A., "Effect of L-Glutamine Antagonists on 5-Phosphoribosyl 1-Pyrophosphate Levels in P388 Leukemia and in Murine Colon Adenocarcinomas *in Vivo*", *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 1509-1513.
- ¹⁶⁶ Lyons, S.D., Sant, M.E., Christopherson, R.I. "Cytotoxic Mechanisms of Glutamine Antagonists in Mouse L1210 Leukemia", *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 11377-11381.
- ¹⁶⁷ Kitz, R., Wilson, I.B. "Esters of Methanesulfonic Acid as Irreversible Inhibitors of Acetylcholinesterase", *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3245-3249.
- ¹⁶⁸ Hussein, A.S., Walter, R.D. "Purification and Characterization of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase from *Ascaris suum*", *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *77*, 41-47.
- ¹⁶⁹ Gardell, S.J., Tate, S.S. "Affinity Labeling of *Gamma*-Glutamyl Transpeptidase by Glutamine Antagonists. Effects of the *Gamma*-Glutamyl Transferase and Proteinase Activities", *FEBS Lett.* **1980**, *122*, 171-174.
- ¹⁷⁰ Buchanan, J.M. "The amidotransferases", *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1973**, *39*, 91-183.
- ¹⁷¹ Zumbrunn, A., Stone, S., Shaw, E. "Synthesis and Properties of Cbz-Phe-Arg-CHN₂ (Benzyloxycarbonylphenylalanylarginyldiazomethane) as a Proteinase Inhibitor", *Biochem. J.* **1988**, *250*, 621-623.
- ¹⁷² Stone, S.R., Rennex, D., Wikstrom, P., Shaw, E., Hofsteenge, J. "Peptidyl-diazomethanes. A Novel Mechanism of Interaction with Prolyl Endopeptidase", *Biochem. J.* **1992**, *283*, 871-876.
- ¹⁷³ Savory, P.J., Djaballah, H., Angliker, H., Shaw, E., Rivett, A.J. "Reaction of Proteasomes with Peptidylchloromethanes and Peptidyl-diazomethanes", *Biochem. J.* **1993**, *296*, 601-605.

-
- and its Analogues as Inhibitors of Cysteine Proteinases Including Cathepsins B, H and L”, *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189-198.
- ¹⁷⁶ Hanzlik, R.P., Thompson, S.A. “Vinyllogous Amino Acid Esters: a New Class of Inactivators for Thiol Proteases”, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 711-712.
- ¹⁷⁷ Govardhan, C.P., Abeles, R.H., “Inactivation of Cysteine Proteinases”, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *330*, 110-114.
- ¹⁷⁸ DiIanni, C.L., Stevens, J.T., Bolgar, M., O’Boyle, D.R., Weinheimer, S.P., Colonna, R.J. “Identification of the Serine Residue at the Active Site of the *Herpes Simplex* Virus Type 1 Protease”, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12672-12676.
- ¹⁷⁹ Oleksyszyn, J., Powers, J.C. “Irreversible Inhibition of Serine Proteinases by Peptidyl Derivatives of Alpha-Aminoalkylphosphonate Diphenyl Esters”, *Biochem. Biophys. Res Commun.* **1989**, *161*, 143-149.
- ¹⁸⁰ Rodriguez, C.E., Holmes, H.M., Mlodnosky, K.L., Lam, V.Q., Berkman, C.E. “Evaluation of Phosphorus-Containing Inhibitors of *Gamma*-Glutamyl Hydrolase”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1521-1524.
- ¹⁸¹ Sawa, M., Kiyoi, T., Kurokawa, K., Kumihara, H., Yamamoto, M., Miyasaka, T., Ito, Y., Hirayama, R., Inoue, T., Kirii, Y., Nishiwaki, E., Ohmoto, H., Maeda, Y., Ishibushi, E., Inoue, Y., Yoshino, K., Kondo, H. “New Type of Metalloproteinase Inhibitor: Design and Synthesis of New Phosphoramidate-Based Hydroxamic Acids”, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 919-929.
- ¹⁸² Mader, M.M., Bartlett, P.A. “Binding Energy and Catalysis: The Implications for Transition-State Analogs and Catalytic Antibodies”, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1281-1302.
- ¹⁸³ de Medina, P., Ingrassia, L.S., Mulliez, M.E. “Synthesis of the First Stable Phosphoramidate Transition State Analogue”, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8424-8430.
- ¹⁸⁴ Rahil, J., Haake, P. “Reactivity and Mechanism of Hydrolysis of Phosphoramidates”, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1723-1734.
- ¹⁸⁵ Malachowski, W.P., Coward, J.K. “The Chemistry of Phosphopeptides: Formation of Functionalized Phosphonochloridates under Mild Conditions and Their Reaction with Alcohols and Amines”, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7616-7624.
- ¹⁸⁶ Chen, S., Lin, C.H., Kwon, D.S., Walsh, C.T., Coward, J.K. “Design, Synthesis, and Biochemical Evaluation of Phosphonate and Phosphoramidate Analogs of Glutathionylspermidine as Inhibitors of Glutathionylspermidine Synthetase/amidase from *Escherichia coli*”, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3842-3850.

- ¹⁸⁷ McLeod, D.A., Brinkworth, R.I., Ashley, J.A., Janda, K.D., Wirsching, P. "Phosphoramidates and phosphoramidate esters as HIV-1 protease inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 653-658.
- ¹⁸⁸ Hirschmann, R., Yager, K.M., Taylor, C.M., Witherington, J., Sprengeler, P.A., Phillips, B.W., Moore, W., Smith, A.B., III "Phosphonate Diester and Phosphonamide Synthesis. Reaction Coordinate Analysis by ³¹P NMR Spectroscopy: Identification of Pyrophosphonate Anhydrides and Highly Reactive Phosphonylammonium Salts", *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8177-8190.
- ¹⁸⁹ Wang, Q., Linhardt, R.J., "Synthesis of a Serine-Based Neuraminic Acid C-Glycoside", *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2668-2672.
- ¹⁹⁰ Damczyk, M., Johnson, D.D., Reddy, R.E. "A Concise Synthesis of (S)-(-)-3-(2-carboxy-4-pyrrolyl)-alanine", *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 3063-3068.
- ¹⁹¹ Meffre, P., Durand, P., Le Goffic, F. "Ethyl (S)-2-phthalimido-4-oxobutanoate (2H-isoindeole-2-acetic acid, 1,3-Dihydro-1,3-dioxo- α -(2-oxoethyl)-, methyl ester, (S)-)", *Org. Synth.* **1999**, *76*, 123-132.
- ¹⁹² Sakaitani, M., Ohfuné, Y. "Syntheses and Reactions of Silyl Carbamates. 2. A New Mode of Cyclic Carbamate Formation from *tert*-Butyldimethylsilyl Carbamate", *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1150-1158.
- ¹⁹³ Tong, G., Perich, J.W., Johns, R.B. "Synthesis of Leu-Abu(P) and Glu-Abu(P)-Leu. Isosteres of Ser(P)-Peptides", *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3759-3762.
- ¹⁹⁴ Tong, G., Perich, J.W., Johns, R.B. "The Improved Synthesis of Boc-Abu(PO₃Me₂)-OH and its Use for the Facile Synthesis of Glu-Abu(P)-Leu", *Aust. J. Chem.* **1992**, *45*, 1225-1240.
- ¹⁹⁵ Wiemann, A., Frank, R., Tegge, W. "Synthesis of Suitably Protected Hydroxymethylene Phosphonate- and Phosphate Phosphonate-Analogues of Phosphoserine and Their Incorporation into Synthetic Peptides", *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1331-1337.
- ¹⁹⁶ Valerio, R.M., Alewood, P.F., Johns, R.B. "Synthesis of Optically Active 2-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-4-Dialkoxyphosphorylbutanoate Protected Isosteres of *O*-Phosphoserine for Peptide Synthesis", *Synthesis* **1988**, *10*, 786-789.
- ¹⁹⁷ Burke, T.R. Jr, Li, Z.H., Bolen, J.B., Marquez, V.E. "Phosphonate-Containing Inhibitors of Tyrosine-Specific Protein Kinases", *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1577-81.

- ¹⁹⁸ Seo, K., Yamashita, M. "Synthesis of 1,2,3,4-*tetra-O*-acetyl-5-deoxy-5-C-[(R)- and (S)-phenylphosphinyl]- α - and - β -D-xylopyranoses", *Carbohydr. Res.* **1985**, *141*, 335-339.
- ¹⁹⁹ Logusch, E.W., "Facile Synthesis of D,L-Phosphinothricin from Methyl 4-Bromo-2-Phthalimidobutyrate", *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5935-5938.
- ²⁰⁰ Gobec, S., Urleb, U. "Synthesis of Phosphono Phthalimido-Desmuramyl dipeptide Analogs", *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **2000**, *156*, 125-133.
- ²⁰¹ Gong, B., Lynn, D.G. "Regioselective Reductions of Diacids: Aspartic Acid to Homoserine", *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4763-5.
- ²⁰² Koch, T., Buchardt, O. "Synthesis of L-(+)-Selenomethionine", *Synthesis* **1993**, 1065-1067.
- ²⁰³ Malachowski, W.P., Coward, J.K. "The Chemistry of Phosphopeptides: Investigations on the Synthesis of Phosphoramidate, Phosphonate, and Phosphinate Analogues of Glutamyl- γ -glutamate", *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7625-7634.
- ²⁰⁴ Tsukamoto, T., Haile, W.H., McGuire, J.J., Coward, J.K. "Mechanism-Based Inhibition of Human Folylpolyglutamate Synthetase: Design, Synthesis, and Biochemical Characterization of a Phosphopeptide Mimic of the Tetrahedral Intermediate", *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *355*, 109-18.
- ²⁰⁵ Howarth, N.M., Wakelin, L.P.G. " α -PNA: A Novel Peptide Nucleic Acid Analog of DNA", *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5441-5450.
- ²⁰⁶ Carrasco, M.R., Brown, R.T., Serafimova, I.M., Silva, O. "Synthesis of *N*-Fmoc-*O*-(*N'*-Boc-*N'*-methyl)-aminohomoserine, An Amino Acid for the Facile Preparation of Neoglycopeptides", *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 195-7.
- ²⁰⁷ Barton, D.H.R., Herve, Y., Potier, P., Thierry, J. "Manipulation of the Carboxyl Groups of α -Amino Acids and Peptides Using Radical Chemistry Based on Esters of *N*-Hydroxy-2-thiopyridone", *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5479-86.
- ²⁰⁸ Griesbeck, A.G., Hirt, J. "A Photochemical Route to Vinylglycine and a Vinylglycine Dipeptide", *Liebigs Ann.* **1995**, 1957-1961.
- ²⁰⁹ Ozinskas, A.J., Rosenthal, G.A. "Synthesis of L-Canaline and γ -Functional 2-Aminobutyric Acid Derivatives", *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5047-5050.
- ²¹⁰ Oza, V.B., Corcoran, R.C. "A Mild Preparation of Protected Phosphate Esters From Alcohols", *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3680-3684.

- ²¹¹ Hoffmann, M. "Selective Cleavage of One Ester Group in Dibenzyl Di-*p*-nitrobenzyl and Dimethyl *N*-protected Aminoalkylphosphonates", *Phosphorous, Sulfur and Silicon* **1998**, *134/135*, 109-118.
- ²¹² Holy A. "Method for Cleavage of Phosphonic Acid Diesters to Monoesters", *Synthesis* **1998**, 381-385.
- ²¹³ Gobec, S., Strancar, K., Urleb, U. "A General Synthesis of Ethyl 4-[Amino(hydroxyimino)methyl]phenyl Phosphonates", *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 167-170.
- ²¹⁴ McNamara, J.F., Lombardo, H., Pillai, S.K., Jensen, I., Albericio, F., Kates, S.A. "An Efficient Solid-Phase Strategy for the Construction of Chemokines", *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 512-518.
- ²¹⁵ Burns, D.H., Jabara, C.S., Burden, M.W. A Convenient Preparation of Benzyl 4-(*R*¹)-3-(*R*²)Pyrrole-2-Carboxylates", *Synthetic Commun.* **1995**, *25*, 379-387.
- ²¹⁶ Ruiz-Gayo, M., Albericio, F., Pons, M., Royo, M., Pedroso, E., Giralt, E. "Uteroglobin-Like Peptide Cavities. I. Synthesis of Antiparallel and Parallel Dimers of Bis-Cysteine Peptides", *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3845-3848.
- ²¹⁷ Nawrot, B., Sobczak, M., Antoszczyk, S. "Synthesis of Dinucleoside (N3'-->MeP5') Methanephosphonamidates", *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1799-802.
- ²¹⁸ Sting, M., Steglich, W. "Phosphorus Analogs of Amino Acids. III. Synthesis of Optically Active 1-Aminoalkanephosphonic Acids of the S- and R-Series with the Aid of (-)-Ephedrine as Auxiliary", *Synthesis* **1990**, *2*, 132-134.
- ²¹⁹ Lu, H., Hu, Y., Choy, C.J., Mallari, J.P., Villanueva, A.F., Arrozal, A.F., Berkman, C.E. "Synthesis of Individual Glutamate-Containing Phosphonamidothionate Stereoisomers", *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4313-4316.
- ²²⁰ Hariharan, M., Chaberek, S., Martell, A.E. "Synthesis of Phosphonopeptide", *Synthetic Commun.* **1973**, *3*, 375-379.
- ²²¹ Musiol, H.J., Grams, F., Rudolph-Böhner, S., Moroder, L. "On the Synthesis of Phosphonamidate Peptides", *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6144-6146.
- ²²² Osby, J.O., Martin, M.G., Ganem, B. "An Exceptionally Mild Deprotection of Phthalimides", *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2093-2096.
- ²²³ Dasgupta, F., Garegg, P.J. "Reductive Dephthalimidation : A Mild and Efficient Method for the *N*-Phthalimido Deprotection during Oligosaccharide Synthesis", *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *7*, 701-707.

-
- ²²⁴ Craig, J.C., Bhargava, H.N., Everhart, E.T., LaBelle, B. "Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4-[[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine)", *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1167-1170.
- ²²⁵ McKillop, A., Taylor, R.J.K., Watson, R.J., Lewis, N. "An Improved Procedure for the Preparation of the Garner Aldehyde and its Use for the Synthesis of *N*-Protected 1-halo-2-(*R*)-amino-3-butenes", *Synthesis* **1994**, 31-33.
- ²²⁶ Houssin, R., Bernier, J.-L., Hénichart, J.-P. "A convenient and General Method for the Preparation of *tert*-Butoxycarbonylaminoalkanenitriles and Their Conversion to Mono-*tert*-butoxycarbonylalkanediamines", *Synthesis* **1988**, 259-261.
- ²²⁷ Seki, M., Shimizu, T., Matsumoto, K. "Stereoselective synthesis of *beta*-benzyl-*alpha*-alkyl-*beta*-amino acids from *L*-aspartic acid", *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1298-304.
- ²²⁸ Kim, S., Lee, J.I., Yi, K.Y. "New Amino-protective Reagents for *t*-Butoxycarbonylation and Benzyloxycarbonylation of Amines and Amino Acids", *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 3570-3575.
- ²²⁹ Castonguay, R., Keillor, J.W. Résultats non publiés.

Annexe 1

GGT-humaine -MKKLVVLLGLAVVLLVIVLGLCLWLPS--ASKEPDNHVYT-----RAAVAADAKQCSK 52
GGT-cochon -MKKRYLLLALAAVALVLLILGLCLWLPS--NSK-PHNHVYP-----RAAVAADALRCSE 51
GGT-rat -MKNRFLVLGLVAVVLFVFIIGLCIWLPT--TSG-KPDHVYS-----KAAVATDAKRCSE 51
GGT-E.coli MIKPTFLRRVAIAALLSGSCFSAAPAPPVSYGVEEDVFHVRRAKQGMVASVDATATQ 60
:* : * . * . . * : * :.* : . * : . : *

GGT-humaine IGRDALRDGGSVDAIAAALLCVGLMNAHSMGIGGGLFTIYNSTTRKAEVINAREVAPR 112
GGT-cochon IGRDTRLRDGGSVDAIAAALLCVGLMNAHSMGIGGGLFTIYNSTTRKAEIINAREVAPR 111
GGT-rat IGRDMLQEGGSVVDAAIASLLCMLINAHSMGIGGGLFTIYNSTTRKAEVINAREMAPR 111
GGT-E.coli VGVLDILKEGGNAVDAVAVGYALAVTHPQAGNLGGGGFMLIR-SKNGNTTADFREMAPA 119
:* * * :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.* :.*

GGT-humaine LAFATMFNS-----SEQSQKGLSVAVPGEIRGYELAHQRHGRLPWARLFQPSIQLARQ 166
GGT-cochon LASASMFNS-----SEQSEEGGLSVAVPGEIRGYELAHQRHGRLPWARLFQPSIELASQ 165
GGT-rat LANTSMFNN-----SKDSEEGGLSVAVPGEIRGYELAHQRHGRLPWARLFQPSIQLARH 165
GGT-E.coli KATRDMLDDQGNPDSKSLTSHLAGTPTGTVAGFSLALDKYGTMLPNKVVQPAFKLARD 179
* ** . * : * . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . * : . *

GGT-humaine GFPVGKGLAAALENK-RTVIEQQPVLCEVFCRDRKVLREGERLTLPLQADTYETLAIEGA 225
GGT-cochon GFPVGKGLAAALERS-QDAIKRHPALCEVFCRNGVNLREGDLVTMPRLAKTYETLAVEGA 224
GGT-rat GFPVGKGLARALDKK-RDIIIEKTPALCEVFCRQKVLQEGETVTMPKLADTLQILAQEGA 224
GGT-E.coli GFIVNDALADDLKTYGSEVLPNHENSKAIFWKEGEPLKKGDTLVQANLAKSLEMIANGP 239
** * . . * * . : . : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *

GGT-humaine QAFYNGSLTAQIVKDIQAAGGIVTAEDLNNYRAELIEHPLNISLGDVLYMPSAPLSGPV 285
GGT-cochon QAFYNGSLTAQIVKDIQEAGGIVTAEDLNNYRAELIEQPLRISLGDQLYAPNAPLSGPV 284

GGT-rat RAFYNGSLTAQIVKDIQEAGGIMTVEDLNNYRAEVEIHPMSIGLGDSTLYVPSAPLSGPV 284
GGT-E.coli DEFYKGTIAEQIAEQEMQKNGGLITKEDLAAKAVERTPISGDYRGYQVYSMPPPSSGGIH 299
* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

GGT-humaine LALILNLIKGYNFSRESVESPEQKGLTYHRIVEAFRFAYAKRT-LLGDPKPFVDVTEVVRN 344
GGT-cochon LALILNLIKGYNFSRASVETPEQKGLTYHRIVEAFRFAYAKRT-LLGDPKPFVNVTEVVRN 343
GGT-rat LILILNLIKGYNFSPKSVATPEQKALTYHRIVEAFRFAYAKRT-MLGDPKPFVDVSVQVIRN 343
GGT-E.coli IVQILNILENDFMKKYGFGSAD----AMQIMAEAEKYAYADRSEYLGDPDFVKVP--WQA 353
: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

GGT-humaine MTSEFFAAQLRAQISDDTTHPISYKPEFYTPDDGG-TAHLVVAEDGSAVSATSTINLY 403
GGT-cochon MSSEFFADQLRARI SDTTHPDSYYPEFYTPDDAG-TAHLVSVSDGSAVSATSTINLY 402
GGT-rat MSSEFYATQLRARI TDETHPTAYYAEFYLPDDGG-TAHLVSVSDGSAVAATSTINLY 402
GGT-E.coli LTNKAYAKSIADQIDINKAKPSSEIRPGKLAPYESNQTTHTYSVVDKGNNAVAVTYTLNNT 413
: : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *

GGT-humaine FGSKVRSVPVSGILFNEMDDFSS-PSITNEFGVPPSPANFIQPGKQPLSSMCPTIMVQD 462
GGT-cochon FGSKVRSRISGILFNEMDDFSS-PNITNQFGVVRSPANFITPGKQPLSSMCPVIVGED 461
GGT-rat FGSKVLSRVSGILFNEMDDFSS-PNFTNQFGVAPSPANFIKPGKQPLSSMCPVIVDKD 461
GGT-E.coli FGTGIVAGESGILLNQMDDFSAPKGPVNVYGLVGGDANAVGPNKRPLSSMSPTIVVK-D 472
* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

GGT-humaine GQVRMVVGAAGGTQITTTALAI IYNLWFGYDVKRAVEEPRLHNQLLPNVTIVERNIDQA 522
GGT-cochon GQVRMVVGASGGTQITTTALAI IHSWFGYDVKRAVEEPRLHNQLLPNTTLEKIDQA 521
GGT-rat GKVRMVVGASGGTQITTSVALAI INSLWFGYDVKRAVEEPRLHNQLLPNTTVEKNIDQV 521
GGT-E.coli GKTWLVTSPPGSRITTVLQMVVNSIDYGLNVAEATNAPRFHHQWLPDELRVKEGFS 532
* . : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

GGT-humaine VTAALTRHHHTQIASTFIAVVQAVVRTAGGWAAASDSR-KGGE PAGY 569
GGT-cochon VAAALKTRHHYIQDASTFIGVVQAVVRTPSGWAAASDSR-KGGE PAGY 568
GGT-rat VTAGLKTRHHHTVTPDFIAVVQAVVRTSGGWAAASDSR-KGGE PAGY 568
GGT-E.coli TLKLEAKGQKVALKEAMGSTQSIMVGPDGELYGASDPRSVDLDTAGY 580
. * : : : : : . . . * . . . * * . * . . * * . . . * * . . . * * . . . *

