

2M11.3102.7

Université de Montréal

Synthèse et étude enzymologique d'inhibiteurs irréversibles de la transglutaminase du
foie du cochon d'Inde

par

Claudio Marrano

Département de Chimie

Université de Montréal

Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)

Juin 2000

© Claudio Marrano 2000



Q1
3
U54
2000
v.029

Page d'identification du Jury

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:

Synthèse et étude enzymologique d'inhibiteurs irréversibles de la transglutaminase du
foie du cochon d'Inde

Présenté par:
Claudio Marrano

A été évalué par un Jury composé des personnes suivantes:

Dr. W. Lubell (Président-rapporteur) – F.A.S. Chimie

Dr. J. W. Keillor (Directeur de recherche) – F.A.S. Chimie

Dr. J. Pelletier (Membre du jury) – F.A.S. Chimie

Mémoire accepté le:

SOMMAIRE

Une haute activité des transglutaminases serait à l'origine de divers troubles physiologiques chez l'humain.

Le travail de recherche constituant ce document a été mené dans le but ultime de réguler l'activité de ces enzymes, à travers l'inhibition de la transglutaminase provenant du foie du cochon d'Inde.

Après une introduction sur les transglutaminases, les différentes stratégies de synthèse d'inhibiteurs irréversibles spécifiques sont énoncées. Ainsi sont décrites les synthèses d'inhibiteurs analogues au meilleur substrat connu de la transglutaminase, soit la carbobenzyloxy-L-glutaminyglycine.

Un travail de purification de la transglutaminase provenant du foie du cochon d'Inde a été ensuite effectué, afin d'être en mesure de tester les effets des différents inhibiteurs potentiels synthétisés.

Malgré la connaissance des transglutaminases depuis longtemps, tous les protocoles utilisés jusqu'à ce jour ne permettaient que de suivre l'activité enzymatique de façon discontinue. Or, pour faire des études d'inhibition de la transglutaminase, une méthode cinétique continue s'avérait avantageuse, d'un point de vue pratique. Ainsi est présenté le développement d'une méthode directe permettant de suivre l'activité enzymatique par spectrophotométrie UV-visible.

Ensuite, avec la méthode développée, les effets des différents inhibiteurs potentiels sont étudiés sur la transglutaminase provenant du foie du cochon d'Inde. Une bonne majorité des composés synthétisés ont montré des résultats d'inhibition fort intéressants. Tous les effets d'inhibition observés ont été de nature irréversible.

Ces études ouvrent donc plusieurs horizons en ce qui concerne l'inhibition des transglutaminases. Ainsi, des conclusions et des perspectives pour l'avenir ont été dégagées des différents résultats obtenus.

TABLE DES MATIERES

Sommaire	i
Table des matières	ii
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vii
Abréviations	viii
Remerciements	xi
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1. Les transglutaminases (TGases).....	2
1.2. Les types de transglutaminase et leurs implications dans les processus biologiques	2
1.3. Les transglutaminases et leur mécanisme enzymatique.	3
1.4. Les objectifs du projet	5
CHAPITRE 2 SYNTHÈSE D'INHIBITEURS IRRÉVERSIBLES POTENTIELS DES TRANSGLUTAMINASES	6
2.1. Stratégies développées pour la mise au point des inhibiteurs.	7
2.2. Synthèse des inhibiteurs potentiels analogues du substrat	11
2.2.1 Synthèse des analogues amide thiadiazole	11
2.2.2 Synthèse des analogues amine thiadiazole	15
2.2.3 Synthèse des analogues de type Michael et époxyde	19
2.3. Conclusion.....	22
CHAPITRE 3 PURIFICATION DE LA TRANSGLUTAMINASE PROVENANT DU FOIE DU COCHON D'INDE	23
3.1. Introduction	24
3.2. Protocole général de purification de l'enzyme.....	25
3.2.1 Homogénéisation des foies.....	25
3.2.2 Chromatographie échangeuse d'ions.....	26

3.2.3 Précipitation et extraction de la TGase.....	26
3.2.4 Concentration de l'enzyme.....	27
3.2.5 Chromatographie d'exclusion de taille.....	27
3.2.6 Tests finaux, lyophilisation et entreposage	27
CHAPITRE 4 DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE CONTINUE DE SUIVI CINÉTIQUE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE UV-VISIBLE.....	29
4.1. Introduction	30
4.2. Stratégie de développement de la méthode	31
4.3. Détermination des K_M de la Z-L-Gln-Gly et du DMPDA	32
4.4. Détermination des constantes d'inhibition pour l'iodoacétamide.....	35
4.5. Conclusion.....	38
CHAPITRE 5 TESTS ENZYMOLOGIQUES	40
5.1. Introduction	41
5.2. Étude d'inhibition des analogues de type thiadiazole	43
5.3. Étude d'inhibition des analogues de types Michael et époxyde.....	48
5.4. Conclusion.....	52
CHAPITRE 6 CONCLUSION.....	53
CHAPITRE 7 PARTIE EXPÉRIMENTALE	57
7.1. Synthèse.....	58
7.1.1 Matériels et méthodes.....	58
7.1.2 Procédure générale de synthèse.....	58
7.1.3 Données spectrales	63
7.2. Purification de la TGase provenant du foie du cochon d'Inde.....	121
7.2.1 Matériels.....	121
7.2.2 Méthodes de dosage	121
7.2.2.1. Concentration de protéines.....	121
7.2.2.2. Activité de la TGase	122
7.2.2.3. Définition d'une unité d'activité pour l'enzyme	123
7.2.3 Procédures pour la purification	123

7.3. Développement d'une méthode continue de suivi cinétique par spectrophotométrie	126
7.3.1 Matériels	126
7.3.2 Procédures pour le test d'activité de la TGase selon la méthode développée. .	126
7.3.3 Procédures pour la détermination des vitesses initiales pour différentes concentrations en substrat (K_m).	128
7.3.4 Protocole pour la détermination des constantes d'inhibition irréversible de l'iodoacétamide.....	128
7.4. Protocole pour les études enzymologiques des inhibiteurs potentiels.	128
RÉFÉRENCES	130

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Réaction catalysée par la TGase entre deux protéines	2
Figure 2: Mécanisme enzymatique de la transglutaminase.....	4
Figure 3: Structures d'inhibiteurs irréversibles connus de la TGase	7
Figure 4: Réaction entre le thiolate du résidu cystéine de la TGase et la fonction thiadiazole.....	8
Figure 5: Réaction entre le thiolate du résidu cystéine de la TGase et la fonction amide α , β -insaturée (Michael)	9
Figure 6: Réaction entre le thiolate du résidu cystéine de la TGase et la fonction époxyde.....	9
Figure 7: Structure du dipeptide Z-L-Gln-Gly.....	10
Figure 8: Structure de base des inhibiteurs	10
Figure 9: Parcours de synthèse des inhibiteurs potentiels amide thiadiazole	11
Figure 10: Mécanisme de synthèse du 5-amino-1,2,4-thiadiazole.....	12
Figure 11: Régiosélectivité de l'attaque nucléophile donnant les composés 1a-2a ...	13
Figure 12: Mécanisme type de la réaction de couplage peptidique	14
Figure 13: Parcours de synthèse des inhibiteurs potentiels amine thiadiazole	15
Figure 14: Mécanisme de formation des acides N_{α} -Z-L-2,3-diaminopropanoïque et N_{α} -Z-L-2,4-diaminobutyrique	16
Figure 15: Mécanisme de formation du 5-chloro-3-méthoxy-1,2,4-thiadiazole.....	17
Figure 16: Parcours de synthèse des analogues de type Michael et époxyde	19
Figure 17: Mécanisme de préparation du DMDO.....	21
Figure 18: Schéma de montage pour la préparation du DMDO	21
Figure 19: Mécanisme d'époxydation en présence de DMDO	22
Figure 20: Séquences comparatives des acides aminés proche du site actif de la TGase provenant du facteur XIIIa humain et celle du foie du cochon d'Inde (FCI).....	25
Figure 21: Réaction de transamidation catalysée par la TGase	31
Figure 22: Profil type de progression de l'absorbance à $\lambda = 278$ nm associée à la formation du produit anilide.....	32

Figure 23: Courbe de Michaelis-Menten pour le substrat donneur Z-L-Gln-Gly.....	34
Figure 24: Courbe de Michaelis-Menten pour le substrat accepteur DMPDA.....	35
Figure 25: Réaction entre l'iodoacétamide et le thiolate d'une cystéine	36
Figure 26: Profils cinétiques à différentes concentrations d'iodoacétamide	37
Figure 27: Double réciproque de k_{obs} versus [Iodoacétamide]	38
Figure 28: Courbes cinétiques pour différentes concentrations en inhibiteur.....	42
Figure 29: Droite résultante de la double réciproque de k_{obs} vs [I].....	43
Figure 30: Test d'activité colorimétrique de la TGase.....	123
Figure 31: Détermination du coefficient d'extinction molaire ϵ de l'anilide formé soit la Z-L-glutamyl-(γ -4-diméthylaminoanilide)glycine.....	127

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Résumé des résultats obtenus lors de la purification de la TGase provenant du foie de cochon d'Inde.....	28
Tableau 2: Résumé des diverses constantes cinétique obtenues par la méthode développée.....	39
Tableaux 3-5: Résumé des paramètres cinétiques pour les analogues amides thiadiazoles.....	45
Tableaux 6-7: Résumé des paramètres cinétiques pour les analogues amines thiadiazoles.....	47
Tableaux 8-10: Résumé des paramètres cinétiques pour les analogues de type Michael.....	49
Tableaux 11-13: Résumé des paramètres cinétiques pour les analogues de type époxyde	51

ABRÉVIATIONS

Ac	Acétyle
BSA	Albumine de sérum du bovin
DEAE	Diéthylaminoéthyle
DMDO	Diméthyl-dioxirane
DMPDA	N,N-diméthyl-1,4-phénylènediamine
EDC	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
FCI	Foie du cochon d'Inde
Fmoc	9-Fluorenylméthoxycarbonyl
FXIIIa	Facteur de coagulation XIIIa
IR	Infrarouge
k_{cat}	Constante de vitesse catalytique d'une enzyme
K_{I}	Constante d'inhibition irréversible
k_{inact}	Constante de vitesse d'inactivation d'une enzyme
K_{M}	Constante de Michaelis-Menten
k_{obs}	Constante de vitesse de pseudo-premier ordre
m/v	Masse/Volume
m-CPBA	Acide méta-chloroperoxybenzoïque
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyle
pf	Point de fusion
Rdt	Rendement
RMN	Résonance magnétique nucléaire

SM	Spectre de masse
TA	Température ambiante
TGase	Transglutaminase
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	Ultraviolet
Z	Carbobenzyloxy
Z-L-Gln-Gly	Carbobenzyloxy-L-glutaminyglycine

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur J. W. Keillor pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet de recherche aussi multidisciplinaire. Il a été un directeur de recherche que j'ai apprécié pour son amabilité et sa disponibilité tout au long de ma maîtrise.

Ce travail de recherche a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec la compagnie Apotex Research. Je voudrais donc remercier la compagnie pour son support financier et j'exprime ma gratitude aux Drs. Tim Tam, Kashi Karimian et particulièrement Jolanta Wodszinska, pour leur conseils tout au long de notre association.

Je ne voudrais pas passer sous silence mes remerciements à Pierre de Macédo qui m'a aidé tout au long de mon parcours. Je tiens également à saluer mes vieux copains Paul et Stéphane. J'exprime ma reconnaissance à Marc pour son aide lors de mes cours gradués et à Roselyne pour le covoiturage de l'Université Concordia.

Je tiens également à remercier Cécile Amiel pour son aide précieuse dans le cadre du traitement informatique de ce mémoire.

Je ne saurais finir sans adresser toute ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont entouré tout au long de mon parcours: je pense à mes parents, à mon frère Roberto et à ma conjointe Sylvie.

“Avoir de l'or faux est un malheur supportable et facile à découvrir ; mais le faux ami, c'est ce qu'il y a de plus pénible à découvrir.” (Théognis)

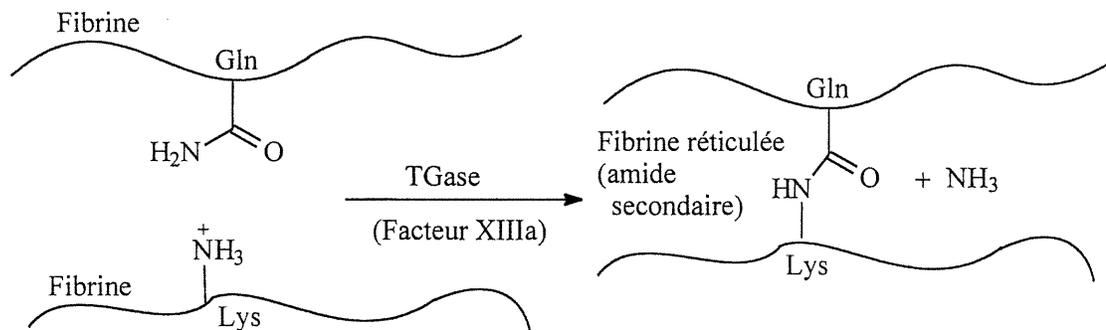
CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. Les transglutaminases (TGases)

Les transglutaminases (EC 2.3.2.13) constituent une famille d'enzymes qui catalysent les réactions entraînant le transfert d'un groupement acyle entre la fonction γ -carboxamide d'un résidu glutamine et le groupement ϵ -amino d'une lysine (cf. figure 1). Les TGases sont donc capables de catalyser la formation de liens ϵ -(γ -glutamyl)-lysine entre les protéines. Elles font partie de la classe d'enzymes des aminoacyltransférases et leur activités dépendent de la présence d'ions calcium Ca^{2+} .

Figure 1: Réaction catalysée par la TGase entre deux protéines



1.2. Les types de transglutaminases et leurs implications dans les processus biologiques

On retrouve les TGases chez les mammifères. L'enzyme peut provenir essentiellement de sept sources différentes dont le facteur de coagulation XIIIa, les

tissus, l'épiderme, les kératinocytes, la prostate, les érythrocytes membranaires et les hémocytes (1-11). Les TGases sont impliquées dans divers rôles biologiques importants tels l'endocytose (1,2), l'apoptose (3), la régulation de la croissance cellulaire (4) et la coagulation sanguine avec le facteur XIIIa qui stabilise les caillots de sang (5-7). Les TGases épidermales sont à l'origine de la formation d'une enveloppe cornale chez les kératinocytes épidermales (8-11).

Divers désordres physiologiques dont l'acné (12,13), la cataracte (14), les maladies des systèmes immunitaires (15), le psoriasis (16-18) et la maladie d'Alzheimer (19-25) sont imputés en partie à une activité excessive des TGases. Pour pallier à ces problèmes, les dernières décennies ont été effervescentes dans la recherche d'inhibiteurs potentiels des TGases (26-40). Toutefois, jusqu'à ce jour, les inhibiteurs de TGases ont eu des applications thérapeutiques limitées, en raison de leur manque d'efficacité ou de spécificité.

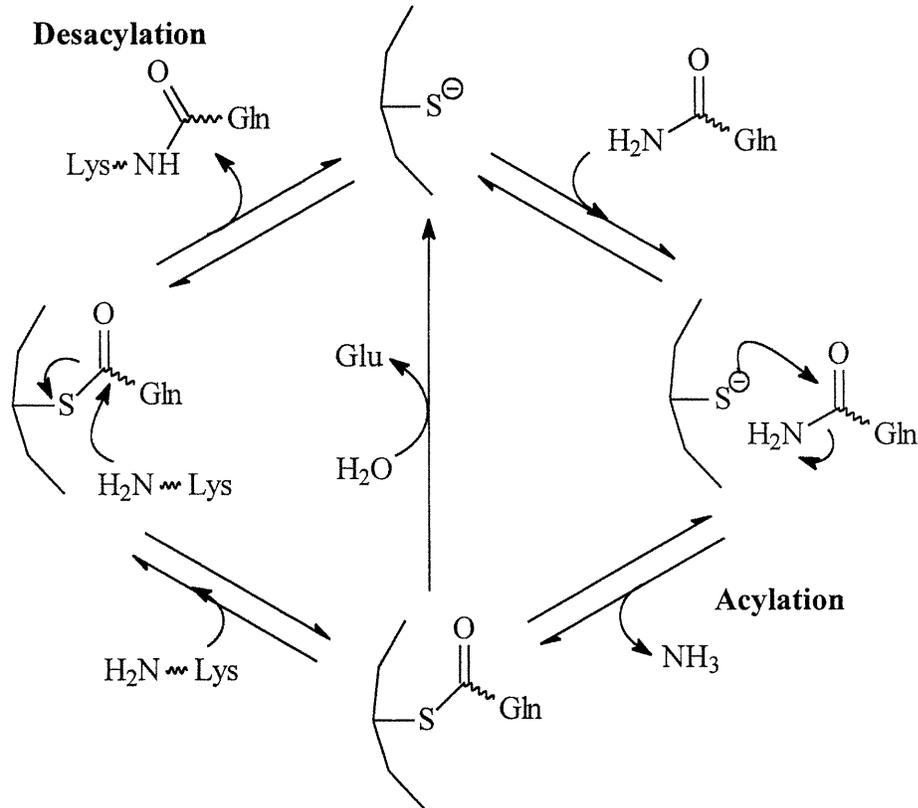
1.3. Les transglutaminases et leur mécanisme enzymatique

Les TGases sont des enzymes à cystéine. Le site actif de ce type d'enzyme est constitué d'un résidu thiolate d'une cystéine stabilisé par la formation d'une paire d'ions (thiolate-imidazolium) avec l'imidazole d'une histidine. La modélisation de la TGase du facteur XIIIa met en évidence trois acides aminés essentiels à la catalyse enzymatique soit la cystéine (C), l'histidine (H) et l'acide aspartique (D) (41).

La réaction catalysée par l'enzyme est un processus à deux étapes. La première étape consiste en une attaque nucléophile du thiolate de la cystéine sur une glutamine, pour former un intermédiaire thioester et libérer une molécule d'ammoniac dont l'un des protons provient de l'ion imidazolium d'une histidine. Il s'agit de l'étape d'acylation de l'enzyme par le substrat glutamine donneur d'acyle. La deuxième étape est initiée par l'attaque nucléophile d'une amine primaire telle la lysine, sur l'intermédiaire thioester régénérant ainsi le thiolate au site actif de l'enzyme et libérant une nouvelle protéine résultant du couplage de deux sous-

protéines liées par une fonction amide secondaire. Cette dernière étape est la désacylation de l'enzyme par le substrat amine primaire accepteur d'acyle. La figure 2 illustre le mécanisme enzymatique de la transglutaminase.

Figure 2: Mécanisme enzymatique de la transglutaminase



Il s'agit d'un mécanisme enzymatique de type «ping-pong» modifié (42) où la première étape est la formation d'un complexe entre l'enzyme et le premier substrat, communément appelé complexe de Michaelis-Menten. Après la libération d'un premier produit (l'ammoniac), un second substrat vient se lier au complexe enzyme-substrat pour former un complexe enzyme-produit. Finalement, le système enzymatique libère le produit final (amide secondaire) et le thiolate de la cystéine au site actif de l'enzyme est régénéré. Toutefois, une hydrolyse du complexe de

Michaelis-Menten peut régénérer directement le thiolate, d'où le terme «modifié» dans l'identification du mécanisme.

1.4. Les objectifs du projet

Une haute activité des TGases engendre des désordres physiologiques importants chez l'humain. En dépit des nombreux inhibiteurs de TGases étudiés jusqu'à ce jour, la plupart ne se sont pas avérés être spécifiques à l'enzyme ou suffisamment efficaces. Sur ces faits, nous avons décidé de développer des inhibiteurs de TGases.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord réalisé un travail de synthèse organique où l'on a mis à profit la présence d'une cystéine dans le site actif de l'enzyme, pour faire des inhibiteurs irréversibles de TGases. Ensuite, il fallait faire le choix de la source de TGase à utiliser, afin de pouvoir évaluer l'efficacité de nos inhibiteurs potentiels. Pour cela, l'enzyme provenant du foie du cochon d'Inde a été retenue, car les techniques de purification et de dosage d'activité et de concentration étaient maîtrisées par notre groupe de recherche. Une fois l'enzyme purifiée, il a fallu mettre au point une méthode spectrophotométrique continue du suivi de l'activité enzymatique, afin que l'on puisse faire les études d'inhibitions irréversibles de la TGase de manière appropriée. Finalement, une fois la méthode au point, les constantes cinétiques d'inhibition irréversible ont été déterminées, pour chacune de nos molécules montrant un effet significatif sur l'enzyme. Enfin, des conclusions et des perspectives pour l'avenir ont été dégagées des différents résultats.

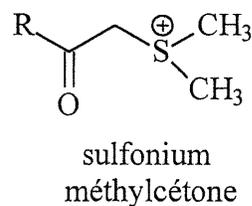
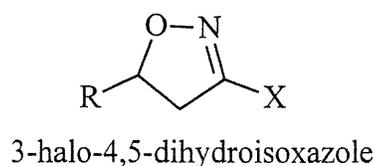
CHAPITRE 2

SYNTHÈSE D'INHIBITEURS IRRÉVERSIBLES POTENTIELS DES TRANSGLUTAMINASES

2.1. Stratégies développées pour la mise au point des inhibiteurs.

La réaction catalysée par la TGase est la formation de liens ϵ -(γ -glutamyl)-lysine entre l'amide d'un résidu glutamine et l'amine primaire d'un résidu lysine. Il s'agit d'une réaction de transfert d'un groupement acyle entre le substrat donneur (Gln) et le substrat accepteur (Lys). Ce processus enzymatique est catalysé par la formation d'un intermédiaire thioester entre le résidu cystéine présent au site actif de la TGase et le substrat donneur d'acyle. Or, étant donné qu'une activité excessive des TGases est à l'origine de divers désordres physiologiques chez l'humain, le contrôle de l'activité de ces enzymes a fait l'objet de plusieurs études dans différents groupes de recherche, dans le but de développer des inhibiteurs de TGase (26-40). Malgré l'intérêt porté à l'inhibition des TGases, il n'y a que très récemment que des composés intéressants ont été mis au point. C'est le cas par exemple des 3-halo-4,5-dihydroisoxazoles (cf. figure 3) qui se sont avérés être des inhibiteurs irréversibles de la TGase provenant du foie du cochon d'Inde (36, 39).

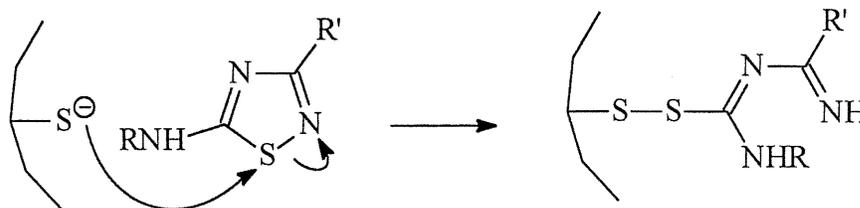
Figure 3: Structures d'inhibiteurs irréversibles connus de la TGase



Étant donné que l'inhibition irréversible est induite par une attaque nucléophile du résidu cystéine présent au site actif de la TGase sur l'inhibiteur isoxazole, il a été établi que le potentiel de ces inhibiteurs dépend de la nature du groupement partant à la position 3 du cycle isoxazole. D'autre part, l'inhibition irréversible des TGases par des dérivés sulfonium méthylcétones (cf. figure 3) a également été décrit dans la littérature (38). Ces composés ont été définis comme étant des inhibiteurs irréversibles spécifiques des TGases, en particulier celle provenant de l'épiderme du bovin. Le potentiel et la spécificité de ces inhibiteurs sont basés sur le fait qu'ils sont chimiquement inertes face au glutathion, un tripeptide de formule γ -glutamylcystéinylglycine.

Par ailleurs, la compagnie Apotex Research (Ontario, Canada) a fait un travail innovateur en démontrant que des dérivés de 1,2,4-thiadiazoles pouvaient inhiber des protéases à cystéine (43, 44), par la formation d'un lien covalent disulfure entre l'inhibiteur et l'enzyme résultant de l'ouverture du cycle thiadiazole (cf. figure 4).

Figure 4: Réaction entre le thiolate du résidu cystéine de la TGase et la fonction thiadiazole



D'autre part, comme beaucoup d'enzymes qui ont une cystéine dans leur site actif, les TGases peuvent être inhibées également par des amides α , β -insaturés (composés Michael) (cf. figure 5) et des dérivés époxydes (cf. figure 6) (45). Le mécanisme d'inhibition est basé sur une attaque nucléophile du thiolate de la cystéine sur la fonction inhibitrice, pour former un lien covalent entre l'enzyme et l'inhibiteur.

Figure 5: Réaction entre le thiolate du résidu cystéine de la TGase et la fonction amide α, β -insaturée (Michael)

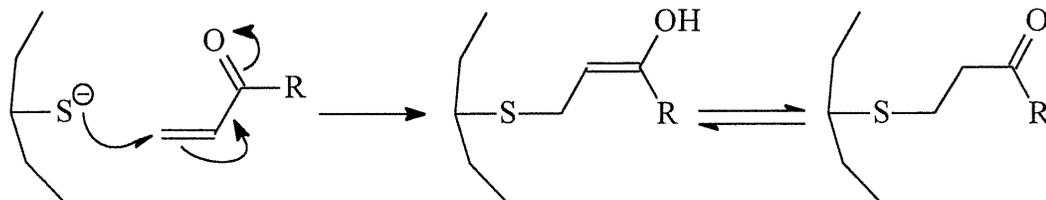
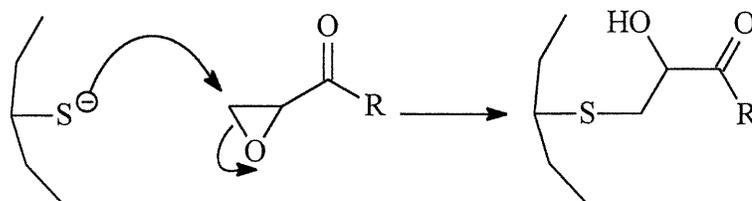
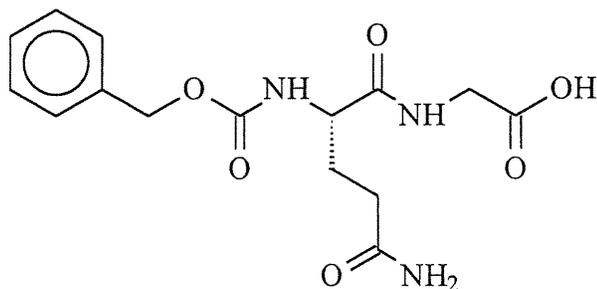


Figure 6: Réaction entre le thiolate du résidu cystéine de la TGase et la fonction époxyde

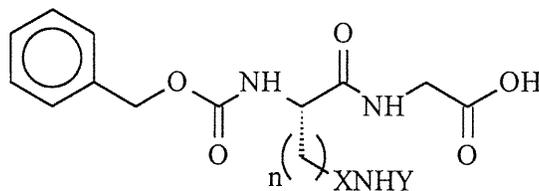


Nous avons donc pris avantage de tous ces faits précédents, pour effectuer la synthèse de nouveaux inhibiteurs irréversibles potentiels de TGase.

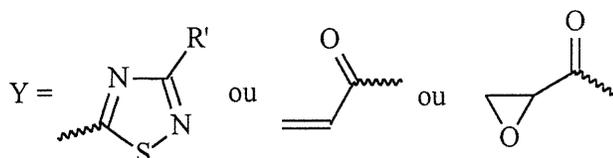
La conception des inhibiteurs potentiels des TGases doit se faire par l'élaboration de la structure du groupement R présenté dans les figures 4 à 6. Le substituant R représente la partie affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme. Par conséquent, nous avons choisi de synthétiser des analogues de la carbobenzyloxy-L-glutaminyglycine (Z-L-Gln-Gly) (cf. figure 7) qui est le substrat spécifique le plus couramment utilisé pour la TGase et le dipeptide possédant la meilleur affinité connue (32, 46-47).

Figure 7: Structure du dipeptide Z-L-Gln-Gly

Étant donné que l'étape d'acylation du mécanisme enzymatique consiste dans l'attaque nucléophile du thiolate de l'enzyme sur la fonction amide de la chaîne latérale de la glutamine, nous avons choisi d'introduire les fonctions inhibitrices au bout de la chaîne latérale des analogues de la Z-L-Gln-Gly reliées à celle-ci par une fonction amide ou amine (cf. figure 8). Également, nos parcours de synthèse ont été conçus de manière à faire varier la longueur de la chaîne latérale des inhibiteurs, afin de pouvoir étudier son effet dans le site actif de l'enzyme. Sur cette base, la confrontation de toutes les molécules résultantes nous permettra d'évaluer la meilleure combinaison entre chaque fonctionnalité, afin d'obtenir un meilleur compromis entre l'efficacité et la spécificité des inhibiteurs.

Figure 8: Structure de base des inhibiteurs

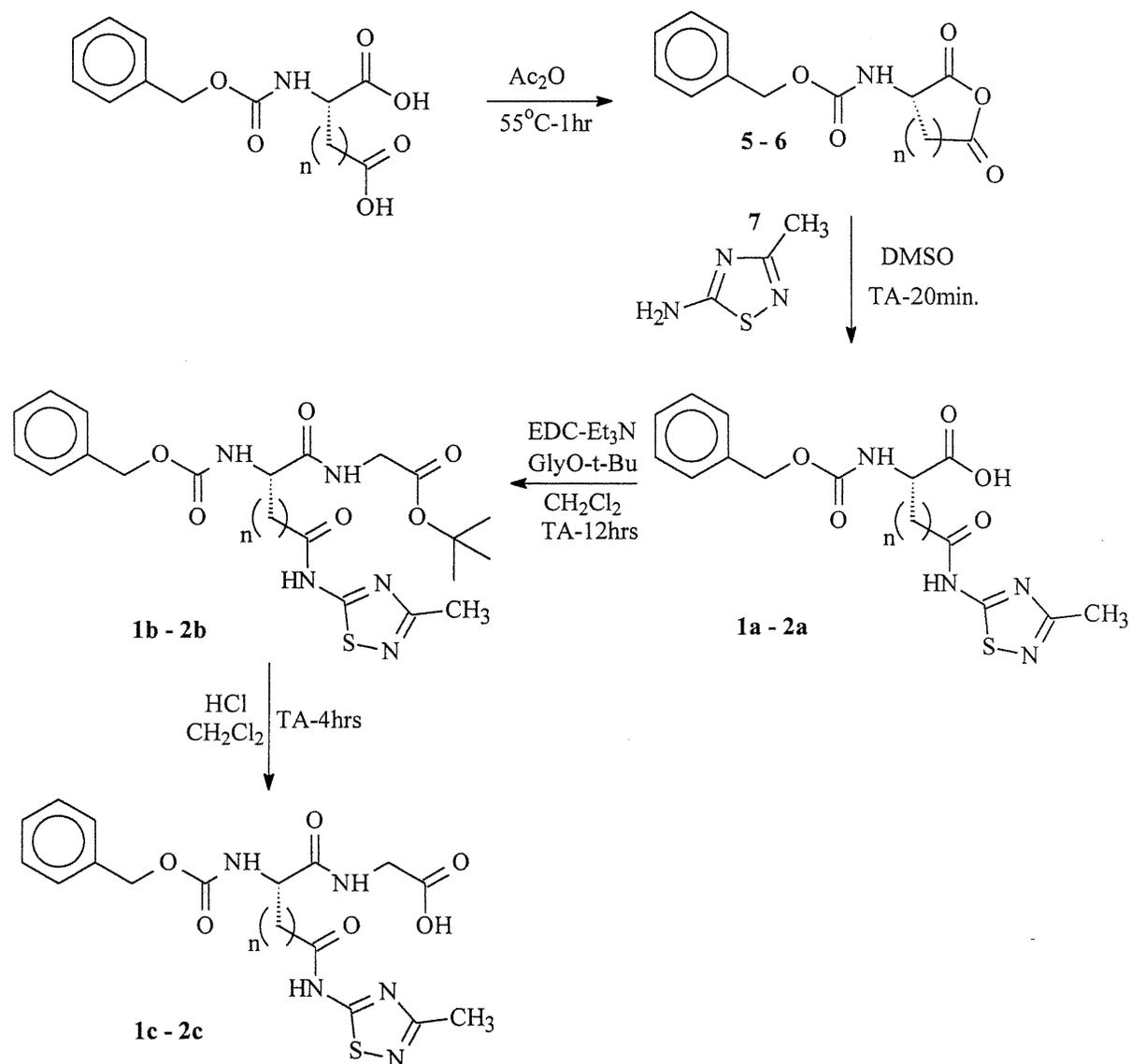
X = CH₂ ou C=O



2.2. Synthèse des inhibiteurs potentiels analogues du substrat

2.2.1 Synthèse des analogues amide thiadiazole

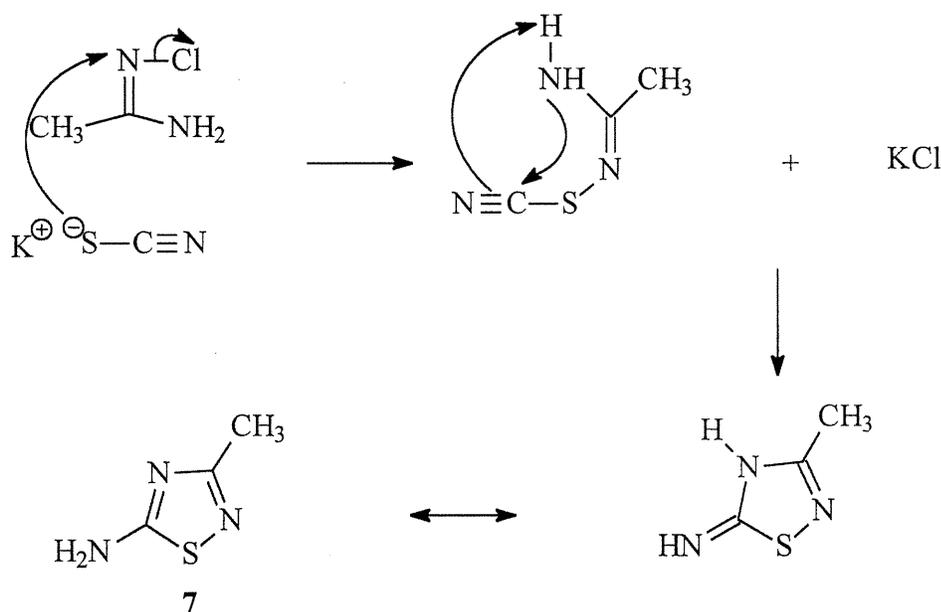
Figure 9: Parcours de synthèse des inhibiteurs potentiels amide thiadiazole



Tel que montré à la figure 9, le premier parcours de synthèse démarre avec les acides carbobenzyloxy-L-aspartique et carbobenzyloxy-L-glutamique correspondant

à des longueurs de chaîne latérale $n = 1$ et 2 respectivement. Ensuite, les anhydrides des dérivés diacides ont été faits par l'intermédiaire de l'anhydride acétique (Ac_2O) à $55\text{ }^\circ\text{C}$. Les composés **5** et **6** ont été ainsi obtenus avec des rendements de 90-92% (48-49). En parallèle, le 5-amino-1,2,4-thiadiazole **7** a été préparé à partir de l'acétamide et du thiocyanate de potassium dans le méthanol (50-52) (cf. figure 10). Le produit pur a été obtenu avec un excellent rendement de 98%.

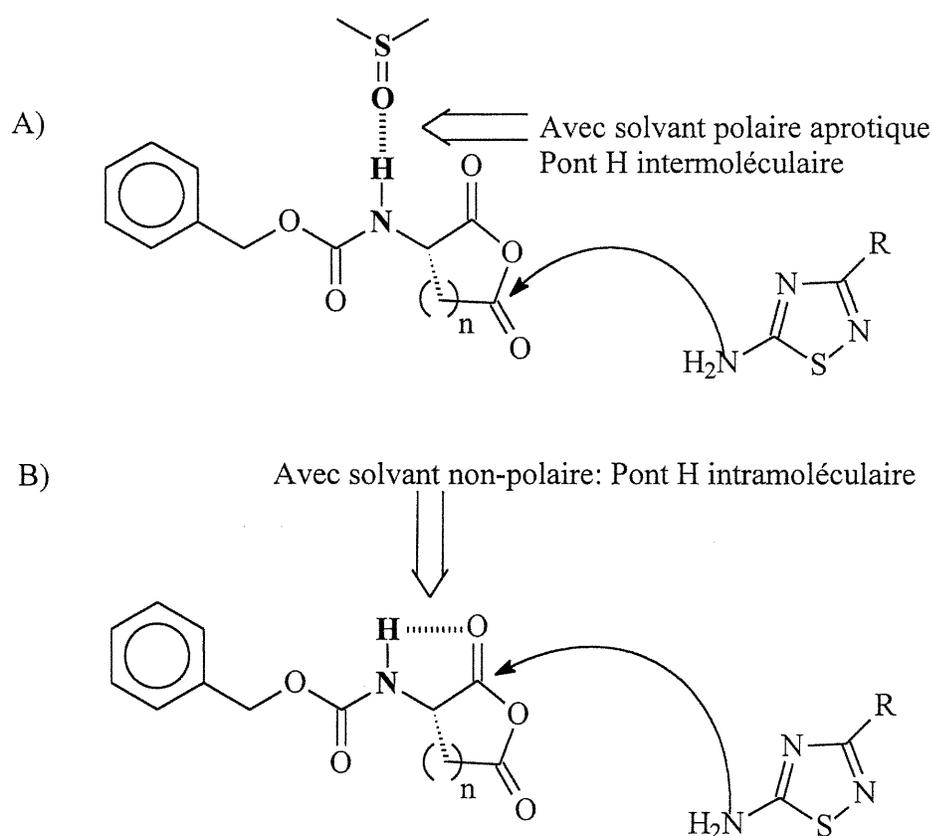
Figure 10: Mécanisme de synthèse du 5-amino-1,2,4-thiadiazole



Les composés **1a-2a** ont été formés par une attaque nucléophile régiosélective du 5-amino-1,2,4-thiadiazole sur les positions β et γ des anhydrides carbobenzyloxy-L-aspartique **5** et carbobenzyloxy-L-glutamique **6** respectivement. Dans des solvants polaires aprotiques, tel que le sulfoxyde de diméthyle, la régiosélectivité quantitative est attribuée à la formation d'un pont hydrogène intermoléculaire entre le proton de l'azote de la fonction carbamate et l'oxygène du sulfoxyde de diméthyle (49) (cf. figure 11A). Cette interaction favorise l'attaque de l'amine du thiadiazole sur le côté

le moins encombré, soit la position β/γ de l'anhydride correspondant. Toutefois, en présence de solvants non polaires, il y a formation d'un pont hydrogène intramoléculaire entre le proton de l'azote de la fonction carbamate et l'oxygène du carbonyle α de l'anhydride (cf. figure 11B). Dans ce cas, l'attaque nucléophile a lieu à la position α qui est activée par l'interaction hydrogène intramoléculaire. La synthèse des composés **1a-2a**, est donc basée sur le mécanisme présenté à la figure 11A. Les produits purs ont été obtenus avec un rendement d'environ 85%.

Figure 11: Régiosélectivité de l'attaque nucléophile donnant les composés **1a-2a**

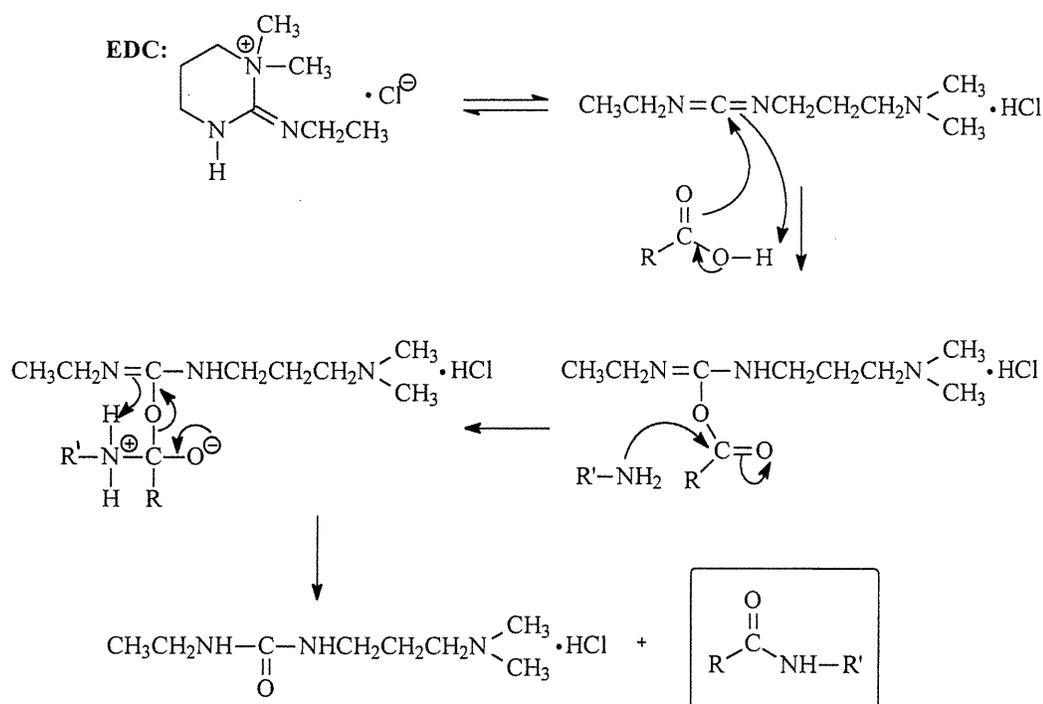


L'étape suivante consiste à greffer la partie glycine sur notre inhibiteur analogue en activant les molécules **1a-2a** avec de l'hydrochlorure de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC), pour faire ensuite réagir avec l'ester *tert*-butylé de la glycine (GlyO-*t*-Bu), en présence de triéthylamine dans le

dichlorométhane (cf. figure 12). Les composés **1b-2b** ont été obtenus avec des rendements entre 94 et 95%. Finalement les composés **1c-2c** sont synthétisés avec un rendement de 100%, à partir de la déprotection de la fonction ester *tert*-butylée en présence d'acide chlorhydrique.

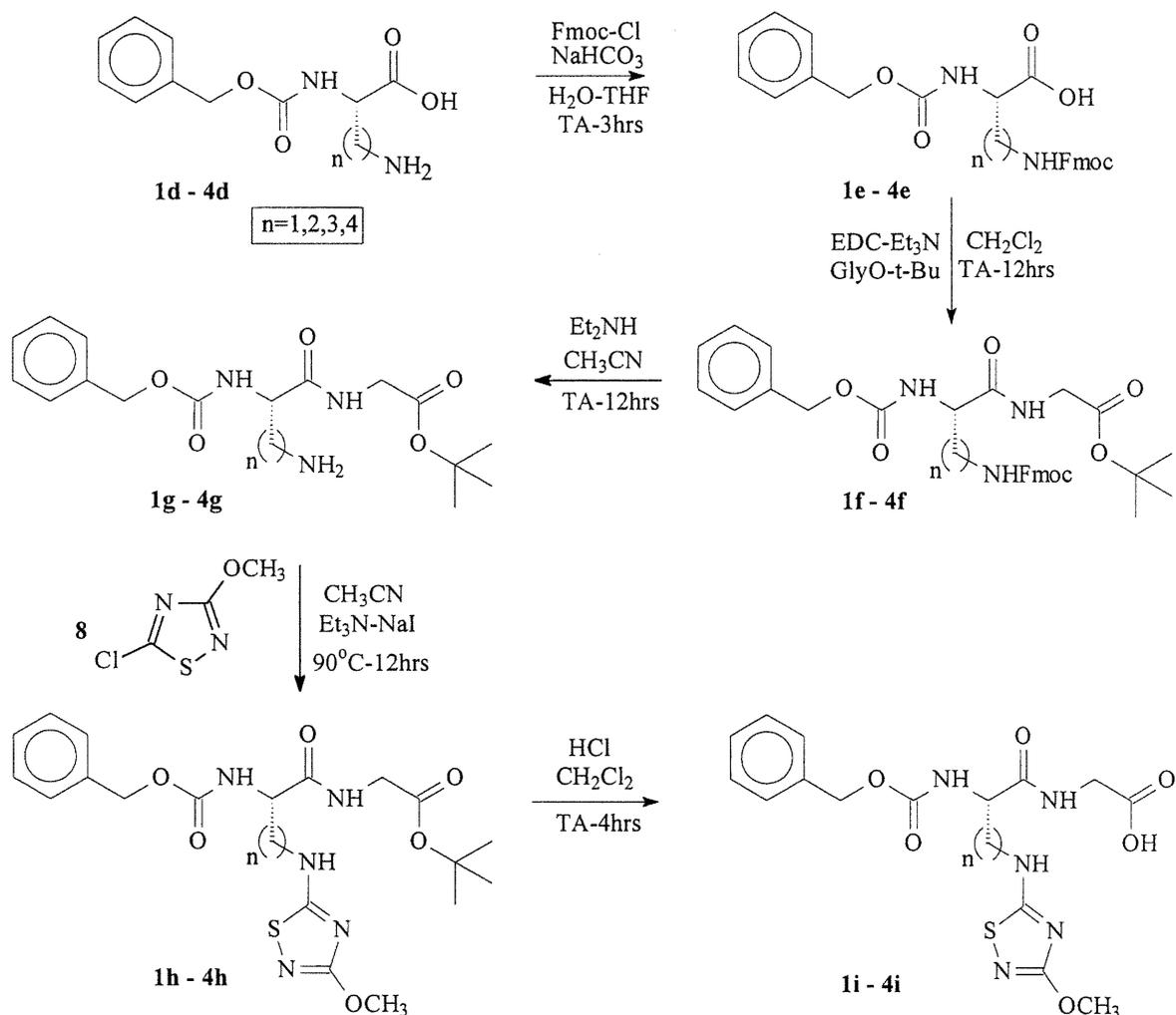
Donc, ce premier parcours de synthèse offre l'avantage de générer 6 molécules (pour $n = 1, 2$) portant la fonction thiadiazole. Par conséquent, ces composés s'avèrent tous intéressants à être étudiés comme des inhibiteurs potentiels de la transglutaminase.

Figure 12: Mécanisme type de la réaction de couplage peptidique



2.2.2 Synthèse des analogues amine thiadiazole

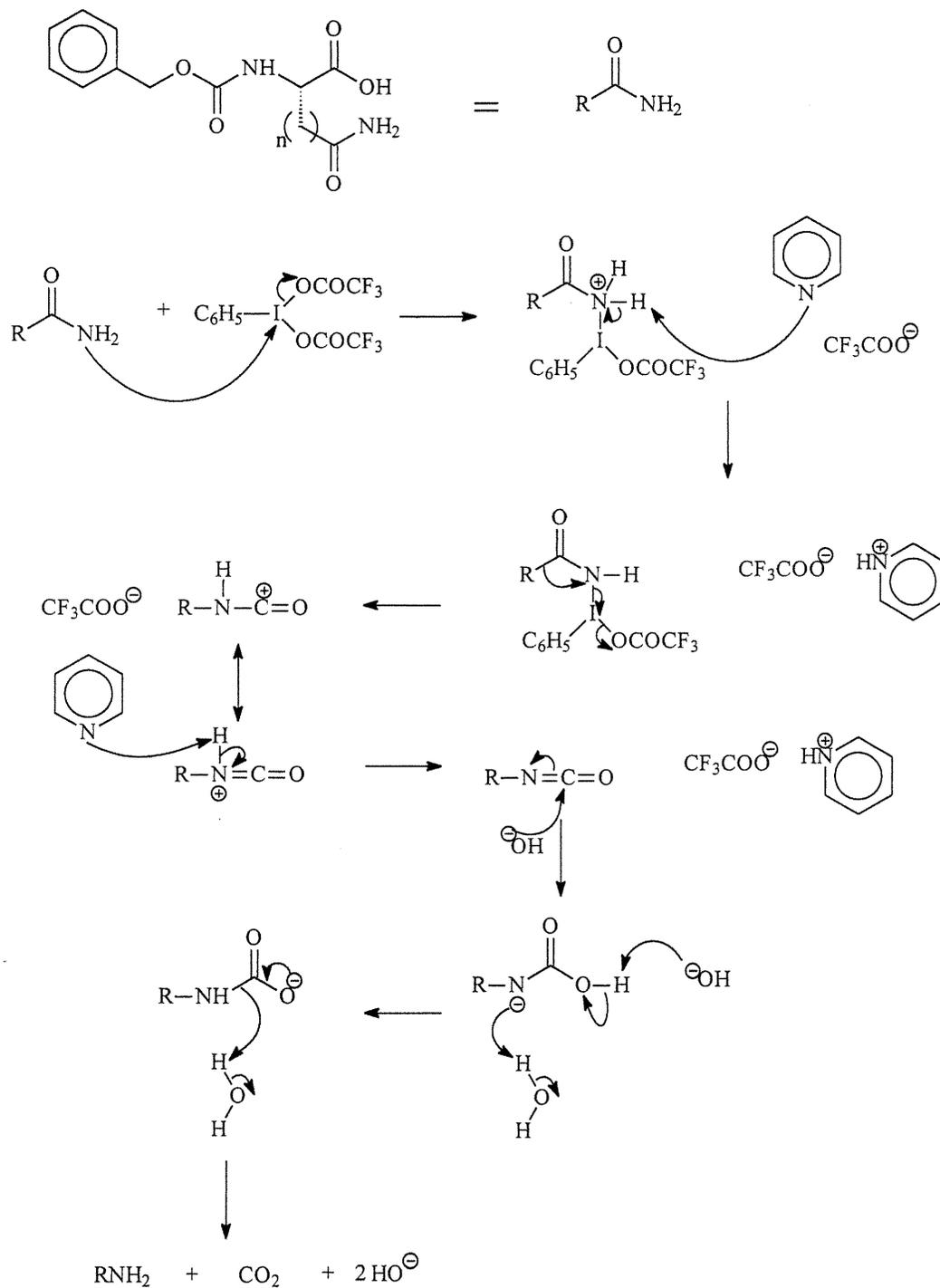
Figure 13: Parcours de synthèse des inhibiteurs potentiels amine thiadiazole



Le deuxième parcours de synthèse (cf. figure 13) démarre avec les dérivés aminés **1d-4d** ayant des chaînes latérales $n = 1$ à 4. Les composés **3d-4d** correspondant à la N_α -Z-L-ornithine et N_α -Z-L-lysine respectivement ont été obtenus commercialement. Toutefois, les dérivés aminés **1d-2d** correspondant respectivement aux acides N_α -Z-L-2,3-diaminopropionique et N_α -Z-L-2,4-diaminobutyrique sont dispendieux. Par conséquent, la synthèse de ces amines a été effectuée à partir des

amides correspondants, soit la Z-L-asparagine et la Z-L-glutamine (53) (cf. figure 14).

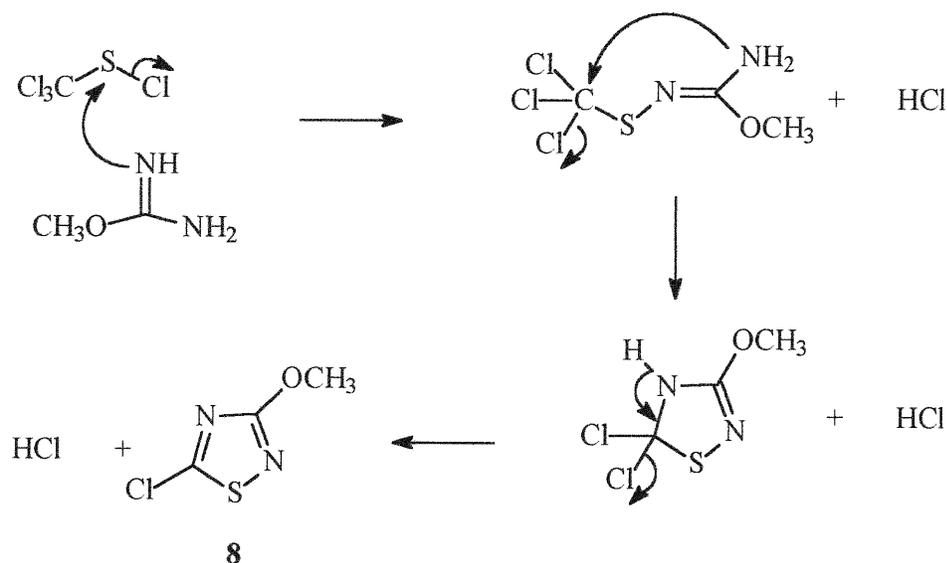
Figure 14: Mécanisme de formation des acides N_{α} -Z-L-2,3-diaminopropionique et N_{α} -Z-L-2,4-diaminobutyrique



Cette réaction consiste dans la transformation d'un amide en isocyanure suivi d'une hydrolyse en amine, en présence de l'iodure de bis(trifluoroacétoxy)phényle et de la pyridine dans un mélange diméthylformamide / eau (1:1). Cette réaction s'est faite avec un rendement d'environ 80%. Ensuite, pour effectuer le couplage avec l'ester *tert*-butylé de la glycine, il a fallu préalablement protéger la fonction amine primaire des composés **1d-4d** en faisant réagir avec le 9-fluorenylméthoxycarbonyl chloroformate (Fmoc-Cl). Les composés **1e-4e** ont été obtenus avec des rendements autour de 95%.

L'étape suivante a consisté en l'activation des produits **1e-4e** par de l'EDC pour faire ensuite réagir avec l'ester *tert*-butylé de la glycine en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane. Cette étape permet d'obtenir les composés **1f-4f** avec des rendements entre 95 et 97%. La déprotection de la fonction amine primaire de la chaîne latérale des composés **1f-4f** a été effectuée en présence d'un large excès de diéthylamine dans l'acétonitrile. Ce système de déprotection a permis de générer les produits **1g-4g** avec des rendements de 92-93%. Les amines ainsi déprotégées ont attaqué de façon nucléophile le 5-chloro-3-méthoxy-1,2,4-thiadiazole **8**, qui a été initialement synthétisé à partir de méthylisourée hydrogénosulfate et de perchlorométhylmercaptan (**54**) (cf. figure 15).

Figure 15: Mécanisme de formation du 5-chloro-3-méthoxy-1,2,4-thiadiazole

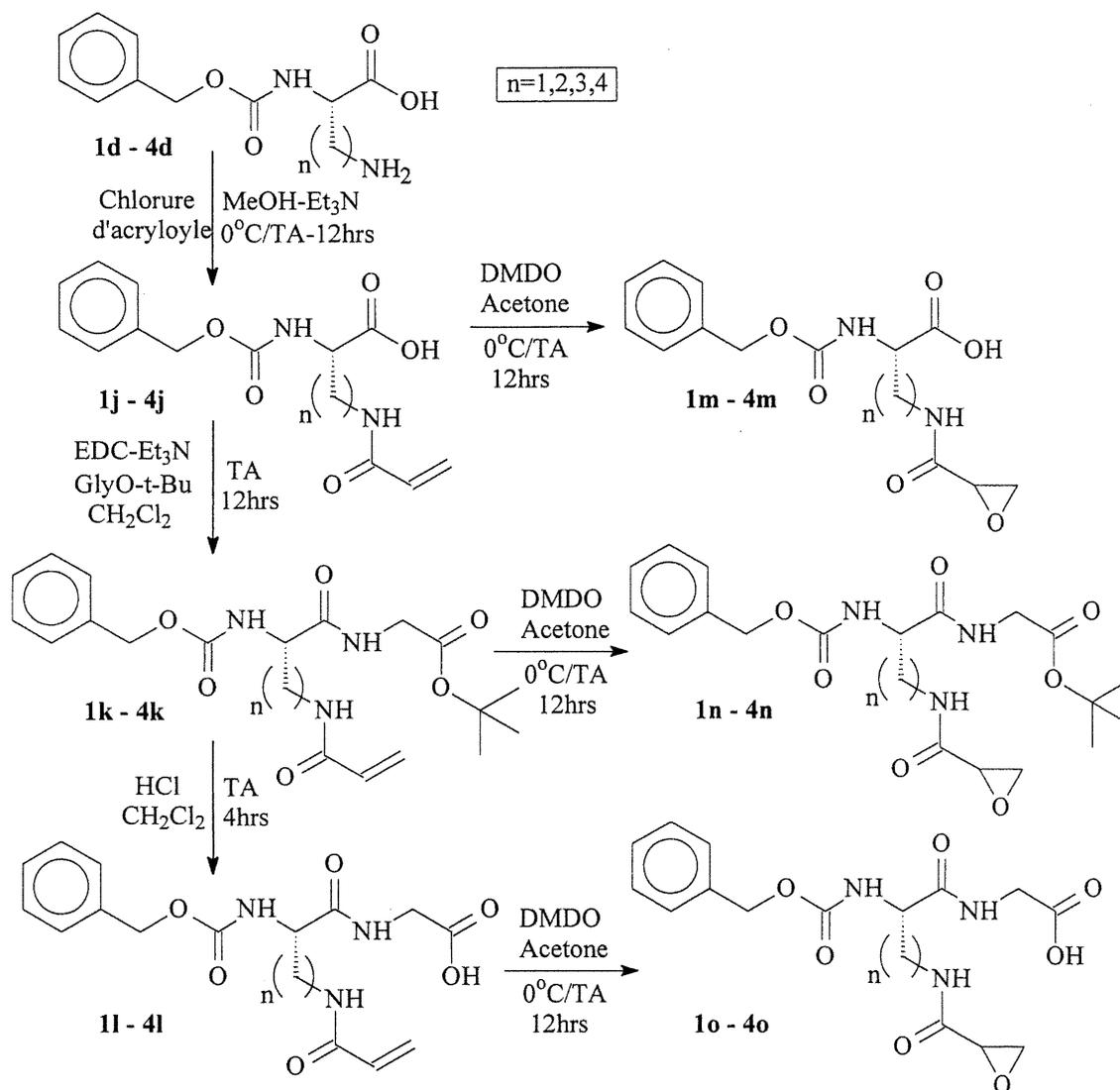


Cette étape de couplage avec le composé thiadiazole permet d'obtenir les molécules **1h-4h** avec de faibles rendements. Cette étape problématique de synthèse a été optimisée à des rendements entre 19 et 26% par l'addition d'iodure de sodium, afin d'activer le groupe partant chlore sur le composé **8**. En absence d'iodure de sodium, aucune réaction n'a été observée. De ce fait, il a été conclu que la présence du chlore comme groupe partant n'était pas suffisante pour activer la réaction. Cette impasse a été résolue en utilisant l'iodure de sodium. La présence de l'iode comme groupe partant a permis de catalyser la réaction. De plus, l'utilisation d'un solvant polaire aprotique, tel l'acétonitrile, et d'une aide thermodynamique, tel le reflux de l'acétonitrile, ont permis d'activer la réaction de substitution nucléophile. Toutefois, les faibles rendements démontrent que nous avons rencontré pour ce couplage de nombreuses difficultés qui trouvent leur explication dans le fait que le 5-chloro-3-méthoxy-1,2,4-thiadiazole **8** semble être un produit instable. Par contre, les composés **1h-4h** qui portent cette fonction thiadiazole sont stables. D'autre part, il est intéressant de souligner que contrairement au 5-chloro-3-méthoxy-1,2,4-thiadiazole **8**, le 5-amino-3-méthyl-1,2,4-thiadiazole **7** est un composé stable. Ceci permet d'expliquer que la synthèse des composés **1a-2a** s'est faite avec de meilleurs rendements. Finalement, la dernière étape de ce parcours de synthèse consiste en la déprotection de l'ester *tert*-butylé du résidu glycine par bullage d'acide chlorhydrique dans le dichlorométhane. Les produits finaux **1i-4i** ont été obtenus avec des rendements de 100% après déprotection du résidu glycine.

Pour des chaînes latérales variant de $n = 1$ à 4, ce deuxième parcours de synthèse présente 8 molécules ayant un intérêt pour les études d'inhibition des transglutaminases. En effet, les composés **1h-4h** et **1i-4i** portent la fonction thiadiazole susceptible d'inhiber ces enzymes à cystéine.

2.2.3 Synthèse des analogues de type Michael et époxyde

Figure 16: Parcours de synthèse des analogues de type Michael et époxyde



Tel que montré à la figure 16, ce troisième parcours de synthèse démarre avec les mêmes dérivés aminés **1d-4d** que le parcours précédent soit avec les analogues amine thiadiazole. La première étape consiste à introduire la fonction amide α , β -insaturée (fonction Michael) en faisant réagir les composés **1d-4d** avec le chlorure d'acryloyle en présence de triéthylamine dans le méthanol. Cette réaction permet d'obtenir les composés **1j-4j** avec des rendements variant entre 73 et 90% selon la

longueur de la chaîne latérale, soit pour $n = 1$ à 4 respectivement. Cette variation de rendement trouve son explication dans la polarité de chaque produit induite par la longueur de la chaîne latérale. En effet, une fois la réaction terminée et que le méthanol ait été évaporé, le résidu de la réaction est repris dans l'eau et acidifié à pH 1,5. Ensuite, le produit est extrait de la phase aqueuse avec de l'acétate d'éthyle. C'est à ce stade que la polarité du produit joue un rôle sur le rendement de la réaction, car plus le produit est polaire (inversement proportionnel au nombre d'unités méthylène de la chaîne latérale), plus il est difficile de l'isoler complètement de la phase aqueuse. Ainsi, d'un point de vue pratique, soit en trois extractions, il est plus difficile d'extraire de l'eau les composés polaires. Cependant, un nombre plus élevé d'extractions pourrait améliorer le rendement de la réaction pour les composés polaires. Ensuite, l'ester *tert*-butylé de la glycine est ajouté sur les composés **1j-4j**, initialement activés par l'EDC dans la triéthylamine en présence de dichlorométhane. Les produits **1k-4k** sont ainsi obtenus avec des rendements variant entre 70 et 93%. Tel que décrit pour les composés **1j-4j**, cette variation de rendement est reliée à la longueur de la chaîne latérale des produits. La fonction ester *tert*-butylée des composés **1k-4k** est retirée en faisant buller de l'acide chlorhydrique dans le dichlorométhane. Cette réaction de déprotection permet de préparer les produits **1l-4l** avec un rendement de 100%.

Finalement, la synthèse des époxydes **1m-4m**, **1n-4n** et **1o-4o** consiste à agiter les composés Michael correspondant avec le diméthylidioxirane (DMDO). Le DMDO a été décrit la première fois par Adam *et al.* (55-56), comme étant un réactif particulièrement efficace pour l'époxydation de doubles liaisons conjuguées. Ainsi, dans le cadre de liaisons π conjuguées, cette méthode d'époxydation s'est avérée une excellente alternative aux méthodes d'époxydation couramment utilisées, telles que la *m*-CPBA, le peroxyphthalate de magnésium, le peroxyde d'hydrogène dans des conditions basiques et le peroxyde d'hydrogène en présence de tétraoxyde de tungstène (57).

Le DMDO est obtenu par oxydation de l'acétone en présence de persulfate de potassium (oxone). En effet, le DMDO est préparé à partir d'oxone en milieu basique

et obtenu en solution dans l'acétone par distillation sous vide au fur et à mesure de sa formation (cf. figure 17). Tel que montré à la figure 18, on fait tomber le distillat directement sur le composé éthylénique. Étant donné la volatilité importante du DMDO, le montage de la distillation doit être piégé avec de la glace sèche. Cette méthode d'oxydation de composés éthyléniques (cf. figure 19) permet d'obtenir quantitativement les époxydes correspondants après évaporation de l'excès de DMDO et du solvant, sans purification, avec un rendement de 100%.

Figure 17: Mécanisme de préparation du DMDO

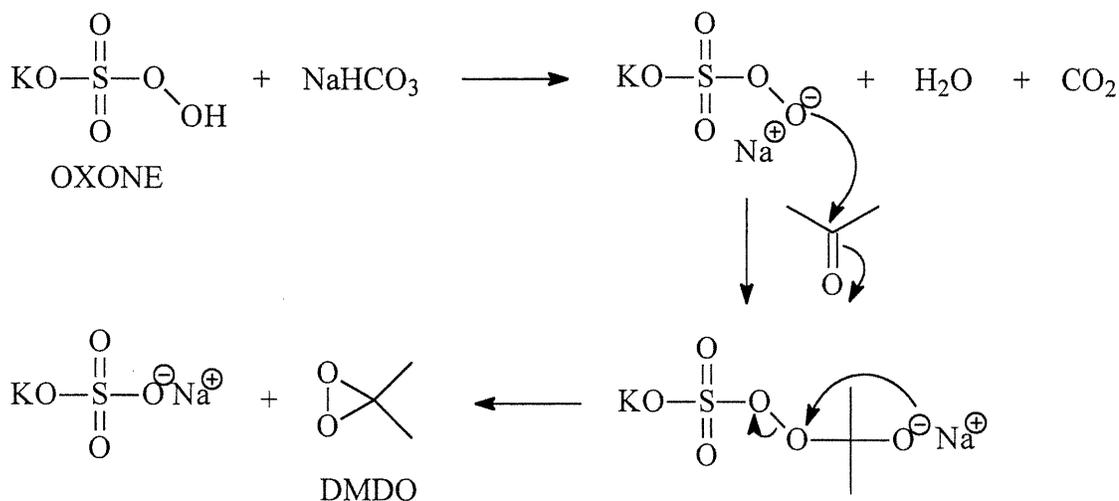


Figure 18: Schéma de montage pour la préparation du DMDO

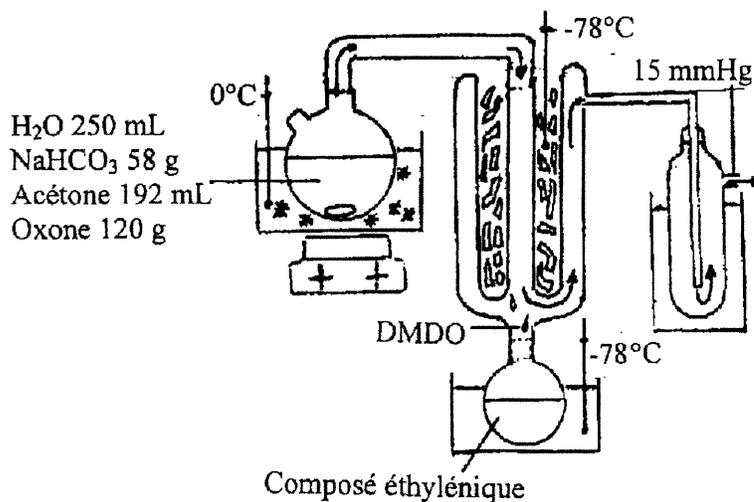
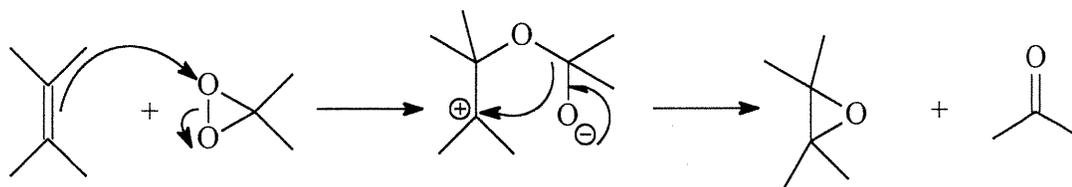


Figure 19: Mécanisme d'époxydation en présence de DMDO

Finalemment, tel que les méthodes classiques d'époxydation, la méthode avec le DMDO génère des composés époxydes sans de stéréosélectivité (époxydes diastéréomériques). Ainsi, étant donné la présence d'un stéréocentre sur le squelette dipeptique de la Z-L-Gln-Gly, nous avons obtenu deux diastéréoisomères pour chaque analogues époxyde synthétisés.

Donc, ce troisième parcours de synthèse permet de générer 12 molécules avec la fonction amide α , β -insaturée (Michael) et 12 avec la fonction époxyde. Il s'agit donc de 24 molécules présentant un intérêt pour les études d'inhibition de la transglutaminase.

2.3. Conclusion

Les trois parcours de synthèse ont été conçus de façon à obtenir le maximum de produits ayant une fonction inhibitrice d'enzyme à cystéine. Ainsi, l'ensemble de nos synthèses ont permis de générer 38 molécules ayant les fonctions thiadiazole, amide α , β -insaturée (Michael) et époxyde et avec des longueurs de chaîne latérale différentes, permettant ainsi d'étudier leur effet dans le site actif de l'enzyme. Tous les composés synthétisés sont des analogues de la Z-L-Gln-Gly, soit le substrat le plus couramment utilisé pour les TGases. Ainsi, sur la base de cette analogie et de par la réactivité connue des fonctions inhibitrices utilisées en présence d'un thiolate, des résultats d'inhibition prometteurs étaient attendus, à l'aube des tests enzymologiques.

CHAPITRE 3

PURIFICATION DE LA TRANSGLUTAMINASE PROVENANT DU FOIE DU COCHON D'INDE

3.1. Introduction

Pour effectuer les études d'inhibition décrites précédemment, sur l'activité enzymatique des TGases, il nous a fallu choisir une source appropriée. De plus, nous nous devons d'isoler la TGase, afin de posséder celle-ci avec un maximum de pureté, en quantité et avec une activité suffisante, pour pouvoir suivre les cinétiques enzymatiques. Nous avons donc choisi de travailler avec la TGase provenant du foie du cochon d'Inde et ceci pour plusieurs raisons. La première est que cette TGase est la plus couramment utilisée en recherche et que les techniques de purification de celle-ci sont maîtrisées dans nos laboratoires (58). De plus, la TGase est particulièrement abondante dans le foie du cochon d'Inde comparée à celle des autres mammifères physiquement exploitables en laboratoire, comme le lapin ou le rat (59). Finalement, l'avantage le plus convaincant d'utiliser cette source de TGase, c'est qu'il existe 80% d'homologie entre la séquence d'acides aminés de la TGase du foie du cochon d'Inde et celle provenant des tissus humains (60). Au site actif, il y a donc une conservation de la triade catalytique et une forte homologie des résidus l'entourant (cf. figure 20). De ce fait, pour les études d'inhibition, l'utilisation de la TGase provenant du foie du cochon d'Inde nous permettra de faire une translation directe sur l'effet possible de nos composés chez l'humain, en vue de remédier aux problèmes physiologiques entraînés par une trop forte activité des TGases.

La procédure d'isolation et de purification de la TGase est basée sur la méthode publiée par Folk et Chung (47). Toutefois, les récentes modifications

apportées dans nos laboratoires (58) ont contribué à augmenter l'activité spécifique de l'enzyme, tout en améliorant son rendement global de purification.

Figure 20: Séquences comparatives des acides aminés proche du site actif de la TGase provenant du facteur XIIIa humain et celle du foie du cochon d'Inde (FCI)

(La triade catalytique nécessaire au mécanisme enzymatique a été mise en évidence en rouge)

FCI YGQ**C**WVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTNFNSAHDQNSNLLIEYFR
FXIII YGQ**C**WVFAGVFNTFLRCLGIPARIVTNNYFSAHDNDANLQNDIFL
FCI NESGEIEGNK-EMIWN**F**H**S**LLGGVVDDQAGPGAWVRGVQAL**D**P
FXIII EDGNVNSKLTKDSVWNY**H**CWNEAWMTRPDL**P**VGF-GGWQAV**D**S

3.2. Protocole général de purification de l'enzyme

Toutes les étapes sont effectuées à 4 °C ou sur de la glace. Le détail technique de chaque manipulation est décrit au chapitre 7, section 7.2.

3.2.1 Homogénéisation des foies

Pour minimiser les pertes d'activité de la TGase, les foies de cochon d'Inde sont homogénéisés et centrifugés dès leur réception. Après la centrifugation, l'enzyme se retrouve dans le surnageant. Une fois filtré, ce dernier peut-être congelé et entreposé à -20 °C sans perte importante d'activité, pendant plusieurs mois. Toutefois, il est fortement suggéré d'entreprendre les étapes suivantes de purification immédiatement après l'homogénéisation et la centrifugation des foies, car c'est à ce stade que l'enzyme est la plus active.

3.2.2 Chromatographie échangeuse d'ions

Des fractions de 50 mL de surnageant, représentant environ 35 g de foie, sont déposées l'une après l'autre sur une colonne échangeuse d'ions contenant du gel Macro-Prep DEAE en présence de deux tampons soit Tris-Cl et Tris-Cl/NaCl à pH = 7,5 comme éluants. L'élution se fait en mode gradient avec une étape d'équilibrage du système, suivi de l'injection et l'élution de l'échantillon et le processus se termine par le lavage et la régénération de la colonne. Cette dernière étape permet de déposer une nouvelle fraction sur la même colonne. Cependant, après plusieurs essais, il est apparu évident que la colonne régénérée n'était pas aussi efficace pour faire la séparation des diverses protéines présentes dans le surnageant. Donc, pour améliorer le rendement de cette étape de purification, il a fallu utiliser une nouvelle colonne pour chaque fraction de 50 mL de surnageant.

3.2.3 Précipitation et extraction de la TGase

Une fois la chromatographie échangeuse d'ions terminée, il faut combiner les fractions ayant des activités spécifiques égales ou supérieures à 1,8 U/mg. Le criblage des meilleures fractions se fait par des dosages d'activité et de concentration de la TGase tel que décrit dans la partie expérimentale.

La TGase est précipitée avec l'ajout goutte à goutte d'une solution de sulfate de protamine 1% (m/v), en vue de séparer l'enzyme de certaines protéines ne précipitant pas dans ces conditions. Afin d'avoir une précipitation maximale, il a été déterminé que le volume de sulfate de protamine à ajouter est de 12 à 15% du volume total de la solution d'enzyme. L'étape de précipitation est suivie d'une centrifugation, après laquelle la TGase se retrouve dans le culot. L'enzyme est récupérée du culot par l'intermédiaire de 3 extractions (triturations du solide) avec une solution de sulfate d'ammonium 0,05 M. Ainsi, l'enzyme resolubilisée est séparée des autres protéines ne se solubilisant pas dans ces conditions. Il est à noter qu'un lavage initial (avant

extraction) du culot avec du tampon Tris-acétate 0,2 M (pH = 6,0) améliore le rendement des extractions.

3.2.4 Concentration de l'enzyme

Par filtration (sous centrifugation), cette étape consiste à ramener les surnageants combinés des extractions à un volume total d'environ 3 mL. La filtration consiste en un filtre ayant une membrane imperméable à l'enzyme, mais perméable à l'eau et les sels en solution. Ainsi, le dépôt sur la colonne d'exclusion de taille se fait avec un échantillon concentré en enzyme.

3.2.5 Chromatographie d'exclusion de taille

La solution d'enzyme concentrée est déposée sur une colonne à exclusion de taille ayant un support de type Bio-Gel A-0,5m à mèche fine. L'élution se fait en mode isocratique avec du tampon Tris-acétate à pH = 6,0. Le chromatogramme de cette colonne est relié à un spectrophotomètre UV à 280 nm, nous permettant ainsi de déterminer où se trouvent les plus fortes concentration en protéines.

3.2.6 Tests finaux, lyophilisation et entreposage

D'après le chromatogramme de la colonne d'exclusion de taille, les fractions ayant le plus de TGase (basé sur l'absorbance) sont dosées en concentration et en activité. Les fractions possédant une haute activité spécifique sont combinées pour donner une solution finale qui est ensuite divisée en aliquots de 1 mL dans des tubes Eppendorf. À ce stade, le protocole de Leblanc *et al* (58) propose que l'enzyme soit entreposée sous forme solide, afin qu'elle puisse demeurer stable dans le temps. Donc, les aliquots de 1 mL étaient congelés sur de la glace sèche et mis dans une centrifugeuse sous vide. Toutefois, cette étape posait problème, car la centrifugeuse réchauffait les échantillons par sa rotation, causant des pertes d'activité spécifique de

l'enzyme. Nous avons donc réglé ce problème, en utilisant un lyophilisateur qui maintient les aliquots congelés sous vide à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tableau 1: Résumé des résultats obtenus lors de la purification de la TGase provenant du foie de cochon d'Inde

(Note: L'erreur expérimentale est estimée à 10%. Les chiffres qui figurent dans ce tableau sont une moyenne établie sur six purifications).

Étape	Quantité de protéine (mg)	Activité (U)	Activité Spécifique (U/mg)	Rendement (%)
Homogén.	22 000	1410	0,06	100
Échange d'ions	7 010	1330	0,19	94
Extraction	320	1050	3,3	74
Exclusion de Taille	62	490	7,9	35
Lyophilisation	22	425	19,3	30

CHAPITRE 4

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE CONTINUE DE SUIVI CINÉTIQUE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE UV-VISIBLE

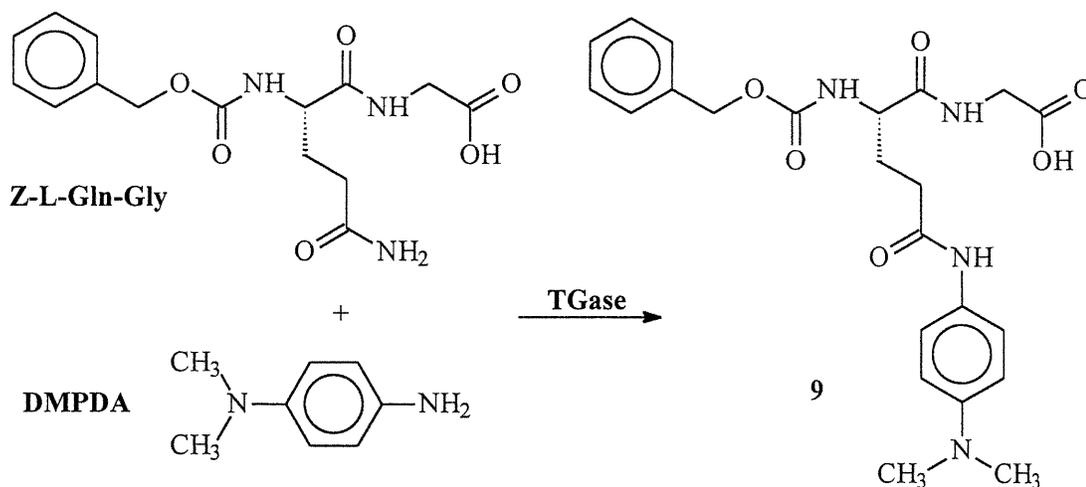
4.1. Introduction

Malgré la connaissance des TGases depuis longtemps, tous les protocoles utilisés jusqu'à ce jour ne permettaient que de faire un suivi discontinu de l'activité enzymatique. Ces différents systèmes impliquent des manipulations longues et lourdes à mettre en oeuvre (61-62). Pour faire des études d'inhibition irréversible de la TGase, une méthode cinétique continue présentait donc plusieurs avantages tel que la possibilité de suivre directement la progression de la réaction enzymatique. Récemment, une méthode continue a été développée dans notre laboratoire (63). Celle-ci permettait de faire des études cinétiques de base de la TGase, mais elle ne s'avère pas appropriée pour les études d'inhibition irréversible. En effet, il s'agit d'une méthode indirecte, car elle fait intervenir une enzyme auxiliaire soit la glutamate déshydrogénase (GDH). De ce fait, l'utilisation de composés secondaires, comme les inhibiteurs, pourraient altérer son activité, compliquant ainsi nos études cinétiques. Nous avons donc cherché à concevoir un système continu direct permettant de suivre l'activité de la TGase. Ce chapitre présente le développement de cette méthode directe de suivi cinétique et ce en utilisant la spectrophotométrie UV-visible. Le détail de chaque expérience est présenté au chapitre 7, section 7.3.

4.2. Stratégie de développement de la méthode

Lors de la mise au point de la méthode spectrophotométrique, nous avons décidé de conserver la Z-L-Gln-Gly comme substrat donneur γ -glutamyle et d'introduire un chromophore au niveau du substrat accepteur γ -glutamyle. Le défi était donc de trouver une amine ayant un chromophore et pouvant être reconnu par l'enzyme. Après avoir testé une série d'amines, seule la N,N-diméthyl-1,4-phénylènediamine (DMPDA) s'est avérée spécifique à l'enzyme (cf. figures 21-22). La méthode consiste à suivre la formation de l'anilide **9** correspondant qui absorbe la lumière à 278 nm. Ainsi, la transamidation par la TGase peut-être déterminée avec une haute sensibilité et de façon continue en suivant l'augmentation de l'absorbance à 278 nm en fonction du temps.

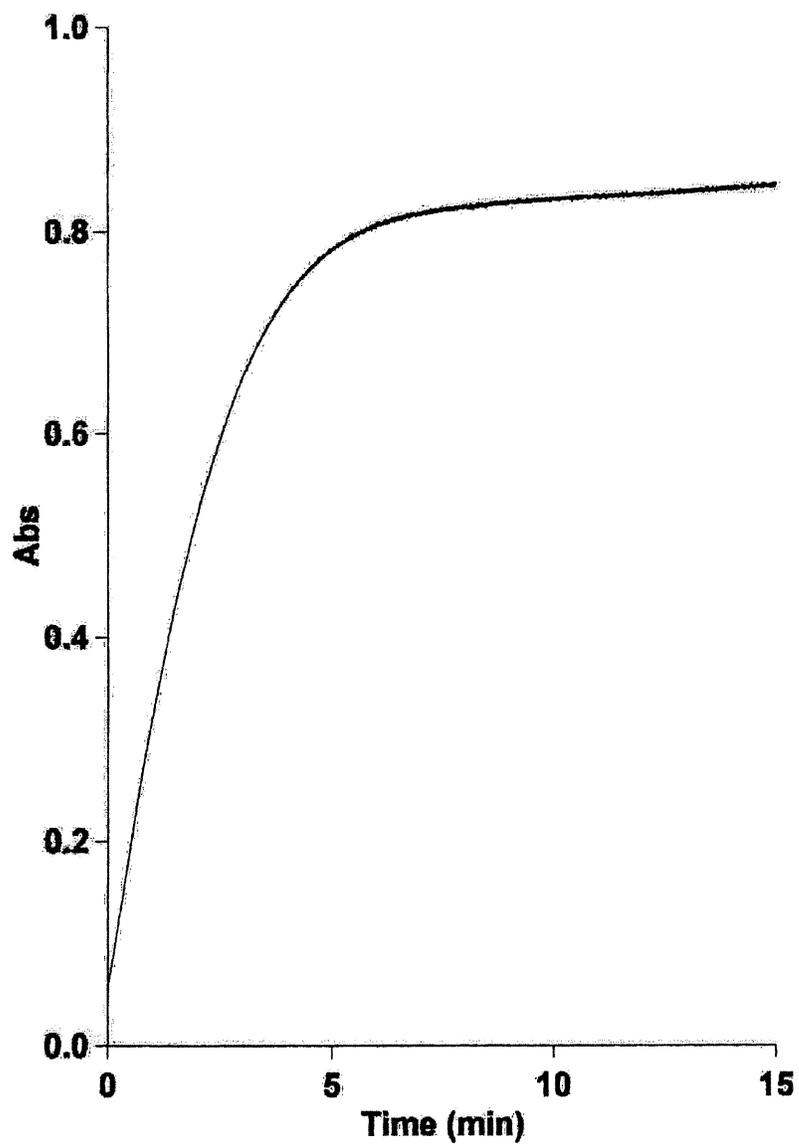
Figure 21: Réaction de transamidation catalysée par la TGase



4.3. Détermination des K_M de la Z-L-Gln-Gly et de la DMPDA

La figure 22 montre un profil typique de suivi cinétique en utilisant la méthode développée.

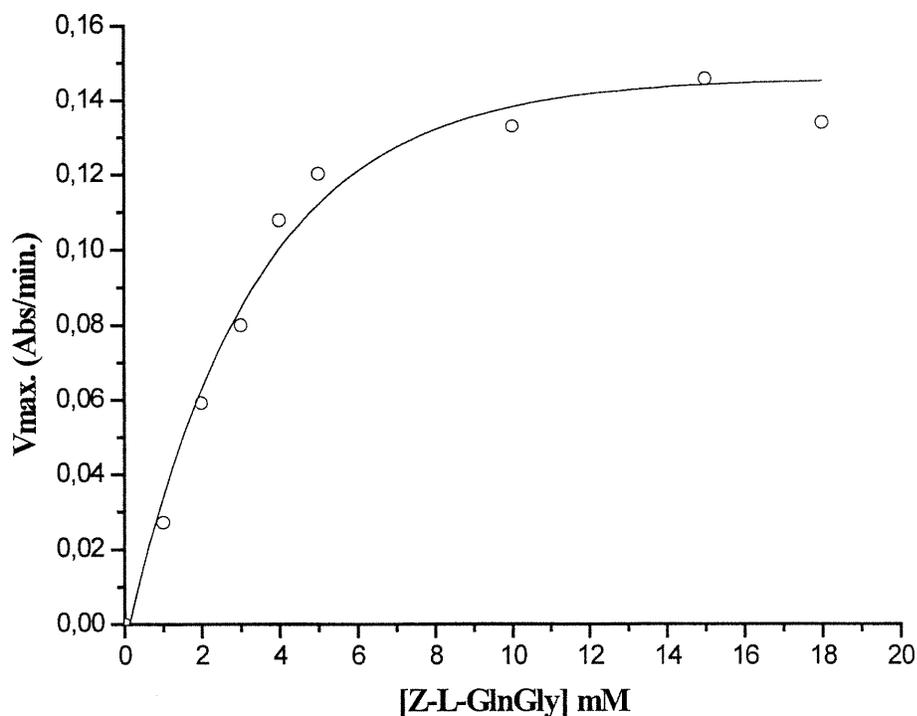
Figure 22: Profil type de progression de l'absorbance à $\lambda=278$ nm associée à la formation du produit anilide



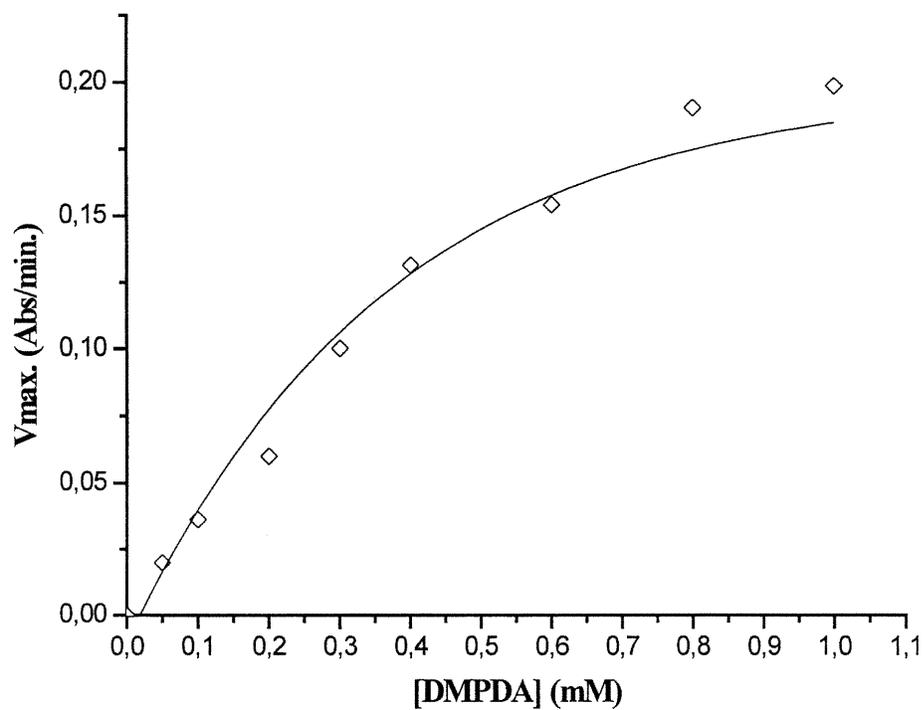
Ainsi, au cours de la réaction enzymatique, cette méthode nous permet de suivre la formation de l'amide **9** par une grande variation d'absorbance (qui diminue ainsi l'incertitude), dans un temps compris entre 2 et 10 minutes, dépendant de la quantité d'enzyme ajoutée. Ceci représente un laps de temps ni trop court permettant des lectures et des manipulations faciles et ni trop long qui impliquerait une perte d'efficacité. De plus, l'excellente linéarité des pentes et le côté pratique de la méthode permet de déterminer rapidement les vitesses initiales de transamidation avec une haute reproductibilité.

Dans le but de valider la précision de la méthode, les paramètres cinétiques du substrat donneur connu dans la littérature soit la Z-L-Gln-Gly et du nouveau substrat accepteur DMPDA ont été déterminés avec la méthode mise au point. Tel que montré à la figure 23, un profil de vitesse initiale de transamidation en fonction de la concentration du substrat donneur, permet de déterminer la constante de Michaelis-Menten K_M qui représente l'affinité du substrat pour la TGase du foie du cochon d'Inde. La vitesse initiale est obtenue en prenant la valeur de la pente (ordre zéro) dans les premiers 10% du profil de progression de la réaction enzymatique (cf. figure 22). Le K_M obtenu pour la Z-L-Gln-Gly est de 2,40 mM (cf. figure 23). Ce résultat est en excellent accord avec les K_M de la littérature (46, 64, 65) qui varient entre 2 mM et 5 mM et valide ainsi la précision de la méthode développée.

Malgré que la Z-L-Gln-Gly soit le meilleur substrat dipeptidique connu pour la TGase, sa valeur du K_M de l'ordre du mM démontre une mauvaise affinité pour l'enzyme. Généralement, un substrat possédant un $K_M \leq \mu\text{M}$ est reconnu comme ayant une bonne affinité pour son enzyme. Ceci n'est évidemment pas le cas de la Z-L-Gln-Gly, pour la TGase du foie du cochon d'Inde.

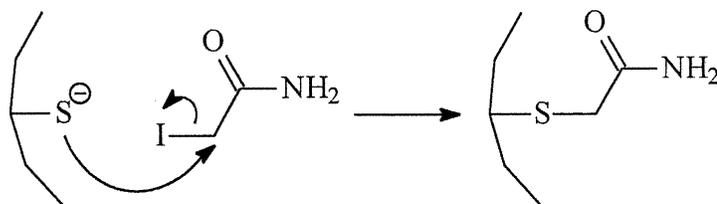
Figure 23: Courbe de Michaelis-Menten pour le substrat donneur Z-L-Gln-Gly

Par ailleurs, la variation de la concentration de la DMPDA, à une concentration fixe et saturante de Z-L-Gln-Gly (15 mM), permet de déterminer le K_M de la DMPDA. Ainsi, le tracé des pentes (ordre zéro) prélevé sur les premiers 10% des profils tels que sur la figure 22 permet d'obtenir une valeur de 0,25 mM comme K_M pour le substrat accepteur (cf. figure 24). Si l'on compare cette valeur à celles qui se trouvent dans la littérature pour d'autres substrats accepteurs, avec la Z-L-Gln-Gly comme substrat donneur (64), on trouve que le N_α -acétyl-L-lysine méthyl ester a un K_M de 9,6 mM et la méthylamine 13,1 mM. Ces résultats démontrent que la DMPDA possède une meilleure affinité pour la TGase que les substrats accepteurs couramment utilisés jusqu'à présent.

Figure 24: Courbe de Michaelis-Menten pour le substrat accepteur DMPDA

4.4. Détermination des constantes d'inhibition pour l'iodoacétamide

La sensibilité de la méthode par rapport à l'inhibition irréversible de la TGase a également été étudiée par la détermination des constantes d'inhibition pour l'iodoacétamide. Cette molécule est connue pour inhiber la TGase et les autres enzymes à cystéine de manière irréversible (cf. figure 25).

Figure 25: Réaction entre l'iodoacétamide et le thiolate d'une cystéine

La littérature présente des résultats d'inhibition de l'iodoacétamide sur le facteur de coagulation XIIIa, une TGase soluble dans le plasma, et sur la TGase du foie du cochon d'Inde: $k_{\text{inact}} = 480 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ (40) et $k_{\text{inact}} = 96 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ (65) respectivement. En utilisant notre méthode spectrophotométrique continue, il a été possible de suivre la perte en activité de la TGase, associée à l'inhibition irréversible, en fonction de la concentration en iodoacétamide variant entre 300 et 1000 nM. D'après les travaux de Tian *et al* (66) et de Crawford *et al* (67), l'inhibition irréversible d'une réaction enzymatique produit des courbes mono-exponentielles (cf. figure 26) à partir desquelles on peut calculer la constante de vitesse de pseudo-premier ordre, k_{obs} . Ainsi, dans des conditions expérimentales où $K_I < [I]$, alors:

$$k_{\text{inact}} = \frac{k_{\text{cat}}}{K_I} \quad [1]$$

Et k_{cat} et K_I peuvent être calculés selon l'équation suivante:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [I]}{[I] + K_I \cdot \left([I] + \frac{[S]}{K_M} \right)} \quad [2]$$

Cette équation peut être réarrangée dans le format $y = b + mx$:

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}} = \frac{(1 + K_I)}{k_{\text{cat}}} + \frac{K_I \cdot [S]}{k_{\text{cat}} \cdot K_M \cdot [I]} \quad [3]$$

Les constantes de vitesse k_{obs} , obtenus à partir d'un calcul de premier ordre sur les courbes de la figure 26, permettent de tracer une droite selon l'équation 3 de $1/k_{\text{obs}}$ vs $1/[I]$ (cf. figure 27). Les constantes d'inhibition k_{cat} , et K_I sont obtenues à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine calculées par régression linéaire. Finalement, k_{inact} est donnée par l'équation 1. Ainsi, la valeur de k_{inact} obtenue pour l'iodoacétamide sur la TGase du foie du cochon d'Inde est de $120 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$. Cette valeur de k_{inact} , mesurée par notre méthode est supérieure d'un facteur de ~ 100 , par rapport à celles présentées dans la littérature. Cette différence est probablement attribuable à la très grande sensibilité de notre méthode qui permet de mesurer et distinguer des vitesses de réaction quasi-identiques, en présence de concentrations relativement faibles en inhibiteurs.

Figure 26: Profils cinétiques à différentes concentrations d'iodoacétamide

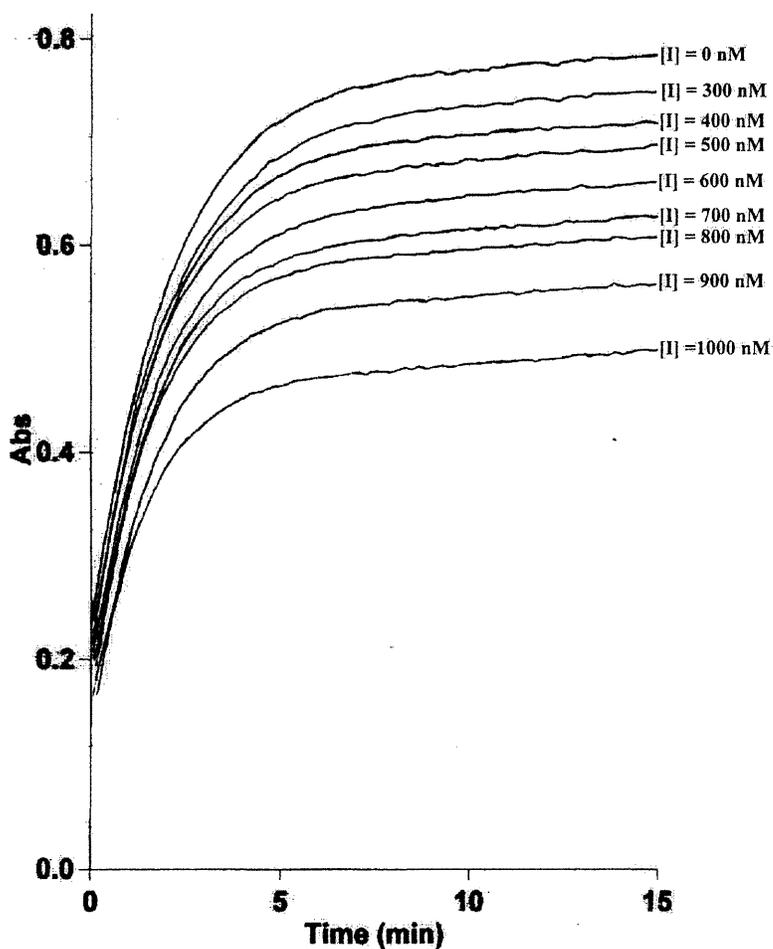
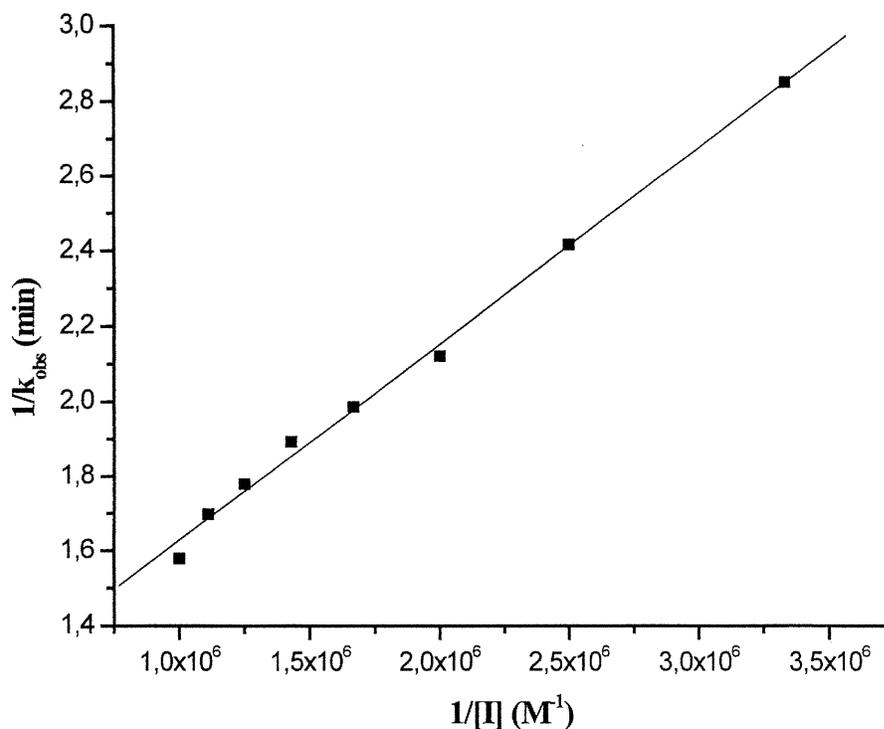


Figure 27: Double réciproque de k_{obs} versus [Iodoacétamide]

4.5. Conclusion

Ce chapitre a montré le développement d'une méthode continue de suivi cinétique de la TGase par spectrophotométrie UV-visible. Cette nouvelle méthode a été validée par la détermination du K_M du substrat le plus couramment utilisé pour la TGase soit la Z-L-Gln-Gly. Par le fait même, le K_M du nouveau deuxième substrat aminé pour la TGase, soit la DMPDA, a été déterminé et comparé avec les K_M des autres amines connus dans la littérature. De plus, la sensibilité de la méthode par rapport à l'inhibition irréversible de la TGase a également été étudiée par la détermination des constantes d'inhibition pour l'iodoacétamide. Il est intéressant de souligner que la valeur de k_{inact} mesurée par cette méthode est supérieure d'un facteur de ~ 100 , par rapport à celles présentées dans la littérature. Ceci est probablement le

résultat d'une très grande sensibilité de notre méthode qui permet de mesurer et distinguer des vitesses de réaction quasi-identiques, en présence de concentrations relativement faibles en inhibiteurs. Cette nouvelle méthode est ainsi sensible, efficace et reproductible. De plus, la nature directe de ce test spectrophotométrique continue le rend pratique et idéal pour son application dans le cadre d'études cinétiques précises de la TGase.

Les valeurs des constantes de Michaelis-Menten et d'inhibition mesurées par cette nouvelle méthode sont résumées au tableau 2.

Tableau 2: Résumé des diverses constantes cinétique obtenues par la méthode développée

K_M (Z-L-Gln-Gly) ^a (mM)	K_M (DMPDA) ^b (mM)	K_I (iodoacétamide) ^c (nM)	k_{cat} ^c (min ⁻¹)	k_{inact} ^c (M ⁻¹ min ⁻¹)
2.40 ± 0.05	0.25 ± 0.02	75 ± 11	0.90 ± 0.06	(120 ± 1) × 10 ⁵

^a Déterminé à 0.8 mM de DMPDA.

^b Déterminé à 15 mM de Z-L-Gln-Gly.

^c Déterminé sur une plage de 300 à 1000 nM d'iodoacétamide.

CHAPITRE 5

TESTS ENZYMOLOGIQUES

5.1. Introduction

L'étape d'acylation du mécanisme catalytique de la TGase consiste en l'attaque nucléophile de la cystéine au site actif de l'enzyme, sur la fonction amide de la chaîne latérale d'une glutamine. Ainsi les inhibiteurs analogues au substrat Z-L-Gln-Gly ont été conçus, de façon à introduire une fonction inhibitrice irréversible en bout de chaîne latérale du squelette dipeptidique. De plus, nous avons synthétisé des inhibiteurs potentiels avec différentes longueurs de chaîne latérale, afin d'étudier leur effet dans le site actif de l'enzyme.

Ce chapitre présente les résultats enzymologiques des 14 analogues thiadiazole et des 24 analogues de types Michael et époxyde. Tous les effets d'inhibition ont été de type irréversible. Cette conclusion a été tirée, après des études cinétiques où les inhibiteurs ont été préincubés avec la TGase, pour des intervalles de temps différents. La détermination des constantes d'inhibition irréversible a été effectuée à partir des courbes mono-exponentielles générées par la réaction enzymatique pour différentes concentrations en inhibiteur (cf. figure 28). Ces profils cinétiques proviennent de la méthode spectrophotométrique continue présentée au chapitre 4. Les constantes de vitesse d'inactivation de pseudo-premier ordre, k_{obs} , ont été calculées à partir de ces profils, afin d'être en mesure de tracer une droite de $1/k_{obs}$ en fonction de $1/[I]$ (cf. figure 29). La pente et l'ordonnée à l'origine de cette droite permettent de déterminer les constantes d'inhibition k_{cat} , k_{inact} et K_I tel que décrit à la section 4.4 (66, 67). La procédure expérimentale pour ces études d'inhibition est décrite au chapitre 7, section 7.4.

Figure 28: Courbes cinétiques pour différentes concentrations en inhibiteur
(exemple avec le composé 1j)

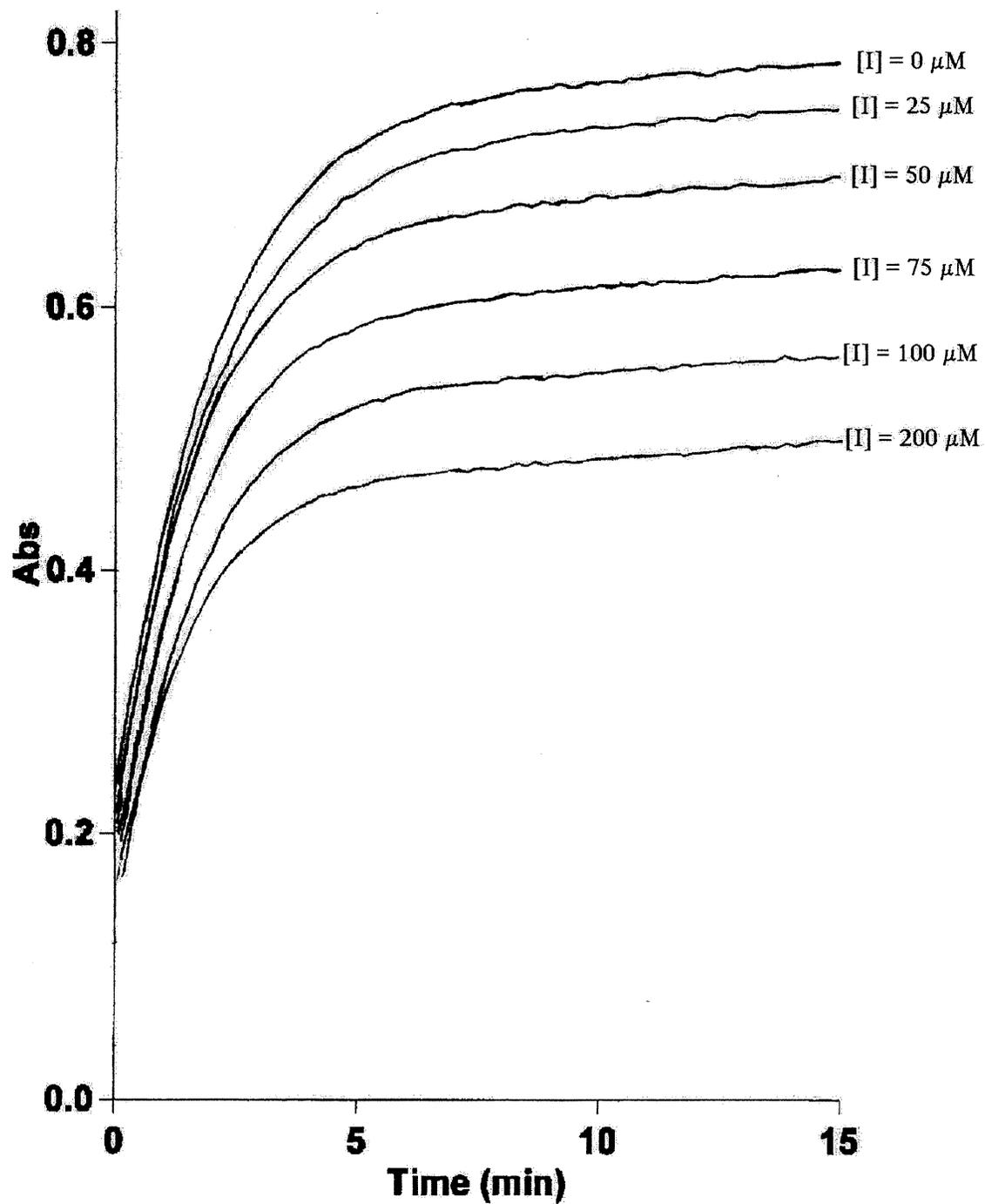
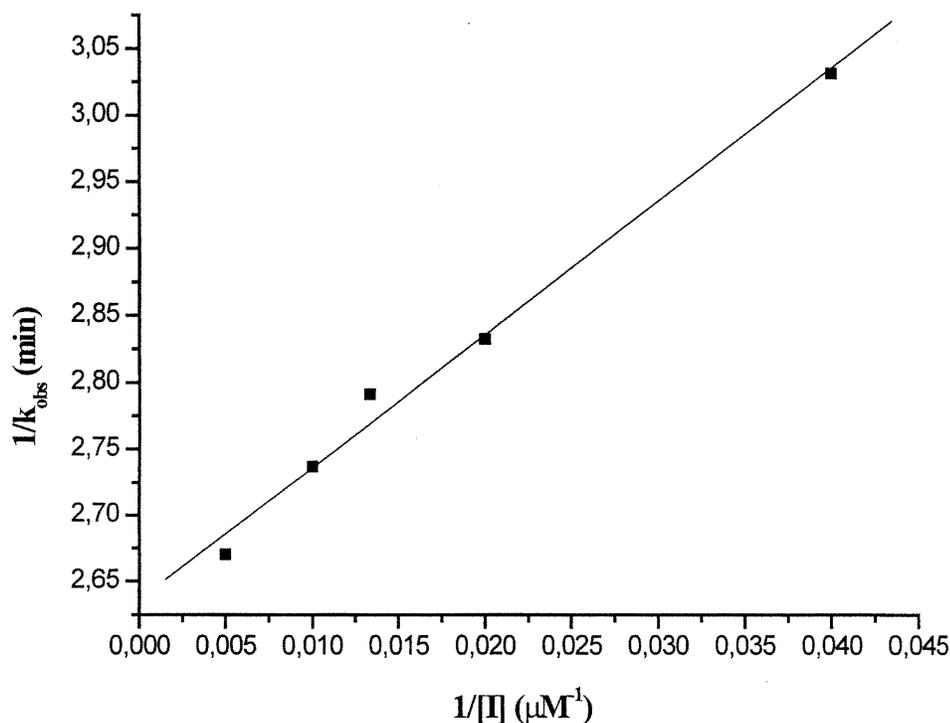


Figure 29: Droite résultante de la double réciproque de k_{obs} vs $[I]$
(exemple avec le composé **1j**)



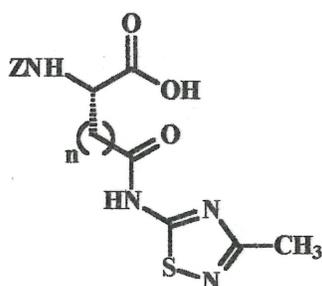
5.2. Étude d'inhibition des analogues de type thiadiazole

Les constantes d'inhibition k_{cat} , k_{inact} et K_I pour les analogues thiadiazole sont résumées aux tableaux 3 à 7. Pour les dérivés amides thiadiazole (cf. tableaux 3 à 5), il n'y a eu aucun effet d'inhibition significatif pour les composés $n = 1$ (**1a**, **1b**, **1c**), pour des concentrations inférieures à 500 μM . Toutefois, des effets d'inhibition ont été observés pour les composés ayant une chaîne latérale $n = 2$ (**2a**, **2b**, **2c**). Parmi ceux-ci, l'inhibiteur **2a** s'est avéré le plus efficace avec un k_{inact} égal à $894 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Il est intéressant de remarquer que le composé **2a** ne porte pas la partie glycine. Ensuite, l'inhibiteur le plus effectif de cette série a été le **2b**, soit le composé ayant la

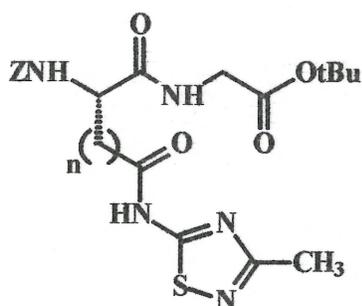
glycine sous forme d'ester *tert*-butylé comme second peptide, avec un k_{inact} de $783 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$. Finalement, parmi les dérivés amide thiadiazole ayant montré de l'effet d'inhibition, le composé **2c** s'est avéré le moins efficace avec un k_{inact} de $330 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$. Il est à noter que ce dernier, porte la glycine sous forme acide comme second peptide. Ces résultats peuvent être expliqués de plusieurs façons. Tout d'abord, contrairement aux inhibiteurs **2a**, **2b**, **2c**, il semble que le soufre de la fonction thiadiazole ne soit pas à proximité de la cystéine au site actif de l'enzyme pour les composés **1a**, **1b**, **1c**. Par ailleurs, si l'on compare les effets observés pour les analogues **2b** et **2c**, la présence d'une poche hydrophobe paraît évidente pour expliquer l'affinité accrue avec la fonction ester *tert*-butylée du composé **2b**. Par contre, étant donné que le composé **2a** est le moins volumineux de la série, l'efficacité de ce dernier serait due à sa capacité à pouvoir mieux s'insérer dans le site actif de la TGase provenant du foie du cochon d'Inde.

Tableaux 3-5

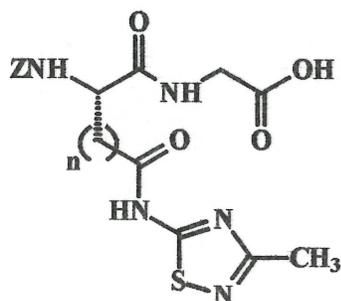
Résumé des paramètres cinétiques pour les analogues amides thiadiazoles
(Le pourcentage d'incertitude pour chaque valeur est de 10%)

Tableau 3: Les composés de la série a

n	k_{cat} (min^{-1})	K_I (μM)	$k_{inact} \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Plage (μM)
1	Pas d'effet significatif			<500
2	0,685	0,766	894	25-200

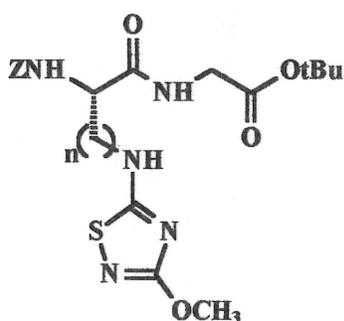
Tableau 4: Les composés de la série b

n	k_{cat} (min^{-1})	K_I (μM)	$k_{inact} \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Plage (μM)
1	Pas d'effet significatif			<500
2	1,012	1,293	783	25-200

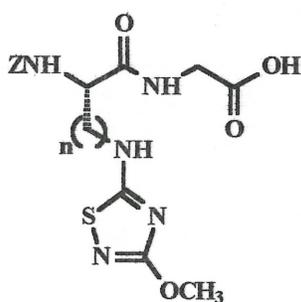
Tableau 5: Les composés de la série c

n	k_{cat} (min^{-1})	K_I (μM)	$k_{inact} \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Plage (μM)
1	Pas d'effet significatif			<500
2	4,715	14,30	330	100-400

Les résultats d'inhibition pour les analogues amine thiadiazole sont résumés aux tableaux 6 et 7. Les composés **1h** à **4h** et **1i** n'ont montré aucun effet d'inhibition pour des concentrations inférieures à 500 μM . D'autre part, les analogues **2i** à **4i** ont généré des effets d'inhibition avec des k_{inact} entre $547 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ et $720 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les composés **2i** et **4i**, pour lesquels il semble que l'arrangement tridimensionnel de la chaîne latérale en rapport avec la cystéine soit plus favorable avec $n = 2$ et $n = 4$. Par ailleurs, la comparaison des résultats entre les analogues amide et amine thiadiazole nous permet de conclure que le positionnement des deux types d'inhibiteurs dans le site actif est différent. En fait, il faut réaliser que la géométrie et les interactions de la chaîne latérale portant la fonction amide thiadiazole sont complètement différentes de celles portant la fonction amine thiadiazole. Par exemple, les analogues amide thiadiazole portent une géométrie planaire sp^2 sur la chaîne latérale, alors que les analogues amine thiadiazole portent une géométrie tétraédrique sp^3 . De plus, la fonction amide peut avoir des interactions différentes avec les acides aminés au site actif de l'enzyme, par rapport à celle de la fonction amine. Finalement, il semble que la fonction ester *tert*-butylée des composés **1h** à **4h** ne se positionne pas à l'intérieur d'une poche hydrophobe, tel que pour le composé **2b**.

Tableaux 6-7**Résumé des paramètres cinétiques pour les analogues amines thiadiazoles***(Le pourcentage d'incertitude pour chaque valeur est de 10%)***Tableau 6: Les composés de la série h**

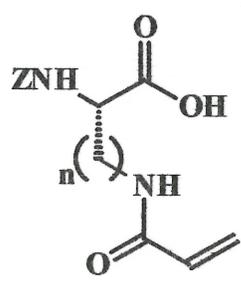
n	k_{cat} (min^{-1})	K_I (μM)	$k_{inact} \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Plage (μM)
1				
2	Pas d'effet significatif			<500
3				
4				

Tableau 7: Les composés de la série i

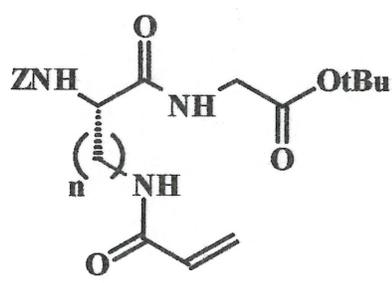
n	k_{cat} (min^{-1})	K_I (μM)	$k_{inact} \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Plage (μM)
1	Pas d'effet significatif			<500
2	0,881	1,248	706	25-200
3	1,227	2,245	547	25-200
4	1,215	1,687	720	25-200

5.3. Étude d'inhibition des analogues de types Michael et époxyde

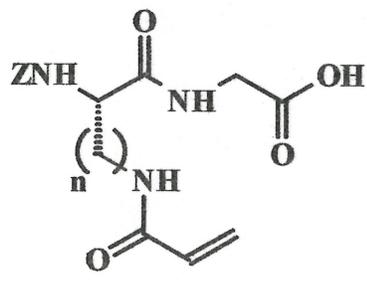
Les constantes d'inhibition k_{cat} , k_{inact} et K_I pour les analogues de types Michael et époxyde sont résumées aux tableaux 8 à 13. Pour les dérivés Michael (cf. tableaux 8 à 10), il semble évident que l'ajout de la glycine comme second résidu aminé augmente l'affinité de l'inhibiteur pour la TGase du foie du cochon d'Inde. De plus, la présence en bout de chaîne principale d'une fonction acide carboxylique, au lieu d'une fonction ester *tert*-butylée, implique une meilleure reconnaissance de l'inhibiteur par l'enzyme. En fait, il semble que l'encombrement stérique de la fonction ester *tert*-butylée soit un handicap pour l'affinité, alors qu'une interaction hydrogène de la fonction acide dans le site actif de l'enzyme favoriserait de meilleurs résultats d'inhibition. Par ailleurs, pour chaque série de composé Michael, il ressort que les analogues avec une chaîne latérale $n = 4$ sont les plus actifs en tant qu'inhibiteurs irréversibles. En effet, le composé Michael ayant montré le plus d'inhibition a été l'analogue **4I** avec une valeur de k_{inact} de $3000 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ et un K_I de 154 nM.

Tableaux 8-10**Résumé des paramètres cinétiques pour les analogues de type Michael***(Le pourcentage d'incertitude pour chaque valeur est de 10%)***Tableau 8: Les composés de la série j**


n	k_{cat} (min^{-1})	K_I (μM)	$k_{inact} \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Plage (μM)
1	1,076	1,173	917	25-200
2	0,729	0,809	901	25-200
3	1,326	2,316	573	25-200
4	0,669	0,521	1284	10-100

Tableau 9: Les composés de la série k


n	k_{cat} (min^{-1})	K_I (μM)	$k_{inact} \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Plage (μM)
1	0,950	1,479	642	25-200
2	0,601	0,511	1176	25-200
3	0,754	0,845	892	25-200
4	0,494	0,225	2196	10-100

Tableau 10: Les composés de la série l


n	k_{cat} (min^{-1})	K_I (μM)	$k_{inact} \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Plage (μM)
1	1,337	2,747	487	25-200
2	0,590	0,475	1242	25-200
3	0,541	0,278	1946	10-100
4	0,462	0,154	3000	5-50

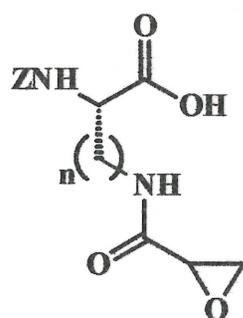
Dans le cas des composés époxydes (cf. tableaux 11 à 13), contrairement aux analogues de type Michael, l'addition de la glycine comme second résidu aminé diminue l'affinité de l'inhibiteur pour la TGase. Toutefois, comme pour les composés Michael, la présence de la glycine sous forme acide implique une meilleure reconnaissance, par rapport aux inhibiteurs avec la glycine sous forme d'ester *tert*-butylé. Les tableaux 12 et 13 montrent respectivement que les meilleurs résultats d'inhibition ont été obtenus avec les analogues ayant une chaîne latérale $n = 3$, soit **3n** et **3o**. Par contre, dans le cas des inhibiteurs époxyde sans la partie glycine (cf. tableau 11), le meilleur effet d'inhibition a été observé avec le composé $n = 4$, soit le dérivé **4m**. Ce dernier s'est avéré être le composé le plus inhibiteur de la série des époxydes, avec un k_{inact} de $2025 \times 10^3 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et un K_{I} de 276 nM. D'autre part, il est important de souligner que les constantes d'inhibition présentées aux tableaux 11 à 13 proviennent du mélange diastéréomérique des analogues époxydes correspondants. Ainsi, une bonne hypothèse serait de supposer qu'un énantiomère soit plus inhibiteur que l'autre, ce qui aurait pour effet d'augmenter les valeurs de k_{inact} calculées.

Tableaux 11-13

Résumé des paramètres cinétiques pour les analogues de type époxyde

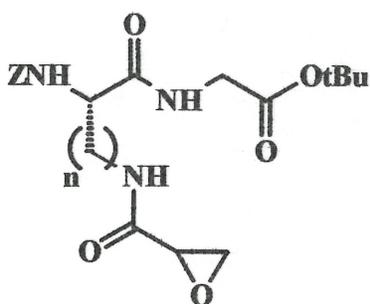
(Le pourcentage d'incertitude pour chaque valeur est de 10%)

Tableau 11: Les composés de la série m



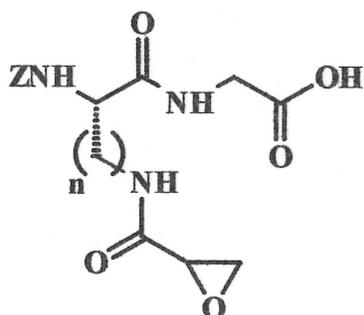
n	k_{cat} (min^{-1})	K_I (μM)	$k_{inact} \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Plage (μM)
1	1,386	2,126	652	25-200
2	0,610	0,498	1225	25-200
3	0,503	0,292	1723	25-200
4	0,559	0,276	2025	5-50

Tableau 12: Les composés de la série n



n	k_{cat} (min^{-1})	K_I (μM)	$k_{inact} \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Plage (μM)
1	2,487	5,907	421	75-300
2	2,017	4,195	481	75-300
3	0,866	0,950	912	25-200
4	1,451	2,421	599	75-300

Tableau 13: Les composés de la série o



n	k_{cat} (min^{-1})	K_I (μM)	$k_{inact} \times 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Plage (μM)
1	0,602	1,100	547	25-200
2	0,813	1,233	659	75-300
3	0,629	0,561	1121	25-200
4	0,593	0,594	998	25-200

La comparaison avec les inhibiteurs Michael apporte deux enseignements intéressants. Le premier est que l'oxygène de la fonction époxyde semble amener une gêne stérique, à l'intérieur du site actif de la TGase du foie du cochon d'Inde. Cet encombrement est prépondérant avec les inhibiteurs époxyde ayant la glycine comme second peptide. Dans ces cas, l'inhibiteur avec une chaîne latérale $n = 3$ est plus efficace que celui avec $n = 4$ (cf. tableaux 12-13). Le deuxième enseignement démontre que les inhibiteurs sans la partie glycine sont plus efficaces avec la fonction époxyde (**2m-4m**) qu'avec la fonction Michael (**2j-4j**).

5.4. Conclusion

En somme, les composés de types Michael et époxyde ont inhibé plus efficacement la TGase du foie du cochon d'Inde que les composés portant la fonction thiadiazole. L'analogue thiadiazole le plus inhibiteur **2a** a été environ de 2 à 4 fois moins efficace que les inhibiteurs de types Michael et époxyde les plus performants.

Dans l'ensemble, il est surtout intéressant de retenir les excellents effets d'inhibition de la plupart des composés qui ont été synthétisés.

CHAPITRE 6

CONCLUSION

En dépit des nombreux inhibiteurs de TGases étudiés jusqu'à ce jour, la plupart ne se sont pas avérés être suffisamment efficaces (26-40). Étant donné l'implication importante de cette enzyme au niveau de divers désordres physiologiques chez l'humain, nous avons décidé de développer des inhibiteurs de TGases pouvant pallier à ces déficits. Différentes synthèses ont donc dû être menées sur une plage assez large de molécules, afin de déterminer les meilleures caractéristiques nécessaires pour engendrer des interactions avec l'enzyme.

Les composés ont été envisagés sur la base d'une analogie de structure avec le substrat le plus couramment utilisé pour la TGase, soit le dipeptide Z-L-Gln-Gly. Trois types de fonctions inhibitrices de protéase à cystéine ont été utilisés, ce qui nous a permis de synthétiser trois familles de composés analogues. Les différentes synthèses ont donc permis de préparer un total de 38 molécules susceptibles de donner des inhibitions. Parmi celles-ci, 14 possèdent la fonction 1,2,4-thiadiazole, 12 portent la fonction Michael et 12 possèdent la fonction époxyde. Ainsi, en considérant l'analogie avec le substrat et l'efficacité de nos fonctions à pouvoir inhiber de manière irréversible des protéases à cystéine, on espérait que les composés synthétisés possèdent suffisamment d'affinité avec la TGase, pour donner des inhibitions intéressantes.

Les études enzymologiques ont été effectuées, après avoir purifié la TGase provenant du foie du cochon d'Inde et mis au point une méthode spectrophotométrique continue de suivi cinétique de la TGase. Sur les 38 molécules synthétisées, plusieurs ont inhibé la TGase du foie du cochon d'Inde. L'analogue thiadiazole le plus efficace a été le composé **2a** avec un k_{inact} de $894 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$. De façon générale, les composés Michael et époxyde ont inhibé plus efficacement la TGase, avec des valeurs de k_{inact} allant jusqu'à $3000 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ pour l'analogue Michael **4I**, qui s'est avéré être le meilleur inhibiteur parmi les 38 testés.

Les résultats enzymologiques ont apportés plusieurs enseignements importants. En ce qui concerne les analogues thiadiazole, la géométrie et les interactions de la chaîne latérale jouent un rôle clé dans la reconnaissance de l'inhibiteur par l'enzyme. De plus, la nature de la fonction carboxylique du groupement glycine est un élément prépondérant pour l'affinité du dipeptide pour la TGase. Dans la série des composés Michael et époxyde, les inhibiteurs les plus efficaces ont une longueur de chaîne latérale $n = 4$. Cette évidence nous permet de conclure que l'effet d'inhibition augmente avec la longueur de la chaîne latérale. Toutefois, la tendance générale des résultats avec les composés époxyde démontre que l'oxygène de la fonction époxyde apporte une gêne stérique dans le site actif de l'enzyme. Cet handicap est atténué avec des analogues moins encombrés, tel que ceux sans le groupement glycine et/ou avec une chaîne latérale plus courte tel $n = 3$.

En somme, plusieurs des inhibiteurs conçus sont très actifs, avec des valeurs de k_{inact} élevées ($\geq 700 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$). Toutefois, d'un point de vue thérapeutique, les composés les plus inhibiteurs devront combiner de fortes valeurs de k_{inact} à une excellente spécificité pour une TGase cible, par rapport aux autres enzymes à cystéine de l'organisme.

Un travail important de recherche a donc été mené jusqu'à ce jour et les objectifs fixés en début de projet ont tous été atteints. Différentes directions ont pu être ciblées, afin de faire progresser la recherche sur l'inhibition des TGases. En ce qui concerne les thiadiazoles, il apparaît intéressant de confirmer le mécanisme enzymatique proposé par la compagnie Apotex Research (43, 44). De plus, il serait approprié de synthétiser et de tester une deuxième génération d'inhibiteurs thiadiazole, en reprenant l'analogue thiadiazole le plus effectif **2a** et d'en faire l'estérification avec un groupement *tert*-butyle. Ainsi, il serait possible de vérifier si la poche hydrophobe putative présente au site de liaison du substrat, augmenterait l'affinité de ce composé. Également, un changement dans la nature de l'ester pourrait nous enseigner sur l'effet d'encombrement dans le site actif. Par exemple, l'utilisation d'ester méthylé ou aromatique serait envisageable. D'autre part, l'étude

d'analogues amine thiadiazole, sans le groupement glycine, permettrait de vérifier si l'efficacité de l'analogue amide **2a** pourrait être reproduite.

Il serait aussi intéressant de synthétiser et de tester une deuxième génération d'analogues Michael et époxyde, où la fonction inhibitrice serait substituée, afin d'étudier l'effet de substituant dans le site actif de l'enzyme. Par exemple, des substituants hydrophobes et hydrophiles pourraient être greffés aux inhibiteurs pour mieux comprendre leurs interactions avec l'enzyme. De plus, l'ajout de groupements substituants électrodonneurs et électroattracteurs pourraient nous enseigner sur leur effet (activateur ou inactivateur), du point de vue de la cinétique d'inhibition. D'autre part, il apparaît prioritaire d'étudier l'effet cinétique d'analogues époxyde énantiopurs, à partir des analogues époxyde diastéréomériques qui ont montré le plus d'effet d'inhibition.

Finalement, des cocrystallisations entre l'enzyme et nos meilleurs inhibiteurs permettraient d'effectuer des travaux de rayons X et de modélisation moléculaire, afin de connaître le positionnement exact des molécules dans le site actif de l'enzyme. En tenant compte de ces résultats et de ceux déjà acquis par enzymologie, une nouvelle série d'inhibiteurs, plus ciblée, pourrait être alors envisagée. Éventuellement, l'héritage de ces travaux pourrait mener à une compréhension plus approfondie du mécanisme natif de l'enzyme et à la conception d'un meilleur substrat que la Z-L-Gln-Gly (cf. chapitre 4, p.33). Ainsi, l'inhibition de la TGase pourrait être améliorée par l'introduction d'un meilleur groupement de reconnaissance sur de nouveaux inhibiteurs.

CHAPITRE 7

PARTIE EXPÉRIMENTALE

7.1. Synthèse

7.1.1 Matériels et Méthodes

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été obtenus sur des appareils Brüker. Les solvants utilisés sont indiqués avec les données spectrales et les déplacements chimiques sont exprimés en ppm à partir du triméthylsilane. Les spectres de masse (SM) ont été réalisés sur un appareil Micromass 1212. Les spectres infrarouge (IR) ont été effectués sur un appareil Perkin-Elmer modèle 298 à transformée de Fourier. Les spectres de produits liquides ont été pris à partir de film de chloroforme entre des plaques de NaCl, alors que les spectres de produits solides ont été faits avec des pastilles de KBr. Les points de fusion (pf) ont été déterminés avec un appareil à tube capillaire Thomas Hoover. Les différentes chromatographies ont été effectuées avec de la silice à Mesh 200-430 obtenue de A&C American Chemicals Ltd. Les réactifs qui ont été achetés proviennent de Sigma-Aldrich Canada.

7.1.2 Procédure générale de synthèse

Procédure 1: Ouverture d'un anhydride cyclique par un thiadiazole nucléophile (synthèse des composés **1a-2a**)

À 25 mL de sulfoxyde de diméthyle anhydre sont dissouts 10 mmol des anhydrides d'acide carbobenzyloxy-L-aspartique **5** ou carbobenzyloxy-L-glutamique **6** correspondant. Ensuite, 1,15 g de 5-amino-3-méthyl-1,2,4-thiadiazole **7** (10 mmol) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 heures. Les composés **1a-2a** sont obtenus après que le sulfoxyde de diméthyle ait été évaporé sous vide.

Procédure 2: Couplage peptidique (synthèse des composés **1b-2b**)

Les composés **1a-2a** (6 mmol) sont activés par l'ajout de 1,15 g de EDC sous forme d'un sel d'acide chlorhydrique (6 mmol), en présence de dichlorométhane (50 mL) et 0,92 mL de triéthylamine (6,6 mmol). Après 15 minutes, 1,00 g de glycine *tert*-butylée sous forme d'un sel d'acide chlorhydrique (6 mmol) est ajoutée au mélange qui est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange réactionnel est lavé avec de l'acide chlorhydrique 1 M (le pH de la phase aqueuse est maintenu autour de 3). Le produit désiré est obtenu après que la phase organique ait été séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide.

Procédure 3: Déprotection d'un ester *tert*-butylé (synthèse des composés **1c-2c** et **1h-4h**)

Les composés **1b-2b** (3 mmol) ou **1g-4g** (1 mmol) sont solubilisés dans 50 mL de dichlorométhane. De l'acide chlorhydrique gazeux est bullé pendant 4 heures dans le mélange réactionnel à température ambiante. Le produit désiré est obtenu après que le solvant ait été évaporé sous vide.

Procédure 4: Transformation d'un amide en amine (synthèse des composés **1d-2d**)

L'iodure de bis(trifluoroacétoxy)phényle (6,45 g, 15 mmol) est dissous dans un mélange diméthylformamide / eau (60 mL; 1:1 v/v). Le N α -carbobenzyloxy-L-asparagine (10 mmol) ou le N α -carbobenzyloxy-L-glutamine (10 mmol) est ajouté à la solution à température ambiante. Après 15 minutes d'agitation, 1,6 mL de pyridine (20 mmol) sont additionnés au mélange qui est ainsi agité pendant 3 heures. Le mélange réactionnel est évaporé sous vide et le résidu est repris dans 100 mL d'eau. La solution aqueuse est lavée avec du diéthyl éther (3 \times 100 mL) et évaporée sous vide. Après dissolution du résidu dans un minimum d'éthanol et précipitation dans de l'éther, le produit désiré est obtenu après que le précipité ait été filtré et lavé avec de l'éther.

Procédure 5: Protection d'une amine par le groupement Fmoc (synthèse des composés **1e-4e**)

Les dérivés aminés **1d-4d** ($n = 1-4$) (10 mmol) et 4,20 g de bicarbonate de sodium (50 mmol) sont solubilisés dans 100 mL d'eau. À cette solution aqueuse sont ajoutés 2,58 g de Fmoc-Cl (10 mmol) dans 100 mL de tétrahydrofurane. Le mélange réactionnel est agité pendant 3 heures à température ambiante. Le tétrahydrofurane est ensuite évaporé sous vide et la phase aqueuse est acidifiée à pH 1. Le produit est extrait avec du dichlorométhane (3×100 mL). Le produit désiré est obtenu après que la phase organique ait été séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide.

Procédure 6: Couplage peptidique (synthèse des composés **1f-4f**)

Les composés **1e-4e** (9 mmol) sont activés par l'ajout de 1,73 g de EDC sous forme d'un sel d'acide chlorhydrique (9 mmol), en présence de 1,38 mL de triéthylamine (9,9 mmol) dans du dichlorométhane (100 mL). Après 15 minutes, 1,50 g de glycine *tert*-butylée sous forme d'un sel d'acide chlorhydrique (9 mmol) est ajoutée au mélange qui est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange réactionnel est lavé avec de l'acide chlorhydrique 1 M (le pH de la phase aqueuse est maintenu autour de 3). Le produit désiré est obtenu après que la phase organique ait été séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide.

Procédure 7: Déprotection du groupement Fmoc (synthèse des composés **1g-4g**)

Les composés **1f-4f** (7 mmol) sont solubilisés dans 100 mL d'acétonitrile et 14,5 mL de diéthylamine (140 mmol). Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. Une fois que le mélange réactionnel ait été évaporé, le résidu est repris dans 100 mL d'acétonitrile et lavé plusieurs fois avec de l'hexane (6×100 mL). Le produit désiré est obtenu après une évaporation sous vide de l'acétonitrile.

Procédure 8: Couplage entre un thiadiazole électrophile et une amine nucléophile
(synthèse des composés **1h-4h**)

Les composés **1g-4g** (6 mmol) ont été solubilisés dans 100 mL d'acétonitrile en présence de 1,67 mL de triéthylamine (12 mmol) et 0,90 g d'iodure de sodium (6 mmol). Après l'addition de 0,90 g de 5-chloro-3-méthoxy-1,2,4-thiadiazole **8** (6 mmol), le mélange est agité et chauffé à reflux pendant une nuit. Le mélange réactionnel est évaporé sous vide et le résidu est purifié par une chromatographie flash avec un mélange acétate d'éthyle/hexane (70/30) comme éluant.

Procédure 9: Formation d'un amide α , β -insaturé (synthèse des composés **1j-4j**)

Dans 300 mL de méthanol sous azote, 10 mmol du dérivé aminé correspondant **1d-4d** sont solubilisés. Après addition de 14 mL de triéthylamine (100 mmol), la solution est amenée à 0 °C et 4,8 mL de chlorure d'acryloyle (60 mmol) sont additionnés goutte à goutte. Le mélange réactionnel est ensuite agité pendant une nuit à température ambiante. Le mélange est évaporé sous vide et le résidu est repris dans 100 mL d'eau. La solution aqueuse est acidifiée jusqu'à un pH de 1,5 avec de l'acide chlorhydrique 1 M et le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 \times 100 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide donnant ainsi le produit désiré.

Procédure 10: Couplage peptidique (synthèse des composés **1k-4k**)

Les composés **1j-4j** (6 mmol) sont activés par l'ajout de 1,15 g de EDC sous forme d'un sel d'acide chlorhydrique (6 mmol) en présence de dichlorométhane (150 mL) et 0,92 mL de triéthylamine (6,6 mmol). Après 15 minutes, 1,00 g de glycine *tert*-butylée sous forme d'un sel d'acide chlorhydrique (6 mmol) est ajoutée au mélange réactionnel qui est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est lavé avec de l'eau (3 \times 150 mL) et la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Le résidu ainsi obtenu est purifié par chromatographie flash avec de l'acétate d'éthyle comme éluant.

Procédure 11: Déprotection d'un ester *tert*-butylé (synthèse des composés **11-4l**)

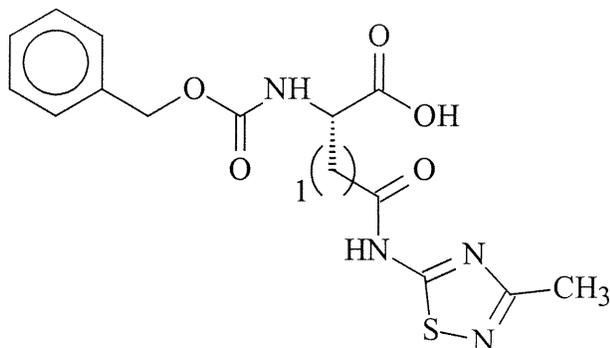
Les composés **1k-4k** (3 mmol) sont solubilisés dans 50 mL de dichlorométhane. De l'acide chlorhydrique gazeux est bullé pendant 4 heures dans le mélange réactionnel à température ambiante. Le produit pur est obtenu après que le solvant ait été évaporé sous vide.

Procédure 12: Époxydation d'un amide α , β -insaturé par le DMDO (synthèse des composés **1m-4m**, **1n-4n**, **1o-4o**)

Le DMDO est préparé à partir d'une solution de 58 g de bicarbonate de sodium (690 mmol), 120 g d'oxone (178 mmol) dans 250 mL d'eau et 192 mL d'acétone. Le DMDO est obtenu en solution 2 M dans l'acétone par distillation sous vide avec un piège à glace sèche. Ainsi, un large excès de DMDO 2 M dans l'acétone est ajouté sur 1 mmol des composés **1j-4j**, **1k-4k**, **1l-4l**. Pour compléter l'époxydation, le mélange réactionnel est agité à 0 °C pendant 5 heures et à température ambiante pendant une nuit. Le produit pur est obtenu après évaporation sous vide du solvant et de l'excès de DMDO.

7.1.3 Données spectrales

1a: N α -Carbobenzyloxy-2-amino-N γ -(3-methyl-5-[1,2,4]thiadiazolyl)-L-asparagine



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 1. Une poudre orange pâle a été obtenue (Rdt = 85%).

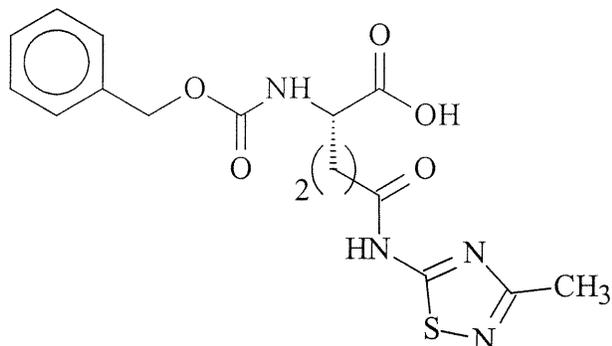
IR ν_{\max} 3279 (OH); 1749, 1709, 1689 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.45-7.25 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 4.24 (t, 1H, J = 4.1 Hz), 2.44 (d, 2H, J = 4.0 Hz), 2.22 (s, 3H).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.32, 170.65, 169.78, 157.19, 138.01, 137.99, 129.29, 128.62, 128.57, 66.80, 54.70, 30.88, 19.01.

SM (FAB+) 365.1 (MH⁺).

pf (°C) 124.

2a: N_α-Carbobenzyloxy-2-amino-N_δ-(3-methyl-5-[1,2,4]thiadiazolyl)-L-glutamine

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 1. Une huile foncée a été obtenue (Rdt = 86%).

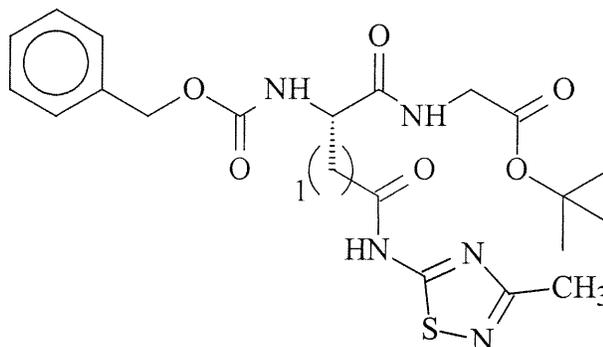
IR ν_{\max} 3290 (OH); 1743, 1712, 1675 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.45-7.27 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 4.21 (t, 1H, J = 4.1 Hz), 2.41 (t, 2H, J = 3.3 Hz), 2.21 (s, 3H), 1.19 (td, 2H, J = 3.3 Hz, J = 4.2 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.30, 170.60, 169.76, 157.25, 138.04, 138.00, 129.25, 128.66, 128.58, 66.76, 54.74, 31.09, 27.95, 18.91.

SM (FAB+) 379.1 (MH+).

1b: Ester N α -carbobenzyloxy-2-amino-N γ -(3-methyl-5-[1,2,4]thiadiazolyl)-L-asparaginyglycine *tert*-butylé



Ce composé a été préparé à partir de la procédure générale 2. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 95%).

IR ν_{\max} 1750, 1747, 1706, 1679 (C=O).

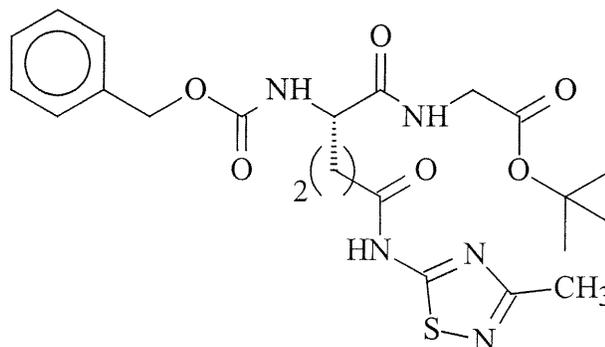
RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.42-7.28 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.22 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 3.83 (s, 2H), 2.39 (d, 2H, J = 5.7 Hz), 2.18 (s, 3H), 1.46 (s, 9H).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.31, 174.62, 170.60, 169.77, 158.49, 138.09, 138.02, 129.59, 128.94, 128.89, 82.79, 67.56, 55.09, 42.98, 33.11, 28.54, 19.08.

SM (FAB+) 478.2 (MH⁺).

pf (°C) 94.

2b: Ester N_{α} -carbobenzyloxy-2-amino- N_{δ} -(3-methyl-5-[1,2,4]thiadiazolyl)-L-glutaminyglycine *tert*-butylé



Ce composé a été préparé à partir de la procédure générale 2. Une poudre foncée a été obtenue (Rdt = 94%).

IR ν_{\max} 1753, 1749, 1709, 1691 (C=O).

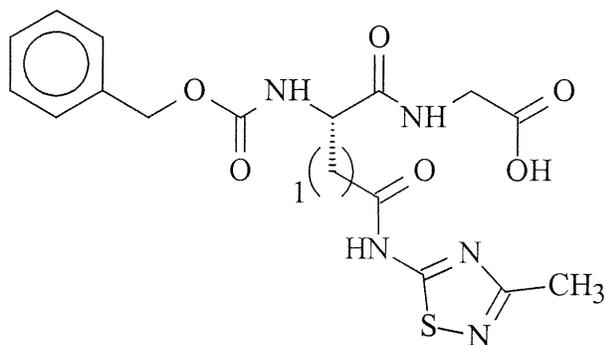
RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.45-7.30 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 4.20 (t, 1H, J = 5.5 Hz), 3.80 (s, 2H), 2.41 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.16 (s, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.26 (td, 2H, J = 7.0 Hz, J = 5.5 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.33, 174.66, 170.63, 169.75, 158.52, 138.11, 138.02, 129.60, 128.96, 128.92, 82.89, 67.76, 55.12, 43.00, 33.14, 31.24, 28.51, 19.12.

SM (FAB+) 492.2 (MH+).

pf (°C) 84.

1c: N_α-Carbobenzyloxy-2-amino-N_γ-(3-methyl-5-[1,2,4]thiadiazolyl)-L-asparaginyglycine



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 3. Une poudre orange pâle a été obtenue (Rdt = 100%).

IR ν_{\max} 3291 (OH); 1749, 1712, 1701, 1689 (C=O).

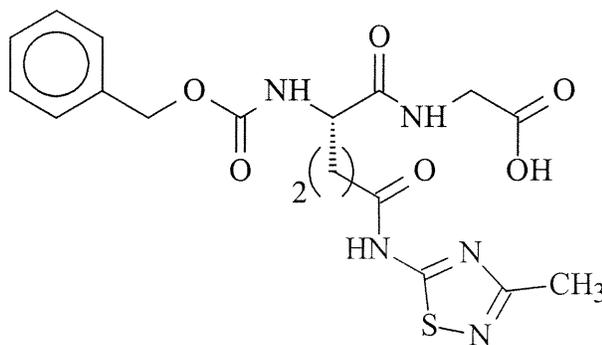
RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.44-7.30 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.19 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 3.95 (s, 2H), 2.37 (d, 2H, J = 7.1 Hz), 2.16 (s, 3H).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.03, 173.99, 173.22, 169.61, 158.14, 137.90, 129.43, 129.05, 128.91, 67.79, 55.60, 41.71, 32.46, 18.77.

SM (FAB+) 422.3 (MH⁺).

pf (°C) 76.

2c: N α -Carbobenzyloxy-2-amino-N δ -(3-methyl-5-[1,2,4]thiadiazolyl)-L-glutaminyglycine



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 3. Une poudre jaune pâle a été obtenue (Rdt = 100%).

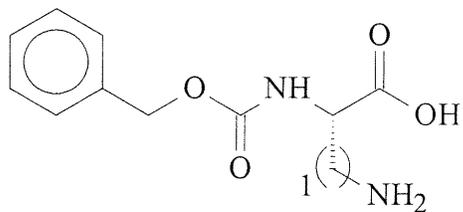
IR ν_{\max} 3301 (OH); 1752, 1715, 1703, 1690 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.36-7.17 (m, 5H), 5.07 (s, 2H), 4.22 (t, 1H, J = 4.9 Hz), 3.90 (s, 2H), 2.43 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.18 (s, 3H), 2.00 (td, 2H, J = 5.0 Hz, J = 7.1 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.01, 173.94, 173.20, 169.66, 158.37, 139.24, 137.90, 128.43, 129.01, 128.87, 67.85, 55.61, 41.82, 32.49, 28.41, 18.74.

SM (FAB+) 436.3 (MH⁺).

pf (°C) 104.

1d: Acide N α -carbobenzyloxy-L-2,3-diaminopropionique

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 4. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 80%).

IR ν_{\max} 3130 (OH); 3050 (NH₂); 1751, 1690 (C=O).

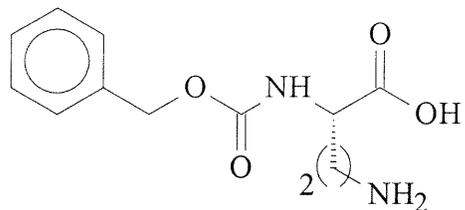
RMN¹H (D₂O; 400 MHz) δ 7.21–7.13 (m, 5H), 4.38 (s, 2H), 3.98 (t, 1H, J = 10.0 Hz), 3.55 (d, 2H, J = 10.0 Hz).

RMN¹³C (D₂O; 100 MHz) δ 178.59, 158.76, 137.14, 129.53, 129.11, 128.51, 67.71, 59.72, 43.58.

SM (FAB+) 239.1 (MH⁺).

pf (°C) 212.

pf litt.(53) (°C) 228-230.

2d: Acide N α -carbobenzyloxy-L-2,4-diaminobutyrique

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 4. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 81%).

IR ν_{\max} 3115 (OH); 3010 (NH₂); 1748, 1692 (C=O).

RMN¹H (D₂O; 400 MHz) δ 7.25–7.14 (m, 5H), 4.40 (s, 2H), 3.94 (t, 1H, J = 9.9 Hz), 3.59 (d, 2H, J = 5.0 Hz), 2.11 (td, 2H, J = 9.8 Hz, J = 5.0 Hz).

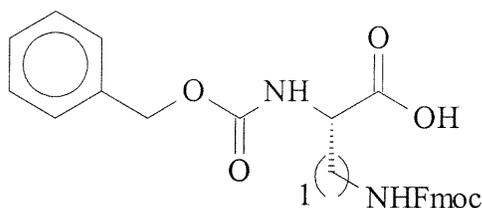
RMN¹³C (D₂O; 100 MHz) δ 178.52, 158.57, 137.09, 129.51, 129.12, 128.47, 67.77, 54.68, 37.48, 30.50.

SM (FAB+) 253.1 (MH⁺)

pf (°C) 191.

pf litt.(53) (°C) 188-190.

1e: Acide N_α-carbobenzyloxy-2-amino-N_β-9-fluorenylmethoxycarbonyl-3-amino-L-propionique



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 5. Une poudre jaune pâle a été obtenue (Rdt = 95%).

IR ν_{\max} 3303 (OH); 1750, 1730, 1672 (C=O).

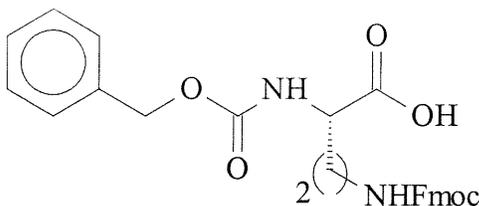
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.74 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.57 (d, 2H, J = 7.4 Hz), 7.43-7.29 (m, 9H), 6.43 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.48-4.41 (m, 3H), 4.16 (t, 1H, J = 6.3 Hz), 1.82 (d, 2H, J = 6.5 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 174.30, 157.69, 156.77, 143.79, 141.30, 136.00, 128.56, 128.21, 127.81, 127.18, 125.19, 124.96, 120.06, 67.37, 64.97, 54.88, 47.02, 42.51.

SM (FAB+) 461.2 (MH⁺).

pf (°C) 95.

2e: Acide N_α-carbobenzyloxy-2-amino-N_γ-9-fluorenylmethoxycarbonyl-4-amino-L-butyrique



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 5. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 96%).

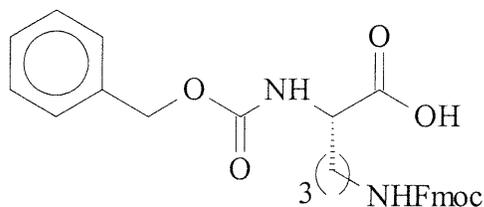
IR ν_{\max} 3305 (OH); 1764, 1733, 1675 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.75 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.58 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 7.48-7.33 (m, 9H), 6.44 (s, 1H), 5.65 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.46-4.41 (m, 3H), 4.17 (t, 1H, J = 6.0 Hz), 1.89 (t, 2H, J = 6.4 Hz), 1.52 (td, 2H, J = 6.2 Hz, J = 6.3 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 175.28, 157.07, 156.79, 143.95, 141.33, 136.11, 128.61, 128.14, 127.79, 127.16, 125.22, 124.95, 120.07, 67.66, 67.31, 51.56, 47.19, 37.55, 332.80.

SM (FAB+) 475.2 (MH⁺).

pf (°C) 106.

3e: N_α-Carbobenzyloxy-N₈-9-fluorenylmethoxycarbonyl-L-ornithine

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 5. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 96%).

IR ν_{\max} 3299 (OH); 1759, 1730, 1675 (C=O).

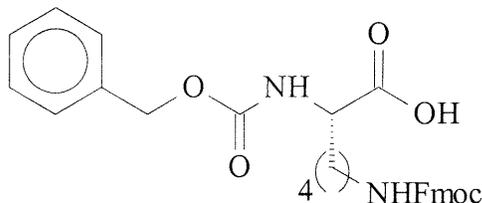
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.76 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 7.56 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 7.45-7.32 (m, 9H), 6.42 (s, 1H), 5.61 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.47-4.39 (m, 3H), 4.15 (t, 1H, J = 6.2 Hz), 1.91 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 1.53-1.28 (m, 4H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 175.54, 156.87, 156.32, 143.88, 141.29, 136.13, 128.53, 128.21, 128.12, 127.70, 125.06, 124.82, 119.99, 67.11, 66.70, 53.43, 47.17, 40.40, 29.53, 25.77.

SM (FAB+) 489.3 (MH⁺).

pf (°C) 121.

pf litt. (68) (°C) 103-105.

4e: N_α-Carbobenzyloxy-N_ε-9-fluorenylmethoxycarbonyl-L-lysine

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 5. Une poudre jaune pâle a été obtenue (Rdt = 95%).

IR ν_{\max} 3300 (OH); 1760, 1730, 1672 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.75 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 7.56 (d, 2H, J = 7.4 Hz), 7.43-7.28 (m, 9H), 6.43 (s, 1H), 5.61 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.44-4.36 (m, 3H), 4.18 (t, 1H, J = 6.5 Hz), 1.88 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 1.54-1.24 (m, 6H).

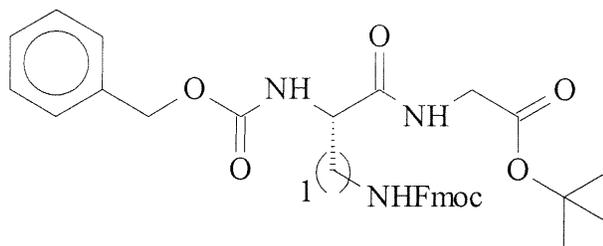
RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 175.95, 156.97, 156.58, 143.98, 141.33, 136.28, 128.57, 128.21, 128.13, 127.15, 125.15, 125.01, 120.06, 67.09, 66.69, 53.76, 47.24, 40.56, 31.78, 29.26, 22.41.

SM (FAB+) 503.4 (MH⁺).

pf (°C) 139.

pf litt. (69) (°C) 113-114.

1f: Ester N_α-carbobenzyloxy-2-amino-N_β-9-fluorenylmethoxycarbonyl-3-amino-L-propionylglycine *tert*-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 6. Une poudre jaune pâle a été obtenue (Rdt = 95%).

IR ν_{\max} 1751, 1721, 1700, 1659 (C=O).

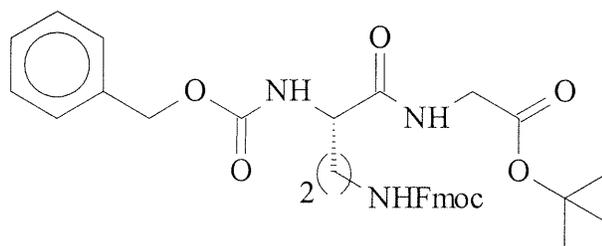
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.75 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.59 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.41-7.34 (m, 9H), 6.44 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.95 (s, 1H), 4.45-4.37 (m, 3H), 4.24 (t, 1H, J = 6.3 Hz), 3.90 (s, 2H), 3.04 (d, 2H, J = 5.9 Hz), 1.44 (s, 9H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 171.02, 168.83, 157.40, 156.38, 145.09, 141.13, 137.89, 128.43, 128.28, 127.67, 127.09, 126.88, 125.08, 119.74, 81.29, 66.87, 64.23, 52.94, 47.04, 45.61, 30.34, 27.98.

SM (FAB+) 574.2 (MH⁺).

pf (°C) 118.

2f: Ester N α -carbobenzyloxy-2-amino-N γ -9-fluorenylmethoxycarbonyl-4-diamino-L-butryl-glycine *tert*-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 6. Une poudre jaune pâle a été obtenue (Rdt = 96%).

IR ν_{\max} 1752, 1720, 1702, 1659 (C=O).

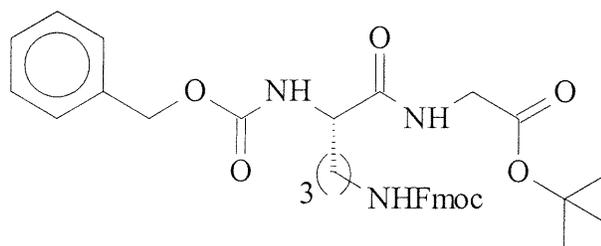
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.77 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.61 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.41-7.32 (m, 9H), 6.44 (s, 1H), 5.45 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.95 (s, 1H), 4.44-4.35 (m, 3H), 4.22 (t, 1H, J = 6.1 Hz), 3.91 (s, 2H), 1.93 (t, 2H, J = 6.4 Hz), 3.04 (d, 2H, J = 5.9 Hz), 1.41 (s, 9H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.01, 168.82, 157.12, 156.40, 143.98, 141.22, 136.35, 128.48, 128.08, 127.95, 127.65, 127.07, 125.17, 119.93, 81.89, 66.90, 64.57, 52.38, 47.16, 42.01, 37.39, 33.49, 27.97.

SM (FAB+) 588.2 (MH⁺).

pf (°C) 90.

**3f: Ester N $_{\alpha}$ -carbobenzyloxy-N $_{\delta}$ -9-fluorenylmethoxycarbonyl-L-ornithinyl
glycine *tert*-butylé**



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 6. Une poudre jaune pâle a été obtenue (Rdt = 97%).

IR ν_{\max} 1754, 1725, 1700, 1660 (C=O).

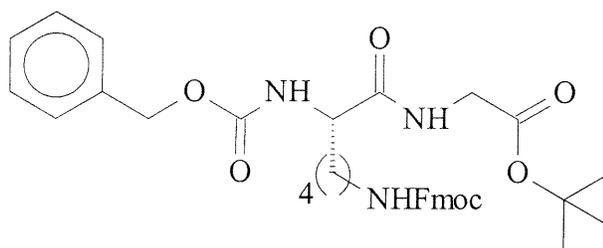
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.74 (d, 2H, J = 7.7 Hz), 7.59 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.40-7.32 (m, 9H), 6.43 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.93 (s, 1H), 4.45-4.36 (m, 3H), 4.23 (t, 1H, J = 6.2 Hz), 3.89 (s, 2H), 3.01 (t, 2H, J = 5.4 Hz), 1.71-1.45 (m, 13H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.16, 168.75, 156.97, 156.38, 143.94, 141.25, 136.25, 128.49, 128.12, 128.02, 127.65, 127.03, 125.08, 119.93, 82.14, 66.94, 66.60, 53.50, 47.21, 41.92, 39.81, 30.12, 27.96, 25.99.

SM (FAB+) 602.4 (MH⁺).

pf (°C) 112.

4f: Ester N_α-carbobenzyloxy-N_ε-9-fluorenylmethoxycarbonyl-L-lysylglycine tert-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 6. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 97%).

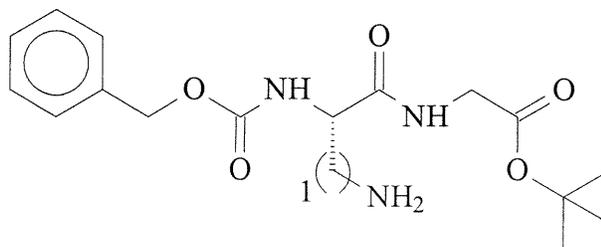
IR ν_{\max} 1750, 1720, 1700, 1658 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.76 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.58 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 7.41-7.31 (m, 9H), 6.43 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.91 (s, 1H), 4.44-4.36 (m, 3H), 4.21 (t, 1H, J = 6.1 Hz), 3.92 (s, 2H), 3.08 (t, 2H, J = 4.2 Hz), 1.70-1.39 (m, 15H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 171.87, 168.67, 156.56, 156.23, 143.91, 141.15, 136.09, 128.39, 128.04, 127.92, 127.53, 126.92, 124.96, 119.83, 82.16, 66.88, 66.37, 54.58, 47.13, 41.83, 40.17, 31.84, 29.19, 27.90, 22.14.

SM (FAB+) 616.4 (MH⁺).

pf (°C) 119.

1g: Ester N α -carbobenzyloxy-2,3-diamino-L-propionylglycine *tert*-butylé

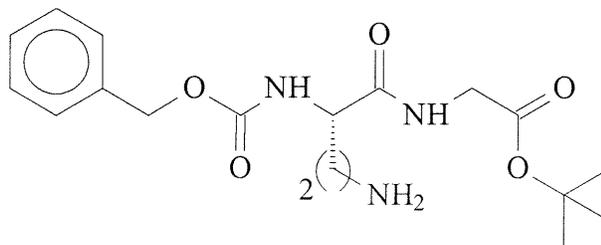
Ce composé a été préparé selon la procédure générale 7. Un solide jaune pâle visqueux a été obtenu (Rdt = 93%).

IR ν_{\max} 3099 (NH₂); 1744, 1724, 1670 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.33-7.28 (m, 5H), 6.01 (s, 2H), 5.41 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.90 (t, 1H, J = 6.6 Hz), 3.82 (s, 2H), 2.96 (d, 2H, J = 6.7 Hz), 1.46 (s, 9H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.74, 168.99, 153.92, 137.49, 128.37, 127.88, 127.76, 81.49, 66.56, 52.91, 45.01, 41.61, 27.92.

SM (FAB+) 352.2 (MH⁺).

2g: Ester N α -carbobenzyloxy-2,4-diamino-L-butyrylglycine *tert*-butylé

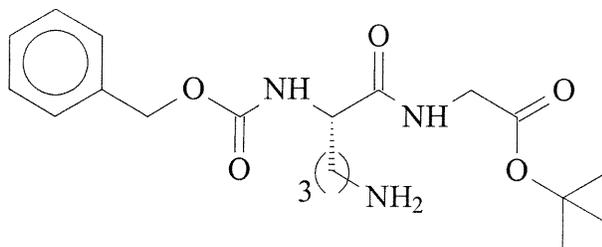
Ce composé a été préparé selon la procédure générale 7. Un solide jaune pâle visqueux a été obtenu (Rdt = 92%).

IR ν_{\max} 3054 (NH₂); 1747, 1725, 1666 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.33-7.29 (m, 5H), 6.02 (s, 2H), 5.45 (s, 1H), 5.27 (s, 1H), 5.03 (s, 2H), 3.94 (t, 1H, J = 6.7 Hz), 3.82 (s, 2H), 2.96 (t, 2H, J = 4.7 Hz), 1.93 (td, 2H, J = 6.8 Hz, J = 4.7 Hz), 1.48 (s, 9H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.67, 168.84, 156.47, 136.45, 128.32, 127.86, 127.76, 81.47, 66.51, 52.81, 44.90, 41.77, 34.88, 27.81.

SM (FAB+) 366.2 (MH⁺).

3g: Ester N α -carbobenzyloxy-L-ornithinyglycine *tert*-butylé

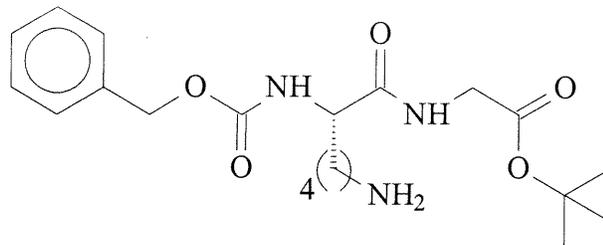
Ce composé a été préparé selon la procédure générale 7. Un solide jaune pâle visqueux a été obtenu (Rdt = 92%).

IR ν_{\max} 3072 (NH₂); 1745, 1723, 1675 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.32-7.28 (m, 5H), 6.03 (s, 2H), 5.44 (s, 1H), 5.27 (s, 1H), 5.05 (s, 2H), 3.91 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 3.83 (s, 2H), 2.99 (t, 2H, J = 4.5 Hz), 1.94-1.36 (m, 13H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.59, 168.89, 156.40, 136.43, 128.34, 127.89, 127.82, 81.65, 66.53, 54.46, 41.77, 30.19, 28.86, 27.88, 20.96.

SM (FAB+) 380.2 (MH⁺).

4g: Ester N α -carbobenzyloxy-L-lysylglycine *tert*-butylé

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 7. Un solide jaune pâle visqueux a été obtenu (Rdt = 93%).

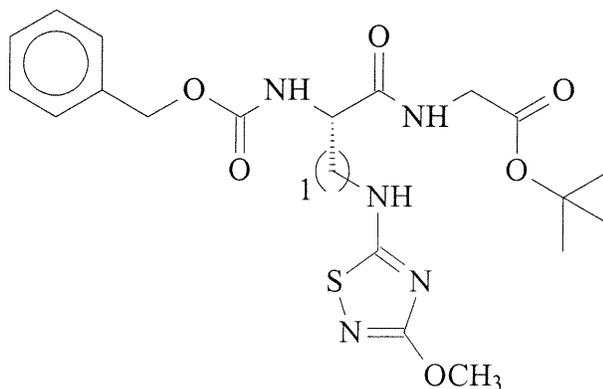
IR ν_{\max} 3104 (NH₂); 1745, 1727, 1671 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.32-7.29 (m, 5H), 6.01 (s, 2H), 5.45 (s, 1H), 5.29 (s, 1H), 5.06 (s, 2H), 3.90 (t, 1H, J = 6.6 Hz), 3.82 (s, 2H), 2.97 (t, 2H, J = 3.5 Hz), 1.96-1.37 (m, 15H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.44, 168.56, 156.09, 136.29, 128.09, 127.63, 127.51, 81.84, 66.19, 54.54, 41.50, 32.11, 31.77, 28.51, 27.61, 22.37.

SM (FAB+) 393.3 (MH⁺).

1h: Ester N_α-carbobenzyloxy-2-amino-N_β-(3-methoxy-5-[1,2,4]thiadiazolyl amino)-L-propionylglycine *tert*-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 8. Une poudre orange pâle a été obtenue (Rdt = 19%).

IR ν_{\max} 1745, 1727, 1670 (C=O).

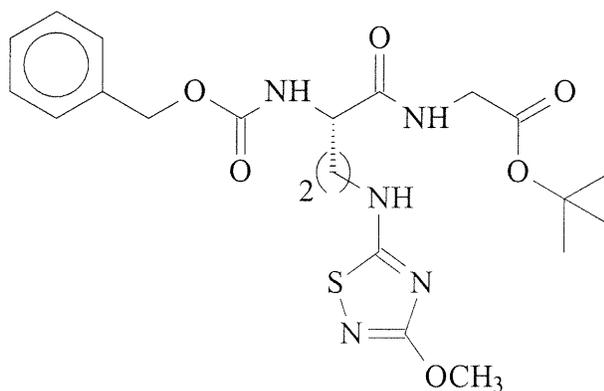
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.35-7.30 (m, 5H), 6.77 (s, 1H), 5.55 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.26 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 3.95 (s, 3H), 3.80 (s, 2H), 3.24 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 1.49 (s, 9H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 183.76, 170.91, 169.23, 168.16, 156.86, 136.47, 128.76, 128.37, 128.20, 82.54, 67.41, 56.35, 53.92, 46.54, 41.40, 27.24.

SM (FAB+) 466.2 (MH+).

pf (°C) 82.

2h: Ester N α -carbobenzyloxy-2-amino-N β -(3-methoxy-5-[1,2,4]thiadiazolyl amino)-L-butrylgycine *tert*-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 8. Une poudre orange pâle a été obtenue (Rdt = 21%).

IR ν_{\max} 1749, 1730, 1674 (C=O).

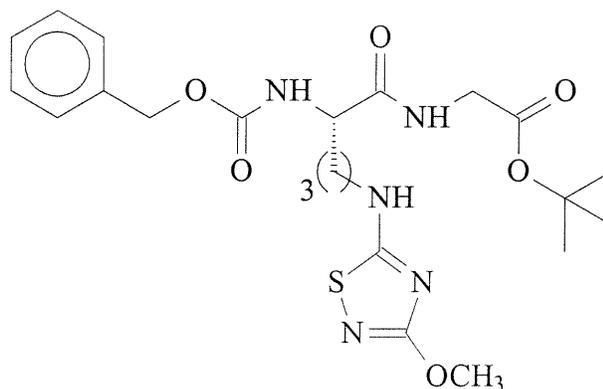
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.34 (m, 5H), 6.79 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.27 (t, 1H, J = 6.7 Hz), 3.96 (s, 3H), 3.80 (s, 2H), 3.24 (t, 2H, J = 4.5 Hz), 1.93-1.70 (m, 2H), 1.47 (s, 9H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 183.08, 172.19, 168.72, 167.88, 156.48, 136.06, 128.42, 128.05, 127.79, 81.90, 67.01, 55.88, 52.02, 41.88, 41.67, 31.92, 27.97.

SM (FAB+) 480.2 (MH⁺).

pf (°C) 126.

3h: Ester N α -carbobenzyloxy-N δ -(3-methoxy-5-[1,2,4]thiadiazolyl)-L-ornithinylglycine *tert*-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 8. Une poudre beige a été obtenue (Rdt = 26%).

IR ν_{\max} 1746, 1725, 1675 (C=O).

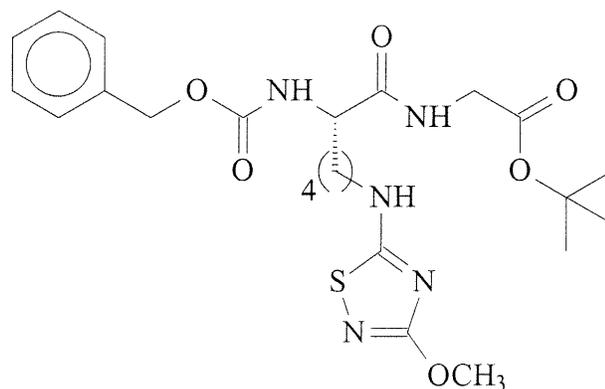
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.35-7.27 (m, 5H), 6.77 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 5.31 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.27 (t, 1H, J = 6.7 Hz), 3.98 (s, 3H), 3.82 (s, 2H), 3.25 (t, 2H, J = 4.0 Hz), 1.90-1.71 (m, 4H), 1.48 (s, 9H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 182.71, 172.47, 168.35, 167.90, 156.80, 136.57, 128.94, 128.61, 128.43, 81.79, 66.50, 55.45, 54.90, 44.76, 41.35, 30.65, 27.71, 26.46, 20.91.

SM (FAB+) 494.2 (MH⁺).

pf (°C) 90.

4h: Ester N α -carbobenzyloxy-N δ -(3-methoxy-5-[1,2,4]thiadiazolyl)-L-lysylglycine tert-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 8. Une poudre beige a été obtenue (Rdt = 25%).

IR ν_{\max} 1745, 1729, 1670 (C=O).

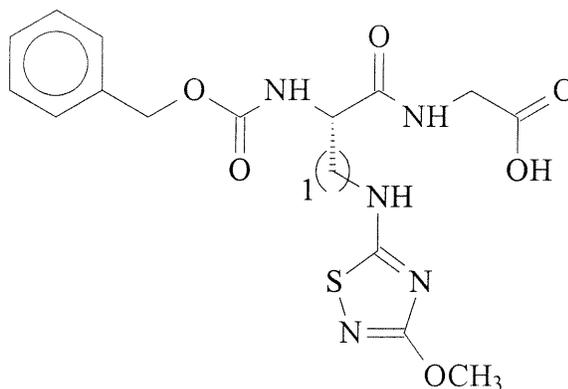
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.34-7.28 (m, 5H), 6.75 (s, 1H), 5.56 (s, 1H), 5.31 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.26 (t, 1H, J = 7.0 Hz), 3.97 (s, 3H), 3.84 (s, 2H), 3.13 (t, 2H, J = 3.9 Hz), 1.87-1.68 (m, 6H), 1.46 (s, 9H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 183.01, 172.51, 168.75, 168.14, 156.39, 136.19, 128.25, 127.84, 127.69, 81.71, 66.65, 55.74, 54.12, 44.85, 41.79, 29.44, 27.76, 24.71.

SM (FAB+) 508.1 (MH⁺).

pf (°C) 89.

1i: N_α-Carbobenzyloxy-2-amino-N_β-(3-methoxy-5-[1,2,4]thiadiazolylamino)-L-propionylglycine



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 3. Une poudre orange pâle a été obtenue (Rdt = 100%).

IR ν_{\max} 3306 (OH); 1745, 1704, 1671 (C=O).

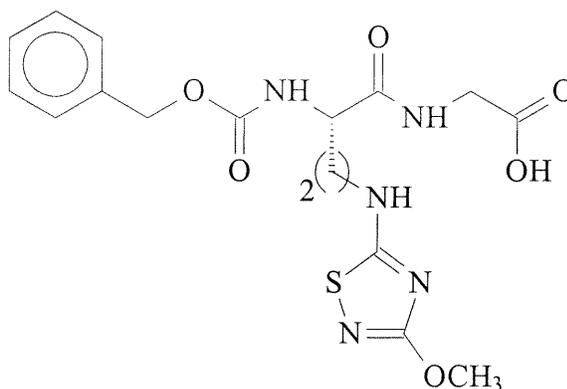
RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.36-7.31 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.17 (t, 1H, J = 6.9 Hz), 4.00 (s, 3H), 3.77 (s, 2H), 3.31 (d, 2H, J = 6.9 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 183.88, 174.53, 172.79, 161.12, 158.41, 138.00, 129.48, 129.17, 128.87, 67.97, 59.60, 53.77, 48.03, 41.87.

SM (FAB+) 410.2 (MH⁺).

pf (°C) 130.

2i: N α -Carbobenzyloxy-2-amino-N γ -(3-methoxy-5-[1,2,4]thiadiazolylamino)-L-butrylglycine



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 3. Une poudre jaune pâle a été obtenue (Rdt = 100%).

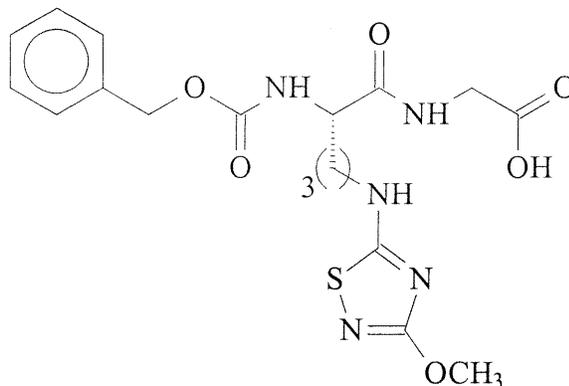
IR ν_{\max} 3310 (OH); 1750, 1701, 1674 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.37-7.32 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.15 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 4.01 (s, 3H), 3.75 (s, 2H), 3.28 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 1.53 (td, 2H, J = 6.8 Hz, J = 5.5 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 183.91, 174.56, 172.82, 161.01, 158.38, 137.91, 129.57, 129.15, 128.94, 67.99, 59.08, 48.50, 41.97, 31.98.

SM (FAB+) 424.2 (MH⁺).

pf (°C) 108.

3i: N α -Carbobenzyloxy-N δ -(3-methoxy-5-[1,2,4]thiadiazolyl)-L-ornithinyglycine

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 3. Une poudre beige a été obtenue (Rdt = 100%).

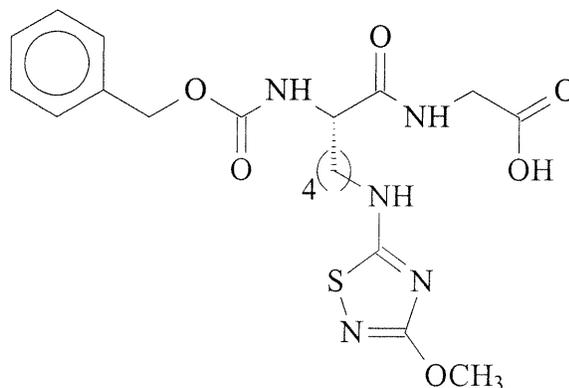
IR ν_{\max} 3308 (OH); 1743, 1699, 1669 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.39-7.33 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.18 (t, 1H, J = 6.9 Hz), 3.99 (s, 3H), 3.74 (s, 2H), 3.30 (t, 2H, J = 3.2 Hz), 1.71-1.50 (m, 4H).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 183.99, 175.17, 172.61, 160.51, 158.35, 138.06, 129.53, 129.08, 128.88, 67.80, 58.98, 55.80, 47.23, 41.84, 30.40, 25.61.

SM (FAB+) 438.2 (MH⁺).

pf (°C) 108.

4i: N_α-Carbobenzyloxy-N_ε-(3-methoxy-5-[1,2,4]thiadiazolyl)-L-lysylglycine

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 3. Une poudre beige a été obtenue (Rdt = 100%).

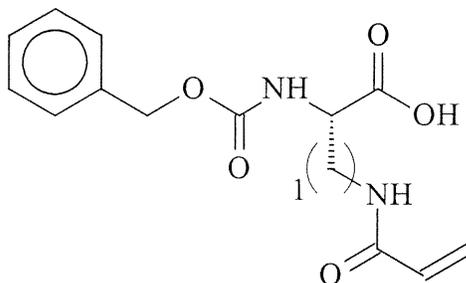
IR ν_{\max} 3301 (OH); 1749, 1700, 1665 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.36-7.30 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 4.16 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 3.96 (s, 3H), 3.31 (t, 2H, J = 3.3 Hz), 1.83-1.47 (m, 6H).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 184.01, 175.18, 172.65, 160.52, 158.36, 138.11, 129.55, 129.09, 128.89, 67.77, 59.05, 56.21, 47.66, 41.88, 32.79, 28.86, 23.85.

SM (FAB+) 452.2 (MH⁺).

pf (°C) 94.

1j: Acide N_α-carbobenzyloxy-L-2-amino-3-acryloylaminopropionique

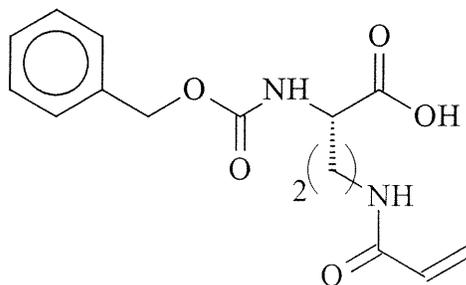
Ce composé a été préparé selon la procédure générale 9. Une huile jaune pâle a été obtenue (Rdt = 73%).

IR ν_{\max} 3310 (OH); 1746, 1690, 1663 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 9.93 (s, 1H), 7.30-7.26 (m, 5H), 7.03 (s, 1H), 6.21 (t, 1H, J = 8.1 Hz), 6.07 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 5.51 (s, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.27 (t, 1H, J = 5.3 Hz), 3.27 (d, 2H, J = 5.3 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.80, 167.65, 156.58, 136.07, 130.10, 128.49, 128.15, 127.98, 127.59, 67.09, 54.61, 41.32.

SM (FAB+) 293.1 (MH⁺).

2j: Acide N α -carbobenzyloxy-L-2-amino-4-acryloylaminobutyrique

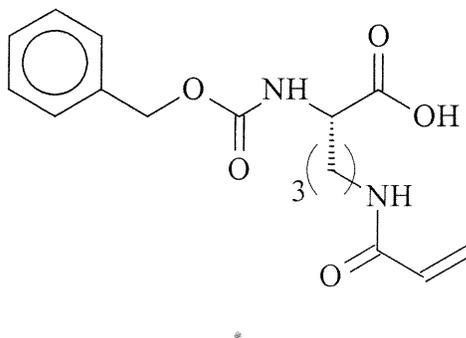
Ce composé a été préparé selon la procédure générale 9. Une huile orange pâle a été obtenue (Rdt = 80%).

IR ν_{\max} 3314 (OH); 1743, 1694, 1669 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 9.94 (s, 1H), 7.27-7.23 (m, 5H), 7.02 (s, 1H), 6.19 (t, 1H, J = 7.9 Hz), 6.05 (d, 2H, J = 7.9 Hz), 5.48 (s, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.27 (t, 1H, J = 4.8 Hz), 3.23 (t, 2H, J = 4.7 Hz), 2.11 (td, 2H, J = 4.8 Hz, J = 4.8 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 174.18, 167.01, 156.70, 136.10, 130.43, 128.44, 128.08, 127.84, 126.97, 66.97, 51.80, 36.07, 31.75.

SM (FAB+) 307.1 (MH⁺).

3j: Acide N α -carbobenzyloxy-L-2-amino-5-acryloylaminopentanoïque

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 9. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 83%).

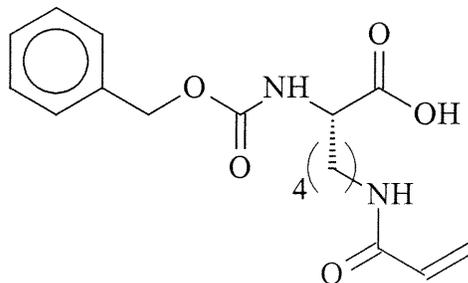
IR ν_{\max} 3310 (OH); 1744, 1691, 1668 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 9.95 (s, 1H), 7.30-7.26 (m, 5H), 7.01 (s, 1H), 6.17 (t, 1H, J = 8.1 Hz), 6.01 (d, 2H, J = 7.9 Hz), 5.50 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.25 (t, 1H, J = 4.8 Hz), 3.20 (t, 2H, J = 4.7 Hz), 1.75-1.35 (m, 4H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.08, 164.22, 153.94, 133.66, 128.05, 125.93, 125.57, 125.37, 124.25, 64.37, 51.03, 36.59, 26.99, 22.66.

SM (FAB+) 321.1 (MH⁺).

pf (°C) 60.

4j: Acide N α -carbobenzyloxy-L-2-amino-6-acryloylaminohexanoïque

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 9. Une poudre orange a été obtenue (Rdt = 90%).

IR ν_{\max} 3305 (OH); 1740, 1691, 1665 (C=O).

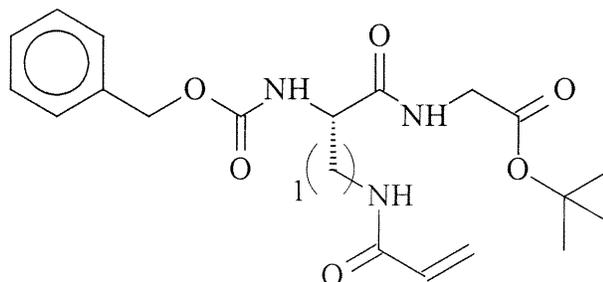
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 9.93 (s, 1H), 7.30–7.27 (m, 5H), 7.04 (s, 1H), 6.17 (t, 1H, J = 7.9 Hz), 6.02 (d, 2H, J = 7.9 Hz), 5.50 (s, 1H), 5.04 (s, 2H), 4.27 (t, 1H, J = 4.6 Hz), 3.21 (t, 2H, J = 4.5 Hz), 1.81-1.26 (m, 6H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 174.68, 166.51, 156.34, 136.08, 130.51, 128.34, 127.97, 127.77, 126.56, 66.77, 53.57, 39.11, 31.58, 28.44, 22.35.

SM (FAB+) 335.1 (MH⁺).

pf (°C) 65.

1k: Ester (N_α-carbobenzyloxy-L-2-amino-3-acryloylamino)propionylglycine *tert*-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 10. Une poudre beige a été obtenue (Rdt = 70%).

IR ν_{\max} 1753, 1739, 1657, 1648 (C=O).

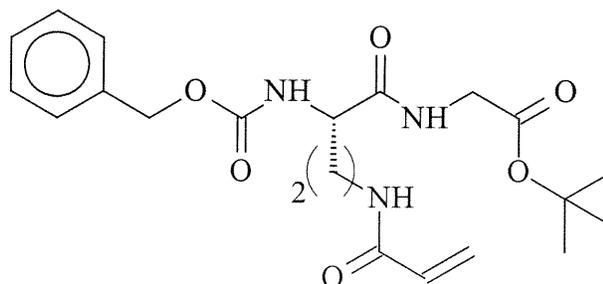
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.30-7.22 (m, 5H), 6.82 (s, 1H), 6.21 (t, 1H, J = 8.2 Hz), 6.09 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 5.49 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.19 (t, 1H, J = 5.7 Hz), 3.91 (s, 2H), 3.33 (d, 2H, J = 5.9 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 170.96, 168.80, 166.76, 156.35, 136.21, 130.75, 128.23, 128.06, 127.67, 126.18, 81.71, 66.57, 55.36, 41.26, 41.29, 27.77.

SM (FAB+) 406.2 (MH⁺).

pf (°C) 70.

2k: Ester (N_α-carbobenzyloxy-L-2-amino-4-acryloylamino)butyrylglycine tert-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 10. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 80%).

IR ν_{\max} 1759, 1746, 1664, 1651 (C=O).

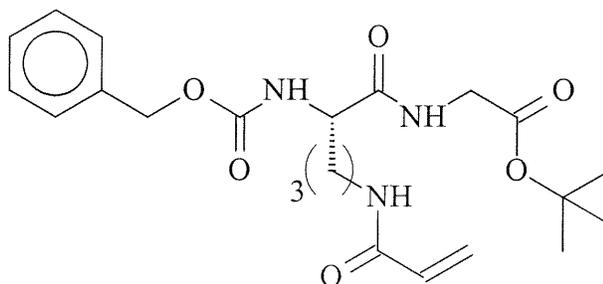
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.28-7.21 (m, 5H), 6.80 (s, 1H), 6.18 (t, 1H, J = 8.2 Hz), 6.09 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 5.48 (s, 1H), 5.45 (s, 1H), 5.00 (s, 2H), 4.18 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 3.89 (s, 2H), 3.30 (t, 2H, J = 6.1 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.14, 168.74, 166.47, 156.29, 136.23, 130.86, 128.38, 127.97, 126.19, 81.85, 66.74, 53.45, 41.94, 35.86, 27.91

SM (FAB+) 420.2 (MH⁺).

pf (°C) 120.

3k: Ester (N_α-carbobenzyloxy-L-2-amino-5-acryloylamino)pentanoylglycine tert-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 10. Une poudre jaune a été obtenue (Rdt = 85%).

IR ν_{\max} 1755, 1746, 1662, 1654 (C=O).

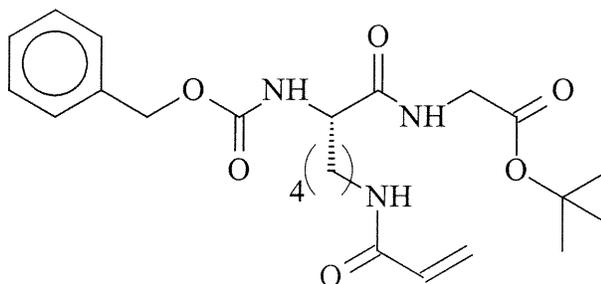
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.29-7.18 (m, 5H), 6.77 (s, 1H), 6.17 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 6.06 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 5.47 (s, 1H), 5.44 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.18 (t, 1H, J = 5.0 Hz), 3.80 (s, 2H), 3.24 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 1.75-1.27 (m, 13H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 170.20, 166.23, 163.59, 153.84, 133.73, 128.55, 125.76, 125.33, 125.21, 123.19, 79.12, 64.03, 51.63, 39.27, 35.94, 27.41, 25.29, 22.81.

SM (FAB+) 434.1 (MH⁺).

pf (°C) 84.

4k: Ester (N_{α} -carbobenzyloxy-L-2-amino-6-acryloylamino)hexanoylglycine tert-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 10. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 93%).

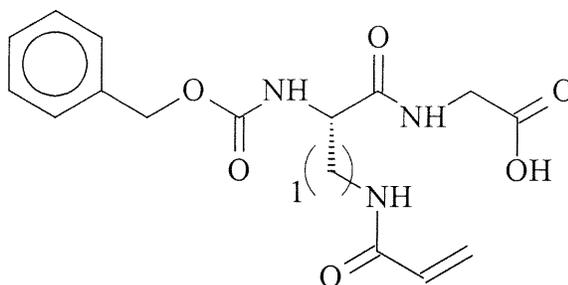
IR ν_{\max} 1752, 1745, 1660, 1652 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.30-7.19 (m, 5H), 6.78 (s, 1H), 6.17 (t, 1H, J = 8.1 Hz), 6.08 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 5.49 (s, 1H), 5.45 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.20 (t, 1H, J = 5.3 Hz), 3.80 (s, 2H), 3.26 (t, 2H, J = 6.2 Hz), 1.76-1.20 (m, 15H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.55, 168.67, 165.91, 156.34, 136.10, 130.93, 128.27, 127.88, 127.73, 125.78, 81.76, 66.62, 54.65, 41.76, 38.68, 31.82, 28.57, 27.80, 22.38.

SM (FAB+) 448.2 (MH⁺).

pf (°C) 116.

11: (N_α-Carbobenzyloxy-L-2-amino-3-acryloylamino)propionylglycine

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 11. Une poudre beige a été obtenue (Rdt = 100%).

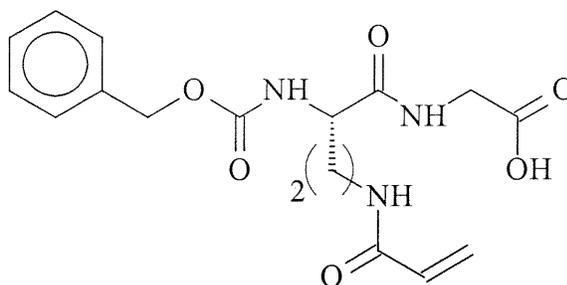
IR ν_{\max} 3318 (OH); 1745, 1689, 1658, 1649 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.35-7.28 (m, 5H), 6.17 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 5.55 (t, 1H, J = 8.1 Hz), 5.08 (s, 2H), 4.21 (t, 1H, J = 6.5 Hz), 3.72 (s, 2H), 3.21 (d, 2H, J = 6.6 Hz).

RMN¹³C(CD₃OD; 100 MHz) δ 173.10, 171.87, 168.90, 158.28, 137.98, 131.82, 129.64, 129.19, 128.99, 127.68, 67.96, 56.50, 42.13, 41.26.

SM (FAB+) 350.1 (MH⁺).

pf (°C) 115.

2l: (N_α-Carbobenzyloxy-L-2-amino-4-acryloylamino)butyrylglycine

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 11. Une poudre beige a été obtenue (Rdt = 100%).

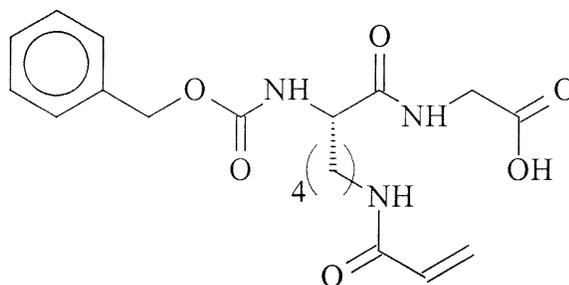
IR ν_{\max} 3311 (OH); 1749, 1692, 1660, 1651 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.34-7.29 (m, 5H), 6.19 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 5.60 (t, 1H, J = 8.3 Hz), 5.04 (s, 2H), 4.18 (t, 1H, J = 6.7 Hz), 3.72 (s, 2H), 3.20 (d, 2H, J = 6.5 Hz), 2.18 (td, 2H, J = 6.4 Hz, J = 6.6 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.00, 172.88, 168.60, 158.37, 137.99, 131.64, 129.62, 129.17, 128.96, 127.67, 67.93, 54.40, 42.03, 37.50, 32.86.

SM (FAB+) 364.2 (MH⁺).

pf (°C) 124.

4l: (N_α-Carbobenzyloxy-L-2-amino-6-acryloylamino)hexanoylglycine

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 11. Une poudre verte pâle a été obtenue (Rdt = 100%).

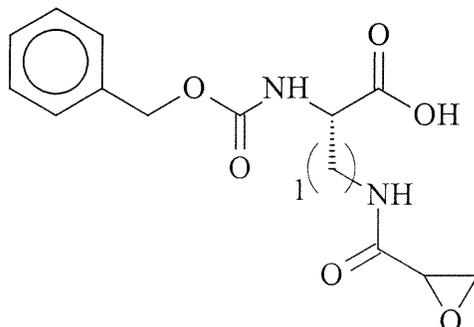
IR ν_{\max} 3310 (OH); 1745, 1690, 1660, 1650 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.36-7.30 (m, 5H), 6.22 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 5.64 (t, 1H, J = 8.4 Hz), 5.09 (s, 2H), 4.15 (t, 1H, J = 6.5 Hz), 3.72 (s, 2H), 3.26 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 1.90-1.40 (m, 6H).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.59, 171.67, 168.68, 158.33, 138.11, 131.20, 129.68, 129.22, 128.96, 128.33, 67.81, 56.51, 42.06, 40.74, 32.96, 29.71, 24.17,.

SM (FAB+) 392.4 (MH+).

pf (°C) 116.

1m: Acide N α -carbobenzyloxy-L-2-amino-3-(oxiranecarbonylamino)propionique

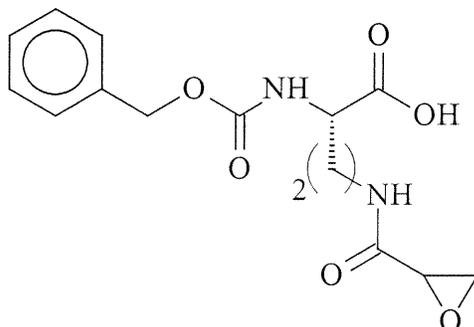
Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une huile jaune pâle a été obtenue (Rdt = 100%).

IR ν_{\max} 3340 (OH); 1750, 1700, 1686 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.33-7.29 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.21 (t, 1H, J = 6.9 Hz), 3.33 (t, 1H, J = 4.7 Hz), 3.25 (d, 2H, J = 7.1 Hz), 2.80 (d, 2H, J = 4.6 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 173.43, 172.08, 158.45, 138.04, 129.57, 129.12, 128.94, 67.83, 55.15, 49.99, 47.64, 41.25.

SM (FAB+) 309.1 (MH⁺).

2m: Acide N_α-carbobenzyloxy-L-2-amino-4-(oxiranecarbonylamino)butyrique

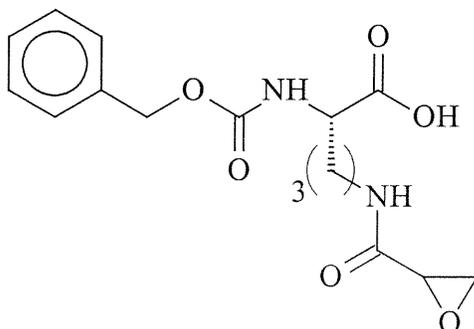
Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une huile orange pâle a été obtenue (Rdt = 100%).

IR ν_{\max} 3330 (OH); 1743, 1690, 1681 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.35-7.32 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 4.20 (t, 1H, J = 7.0 Hz), 3.34 (t, 1H, J = 4.6 Hz), 3.28 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 2.85 (d, 2H, J = 4.6 Hz), 2.09 (td, 2H, J = 7.0 Hz, J = 7.1 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.52, 171.66, 171.58, 158.61, 138.08, 129.63, 129.16, 128.93, 67.86, 53.13, 50.14, 47.74, 36.94, 32.16.

SM (FAB+) 323.1 (MH+).

3m: Acide N α -carbobenzyloxy-L-2-amino-5-(oxiranecarbonylamino)pentanoïque

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une poudre beige a été obtenue (Rdt = 100%).

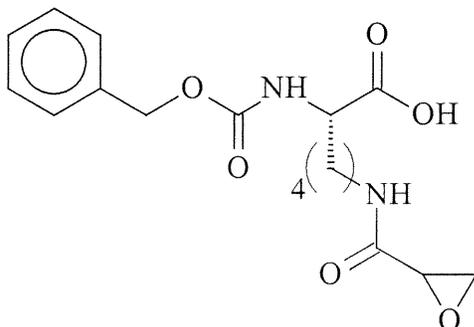
IR ν_{\max} 3332 (OH); 1741, 1698, 1683 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.37-7.29 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.21 (t, 1H, J = 7.1 Hz), 3.36 (t, 1H, J = 4.8 Hz), 3.26 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.86 (d, 2H, J = 4.7 Hz), 1.85-1.42 (m, 4H).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 176.18, 171.62, 158.70, 137.98, 129.72, 129.28, 128.98, 67.90, 55.19, 50.17, 47.85, 39.70, 30.03, 26.79.

SM (FAB+) 337.1 (MH+).

pf (°C) 102.

4m: Acide N_α-carbobenzyloxy-L-2-amino-6-(oxiranecarbonylamino)hexanoïque

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 100%).

IR ν_{\max} 3312 (OH); 1744, 1701, 1689 (C=O).

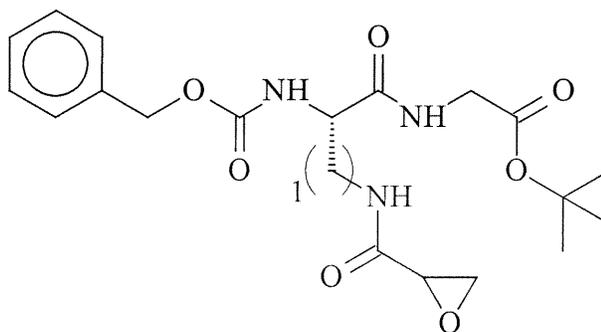
RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.37-7.27 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 4.22 (t, 1H, J = 7.0 Hz), 3.33 (t, 1H, J = 4.9 Hz), 3.25 (t, 2H, J = 6.9 Hz), 2.82 (d, 2H, J = 4.9 Hz), 1.85-1.38 (m, 6H).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.36, 171.70, 158.34, 138.13, 129.58, 129.13, 128.94, 67.78, 56.32, 50.03, 47.51, 39.82, 32.96, 29.91, 23.97.

SM (FAB+) 351.2 (MH+).

pf (°C) 95.

1n: Ester (N_α-carbobenzyloxy-L-2-amino-3-(oxiranecarbonylamino))propionyl glycine *tert*-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 100%).

IR ν_{\max} 1761, 1748, 1680, 1663 (C=O).

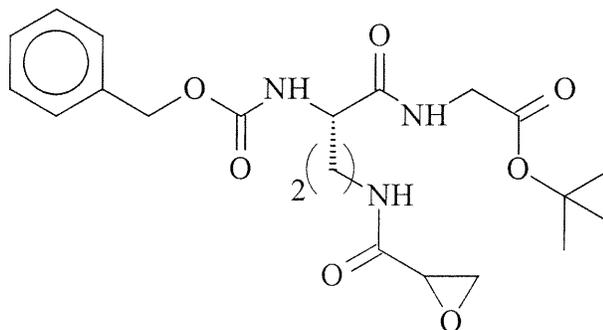
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.35-7.30 (m, 5H), 6.80 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.10 (t, 1H, J = 7.0 Hz), 3.84 (s, 2H), 3.46 (t, 1H, J = 4.5 Hz), 3.02 (d, 2H, J = 7.1 Hz), 2.79 (d, 2H, J = 4.6 Hz), 1.48 (s, 9H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 170.96, 168.96, 168.80, 156.46, 136.19, 128.41, 128.02, 127.86, 82.03, 66.88, 49.22, 46.96, 41.98, 41.87, 27.91, 27.68.

SM (FAB+) 422.2 (MH⁺).

pf (°C) 80.

**2n: Ester (N_α-carbobenzyloxy-L-2-amino-4-(oxiranecarbonylamino))butyryl
glycine *tert*-butylé**



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une poudre blanche a été obtenue (Rdt = 100%).

IR ν_{\max} 1752, 1747, 1684, 1675 (C=O).

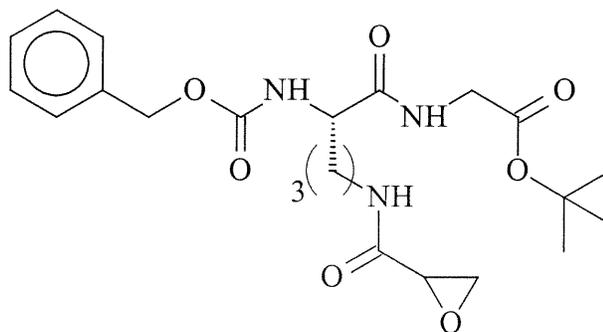
RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.34-7.29 (m, 5H), 6.79 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.10 (t, 1H, J = 7.0 Hz), 3.84 (s, 2H), 3.45 (t, 1H, J = 4.6 Hz), 3.08 (d, 2H, J = 7.1 Hz), 2.77 (d, 2H, J = 4.6 Hz), 1.90 (td, 2H, J = 7.0 Hz, J = 7.1 Hz), 1.46 (s, 9H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 171.96, 169.84, 168.71, 156.34, 136.21, 128.41, 128.02, 127.83, 81.98, 66.84, 52.21, 49.34, 47.15, 41.93, 35.45, 32.97, 27.93.

SM (FAB+) 436.2 (MH⁺).

pf (°C) 118.

3n: Ester (N_α-carbobenzyloxy-L-2-amino-5-(oxiranecarbonylamino))pentanoyl
glycine *tert*-butylé



Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une huile jaune foncée a été obtenue (Rdt = 100%).

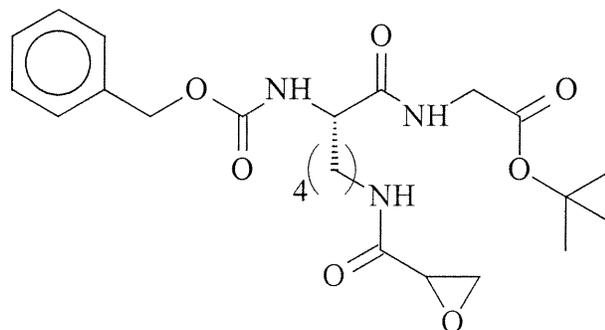
IR ν_{\max} 1755, 1745, 1680, 1672 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.35-7.30 (m, 5H), 6.79 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.11 (t, 1H, J = 7.1 Hz), 3.84 (s, 2H), 3.46 (t, 1H, J = 4.5 Hz), 3.10 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.79 (d, 2H, J = 4.5 Hz), 1.90-1.41 (m, 13H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 173.06, 169.36, 170.30, 156.35, 136.10, 128.55, 128.10, 127.94, 82.86, 67.76, 55.95, 49.99, 47.50, 42.83, 39.49, 30.63, 28.41, 26.73.

SM (FAB+) 450.3 (MH⁺).

**4n: Ester (N_α-carbobenzyloxy-L-2-amino-6-(oxiranecarbonylamino))hexanoyl
glycine *tert*-butylé**



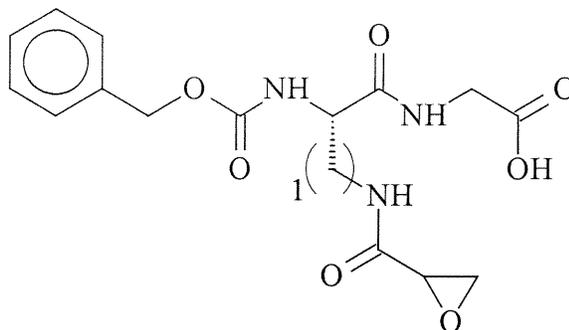
Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une huile orange pâle a été obtenue (Rdt = 100%).

IR ν_{\max} 1760, 1749, 1682, 1667 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.33-7.29 (m, 5H), 6.81 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.15 (t, 1H, J = 7.0 Hz), 3.83 (s, 2H), 3.42 (t, 1H, J = 4.6 Hz), 3.09 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.82 (d, 2H, J = 4.6 Hz), 1.87-1.35 (m, 15H).

RMN¹³C (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.38, 168.79, 168.64, 156.24, 136.09, 128.25, 127.87, 127.72, 81.84, 66.66, 54.43, 49.21, 47.05, 41.75, 38.21, 31.80, 28.50, 27.76, 22.26.

SM (FAB+) 464.4 (MH⁺).

1o: (N_α-Carbobenzyloxy-L-2-amino-3-(oxiranecarbonylamino))propionylglycine

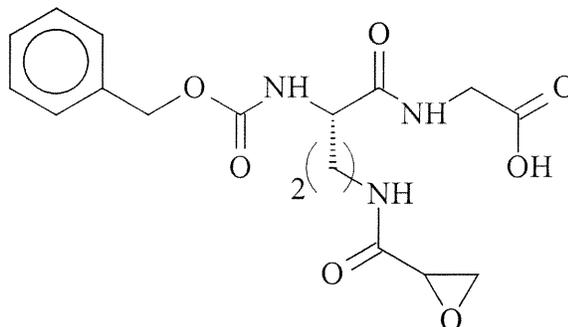
Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une huile jaune pâle a été obtenue (Rdt = 100%).

IR ν_{\max} 3320 (OH); 1751, 1718, 1682, 1660 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.39-7.33 (m, 5H), 5.13 (s, 2H), 4.11 (t, 1H, J = 6.6 Hz), 3.81 (s, 2H), 3.35 (t, 1H, J = 4.6 Hz), 3.20 (d, 2H, J = 6.6 Hz), 2.79 (d, 2H, J = 4.6 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 172.86, 172.10, 171.79, 158.24, 137.99, 129.62, 129.20, 129.06, 67.97, 52.95, 50.11, 47.74, 42.07, 41.18.

SM (FAB+) 366.1 (MH+).

2o: (N_α-Carbobenzyloxy-L-2-amino-4-(oxiranecarbonylamino))butyrylglycine

Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une poudre jaune pâle a été obtenue (Rdt = 100%).

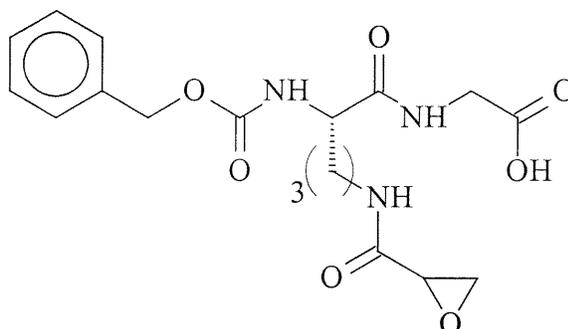
IR ν_{\max} 3333 (OH); 1750, 1717, 1686, 1674 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.38-7.32 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.13 (t, 1H, J = 6.7 Hz), 3.79 (s, 2H), 3.28 (t, 1H, J = 4.5 Hz), 3.23 (d, 2H, J = 6.6 Hz), 2.81 (d, 2H, J = 4.6 Hz), 2.12 (td, 2H, J = 6.5 Hz, J = 6.5 Hz).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 174.82, 171.76, 171.56, 158.34, 138.03, 129.57, 129.13, 128.97, 67.90, 54.12, 50.06, 47.59, 41.96, 36.80, 32.95.

SM (FAB+) 380.2 (MH⁺).

pf (°C) 111.

3o: (N $_{\alpha}$ -Carbobenzyloxy-L-2-amino-5-(oxiranecarbonylamino))pentanoylglycine

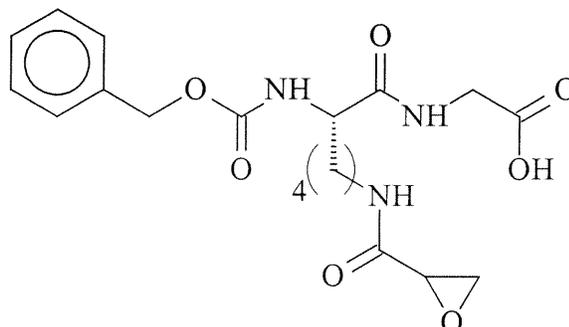
Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une huile jaune foncée a été obtenue (Rdt = 100%).

IR ν_{\max} 3335 (OH); 1745, 1725, 1677, 1669 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.35-7.30 (m, 5H), 5.08 (s, 2H), 4.15 (t, 1H, J = 6.5 Hz), 3.82 (s, 2H), 3.39 (t, 1H, J = 4.2 Hz), 3.19 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 2.88 (d, 2H, J = 4.3 Hz), 1.89-1.35 (m, 4H).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.26, 171.78, 171.44, 158.35, 138.07, 129.58, 129.14, 128.95, 67.81, 55.97, 50.05, 47.58, 42.04, 41.94, 30.63, 26.67.

SM (FAB+) 394.2 (MH+).

4o: (N $_{\alpha}$ -Carbobenzyloxy-L-2-amino-6-(oxiranecarbonylamino))hexanoylglycine

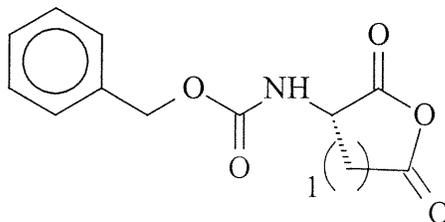
Ce composé a été préparé selon la procédure générale 12. Une huile jaune pâle a été obtenue (Rdt = 100%).

IR ν_{\max} 3340 (OH); 1750, 1720, 1680, 1670 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.36-7.33 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.15 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 3.80 (s, 2H), 3.32 (t, 1H, J = 4.3 Hz), 3.20 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 2.78 (d, 2H, J = 4.5 Hz), 1.92-1.37 (m, 6H).

RMN¹³C (CD₃OD; 100 MHz) δ 175.36, 171.70, 171.18, 158.34, 138.13, 129.58, 129.13, 128.94, 67.78, 56.32, 50.03, 47.51, 41.93, 39.82, 32.96, 29.91, 23.97.

SM (FAB+) 410.2 (MH⁺).

5: Anhydride carbobenzyloxy-L-aspartique

2,67 g d'acide carbobenzyloxy-L-aspartique (10 mmol) ont été dissous dans 300 mL d'anhydride acétique. Le mélange réactionnel est chauffé à 55 °C pendant 1 heure. Après évaporation de l'anhydride acétique, l'huile obtenue est solubilisée dans un minimum de CH₂Cl₂ et précipitée par ajout d'hexane. Après filtration, 2,71 g d'un solide blanc sont recueillis (Rdt = 92%).

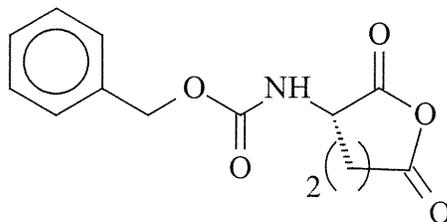
IR ν_{\max} 1800, 1750 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.33 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 4.57 (t, 1H, J = 9,2 Hz), 2.87 (d, 2H, J = 9,0 Hz).

RMN¹³C(CD₃OD; 100 MHz) δ 176.32, 174.26, 158.63, 138.09, 129.55, 129.09, 128.86, 67.76, 54.79, 31.07.

SM (FAB+) 250.1 (MH+).

pf (°C) 128.

6: Anhydride carbobenzyloxy-L-glutamique

2,81 g d'acide carbobenzyloxy-L-aspartique (10 mmol) ont été dissous dans 300 mL d'anhydride acétique. Le mélange réactionnel est chauffé à 55 °C pendant 1 heure. Après évaporation de l'anhydride acétique, l'huile obtenue est solubilisée dans un minimum de CH₂Cl₂ et précipité par ajout d'hexane. Après filtration, 2,93 g d'un solide blanc sont recueillis (Rdt = 90%).

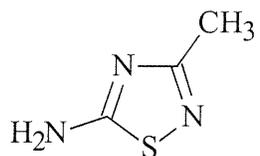
IR ν_{\max} 1800, 1750 (C=O).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 7.34 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.56 (t, 2H, J = 9,2 Hz), 2.95 (t, 2H, J = 3,9 Hz), 2.10(td, 2H, J = 3,8 Hz, J = 9,2 Hz).

RMN¹³C(CD₃OD; 100 MHz) δ 176.28, 174.23, 158.59, 138.07, 129.51, 129.05, 128.83, 67.74, 54.78, 31.05, 27.93.

SM (FAB+) 264.1 (MH+).

pf (°C) 97.

7: 5-amino-3-méthyl-1,2,4-thiadiazole

12,29 g d'hydrochlorure d'acétamidine (130 mmol) sont dissous dans 150 mL d'eau. Le mélange réactionnel est refroidit à 0 °C, avant l'introduction goutte à goutte de 184 mL d'hypochlorite de sodium 0,705 M (130 mmol) sur une période de 90 minutes. Une fois l'addition terminée, le mélange réactionnel est agité pendant une heure à 0 °C. Ensuite, la phase aqueuse est saturée avec du NaCl et le produit désiré (l'acétamide) est extrait de la phase aqueuse avec de l'acétate d'éthyle (3 × 250 mL). Après séchage sur MgSO₄, la phase organique est filtrée et évaporée sous vide. 9,86 g d'un solide blanc (l'acétamide) sont obtenus (Rdt = 82%).

Ensuite, à 9,25 g d'acétamide (100 mmol) dans 500 mL de méthanol sont ajoutés, à 0 °C, 9,72 g de thiocyanate de potassium (100 mmol). La solution est agitée pendant une nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est évaporé sous vide et le solide obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle. Le précipité obtenu est filtré pour ensuite évaporer le filtrat sous vide. 11,23 g d'une poudre rose ont été recueillis (Rdt = 98%).

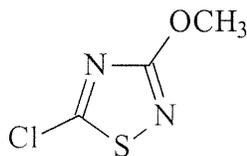
IR ν_{\max} 3250 (N-H), 2050 (N=C-S), 1650 (C=N).

RMN¹H (CD₃OD; 400 MHz) δ 2.20 (s, 3H).

RMN¹³C(CD₃OD; 100 MHz) δ 169.94, 133.80, 18.48.

SM (FAB+) 116.1 (MH+).

pf (°C) 68.

8: 5-chloro-3-méthoxy-1,2,4-thiadiazole

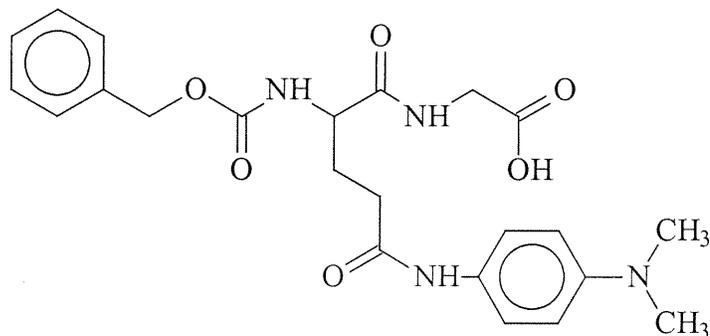
3,44 g de méthylisourée hydrogénosulfate (20 mmol) sont solubilisés dans 50 mL de CH_2Cl_2 . 2,30 mL de perchlorométhylmercaptopan (20 mmol) sont additonnés à la solution qui a été préalablement refroidie à $-4\text{ }^\circ\text{C}$. Ensuite, une solution aqueuse de NaOH (4 g / 14 mL d'eau) est ajoutée goutte à goutte pendant 1 heure en agitant fortement le mélange réactionnel à $-4\text{ }^\circ\text{C}$. Une fois l'addition terminée, le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 heures. Ensuite, la phase organique est décantée et lavée avec une solution saturée de NaCl ($3 \times 50\text{ mL}$). Après séchage sur MgSO_4 , la phase CH_2Cl_2 est filtrée et évaporée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie avec un mélange hexane/acétate d'éthyle (95/5) comme éluant. 1,25 g d'une huile jaune est obtenue (Rdt = 42%).

IR ν_{max} 2048 (N=C-S), 1665 (C=N).

RMN¹H (CDCl_3 ; 400 MHz) δ 4.04 (s, 3H).

RMN¹³C (CD_3OD ; 100 MHz) δ 173.20, 169.47, 56.84.

SM (FAB+) 151.1 (MH+).

9: Z-L-glutamyl(γ -4-diméthylaminoanilide)glycine

À température ambiante, 1 g d'anhydride Z-L-glutamique (3,80 mmol) est additionné à une solution de 0,66 g de DMPDA (3,80 mmol) dans 5,30 mL de triéthylamine (38,0 mmol) et 25 mL de DMSO. Après 3 heures, une solution de 0,73 g de EDC (3,80 mmol) dans 25 mL de CH_2Cl_2 est ajoutée au mélange réactionnel. Après 15 minutes, 0,64 g d'ester de glycine *tert*-butylé (3,80 mmol) est introduit dans le mélange qui est agité pendant une nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est évaporé et le résidu est repris dans le CH_2Cl_2 . La fonction ester *tert*-butylée est déprotégée après agitation de la solution CH_2Cl_2 avec de la silice à 50 °C pendant 48 heures. Après filtration de la silice et évaporation de la solution, le résidu est purifié par chromatographie avec un mélange dichlorométhane/méthanol (95/5) comme éluant donnant ainsi 410 mg d'un solide foncé (Rdt = 24%).

IR ν_{max} 1695, 1660, 1510 (C=O).

RMN¹H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9.12 (s, 1H), 7.45 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.36 (m, 5H), 6.66 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz), 5.84 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 5.05 (s, 2H), 3.26 (t, 1H, $J = 7.0$

Hz), 2.89 (s, 2H), 2.88 (s, 6H), 1.38 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 1.16 (td, 2H, $J = 7.2$ Hz, $J = 7.1$ Hz).

RMN¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 170.51, 156.56, 147.49, 136.04, 128.42, 128.32, 128.24, 128.11, 127.84, 127.66, 121.60, 112.73, 66.62, 53.92, 49.79, 45.73, 35.36, 29.05.

SM (FAB+) 457 (MH⁺).

7.2. Purification de la TGase provenant du foie du cochon d'Inde

7.2.1 Matériels

Les foies de cochon d'Inde utilisés ont été obtenus de Merck Frosst (Pointe-Claire, Dorval, Canada), par l'intermédiaire de S. Rowland. La Z-L-Gln-Gly, l'EDTA, le sucrose et le chlorure de fer ont été obtenus de Aldrich. Le chlorure d'hydroxylamine, l'acide trifluoroacétique, le chlorure de potassium et le chlorure de calcium proviennent de Anachemia. Le tampon Tris, la trousse de dosage de protéines Bio-Rad DC Protein Assay et les supports Macro-Prep DEAE et Bio-Gel A-0.5m ont été achetés chez Bio-Rad. Le sulfate de protamine de saumon (grade X), le sulfate d'ammonium (grade SigmaUltra), et la protéine BSA ont été obtenus de Sigma. Toutes les solutions aqueuses ont été préparées en utilisant de l'eau préalablement purifiée et déionisée par un système Millipore BioCell. Toutes les étapes de purification de l'enzyme ont été effectuées à 4 °C ou sur de la glace. Les chromatographies ont été faites avec l'appareil Bio-Rad Econo Chromatography System. Un homogénéisateur Polytron PT 3000 de Brinkmann Instruments a été utilisé pour les étapes impliquant des homogénisations. Les différentes centrifugeuses utilisées sont décrites dans le texte. La lyophilisation a été effectuée avec un lyophilisateur de modèle Labconco Freeze Dry System / Freezone 4.5.

7.2.2 Méthodes de dosage

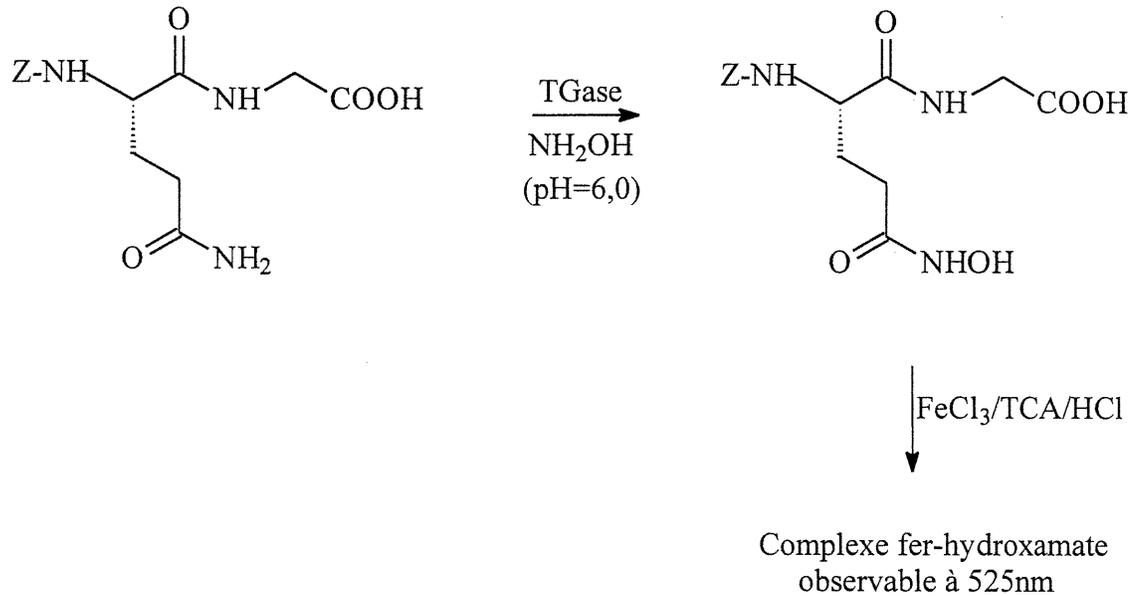
7.2.2.1. Concentration de protéines

La concentration totale de protéines présentes en solution a été déterminée à partir de la méthode de Lowry (70) en utilisant la trousse Bio-Rad DC Protein Assay et la protéine BSA comme étalon. Ce test colorimétrique a lieu sur une période de 15 minutes et les absorbances de chaque échantillon sont mesurées avec un

spectrophotomètre Milton-Roy Spectronic 1201 à $\lambda = 740\text{nm}$. La méthode de Lowry a été utilisée pour toutes les étapes de la purification, jusqu'à la chromatographie d'exclusion de taille exclusivement. Après la dernière colonne, l'enzyme étant pure, le dosage en protéine se fait par une mesure directe de l'absorbance de l'enzyme à 280 nm en utilisant le coefficient d'extinction molaire de la TGase ($\epsilon=1,58 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

7.2.2.2. Activité de la TGase

L'activité de la TGase est mesurée par le dosage colorimétrique de formation d'un complexe fer-hydroxamate observable à $\lambda = 525\text{nm}$ (47). Le test consiste en la réaction de la Z-L-Gln-Gly 30 mM et l'hydroxylamine 0,1 M en présence de EDTA 1 mM, CaCl_2 5 mM et du tampon Tris-acétate (pH = 6,0) 0,2 M dans un volume total de 400 μL . La réaction est déclenchée par l'ajout de 100 μL d'une solution aqueuse d'enzyme (l'enzyme est diluée de manière à ce que les absorbances lues à 525 nm sont dans un intervalle entre 0,2 et 0,8 unité d'absorbance). L'enzyme catalyse cette réaction qui se termine au bout de 10 minutes d'incubation à 37 °C, après l'ajout de 500 μL d'une solution de 1,7% FeCl_3 /5% TCA/0,83 M HCl (voir figure 30). L'absorbance est ensuite mesurée à 525 nm avec un spectrophotomètre Milton-Roy 1201. Un blanc, c'est-à-dire un test sans TGase, est effectué dans les mêmes conditions. L'activité est calculée à partir du coefficient d'extinction molaire du complexe formé, soit la Z-L-glutamyl(γ -hydroxamate)glycine avec l'ion Fe^{3+} , à 525 nm: $\epsilon= 340 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Figure 30: Test d'activité colorimétrique de la TGase

7.2.2.3. Définition d'une unité d'activité pour l'enzyme

Une unité d'activité (U) d'enzyme correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser la formation de 1 μmol de Z-L-glutamyl(γ -hydroxamate)glycine sur une période de 1 minute. D'autre part, l'activité spécifique (U/mg) de l'enzyme correspond à l'activité par mg de protéine totale.

7.2.3 Procédures pour la purification

Étape 1: Homogénéisation des foies

Dès leur réception, les foies de cochon d'Inde, en portion de 50 g, sont homogénéisés avec une solution de sucrose 0,25 M (2,5 mL/g de foie) à 15 000 rpm pendant 90 secondes. L'homogénat est ensuite centrifugé à 3000 rpm (1962 \times g) pendant une heure avec une centrifugeuse Beckman GS-6R, rotor GH-3,8 et le surnageant est filtré à travers 8 couches de «cheese cloth» de Veratec. Le surnageant

filtré est séparé en portions de 50-75 mL et peut être congelé si la prochaine étape de purification n'est pas prévue pour le moment.

Note: Afin d'avoir une activité en TGase optimale, l'homogénéisation des foies doit se faire dans les trois jours suivant la mort du cobaye.

Étape 2: Chromatographie échangeuse d'ions.

Des fractions de 50 mL de surnageant représentant environ 35 g de foie sont déposées l'une après l'autre sur une colonne de 50 mL contenant du gel Macro-Prep DEAE en présence de deux tampons comme éluants en mode gradient:

Tampon A (pH = 7,5): Tris-Cl 5 mM, EDTA 2 mM;

Tampon B (pH = 7,5): Tris-Cl 5 mM, EDTA 2 mM, NaCl 1 M.

À un débit de 5 mL/min, le système de chromatographie a été programmé de la façon suivante:

- 1) élution pendant 15 minutes de tampon A;
- 2) dépôt de 50 mL de surnageant;
- 3) élution de la colonne en mode gradient (de 0 à 100% de tampon B dans A) pendant 110 minutes;
- 4) régénération de la colonne pendant 20 minutes avec 100% de tampon A.

Étape 3: Précipitation et extraction de la TGase

Après que la chromatographie échangeuse d'ions ait été terminée, il faut combiner les fractions ayant des activités spécifiques égales ou supérieures à 1,8 U/mg. La TGase est précipitée avec l'ajout goutte à goutte d'une solution de protamine 1% (m/v) sur une période de 15 minutes tout en agitant la solution d'enzyme. Il a été déterminé que le volume de sulfate de protamine à ajouter correspond à 12-15% du volume totale de la solution d'enzyme. L'étape de précipitation est suivie d'une centrifugation (centrifugeuse Beckman L-70, rotor 45 Ti) à 11 200 rpm ($14557 \times g$) pendant 15 minutes. Après la centrifugation, l'enzyme est dans le culot. Aucune activité ne doit être trouvée dans le surnageant. Les culots de chaque fraction sont combinés et lavés par homogénéisation pendant 1 minute à

2000 rpm avec 7,5 mL de tampon Tris-acétate 0,2M (pH=6,0). Les suspensions sont centrifugées (centrifugeuse Beckman GS-6R, rotor GH-3,8) à 4000 rpm (3488 × g) pendant 5 minutes.

La TGase est extraite du culot en faisant 3 extractions (triturations du solide) avec 11, 9 et 7 mL respectivement de NH_4SO_4 0,05M dans du tampon A. Chacune des extractions implique 3 homogénéisations de 30 secondes à 2000 rpm. Un intervalle d'une minute entre chaque homogénéisation est nécessaire afin de refroidir l'homogénat sur de la glace. L'homogénat est ensuite centrifugé (centrifugeuse Beckman GS-6R, rotor GH-3,8) à 4000 rpm (3488 × g) pendant 10 minutes pour récupérer le culot. À ce stade, le surnageant est riche en TGase et on poursuit les extractions sur le culot résiduel, afin d'en extraire le maximum de TGase. Les surnageants sont combinés et le volume final est réduit par centrifugation avec les tubes Amicon Centri-Prep 30 ayant un filtre pour masse moléculaire de 30 kDa. Cette étape de concentration est faite avec la centrifugeuse Beckman GS-6R, rotor GH-3,8 à 4000 rpm (3488 × g). Pour la colonne d'exclusion de taille, il faut un échantillon de volume entre 1 et 4 mL. Quelques heures sont nécessaires pour atteindre le volume désiré.

Étape 4: Chromatographie d'exclusion de taille et lyophilisation

La solution d'enzyme concentrée est déposée sur une colonne à exclusion de taille de 250 mL ayant un support de type Bio-Gel A-0,5m à fine mèche. L'élution se fait à un débit de 0,50 mL/min en mode isocratique avec un tampon Tris-acétate 10 mM (pH = 6,0) contenant 1 mM de EDTA et 0,16 M de KCl. Le système de chromatographie a été opéré de la façon suivante:

- 1) Injection manuelle de la solution d'enzyme concentrée;
- 2) Éluion avec le tampon pendant 400 minutes.

À partir du chromatogramme, il est possible de cribler les fractions ayant le plus de TGase en faisant des tests d'activité. Des tests de concentration sont faits sur les fractions ayant le plus d'activité. À cette étape, le test de concentration consiste à

mesurer directement l'absorbance de la fraction à 280 nm, sachant que le coefficient d'extinction de la TGase à cette longueur d'onde est égal à $1,58 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Les fractions possédant une haute activité spécifique (ex: 15,0-25,0 U/mg) sont combinées en un volume final. La solution finale est ensuite divisée en aliquots de 1 mL dans des tubes Eppendorf qui sont congelés sur de la glace sèche. Ces échantillons sont lyophilisés sous vide à une température de $-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à ce qu'il ne reste plus aucune trace d'eau. Finalement, les tubes Eppendorf sont entreposés dans un congélateur à $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.3. Développement d'une méthode continue de suivi cinétique par spectrophotométrie

7.3.1 Matériels

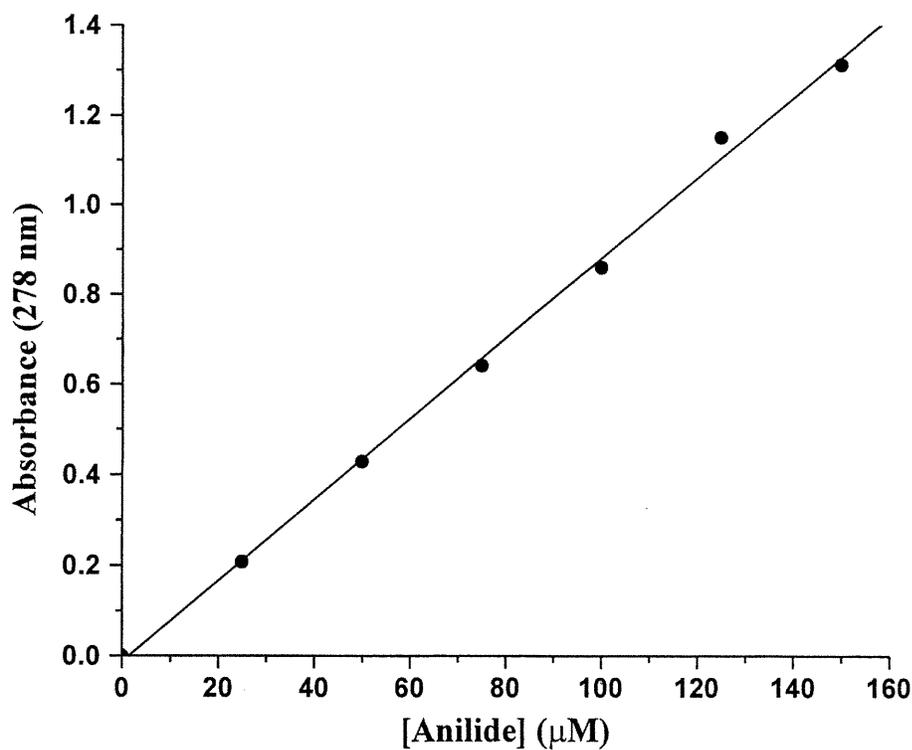
La TGase utilisée pour ces expériences a été obtenue tel que décrit au chapitre 3. Le substrat accepteur DMPDA a été acheté de Sigma-Aldrich sous la forme d'un sel d'acide chlorhydrique. L'eau utilisée pour toutes les manipulations fut préalablement purifiée par un système Millipore BioCell. Les études cinétiques ont été faites à partir d'un spectrophotomètre Varian Cary 100. Les réactions enzymatiques ont eu lieu dans des cuvettes en quartz de 1 cm de largeur et à $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Les différentes solutions ont été préparées dans l'eau.

7.3.2 Procédures pour le test d'activité de la TGase selon la méthode développée

Une solution tampon a été préparée en combinant 12 mL d'une solution Tris-acétate 1 M (pH = 7,0), 3 mL de CaCl_2 0,1 M, 3 mL d'EDTA 0,02 M et 48 mL d'eau. À 340 μL de la solution tampon est ajouté 4 μL de DMPDA 100 mM, 75 μL de Z-L-Gln-Gly 100 mM et 61 μL d'eau. Après une préincubation de 3 minutes à $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, la réaction enzymatique est déclenchée par l'addition de 20 μL de TGase (0,2 unité)

donnant ainsi un volume final de 500 μL . Toutes les expériences ont été faites en parallèle avec un blanc où les 20 μL de TGase ont été substitués par 20 μL d'eau. Le calcul de la vitesse initiale (ordre zéro) de la réaction se fait dans les premiers 10% de la réaction en prenant la valeur de la pente du profil de la réaction enzymatique (cf. figure 22) et en divisant par le coefficient d'extinction molaire ϵ de l'anilide formé soit le Z-L-glutamyl(γ -4-diméthylaminoanilide)glycine. Pour déterminer la valeur de ϵ , il a fallu préalablement synthétiser par voie chimique la Z-L-glutamyl(γ -4-diméthylaminoanilide)glycine (cf. section 7.1.3, page 92). Ensuite, une droite de Beer-Lambert ($A = \epsilon lc$) a été tracée (cf. figure 31), afin d'établir la valeur de ϵ comme étant $8940 \pm 55 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ sur une intervalle de concentrations entre 25 et 150 μM à 278 nm.

Figure 31: Détermination du coefficient d'extinction molaire ϵ de l'anilide formé soit la Z-L-glutamyl-(γ -4-diméthylaminoanilide)-glycine



7.3.3 Procédures pour la détermination des vitesses initiales pour différentes concentrations en substrat (K_M)

Dans le but de déterminer la valeur de la constante de Michaelis-Menten K_M pour le substrat donneur soit la Z-L-Gln-Gly, le protocole suivant a été suivi en utilisant 340 μL de solution tampon (tel que décrit à la section 7.3.2), 4 μL de DMPDA 100 mM et où l'on ajoute de 0 à 90 μL de Z-L-Gln-Gly 100 mM pour faire varier sa concentration dans un volume final de 500 μL par l'addition de 136 à 46 μL d'eau et 20 μL de TGase. Pour mesurer le K_M du substrat accepteur soit le DMPDA, la même procédure s'applique mais cette fois-ci en gardant la concentration en Z-L-Gln-Gly fixe avec 75 μL de solution 100 mM et où l'on fait varier la quantité de DMPDA de 0 à 50 μL de solution 10 mM. L'ajout d'eau de 65 à 15 μL et d'enzyme permet d'atteindre le volume final de 500 μL .

7.3.4 Protocole pour la détermination des constantes d'inhibition irréversible de l'iodoacétamide

À 340 μL de solution tampon est ajouté 75 μL de Z-L-Gln-Gly 100 mM et 4 μL de DMPDA 100 mM. On fait varier la concentration d'inhibiteur en ajoutant de 0 à 50 μL d'iodoacétamide 10 μM et en complétant à 500 μL avec 61 à 11 μL d'eau et 20 μL de TGase

7.4. Protocole pour les études enzymologiques des inhibiteurs potentiels

Les tests d'activité et les cinétiques d'inhibition ont été effectués tel que décrit aux sections 7.3.1, 7.3.2 et 7.3.4. Les constantes d'inhibition des inhibiteurs ont été déterminées dans les conditions réactionnelles suivantes: 75 μL de Z-L-Gln-Gly 100

mM, 4 μ L de DMPDA 100 mM et 0-20 μ L d'inhibiteur en solution dans le DMSO (la concentration utilisée de l'inhibiteur dépend de son efficacité). Le volume du mélange réactionnel est complété à 480 μ L par l'ajout de 20-0 μ L de DMSO. La solution est préincubée pendant 3 minutes à 37 °C, avant l'ajout de 20 μ L d'une solution aqueuse de TGase 0,2 unité.

RÉFÉRENCES

- 1 Levitzki, A., Willingham, M. et Pastan, I.H. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 2706-2710.
- 2 Davies, P.J., Davies, D.R., Levitzki, A., Maxfield, F.R., Milhaud, P., Willingham, M.C. et Pastan, I.H. (1980) *Nature (London)* **283**, 162-167.
- 3 Fesus, L., Thomazy, V. et Falus, A. (1987) *FEBS Letters* **224**, 104-108.
- 4 Birckbichler, P.J., Orr, G.R., Patterson, M.K., Conway, E., Carter, H.A et Maxwell, M.D. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **763**, 27-34.
- 5 Matacic, S. et Loewy, A.G. (1968) *Biochim Biophys Res. Commun.* **30**, 356-362.
- 6 Lorand, L. (1972) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **202**, 6-30.
- 7 Pisano, J.J., Finlayson, J.S. et Peyton, M.P. (1968) *Science* **160**, 892-893.
- 8 Rice, R.H. et Green, H. (1979) *Cell* **18**, 681-694.
- 9 Kim, S.Y., Chung, S.I. et Steinert, P. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18026-18035.
- 10 Nemes, Z., Demeny, M., Marekov, L.N., Fesus, L. et Steiner, P.M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 2636-2646.
- 11 Candi, E., Tarcsa, E., Digiovanna, J.J., Compton, J.G., Elias, P.M., Marekov, L.N. et Steinert, P.M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2067-2072.
- 12 De Young, L., Ballaron, S. et Epstein, W. (1984) *J. Invest. Dermatol.* **82**, 275-279.
- 13 Dalziel, K., Dykes, P. J. et Marks, R. (1984) *Br. J. Exp. Pathol.* **65**, 107-115.
- 14 Azari, P., Rahim, J. et Clarkson, D. P. (1981) *Curr. Eye Res.* 463-470.
- 15 Fesus, L. (1982) *Surv. Immunol. Res.* **1**, 297-304.
- 16 Bernard, B. A., Reano, A., Darmon, Y. M. et Thivolet, J. (1986) *Brit. J. Dermatol.* **114**, 279-283.

- 17 Schroeder, W. T., Thatcher, S. M., Stewart-Galetka, S., Annarella, M., Chema, D., Siciliano, M. J., Davies, P. J. A., Tang, H. Y., Sowa, B. A. et Duvic, M. (1992) *J. Invest. Dermatol.* **99**, 27-34.
- 18 Wolf, R. et Schiavo, A.L. (1997) *Int. J. Dermatol.* **36**, 10-13.
- 19 Selkoe, D. J., Ihara, Y. et Salazar, F. (1982) *Science* **215**, 1243-1245.
- 20 Selkoe, D. J., Abraham C. et Ihara, Y. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6070-6074.
- 21 Schlaepfer, W. (1983) in *Biological Aspects of Alzheimer's Disease* (Katzman, R., Ed.), pp. 107-115, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- 22 Farmer, P. M., Peck, A. et Terry, R. D. (1976) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **35**, 367.
- 23 Amendola, A., Lombardi, G., Oliverio, S., Colizzi, V. et Piacentini, M. (1994) *FEBS Lett.* **339**, 258-264.
- 24 Benzinger, T.L.S., Gregory, D.M., Burkoth, T.S., Miller-Auer, H., Lynn, D.G., Botto, R.E. et Meredith, S.C. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13407-13412.
- 25 Norlund, M.A., Lee, J.M., Zainelli, G.M. et Muma, N.A. (1999) *Brain Research* **851**, 154-163.
- 26 Lorand, L., Rule, N.G., Ong, H.H., Furlanetto, R., Jacobsen, A., Downey, J., Oner, N. et Bruner-Lorand, J. (1968) *Biochemistry* **7**, 1214-1223.
- 27 Stenberg, P., Nilsson, L., Erickson, O. et Lunden, R. (1971), *Acta Pharm. Suec.* **8**, 415-422.

- 28 Holbrook, J.J., Cooke, R.D. et Kingston, I.B. (1973) *Biochem. J.* **135**, 901-903.
- 29 Chung, S.I., Lewis, M.S. et Folk, J.E. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 940-950.
- 30 Curtis, C.G., Brown, K.L., Credo, R.B., Domanik, R.A., Gray, A., Stenberg, P. et Lorand, L. (1974) *Biochemistry* **13**, 3774-3780.
- 31 Gross, M., Whetzel, N.K. et Folk, J.E. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 7693-7699.
- 32 Folk, J.E. et Finlayson, J.S. (1977) *Adv. Protein Chem.* **31**, 1-133.
- 33 Lorand, L., Parameswara, K.N., Stenberg, P., Tong, Y.S., Velasco, P.T., Jonsson, N.A., Mikiver, L. et Moses, P. (1979) *Biochemistry* **18**, 1756-1765.
- 34 Delcros, J.G., Roch, A.M. et Quash, G. (1984) *FEBS Letters* **171**, 221-226.
- 35 Lee, K.N., Fesus, L., Yancey, S.T., Girard, J.E. et Chung, S.I. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 14689-14694.
- 36 Castelhana, A.L., Billedeau, R., Pliura, D.H., Bonaventura, B.J. et Krantz, A. (1988) *Bioorg. Chem.* **16**, 335-340.
- 37 Doyle, P.M., Harris, C.J., Carter, K.R., Simpkin, D.S.A., Bailey-Smith, P., Stone, D, Russel, L. et Blackwell, G.J. (1990) *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 1318-1320.
- 38 Pliura, D.H., Bonaventura, B.J., Pauls, H.W., Killackey, J.F. et Krantz, A. (1992) *J. Enzyme Inhib.* **6**, 181-194.
- 39 Auger, M., McDermott, A.E., Robinson, V., Castelhana, A.L., Billedeau, R.J., Pliura, D.H., Krantz, A. et Griffin, R.G. (1993) *Biochemistry* **32**, 3930-3934.
- 40 Freund, K.F., Doshi, K.P., Gaul, S.L., Claremon, D.A., Remy, D.C., Baldwin, J.J., Pitzenberger, S.M. et Stern, A.M. (1994) *Biochemistry* **33**, 10109-10119.

- 41 Yee, V.C., Pedersen, L.C., LeTrong, I., Bishop, P.D. et Stenkamp, R.E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7296-7300.
- 42 Folk, J.E. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 3707-3713.
- 43 Karimian, K. , Tam, T. F., Desilets, D., Lee, S., Cappeletto, T. and Li, W., Apotex Research Inc., U.S. Patent 5,677,302, 14 octobre 1997.
- 44 Karimian, K. , Tam, T. F., Leung-Toung, R. C. S. H. and Li, W., Apotex Research Inc., U.S. Patent 6,060,472, 9 mai 2000.
- 45 Rich, D.H. (1986) in *Proteinase Inhibitors* (Barret et Salvesen Eds.), 153-178.
- 46 Folk, J.E. (1983) *Adv. in Enzymol. & Relat. Areas of Mol. Biol.* **54**, 1-56.
- 47 Folk, J.E. et Chung, S.I. (1985) *Methods Enzymol.* **113**, 358-375.
- 48 Manesis, N.J et Goodman, M. (1987) *J. Org. Chem.* **52**, 5331-5341.
- 49 Huang, X., Luo, X., Roupioz, Y et Keillor, J.W. (1997) *J. Org. Chem.* **62**, 8821-8825.
- 50 Kurzer, F. (1965) *Adv. Heterocycl. Chem.* **5**, 119-204.
- 51 Kurzer, F. (1982) *Adv. Heterocycl. Chem.* **32**, 285-398.
- 52 Franz, J.E. et Dhingra, O.P. (1984) *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* Katritzky, A.R. Eds. **6**, 463-511.
- 53 Waki, M., Kitajima, Y. et Izumiya, N. (1981) *Synthesis*, 266-268.
- 54 Goerdeler, J., Groschopp, H. et Sommerland, U. (1957) *Chem. Ber.* **90**, 182-187.
- 55 Adam, W., Bialas, J. et Hadjiarapoglou, L. (1991) *Chem. Ber.* **124**, 2377.
- 56 Adam, W., Hadjiarapoglou, L. et Smerz, A. (1991) *Chem. Ber.* **124**, 227-232.
- 57 de Macédo, P. et Perie, J.J. (1998) *Synth. Commun.* **28**, 2679-2683.

- 58 Leblanc, A., Day, N., Ménard, A. et Keillor, J.W. (1999) *Prot. Exp. & Purif.* **17**, 89-95.
- 59 Abe, T., Chung, S.I., Di Augustine, R.P. et Folk, J.E. (1977) *Biochemistry* **16**, 5495-5501.
- 60 Aeschlimann, D. et Paulsson, M. (1994) *Thrombosis and Haemostasis* **71**, 402-415.
- 61 Barnes, A. R. et Sugden, J. K. (1990) *Pharm. Acta. Helv.* **65**, 258-268.
- 62 Sheng S., Kraft J. J. et Shuster, S. M. (1993) *Anal. Biochem.* **211**, 242-249.
- 63 Day, N. et Keillor, J. W. (1999) *Anal. Biochem.* **274**, 141-144.
- 64 Folk, J. E. et Chung, S. I. (1973) *Adv. in Enzymol. & Relat. Areas of Mol. Biol.* **38**, 109-191.
- 65 Folk, J. E., Cole, P. W. et Mullooly, J. P. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 418-427.
- 66 Tian, W. X. et Tsu, C. L. (1982) *Biochemistry*, **21**, 1028-1032.
- 67 Crawford, C., Mason, R. W., Wikstrom, P. et Shaw, E. (1988) *Biochem. J.* **253**, 751-758.
- 68 Amblard, M., Rodriguez, M., Lignon, M-F., Galas, M-C., Bernad, N., Aumelas, A. et Martinez, J. (1998) *Eur. J. Med. Chem.* **33**, 171-180.
- 69 Schon, I. et Kisfaludy, L. (1986) *Synthesis*, 303-305.
- 70 Lowry, D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.