

CHRISTIAN BALG

**SYNTHÈSE D'INHIBITEURS DES AMINOACYL-ARNt SYNTHÉTASES
ET DES AMINOACYL-ARNt AMIDOTRANSFÉRASES**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en chimie
pour l'obtention du grade de Philosophiæ doctor (Ph. D.)

DÉPARTEMENT DE CHIMIE
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2011

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier en premier lieu mon directeur de recherche, le professeur Robert Chênevert, pour le projet de recherche motivant et le soutien scientifique qu'il m'a donnés. Je souhaite aussi remercier mon codirecteur de recherche, le professeur Jacques Lapointe (Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique), qui m'a permis d'exercer mes travaux de recherche dans un environnement multidisciplinaire.

Je remercie les membres du laboratoire de Jacques Lapointe qui ont contribué de façon considérable aux travaux de recherche (spécialement Jonathan Huot et Sébastien Blais). J'aimerais aussi mentionner le travail appréciable de Nancy Messier (laboratoire du professeur Paul H. Roy) pour évaluer l'activité antibiotique des inhibiteurs. Je dois également souligner l'importance que plusieurs membres de mon laboratoire ont eue au cours de ma formation: Stéphane Bernier, Pascall Giguère, Frédéric Jacques, Carine Lévesque, Nicholas Pelchat, Pierre Morin, Michel Fila, Mélanie Bolduc, Isabelle Trépanier et Maria De Mieri. Je remercie grandement les professeurs Richard Giegé, Catherine Florentz, Bernard Lorber et Magali Frugier et les étudiants Tania Bour, Claude Sauter et Marie Messmer (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France) qui ont grandement collaboré dans l'étude des aaRS. Je souhaite aussi souligner les efforts du professeur Isao Tanaka (Faculty of Advanced Life Sciences, Hokkaido University, Japon) pour les essais de cristallisation de l'AdT avec nos inhibiteurs ainsi que le groupe du Dr. Yuxin Jin (State Key Laboratory of Molecular Biology, Chine) qui étudie présentement la TrpRS. Merci à M. André Demers et M. Pierre Audet pour le support administratif et technique. Plusieurs organismes subventionnaires ont contribué aux recherches, notamment: le «Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT)», le «Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG)».

Au niveau personnel, je remercie grandement ma famille, ma conjointe et mes amis qui m'ont encouragé à poursuivre mes études.

RÉSUMÉ

Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) sont des enzymes essentielles au processus de traduction des acides nucléiques (ADN) en séquences d'acides aminés (protéines). Elles catalysent l'estérification de chacun des 20 acides aminés à leurs ARN de transfert respectifs. Dans une première étape, l'acide aminé est activé pour donner un intermédiaire instable (aa-AMP), lequel réagit avec l'ARNt correspondant dans une seconde étape pour générer l'ARNt aminoacylé (aa-ARNt). Les inhibiteurs synthétisés dans le cas présent sont des analogues de l'intermédiaire instable (chapitres 2, 3 et 4). Les inhibiteurs des aminoacyl-ARNt synthétases ont plusieurs utilités : faciliter la cristallisation des aaRS en vue de déterminer leurs structures par diffraction des rayons-X, étudier les mécanismes réactionnels des aaRS, et à plus long terme, approfondir la recherche sur de nouvelles thérapies antibiotiques. Les aaRS ont évolué de façon divergente entre les procaryotes et les eucaryotes, ce qui rend possible l'inhibition sélective des aaRS bactériennes.

Plusieurs bactéries ne possèdent pas la glutamine-ARNt synthétase et utilisent donc une voie indirecte pour le chargement de l'ARNt correspondant (Gln-ARNt^{Gln}). En premier lieu, l'acide glutamique est estérifié avec l'ARNt^{Gln} par une glutamyl-ARNt synthétase non discriminante (ND-GluRS). L'ARNt^{Gln} incorrectement apparié (Glu-ARNt^{Gln}) est par la suite transformé par une aminoacyl-ARNt amidotransférase (AdT) pour donner l'ARNt correctement apparié (Gln-ARNt^{Gln}). Ce type de mécanisme existe aussi pour le chargement de l'ARNt correspondant à l'asparagine (transamidation de l'Asp-ARNt^{Asn}). Très peu d'inhibiteurs des aminoacyl-ARNt amidotransférases ont été rapportés jusqu'à maintenant. Pourtant, l'absence de cette enzyme dans le cytoplasme des cellules eucaryotes en fait une cible intéressante pour le développement d'antibiotiques. Le design et la synthèse de nouveaux inhibiteurs ont été réalisés en se basant sur le mécanisme des aminoacyl-ARNt amidotransférases (chapitre 5, 6 et 7).

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
RÉSUMÉ	II
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES SCHÉMAS	XII
LISTE DES TABLEAUX	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
CHAPITRE 1 : Introduction	
1.1. Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS)	1
1.1.1. Fonction des aaRS	1
1.1.2. Mécanisme des aaRS	1
1.1.3. Classification des aaRS	2
1.1.4. Cibler les aaRS pour de nouveaux antibiotiques	4
1.1.5. Inhibiteurs des aaRS	5
1.1.5.1 Inhibiteurs naturels des aaRS	5
1.1.5.2. Design basé sur le mécanisme (analogues de l'adénylate d'aminocycle)	8
1.1.5.3. Criblage à haut débit	9
1.1.5.3.1 Criblage virtuel (<i>in silico</i>)	9
1.1.5.3.1 Criblage conventionnel (<i>in vitro</i>)	10
1.1.5.4. Modification d'inhibiteurs connus (relations structure-activité)	11
1.2. Les aminoacyl-ARNt amidotransférases (AdT)	13
1.2.1. Fonction des AdT	13
1.2.2. Mécanisme des AdT	13
1.2.3. Classification des AdT	14
1.2.4. Cibler les AdT pour de nouveaux antibiotiques	15
1.2.5. Inhibiteurs des AdT	16
1.3. Objectifs généraux	17
1.4. Références	17
CHAPITRE 2 : Synthèse d'adénylates d'aminoalcool	
2.1. Introduction	22
2.2. Synthèse d'adénylates d'aminoalcool	25
2.2.1. Synthèse des <i>N</i> -Boc-aminoalcools	26
2.2.2. Méthode des phosphoramidites-phosphites-triesters	27
2.2.3. Déméthylation et déprotection	28
2.2.4. Synthèse du pyroglutamol	28
2.2.5. Synthèse de l'adénylate de pyroglutamol	29
2.3. Résultats biologiques	30
2.3.1. Études de cinétique enzymatique	31
2.3.2. Détermination de structures par diffraction des rayons-X	31
2.3.3. Activité antibiotique sur disque de culture	32
2.4. Références	33

CHAPITRE 3 : Synthèse des aminoacylsulfamoyl-adénosines	
3.1. Introduction	35
3.2. Synthèse des aminoacylsulfamoyl-adénosines	38
3.2.1. Synthèse du pyroglutamylsulfamoyl-adénosine et du γ -méthyl ester du glutamylsulfamoyl-adénosine	39
3.2.2. Synthèse du tryptophanylsulfamoyl-adénosine	40
3.3. Résultats biologiques	41
3.3.1. Études de cinétique enzymatique	41
3.3.2. Activité antibiotique sur disque de culture	42
3.4. Références	42
CHAPITRE 4 : Synthèse d'analogues β-cétophosphonate de l'adénylate de glutamyle et de glutaminyle et inhibition sélective des aminoacyl-ARNt synthétases bactériennes correspondantes.	
4.1. Préambule	46
4.2. Résumé	46
4.3. Abstract	46
4.4. Introduction	47
4.5. Results and discussion	49
4.5.1. Synthesis of β -ketophosphonates 4, 9 and 15.	49
4.5.2. Inhibition of <i>E. coli</i> GluRS by Glu- β -ketophosphonate-adenosine 9 (Glu-KPA), and specificity of this inhibition.	51
4.5.3. Inhibition of <i>E. coli</i> GlnRS by Gln- β -ketophosphonate-adenosine 15 (Gln-KPA), and specificity of this inhibition.	53
4.5.4. Inhibition of a mammalian cytoplasmic GluRS by Glu-KPA 9.	55
4.6. Discussion	55
4.7. Experimental	56
4.7.1. General	56
4.7.2. Dimethyl β -ketophosphonate 6	57
4.7.3. Methyl β -ketophosphonate 7	58
4.7.4. Phosphonate 8	58
4.7.5. Glutamic ketophosphonate 9	59
4.7.6. Glutamine methyl ester 11	59
4.7.7. Dimethyl β -ketophosphonate 12	60
4.7.8. Methyl β -ketophosphonate 13	61
4.7.9. Phosphonate 14	61
4.7.10. β -ketophosphonate 15	62
4.7.11. Enzyme purifications	62
4.7.12. Enzyme activity and inhibition assays	63
4.7.13. Determination of the inhibition type and constant (K_i)	65
4.8. Acknowledgements	66
4.9. References and notes	66
CHAPITRE 5: Mécanisme de l'amidotransférase GatCAB : l'aspartyl-ARNt synthétase augmente l'affinité avec l'Asp-ARNt^{Asn} et de nouveaux analogues de l'aminoacyl-ARNt sont des inhibiteurs compétitifs.	
5.1. Préambule	70

5.2. Résumé	70
5.3. Abstract	71
5.4. Introduction	71
5.5. Materials and methods	73
5.6. Results	80
5.7. Discussion	87
5.8. Acknowledgment	90
5.9. References	91
5.10. Annexe	93
CHAPITRE 6: Inhibition de l' aminoacyl-ARNt amidotransférase d'<i>Helicobacter pylori</i> par des analogues de la puromycine	
6.1. Préambule	96
6.2. Résumé	96
6.3. Abstract	96
6.4. Inhibition of <i>Helicobacter pylori</i> aminoacyl-tRNA amidotransferase by puromycin analogues	97
6.5. Acknowledgment	102
6.6. References	102
6.7. Supporting information	104
6.7.1. Typical enzyme assay	104
6.7.2. Chemistry: experimental procedures	105
6.7.2.1. General	105
6.7.2.2. <i>N</i> -Boc-DL-phosphinothricin 2f	105
6.7.2.3. Coupling reaction of puromycin aminonucleoside 1 with carboxylic acids 2c-h	106
6.7.2.4. Procedure for the hydrolysis of esters 3c-d	109
6.7.2.5. General procedure for the cleavage of the <i>N</i> -tert-butoxycarbonyl groups	110
6.8. Annexe	113
6.8.1. Synthèse de l'acide <i>N</i> -Boc homocystéique et de l'acide (<i>S</i>)-2-[<i>N</i> -(Boc)]-5-(diméthoxy-phosphoryl)-4-oxo-pentanoïque.	113
6.8.2. Synthèse d'analogues de la puromycine (variation de l'acide aminé).	114
6.8.3. Synthèse du 3'-déoxy- <i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁶ -diméthyl-5'-méthylphosphoryl-3'-(<i>L</i> -méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.26.	115
6.8.4. Synthèse du 3'-déoxy-3'-(<i>L</i> -méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.30.	115
6.8.5. Résultats	116
6.8.6. Références	117
CHAPITRE 7 : Inhibition de l' aminoacyl-ARNt amidotransférase d'<i>Helicobacter pylori</i> par des analogues du chloramphénicol	
7.1. Préambule	119
7.2. Résumé	119
7.3. Abstract	119
7.4. Introduction	120
7.5. Results and discussion	122
7.5.1. Synthesis of chloramphenicol derivatives (7a-f)	122

7.5.2. Inhibition of <i>Helicobacter pylori</i> GatCAB amidotransferase (AdT)	123
7.6. Experimental	126
7.6.1. General	126
7.6.2. Typical procedure for preparation of amides 6a-f	126
7.6.2.1. (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(<i>N</i> ^α -Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6a).	126
7.6.2.2. (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-(4-Methylsulfonylphenyl)-2-(<i>N</i> ^α -Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6b).	127
7.6.2.3. (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-Phenyl-2-(<i>N</i> ^α -Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6c).	127
7.6.2.4. (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(<i>N</i> ^α -Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6d).	127
7.6.2.5. (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(<i>N</i> ^α -Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6e).	127
7.6.2.6. (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(<i>N</i> ^α -Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6f).	128
7.6.3. Typical procedure for the cleavage of the <i>N</i> - <i>tert</i> -butoxycarbonyl groups	128
7.6.3.1. (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7a).	128
7.6.3.2. (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-(4-Methylsulfonylphenyl)-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7b).	129
7.6.3.3. (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-Phenyl-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7c).	129
7.6.3.4. (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7d).	129
7.6.3.5. (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7e).	129
7.6.3.6. (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7f).	130
7.6.4. Typical enzyme assay	130
7.7. Acknowledgments	131
7.8. References	131
7.9. Annexe	133
CHAPITRE 8 : Conclusion	135
CHAPITRE 9 : Partie expérimentale	139
9.1. Généralités	139
9.2. Synthèse de l'adénylate de glutaminol 2.8a	139
9.2.1 <i>N</i> -Boc-glutaminol 2.2a	139
9.2.2. Triester de phosphate 2.6a	140
9.2.3. Diester de phosphate 2.7a	141
9.2.4. Adénylate de glutaminol 2.8a	142
9.3. Synthèse de l'adénylate d'aspartol 2.8b	143
9.3.1. Triester de phosphate 2.6b	144
9.3.2. Diester de phosphate 2.7b	144
9.3.3. Adénylate d'aspartol 2.8b	145

9.4. Synthèse de l'adénylate de tyrosinol 2.8c	146
9.4.1. <i>N</i> -Boc- <i>O</i> (<i>t</i> Bu)-tyrosinol 2.2c	146
9.4.2. Triester de phosphate 2.6c	147
9.4.3. Diester de phosphate 2.7c	148
9.4.4. Adénylate de tyrosinol 2.8c	149
9.5. Synthèse de l'adénylate de tryptophanol 2.8d	150
9.5.1. <i>N</i> -Boc-tryptophanol 2.2d	150
9.5.2. Triester de phosphate 2.6d	151
9.5.3. Diester de phosphate 2.7d	152
9.5.4. Adénylate de tryptophanol 2.8d	153
9.6. Synthèse de l'adénylate de pyroglutamol 2.14	154
9.6.1. Ester méthylique de l'acide L-pyroglutamique 2.10	154
9.6.2. (<i>S</i>)-5-(Hydroxyméthyl)-2-pyrrolidinone 2.11	154
9.6.3. Triester de phosphate 2.12	155
9.6.4. Diester de phosphate 2.13	156
9.6.5. Adénylate de pyroglutamol 2.14	157
9.6.6. Triester de phosphate 2.15	158
9.7. Synthèse du pyroglutamylsulfamoyl-adénosine 3.7a et du γ -méthyl ester-glutamylsulfamoyl-adénosine 3.7b.	159
9.7.1. <i>N</i> ⁶ -Benzoyl-2',3'- <i>O</i> -isopropylidène adénosine 3.2	159
9.7.2. <i>N</i> ⁶ -Benzoyl-2',3'- <i>O</i> -isopropylidène-5'- <i>O</i> -sulfamoyladénosine 3.3	160
9.7.3. <i>N</i> ⁶ -Benzoyl-2'-3'-isopropylidène-5'- <i>O</i> -(<i>N</i> -(L-pyroglutamyl)-sulfamoyl) adénosine 3.5a	161
9.7.4. 2',3'- <i>O</i> -Isopropylidène-5'- <i>O</i> -(<i>N</i> -(L-pyroglutamyl)-sulfamoyl) adénosine 3.6a	162
9.7.5. 5'- <i>O</i> -(<i>N</i> -(L-Pyroglutamyl)-sulfamoyl) adénosine 3.7a	163
9.7.6. <i>N</i> ⁶ -Benzoyl-2',3'- <i>O</i> -isopropylidène-5'- <i>O</i> -[<i>N</i> -(<i>N</i> -Boc- γ -méthylester-glutamyl)-sulfamoyl] adénosine 3.5b	163
9.7.7. 2',3'- <i>O</i> -Isopropylidène-5'- <i>O</i> -[<i>N</i> -(<i>N</i> -Boc- γ -méthylester-glutamyl)-sulfamoyl] adénosine 3.6b	164
9.7.8. 5'- <i>O</i> -[<i>N</i> -(γ -Méthylester-glutamyl)-sulfamoyl] adénosine 3.7b	164
9.8. Synthèse du tryptophanylsulfamoyl-adénosine 3.12	166
9.8.1. <i>N</i> ⁶ -Boc-2'-3'- <i>O</i> -isopropylidène adénosine 3.8	166
9.8.2. <i>N</i> ⁶ -Boc-2',3'- <i>O</i> -isopropylidène-5'- <i>O</i> -sulfamoyladénosine 3.9	167
9.8.3. <i>N</i> ⁶ -Boc-2'-3'-isopropylidène-5'- <i>O</i> -(<i>N</i> -(<i>N</i> -Boc-tryptophanyl)-sulfamoyl) adénosine 3.11	168
9.8.4. Tryptophanylsulfamoyl-adénosine 3.12	169
9.9. (<i>S</i>)-2-Amino-4-oxo-5-(phosphonyl) pentanoate de méthyle 5.4	170
9.9.1. Diméthyl ester du <i>N</i> -(trityl) aspartate 5.2	170
9.9.2. (<i>S</i>)-2- <i>N</i> -(Trityl) amino-4-oxo-5-(diméthylphosphonyl) pentanoate de méthyle 5.3	171
9.9.3. (<i>S</i>)-2-Amino-4-oxo-5-(phosphonyl) pentanoate de méthyle 5.4	172
9.10. Synthèse de l'acide <i>N</i> -Boc homocystéique 6.2 et de l'acide (<i>S</i>)-2-[<i>N</i> -(Boc)]-5-(diméthoxy-phosphoryl)-4-oxo-pentanoïque 6.6.	172
9.10.1. Acide <i>N</i> -Boc homocystéique 6.2	172
9.10.2. Diméthyl ester du <i>N</i> -(Boc) ₂ aspartate 6.4	173

9.10.3. (S)-2-N-(Boc) ₂ -amino-4-oxo-5-(diméthylphosphonyl) pentanoate de méthyle 6.5	174
9.10.4. Acide (S)-2-N-(Boc)-amino-4-oxo-5-(diméthylphosphonyl) pentanoïque 6.6	175
9.11. Synthèse de la 3'-déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(DL-homocystéinyl- amido) adénosine 6.18	176
9.11.1. 3'-Déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(N ^α -Boc-DL-homocystéinyl- amido) adénosine 6.11	176
9.11.2. 3'-Déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(DL-homocystéinyl-amido) adénosine 6.18	177
9.12. Synthèse de la 3'-déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-[(S)-2-amino-4-oxo-5- (méthylphosphonyl) pentanoyl-amido] adénosine 6.19	178
9.12.1. 3'-Déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-[(S)-2-N-(Boc)-amino-4-oxo-5- (diméthylphosphonyl) pentanoyl-amido] adénosine 6.12	178
9.12.2. 3'-Déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-[(S)-2-N-(Boc)-amino-4-oxo-5- (méthylphosphonyl) pentanoyl-amido] adénosine 6.13	179
9.12.3. 3'-Déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-[(S)-2-amino-4-oxo-5- (méthylphosphonyl) pentanoyl-amido] adénosine 6.19	180
9.13. Synthèse de la 3'-déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(γ-hydrazide-L- glutamyl-amido) adénosine 6.20.	181
9.13.1. 3'-Déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(N ^α -Boc-γ-hydrazide-L- glutamyl-amido) adénosine 6.15	181
9.13.2. 3'-Déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(γ-hydrazide-L-glutamyl-amido) adénosine 6.20	182
9.14. Synthèse de la 3'-déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(S-méthyl-sulfone-L- cystéinyl-amido) adénosine 6.21.	183
9.14.1. 3'-Déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(N ^α -Boc-S-méthyl-sulfone-L- cystéinyl-amido) adénosine 6.16	183
9.14.2. 3'-Déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(S-méthyl-sulfone-L-cystéinyl- amido) adénosine 6.21	184
9.15. Synthèse de la 3'-déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(L-asparaginyl-amido) adénosine 6.22.	185
9.15.1. 3'-Déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(N ^α -Boc-L-asparaginyl-amido) adénosine 6.17	185
9.15.2. 3'-Déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(L-asparaginyl-amido) adénosine 6.22.	186
9.16. Synthèse du 5'-O-méthylphosphoryl-3'-déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'- (L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.26.	187
9.16.1. 5'-O-Diméthylphosphoryl-3'-déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(N ^α - Boc-L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.24	187
9.16.2. 5'-O-Méthylphosphoryl-3'-déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(N ^α -Boc- L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.25	188
9.16.3. 5'-O-Méthylphosphoryl-3'-déoxy-N ⁶ ,N ⁶ -diméthyl-3'-(L- méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.26	189
9.17. Synthèse du 3'-déoxy-3'-(L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.30.	190

9.17.1. 3'-Déoxy-3'-(<i>N</i> ^α -Boc-L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.29.	190
9.17.2. 3'-Déoxy-3'-(L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.30	191
9.18. Synthèse du (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-(<i>p</i> -Nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol 7.6	192
9.18.1. (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-(<i>p</i> -Nitrophényl)-2-(<i>N</i> -benzoyl)-3-benzoyloxypropane 7.1	192
9.18.2. (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-(<i>p</i> -Nitrophényl)-1-mésyloxy-2-(<i>N</i> -benzoyl)-3-benzoyloxypropane 7.2	192
9.18.3. (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-(<i>p</i> -Nitrophényl)-1-mésyloxy-2-(<i>N</i> -benzoyl)-3-propanol 7.3	193
9.18.4. (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-Phényl-4-hydroxyméthyl-5-(<i>p</i> -nitrophényl)-oxazoline 7.4	194
9.18.5. (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-(<i>p</i> -Nitrophényl)-2-(<i>N</i> -benzoyl)-1,3-propadiol 7.5	195
9.18.6. (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-(<i>p</i> -Nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol 7.6	196

LISTES DES FIGURES

Figure 1.1. Biosynthèse des protéines et fonction des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS).	1
Figure 1.2. Mécanisme des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS).	2
Figure 1.3. Structure de l'acide pseudomonique.	4
Figure 1.4. Exemples d'inhibiteurs naturels des aaRS (analogues simples des acides aminés).	6
Figure 1.5. Exemples d'inhibiteurs naturels des aaRS (molécules complexes).	7
Figure 1.6. Exemples d'inhibiteurs naturels des aaRS (analogues de l'adénylate d' aminoacyle).	7
Figure 1.7. Principaux analogues stables de l'adénylate d' aminoacyle (aa-AMP).	8
Figure 1.8. Autres groupements analogues à l'anhydride carboxylique-phosphorique de l'aa-AMP.	9
Figure 1.9. Inhibiteurs des aaRS découverts par criblage virtuel.	10
Figure 1.10. Inhibiteurs des aaRS découverts par criblage <i>in vitro</i> .	10
Figure 1.11. Exemple d'un inhibiteur d'aaRS découvert par chimie combinatoire.	11
Figure 1.12. Exemple d'une étude de relations structure-activité menée à partir d'un produit naturel.	11
Figure 1.13. Exemple d'une étude de relations structure-activité (à partir d'un analogue de l'adénylate d' aminoacyle).	12
Figure 1.14. Exemple d'une étude de relations structure-activité (à partir d'une molécule identifiée par criblage à haut débit).	12
Figure 1.15. Voie indirecte du chargement de la glutamine et de l'asparagine sur leurs ARN de transfert.	13
Figure 1.16. Mécanisme des aminoacyl-ARNt amidotransférases (AdT).	14
Figure 1.17. Acides boroniques en tant qu'inhibiteurs des aminoacyl-ARNt amidotransférases.	16
Figure 1.18. Exemple d'un analogue de l'ATP en tant qu'inhibiteurs des aminoacyl-ARNt amidotransférases.	17
Figure 2.1. Adénylate d' aminoalcool, remplacement du carbonyle par un méthylène.	22
Figure 2.2. Dérivés de l'adénylate de glutamol.	24
Figure 2.3. Dérivé de l'adénylate de glutaminol.	24
Figure 2.4. Cristallisation de l'AspRS de <i>T. thermophilus</i> .	32
Figure 3.1. Les aminoacylsulfamoyl-adénosines comme analogues de l'adénylate d' aminoacyle.	35
Figure 3.2. Structure de l'ascamycine et de son métabolite cytotoxique.	35
Figure 3.3. Dérivés dipeptidiques des aminoacylsulfamoyl-adénosines.	37
Figure 3.4. Le composé CB432, un analogue de l'isoleucylsulfamoyl-adénosine.	37
Figure 3.5. Sulfamates analogues à la microcine C.	38

Figure 3.6. Synthèse des dérivés du 5'- <i>O</i> -sulfamoyl-adénosine par la formation d'un éther de tributylétain.	38
Figure 3.7. Voie de dégradation des dérivés du 5'- <i>O</i> -sulfamoyl-adénosine.	39
Figure 4.1. Inhibition of <i>Escherichia coli</i> GluRS by Glu-KPA 9	52
Figure 4.2. Inhibition by Glu-KPA 9 and by Gln-KPA 15 .	52
Figure 4.3. Schematic models of the binding of one molecule of aa-AMP to an aaRS (left), and of two molecules of Gln-KPA 15 to <i>E. coli</i> GlnRS (right).	53
Figure 4.4. Cooperative pure competitive inhibition by two different nonexclusive inhibitors.	54
Figure 4.5. SDS-PAGE (10%) of the purified fractions of <i>E. coli</i> GluRS and GlnRS (5 µg per lane).	65
Figure 5.1. AdT aminoacyl-tRNA substrates and analogues.	73
Figure 5.2. β-phosphoryl-aspartyl-tRNA ^{Asn} , a reaction intermediate in transamidation. Asp-KP, a stable analog of a part of β-phosphoryl-aspartyl-tRNA ^{Asn} .	74
Figure 5.3. An example of the transamidation assay, using Asp/Asn separation by thin-layer chromatography.	79
Figure 5.4. Asp-tRNA ^{Asn} was prepared as described in Materials and Methods, and added to the reaction mixture used for the transamidase assay.	82
Figure 5.5. Determining tRNA ^{Asn} concentrations with a transamidation plateau.	83
Figure 5.6. ND-AspRS increases <i>H. pylori</i> GatCAB affinity for Asp-tRNA ^{Asn} .	84
Figure 5.7. Competitive inhibition of <i>H. pylori</i> AdT by asparticin and glutamycin.	85
Figure 5.8. Asparticin is not a substrate for GatCAB.	86
Figure 6.1. Indirect pathway for Gln-tRNA ^{Gln} and Asn-tRNA ^{Asn} biosynthesis.	97
Figure 6.2. Reaction mechanism: Glu-tRNA ^{Gln} amidotransferase (GluAdT), n = 2, tRNA ^{aa} = tRNA ^{Gln} . Asp-tRNA ^{Asn} amidotransferase (AspAdT), n = 1, tRNA ^{aa} = tRNA ^{Asn} .	98
Figure 6.S1. Compound 4h is a competitive inhibitor of <i>H. pylori</i> AdT with respect to <i>H. pylori</i> Asp-tRNA ^{Asn} .	104
Figure 7.1. Glutaminyl-tRNA and asparaginylyl-tRNA biosynthetic pathways. ND-aaRS = nondiscriminating aminoacyl-tRNA synthetase; AdT = amidotransferase.	120
Figure 7.2. Reaction mechanism of GatCAB aminoacyl-tRNA amidotransferase. A linked to the ribose = Adenine; aa = Asn, n = 1; aa = Gln, n = 2. For each of the three reactions represented here, the catalysis takes place in the subunit whose symbol (A or B) is underlined in GatCAB.	121
Figure 7.3. Chemical structures of puromycin 1 , AdT inhibitor 2 and chloramphenicol 3 .	122
Figure 7.4. Analogy between a putative transition state of the transamidase step (A) and the sulfone side chain of inhibitors 7a-f (B).	125
Figure 7.5. Compound 7a is a competitive inhibitor of <i>H. pylori</i> AdT with	131

respect to *H. pylori* Asp-tRNA^{Asn}. A K_i of $27 \pm 6 \mu\text{M}$ was obtained by fitting the data points to the competitive inhibition equation described above for four experiments, and the calculated values were weighted by inverse variance.

Figure 8.1. Modélisation d'un inhibiteur par la bioinformatique. 136

Figure 8.2. Résumé des modifications apportées sur les inhibiteurs des AdT. 136

Figure 8.3. Optimisation du (1*R*,2*R*)-1-(4-nitrophényl)-2-(L-méthionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol en tant qu'inhibiteur des AdT par une étude de relations structure-activité. 137

Figure 8.4. (A) Réaction peptidyl-tranfèrase dans le ribosome. (B) Réaction de transamidation des AdT. 138

Figure 8.5. Exemples de molécules actives sur le ribosome pouvant être utilisées pour le design de nouveaux inhibiteurs des AdT. 138

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 2.1. Première synthèse des adénylates d' aminoalcool.	25
Schéma 2.2. Synthèse des <i>N</i> -Boc-aminoalcools.	26
Schéma 2.3. Méthode des phosphoramidites-phosphites-triesters.	27
Schéma 2.4. Déméthylation et déprotection des triesters de phosphate.	28
Schéma 2.5. Synthèse du pyroglutamol.	29
Schéma 2.6. Synthèse de l' adénylate de pyroglutamol.	29
Schéma 3.1. Synthèse du pyroglutamylsulfamoyl-adénosine et du γ -méthyl ester-glutamylsulfamoyl-adénosine.	39
Schéma 3.2. Synthèse du tryptophanysulfamoyl-adénosine.	41
Scheme 4.1.	48
Scheme 4.2.	49
Scheme 4.3.	50
Scheme 4.4.	50
Scheme 4.5.	51
Schéma 5.1. Voie de synthèse du (<i>R</i>)-4-oxo-5-phosphonorvaline méthyl ester.	93
Scheme 6.1. General synthetic approach to inhibitors.	99
Schéma 6.2. Synthèse de l'acide <i>N</i> -Boc homocystéique.	113
Schéma 6.3. Synthèse de l'acide (<i>S</i>)-2-[<i>N</i> -(Boc)]-5-(diméthoxy-phosphoryl)-4-oxo-pentanoïque.	114
Schéma 6.4. Synthèse d' analogues de la puromycine (variation de l'acide aminé).	114
Schéma 6.5. Synthèse du 3'-déoxy- <i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁶ -diméthyl-5'-méthylphosphoryl-3'-(<i>L</i> -méthionyl-sulfone-amido) adénosine.	115
Schéma 6.6. Synthèse du 3'-déoxy-3'-(<i>L</i> -méthionyl-sulfone-amido) adénosine.	115
Scheme 7.1. Reagents and conditions: (a) EDC, <i>N</i> -hydroxysuccinimide, DMF, 24h (b) 4 M HCl / dioxane, 40 min.	123
Schéma 7.2. Synthèse du (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-(<i>p</i> -nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol	134
7.6.	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Classification des aminoacyl-ARNt synthétases.	3
Tableau 1.2. Exemples de bactéries pathogènes utilisant la voie des AdT.	15
Tableau 2.1. Inhibition des aminoacyl-ARNt synthétases par les adénylates d' aminoalcool.	23
Tableau 2.2. Résumé des résultats obtenus à partir des adénylates d' aminoalcool.	30
Tableau 3.1. Inhibition des aminoacyl-ARNt synthétases par les aminoacylsulfamoyl-adénosines respectifs.	36
Tableau 3.2. Inhibition de la croissance bactérienne sur disque de culture avec le pyroglutamysulfamoyl-adénosine et le γ -méthyl ester-glutamysulfamoyl-adénosine.	42
Table 4.1. K_i for the inhibition of various GluRS and of <i>E. coli</i> GlnRS by aa-AMP analogs.	53
Table 6.1. Inhibition of <i>Helicobacter pylori</i> GatCAB amidotransferase.	100
Tableau 6.2. Inhibition de l' aminoacyl-ARNt amidotransférase GatCAB d' <i>Helicobacter pylori</i> avec les nouveaux analogues de la puromycine.	116
Table 7.1. Inhibition of <i>H. pylori</i> GatCAB aminoacyl-tRNA amidotransferase (AdT) by chloramphenicol and several analogues.	124

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$[\alpha]_D$: rotation optique spécifique, raie D du sodium
 δ : déplacement chimique en ppm
 Å : angström
aa : acide aminé
aa-AMP : adénylate d' aminoacyle
aaRS : aminoacyl-ARNt synthétase
AcOEt : acétate d'éthyle
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
AdT : aminoacyl-ARNt amidotransférase
aq. : aqueux
AlaRS : alanyl-ARNt synthétase
AMP : adénosine monophosphate
ARN : acide ribonucléique
ARNt : ARN de transfert
ARNt^{Asp} : ARN de transfert de l'acide aspartique
ARNt^{Asn} : ARN de transfert de l'asparagine
ARNt^{Gln} : ARN de transfert de la glutamine
ARNt^{Glu} : ARNt de transfert de l'acide glutamique
Asn : asparagine
Asp : acide aspartique
AspRS : aspartyl-ARNt synthétase
Asn-ARN^{Asn} : ARNt de transfert de l'asparagine apparié avec l'asparagine
Asp-ARN^{Asn} : ARNt de transfert de l'asparagine apparié avec l'acide aspartique
AsnRS : asparaginyl-ARNt synthétase
ATP : adénosine triphosphate
B. cereus : *Bacillus cereus*
B. malayi : *Brugia malayi*
Boc : *tert*-butyloxycarbonyl
Boc₂O : di-*tert*-butyldicarbonate
B. stearothermophilus : *Bacillus stearothermophilus*
BuLi : butyllithium
BuNH₂ : butylamine
Bz : benzoate
c : concentration en g / 100 mL
°C : degré Celcius
C. albicans : *Candida albicans*
Cbz : benzyloxycarbonyle
CMI : concentration minimale inhibitrice
d : doublet
dd : doublet de doublet
déc. : décomposition
DIPEA : diisopropyléthylamine
DMAP : *N,N*-diméthylaminopyridine

DMF : *N,N*-diméthylformamide
dt : doublet de triplet
EDC : hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
E. coli : *Escherichia coli*
Et : éthyl
ESI : electrospray ionization
g : gramme
Glu : acide glutamique
Glu-AMP : glutamyl-adénosine monophosphate
Glu-ARNt^{Gln} : ARNt de transfert de la glutamine apparié avec l'acide glutamique
GluRS : glutamyl-ARNt synthétase
Gln : glutamine
Gln-ARNt^{Gln} : ARNt de transfert de la glutamine apparié avec la glutamine
GlnRS : glutaminyl-ARNt synthétase
h : heure
HBTU : hexafluorophosphate de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
HRMS : high resolution mass spectrometry
Hz : Hertz
i : iso
IC₅₀ : concentration inhibitrice à 50%
IleRS : isoleucyl-ARNt synthétase
IR : infrarouge
J : constante de couplage
*K*_i : constante d'inhibition
*K*_m : constante de Michaelis
K. Pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*
L : litre
LeuRS : leucyl-ARNt synthétase
LRMS : low resolution mass spectrometry
LysRS : lysyl-ARNt synthétase
m : multiplet
M : molaire
MetRS : méthionyl-ARNt synthétase
mg : milligramme
MHz : mégahertz
min : minute
mL : millilitre
μL : microlitre
mM : millimolaire
μM : micromolaire
mmol : millimole
mol : mole
M. tuberculosis : *Mycobacterium tuberculosis*
ND : non déterminé
NHS : *N*-hydroxysuccinide
nM : nanomolaire

N. meningitidis : *Neisseria meningitidis*
NMR : nuclear magnetic resonance
P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*
pH : potentiel hydrogène
PheRS : phénylanalyl-ARNt synthétase
Ph : phényl
ProRS : prolyl-ARNt synthétase
ppm : partie par million
q : quadruplet
RMN : résonance magnétique nucléaire
s : singulet
sat. : saturé
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
S. pyogenes : *Streptococcus pyogenes*
SerRS : séryl-ARNt synthétase
SMHR : spectre de masse à haute résolution
t : triplet
t : tert
TFA : trifluoroacetic acid
THF : tétrahydrofurane
ThrRS : thréonyl-ARNt synthétase
TMS : triméthylsilyl
T°p : température de la pièce
Tr : trityl
TrpRS : tryptophanyl-ARNt synthétase
T. thermophilus : *Thermus thermophilus*
TyrRS : tyrosinyl-ARNt synthétase
V_{max} : vitesse maximale
V_o : vitesse initiale

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1. Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS)

1.1.1. Fonction des aaRS

Dans la biosynthèse des protéines, les ARN de transfert permettent de traduire l'information contenue dans les acides nucléiques (ADN) en séquences d'acides aminés (protéines). En fait, les ARN de transfert (ARNt) agissent comme des transporteurs spécifiques à chacun des acides aminés lors du processus de traduction dans le ribosome (figure 1.1). Tous les ARNt possèdent une portion complémentaire au codon de l'ARN messenger, permettant ainsi l'élongation du peptide avec l'acide aminé requis (l'ARN messenger (ARNm) provient du processus de transcription de l'ADN dans le noyau des cellules). La fixation des acides aminés sur les ARNt est donc un processus primordial pour la synthèse de l'ensemble de nos protéines. Comme celles-ci sont constituées de 20 types d'acides aminés différents, les organismes vivants nécessitent 20 aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) spécifiques. Le rôle des aaRS est de catalyser l'estérification de chacun des acides aminés à leurs ARNt respectifs.

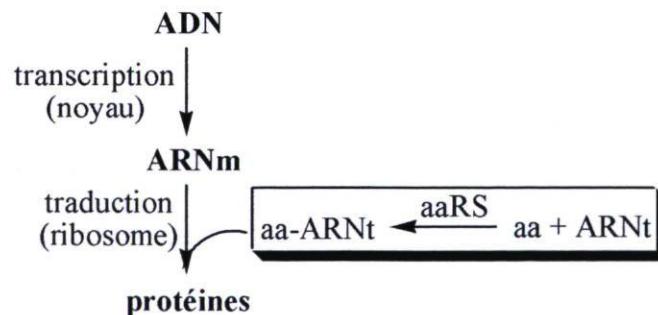


Figure 1.1. Biosynthèse des protéines et fonction des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS).

1.1.2. Mécanisme des aaRS

Le mécanisme enzymatique peut être schématisé en deux étapes (figure 1.2).^{1,2} Dans la première étape, l'acide carboxylique de l'acide aminé réagit sur l'adénosine triphosphate

(ATP) pour former un intermédiaire activé : l'adénylate d'acétyl (aa-AMP). Dans cet intermédiaire, l'anhydride carboxylique-phosphorique permet au carboxyle de l'acide aminé d'être plus réactif. L'ion magnésium (Mg^{2+}) facilite le déplacement du groupe sortant (un pyrophosphate) lors de cette première addition-élimination. Dans la seconde étape, l'acide aminé est transféré sur l'adénosine terminale de l'ARNt (chaque ARNt se termine par la séquence CCA). L'acide aminé est estérifié sur un des alcools libres (2' ou 3') du ribose de l'adénosine pour donner l'ARNt correctement apparié (produit final) et l'adénosine monophosphate comme sous-produit.

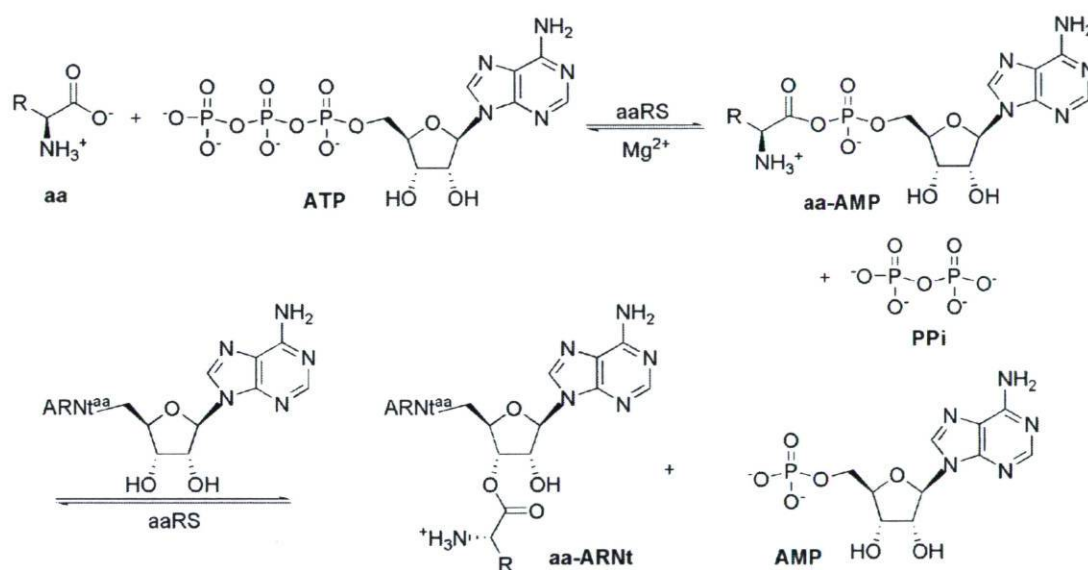


Figure 1.2. Mécanisme des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS).

1.1.3. Classification

Les aaRS sont divisées en deux grandes catégories (classe I et II) selon les motifs retrouvés dans le site catalytique (séquences d'acides aminés et arrangements typiques d'hélices α et de feuilletts β).³⁻⁹ Les enzymes de classe I contiennent les séquences HIGH et KMSKS dans le site de liaison de l'ATP. Le site actif est composé d'un arrangement en alternance d'hélices α , de feuilletts β et de boucles de type « Rossman fold ». Sauf dans le cas de la phénylalanine-tRNA synthétase¹⁰, les enzymes de classe I catalysent l'estérification

en position 2'-OH de l'adénosine terminale de l'ARNt (l'acide aminé peut par la suite migrer en position 3'-OH par une transestérisation intramoléculaire). La liaison de l'ATP par les enzymes de classe I se fait en conformation étendue et le carbonyle activé de l'intermédiaire de la réaction interagit peu avec l'enzyme. D'un autre côté, les enzymes de classe II ont un site actif situé au coeur d'un domaine formé d'un feuillet de 7 barreaux β et de 3 hélices α . Structurellement, l'ATP est lié à l'enzyme avec une conformation repliée et le carbonyle activé de l'intermédiaire de la réaction interagit fortement avec l'enzyme. Contrairement aux enzymes de classe I, elles catalysent l'aminacylation en position 3'-OH de l'adénosine terminale de l'ARNt. La tableau 1.1 associe chacune des aaRS à sa classe correspondante, ainsi qu'à des sous-classes (a, b et c). Les aaRS de la même « classe-sous-classe » ont probablement une enzyme primitive commune et sont devenues spécifiques au fil de l'évolution. Ceci explique que les enzymes de la même sous-classe reconnaissent des acides aminés assez semblables (polaires, aromatiques, aliphatiques, soufrés, etc).

Tableau 1.1. Classification des aminoacyl-ARNt synthétases.

Classe I	aaRS	Classe II	aaRS
Ia	IleRS	IIa	GlyRS
	ValRS		HisRS
	LeuRS		ProRS
	MetRS		ThrRS
	CysRS		SerRS
	ArgRS		
Ib	LysRS I	IIb	AsnRS
	GlnRS		AspRS
Ic	GluRS	IIc	LysRS II
	TrpRS		AlaRS
	TyrRS		GlyRS
			PheRS

1.1.4. Cibler les aaRS pour de nouveaux antibiotiques

Les aminoacyl-ARNt synthétases ont évolué de façon divergente entre les bactéries et les mammifères à partir d'enzymes primitives communes. Par conséquent, l'inhibition sélective des aaRS bactériennes constitue une stratégie intéressante dans la recherche de nouveaux antibiotiques.¹¹⁻¹⁵ L'acide pseudomonique (figure 1.3), un antibiotique commercialisé sous le nom de Bactroban, illustre bien cette divergence des aaRS bactériennes. Il s'agit d'un inhibiteur de l'isoleucine-ARNt synthétase (IleRS) 8000 fois plus actif sur l'IleRS de *E. coli* que sur celle de foie de rat.¹⁶ D'autre part, les aaRS sont généralement similaires chez les organismes pathogènes, ce qui est avantageux en médecine clinique (antibiotiques avec un large spectre d'activité).

L'exploitation de nouvelles stratégies est indispensable pour contrer la résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques classiques (résistance acquise au cours de l'évolution par des mutations ou des transferts de gènes). Les infections par des organismes pathogènes résistants aux antibiotiques de dernier recours sont devenues courantes: *Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV) et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), par exemple. L'ensemble des aaRS constitue une cible potentielle pour la découverte d'antibiotiques avec de nouveaux mécanismes d'action. Les inhibiteurs des aaRS, en empêchant la synthèse des protéines, permettent d'obtenir des agents antibactériens efficaces. Les composés interférant avec la biosynthèse des protéines forment d'ailleurs une famille très importante au sein des antibiotiques (oxazolidinones, macrolides, aminoglycosides, cyclines, etc).

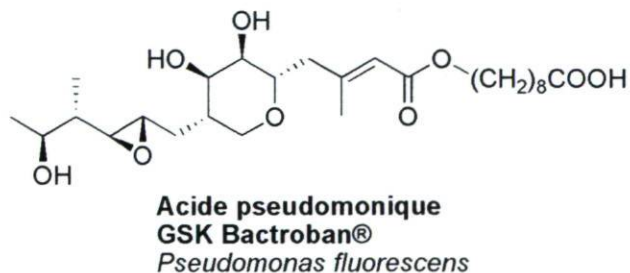


Figure 1.3. Structure de l'acide pseudomonique.

1.1.5. Inhibiteurs des aaRS

Différentes stratégies ont permis d'identifier des inhibiteurs des aaRS:

- La caractérisation de composés naturels aux propriétés antibiotiques a entraîné l'identification des premiers inhibiteurs des aaRS (très grande diversité).
- Le design rationnel en se basant sur le mécanisme de la réaction catalysée par les aaRS (analogues de l'adénylate d'aminocycle) a permis d'obtenir des inhibiteurs adaptés à chacune des aaRS.
- Le criblage à haut débit de banques moléculaires (composés naturels et synthétiques) est également une source importante d'inhibiteurs des aaRS, particulièrement pour l'industrie pharmaceutique.
- La modification d'inhibiteurs connus (études de relations structure-activité) génère des molécules avec de meilleures propriétés pharmacologiques (affinité, sélectivité, pharmacocinétique, etc).

Ces stratégies sont discutées plus en détail dans les sections suivantes.

1.1.5.1. Inhibiteurs naturels des aaRS

Il existe de nombreux inhibiteurs naturels des aaRS.^{13,17} Plusieurs sont des analogues relativement simples des acides aminés (figure 1.4) alors que d'autres présentent une plus grande complexité (figure 1.5). La figure 1.6 démontre que certains inhibiteurs naturels présentent une analogie forte avec l'intermédiaire activé de la réaction catalysée par les aminoacyl-ARNt-synthétases (l'adénylate d'aminocycle). Les exemples présentés illustrent aussi qu'une grande variété de structures chimiques inhibe les aminoacyl-ARNt synthétases. Les streptomycètes (bactéries peu pathogènes) sont une source particulièrement riche d'inhibiteurs des aaRS en raison de leur métabolisme secondaire complexe (grande variété de métabolites).

La cispentacine (figure 1.4) ressemble à l'acide aminé correspondant à la proline-ARNt synthétase et est un inhibiteur modéré de la ProRS de *Candida albicans*.¹⁸ La capsaïcine est un inhibiteur faible de la TyrRS des mammifères ($K_i = 41.7 \mu\text{M}$).¹⁹ Ce

composé, ainsi que plusieurs variantes de la même famille, est responsable du goût piquant retrouvé dans les piments. L'indolmycine a été isolée et brevetée en 1965 par la compagnie Pfizer.²⁰ Elle inhibe sélectivement la TrpRS bactérienne (IC₅₀ pour *E. coli* de 9.25 nM et IC₅₀ pour les cellules de foie de bœuf de 4.04 mM).²¹ L'indolmycine a un spectre d'activité antibactérienne plutôt étroit mais celle-ci pourrait éventuellement trouver des applications pour certaines infections (ulcères gastriques causés par *H. pylori* par exemple).¹⁴ La chuangxinmycine est un inhibiteur sélectif à la TrpRS bactérienne (IC₅₀ pour *S. aureus* de 20 nM et aucune inhibition à 30 µM pour les cellules de mammifère) et possède une activité antibactérienne sur plusieurs bactéries Gram-positives et Gram-négatives.²² La furanomycine²³ agit sur l'IleRS en mimant le substrat (isoleucine). L'IleRS forme non-correctement le furanomycine-ARNt^{lle} puis la furanomycine est incorporée dans les protéines (effet antibactérien).²⁴

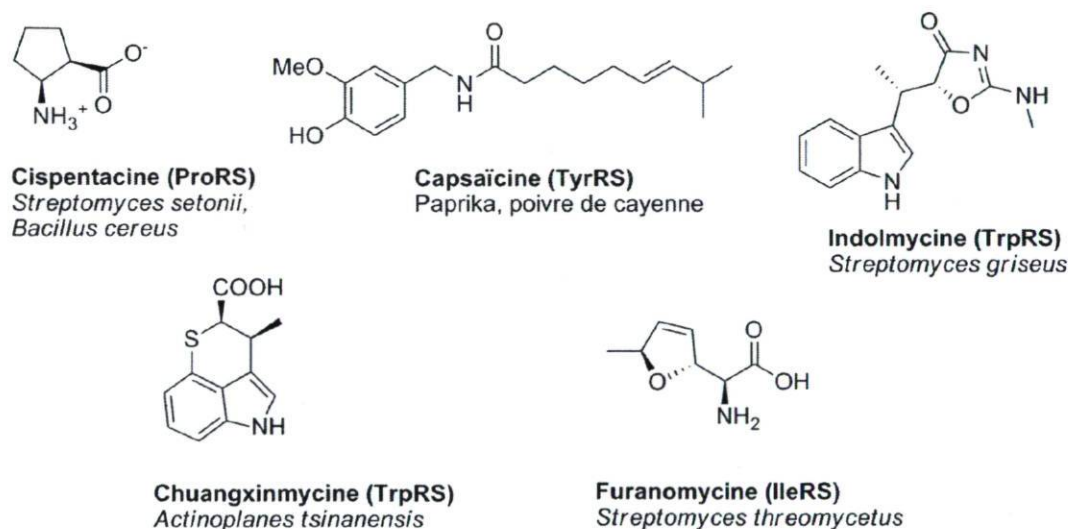


Figure 1.4. Exemples d'inhibiteurs naturels des aaRS (analogues simples des acides aminés).

L'ochratoxine A est un inhibiteur de la PheRS qui est actif sur les bactéries Gram-positives mais toxique pour les mammifères.²⁵ Ce composé aurait des mécanismes secondaires d'action sur d'autres enzymes (immunosuppression, effet tératogène et cancérigène).¹¹ La borrelidine est un macrolide qui inhibe la thréonyl-ARNt synthétase et fut nommé ainsi en raison de sa cytotoxicité sur les bactéries *Borrelia*.²⁶ La borrelidine a récemment été étudiée pour le traitement de la malaria, maladie causée par un parasite du

genre *Plasmodium* (protozoaire).²⁷ La granaticine est un produit naturel produit par les bactéries *Streptomyces*, qui inhibe la leucyl-ARNt synthétase (effet bactériostatique sur *Bacillus subtilis*, dépendant de la concentration en leucine dans le milieu de croissance).²⁸



Figure 1.5. Exemples d'inhibiteurs naturels des aaRS (molécules complexes).

L'ascamycine est une molécule analogue à l'intermédiaire activé de la réaction catalysée par l'alanyl-ARNt synthétase (adénylate d'alanine).²⁹ Elle a un effet antibactérien sélectif aux *Xanthomonas* (pathogènes chez les plantes). L'ascamycine a par ailleurs été une source d'inspiration pour la synthèse d'un grand nombre d'analogues de l'intermédiaire activé (les aminocylsulfamoyl-adénosines, voir chapitre 3). La microcine C est un inhibiteur de l'AspRS comportant un lien acylphosphoramidate.³⁰ Cet antibiotique est particulier puisqu'il comporte une portion peptidique qui permet son transport actif dans la membrane bactérienne. Dans le cytoplasme, une peptidase hydrolyse le lien Ala-Asp de la microcine C, libérant l'analogue cytotoxique de l'adénylate d'aspartyle (principe des pro-drogues).



Figure 1.6. Exemples d'inhibiteurs naturels des aaRS (analogues de l'adénylate d'aminoacyle).

1.1.5.2. Design basé sur le mécanisme (analogues de l'adénylate d' aminoacyle)

Les analogues stables de l'intermédiaire activé de la réaction catalysée par les aaRS (aa-AMP) sont généralement de puissants inhibiteurs des aaRS. Ces molécules synthétiques ont typiquement 10^2 à 10^3 plus d'affinité pour l'enzyme que les substrats (acides aminés et ATP).¹⁷ La stratégie utilisée pour mimer l'adénylate d' aminoacyle est le remplacement du groupement chimiquement instable (l'anhydride carboxylique-phosphorique) par un groupement stable par rapport aux nucléophiles (l'eau et l'alcool libre de l'ARNt). Selon ce principe, les adénylates d' aminoalcool ont été les premiers composés synthétisés dans le but de mimer l'intermédiaire activé des aaRS (figure 1.7).³¹⁻³² Les aminoacylsulfamoyl-adénosines, dérivés de l'ascamycine, ont par la suite été synthétisés et caractérisés comme inhibiteurs des aaRS. Leur affinité pour les aaRS est généralement très forte (de l'ordre du nM). Les β -cétophosphonates sont moins courants dans la littérature, peut-être en raison de la plus grande complexité de synthèse pour ces molécules. Les adénylates d' aminoalcool, les aminoacylsulfamoyl-adénosines et les β -cétophosphonates sont les analogues de l'intermédiaire activé qui seront détaillés davantage (chapitres 2, 3 et 4, respectivement). Plusieurs autres groupements ont été utilisés pour mimer l'anhydride carboxylique-phosphorique instable de l'intermédiaire activé des aaRS, par exemple : les esters³³⁻³⁴, les amides³⁴, les hydroxamates³⁴⁻³⁶, les sulfamides³⁷, les *N*-alkoxysulfamides³⁸, les *N*-hydroxysulfamides³⁸, les acylphosphoramidates³⁹⁻⁴⁰ et les anhydrides phosphoniques⁴¹ (figure 1.8).

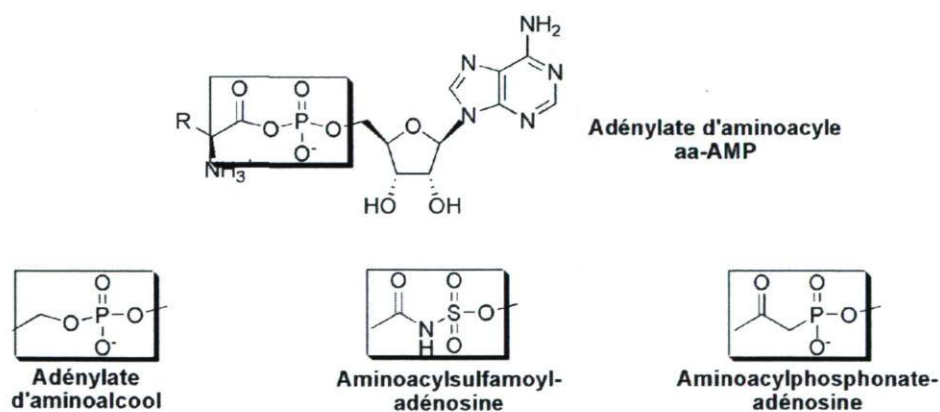


Figure 1.7. Principaux analogues stables de l'adénylate d' aminoacyle (aa-AMP).

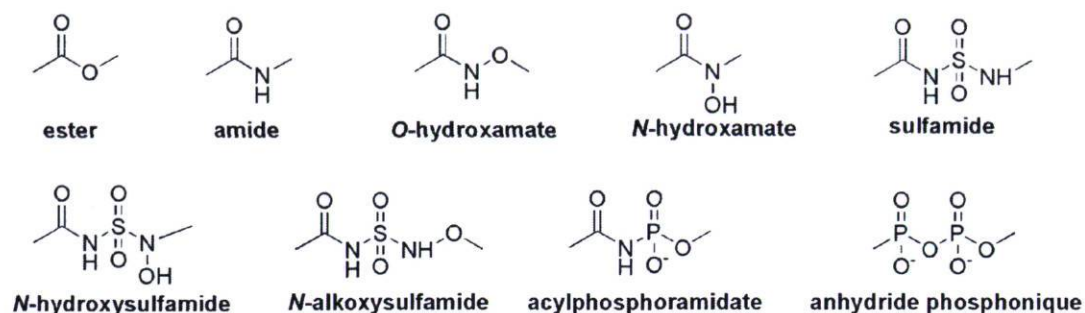


Figure 1.8. Autres groupements analogues à l'anhydride carboxylique-phosphorique de l'aa-AMP.

Les inhibiteurs analogues à l'adénylate d'aminocyle sont grandement utiles pour l'étude des mécanismes d'aminocyclation et comme ligand pour cristalliser les aaRS (dans le but d'obtenir des structures par diffraction des rayons-X). Bien que certains de ces inhibiteurs soient sélectifs aux bactéries *in vitro*⁴², ceux-ci sont rarement antibactériens (activité faible *in vivo*). L'analogue *N*-hydroxamate de l'adénylate de méthionyle (figure 1.8) est actif sur *E. coli* et *B. cereus* (CMI de 0.5 et 8 µg/mL, respectivement).³⁶ Généralement, il semble que la grande polarité des analogues de l'adénylate d'aminocyle soit un facteur limitant à leur transport au travers des membranes bactériennes.¹³⁻¹⁴ Ce type de molécule est donc peu adapté au développement d'antibiotiques.

1.1.5.3. Criblage à haut débit

1.1.5.3.1. Criblage virtuel (*in silico*)

La bioinformatique permet d'exploiter les informations contenues dans les structures d'aaRS complexées avec un ligand (ces structures sont obtenues par diffraction des rayons-X). Différents logiciels modélisent le site actif afin d'évaluer de façon virtuelle le potentiel d'inhibition d'une variété de molécules provenant de banques moléculaires. Plusieurs inhibiteurs de l'AsnRS de *Brugia malayi*, un nématode parasite, ont ainsi été découverts et caractérisés.⁴³ Le meilleur composé de cette série (NSC35467, figure 1.9) est un inhibiteur modéré de l'AsnRS de *B. malayi* (IC₅₀ de 25 µM) et de l'AsnRS humaine (80% d'inhibition à 25 µM). Avec une technique similaire, certains dérivés de l'acide benzoïque ont été identifiés comme inhibiteur de la TrpRS de *Streptococcus epidermis*.⁴⁴

Le meilleur de ces composés ($IC_{50} = 18.3 \mu M$) affecte peu la TrpRS humaine ($IC_{50} > 100 \mu M$) et possède une légère activité *in vivo* (MIC de $100 \mu M$).

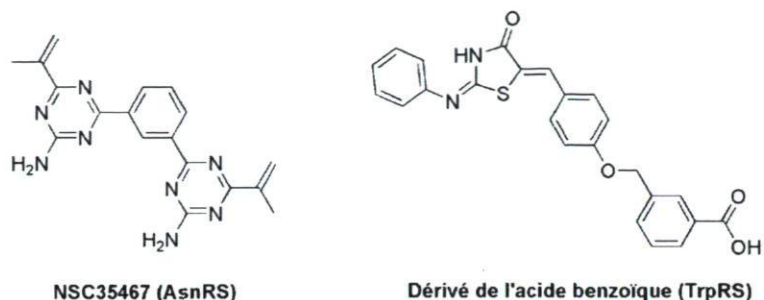


Figure 1.9. Inhibiteurs des aaRS découverts par criblage virtuel.

1.1.5.3.2. Criblage conventionnel (*in vitro*)

Le criblage à haut débit est une technique largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique. Le principe général est de tester systématiquement une grande variété de composés sur une cible biologique d'intérêt (aaRS dans ce cas-ci). Deux aspects sont donc primordiaux : posséder une imposante bibliothèque moléculaire et pouvoir effectuer de nombreux tests biologiques (en répétition). La figure 1.10 illustre des exemples provenant de l'industrie pharmaceutique d'inhibiteurs identifiés par criblage à haut débit. Le premier composé est une quinolone active sur la MetRS de *S. Aureus* ($K_i = 100 \text{ nM}$).⁴⁵ Le second composé est une quinoline inhibant sélectivement la ProRS de *Candida albicans* ($IC_{50} = 500 \text{ nM}$) par rapport à la ProRS de l'humain ($IC_{50} > 100 \mu M$).⁴⁶

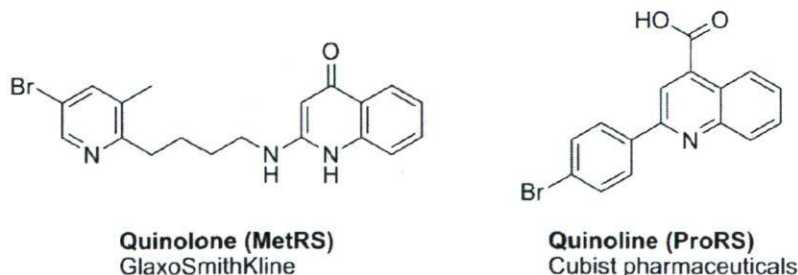


Figure 1.10. Inhibiteurs des aaRS découverts par criblage *in vitro*.

La chimie combinatoire est un complément au criblage à haut débit puisqu'elle permet de générer rapidement un grand nombre de molécules organiques (bibliothèque moléculaire). Plusieurs nouveaux inhibiteurs de la LysRS de *Trypanosoma brucei* ont été

identifiés avec cette technique.⁴⁷ Des différentes combinaisons de groupements testées, l'hydroxamate représenté à la figure 1.11 est le meilleur inhibiteur ($K_i = 10 \mu\text{M}$).

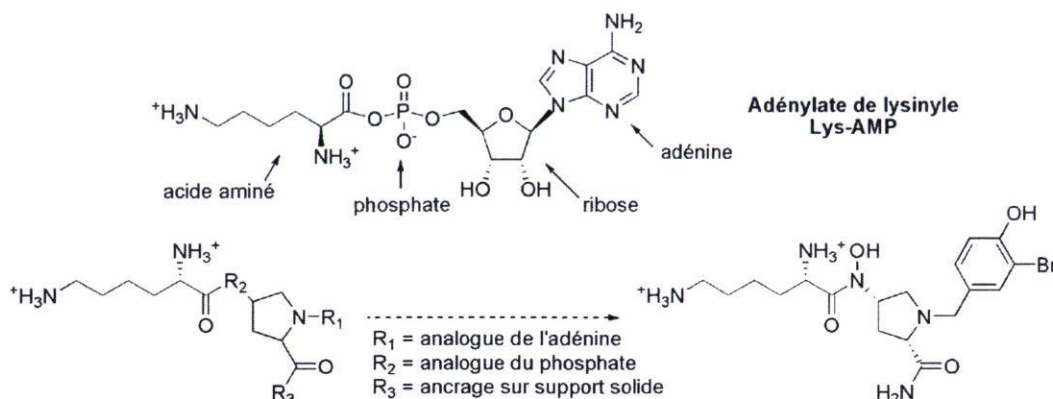


Figure 1.11. Exemple d'un inhibiteur d'aaRS découvert par chimie combinatoire.

1.1.5.4. Modification d'inhibiteurs connus (relations structure-activité)

L'icofungipen (figure 1.12) est un β -amino-acide dérivé de la cispentacine, découvert par la pharmaceutique Bayer (nommé BAY 10-8888 puis PLD-118). C'est en s'inspirant de la cispentacine et de l'acide 2-aminocyclohexènedicarboxylique (deux composés actifs sur *Candida albicans*) qu'une étude de relations structure-activité a été initialement entreprise.⁴⁸ Celle-ci a démontré l'efficacité supérieure de l'icofungipen comme antifongique (CMI de $0.13 \mu\text{g/mL}$ pour *C. albicans*) de même qu'un profil pharmacologique intéressant. Ce composé est maintenant en étude clinique de phase II sous la licence de la compagnie PLIVA pour le traitement oral des infections aux *Candida*. Le mécanisme d'action est unique car cette molécule est transportée de façon active par des perméases (accumulation à l'intérieur des levures d'un facteur 200).⁴⁹ L'icofungipen inhibe l'isoleucyl-ARNt synthétase et bloque ainsi la biosynthèse des protéines.

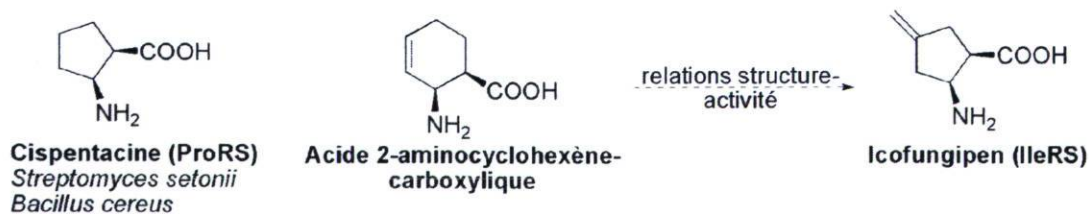


Figure 1.12. Exemple d'une étude de relations structure-activité menée à partir d'un produit naturel.

Le composé CB432 (figure 1.13) est un analogue de l'adénylate d'isoleucine développé par « Cubist pharmaceuticals ». Dans le cadre d'une étude de relations structure-activité, une série de dérivés de l'isoleucylsulfamoyl-adénosine a été synthétisée en modifiant la portion « adénosine » par différents tétrazoles substitués.²⁰ L'inhibiteur CB432 est actif sur l'IleRS de *S. aureus*, *E. faecalis* et *E. coli* (IC₅₀ de 0.5 nM, 8.6 nM et 1 nM, respectivement) tout en étant sélectif (IC₅₀ pour l'humain de 570 nM).⁵⁰ Il possède une activité antibiotique intéressante (CMI de 0.5 µg/mL pour *S. pyogenes*) mais son efficacité clinique est compromise par sa forte affinité pour les protéines du sérum (transport dans le sang). Le composé CB432 démontre qu'il existe un potentiel pour le développement d'antibiotiques analogues aux adénylates d'aminoacyle.

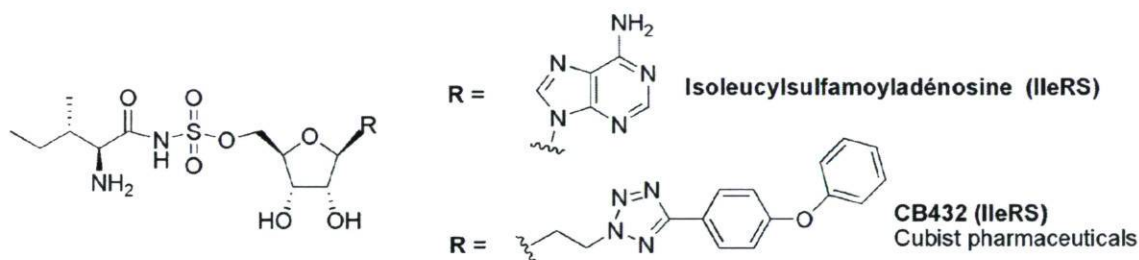


Figure 1.13. Exemple d'une étude de relations structure-activité (à partir d'un analogue de l'adénylate d'aminoacyle).

REP8839 (figure 1.14) est un inhibiteur de MetRS développé à partir d'une quinolone découverte par criblage à haut débit (figure 1.11).¹¹ Il est très actif *in vitro* sur *S. aureus* (IC₅₀ < 1.9 nM) et affecte très peu l'enzyme des mammifères (K_i > 500 nM).⁵¹ Son activité antibiotique comprend l'ensemble des bactéries Gram-positives (CMI très faibles).⁵² Des études cliniques de phase I (licence de Réplidyne) sont en cours pour son utilisation contre diverses infections topiques.

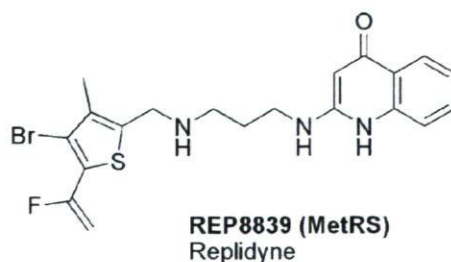


Figure 1.14. Exemple d'une étude de relations structure-activité (à partir d'une molécule identifiée par criblage à haut débit).

1.2. Les aminoacyl-ARNt amidotransférases (AdT)

1.2.1. Fonction des AdT

Les bactéries possèdent rarement l'ensemble des 20 aminoacyl-ARNt synthétases nécessaires à l'estérification des acides aminés sur leurs ARNt spécifiques. Dans plusieurs cas, les bactéries n'ont pas la GlnRS et/ou l'AsnRS, indispensables à l'incorporation de la glutamine et/ou l'asparagine dans leurs protéines. Elles doivent donc utiliser une voie indirecte pour la formation des ARNt respectifs (Gln-ARNt^{Gln} et Asn-ARNt^{Asn}).⁵³ Dans cette voie indirecte, une aminoacyl-ARNt synthétase non discriminante (ND-GluRS et ND-AspRS) estérifie d'abord l'ARNt (ARNt^{Gln} et ARNt^{Asn}) avec l'acide glutamique et l'acide aspartique (figure 1.15). Deux ARN de transfert incorrectement appariés sont donc générés dans cette première étape : Glu-ARNt^{Gln} et Asp-ARNt^{Asn}. Par après, une aminoacyl-ARNt amidotransférase effectue la transamidation des chaînes latérales de ces ARNt pour donner les ARNt correctement appariés : Gln-ARNt^{Gln} et Asn-ARNt^{Asn}.



Figure 1.15. Voie indirecte du chargement de la glutamine et de l'asparagine sur leurs ARN de transfert.

Les aminoacyl-ARNt amidotransférases sont également nécessaires pour certains organismes dépourvus d'asparagine synthétase (*Thermus thermophilus* et *Deinococcus radiodurans*, par exemple). Ces bactéries possèdent l'AsnRS et sont donc capables de synthétiser directement l'Asn-ARNt^{Asn}. Toutefois, ils nécessitent une Asp-ARNt amidotransférase pour la biosynthèse de l'asparagine (via un Asn-ARNt).⁵⁴

1.2.2. Mécanisme des AdT

Le mécanisme de la réaction catalysée par les aminoacyl-ARNt-amidotransférases est représenté à la figure 1.16. La glutamine est d'abord hydrolysée pour produire de

l'ammoniac (NH_3) et de l'acide glutamique comme sous-produit (étape glutaminase). L'acide aminé porté par l'ARNt est par la suite phosphorylé à partir de l'adénosine triphosphate (ATP), ce qui engendre un intermédiaire comportant un lien anhydride carboxylique-phosphorique instable (étape kinase). Cet intermédiaire instable peut par la suite réagir avec l'ammoniac libéré précédemment pour donner l'ARNt chargé avec l'acide aminé approprié : $\text{Gln-ARNt}^{\text{Gln}}$ ou $\text{Asn-ARNt}^{\text{Asn}}$ (étape transamidase). L'étape glutaminase et l'étape kinase-transamidase s'effectuent dans deux sites actifs distincts. Lorsque l'AdT est privée de sa source d'ammoniac (la glutamine), un sous-produit de cyclisation se forme à partir du glutamyl-ARNt^{Gln} (le pyroglutamyl-ARNt^{Gln}), ce qui supporte l'existence de l'intermédiaire carboxylique-phosphorique instable.⁵⁵ Les AdT utilisent le groupement OH d'une sérine comme nucléophile lors de l'étape glutaminase et se distinguent ainsi des autres transamidases qui emploient généralement la fonction SH d'une cystéine.

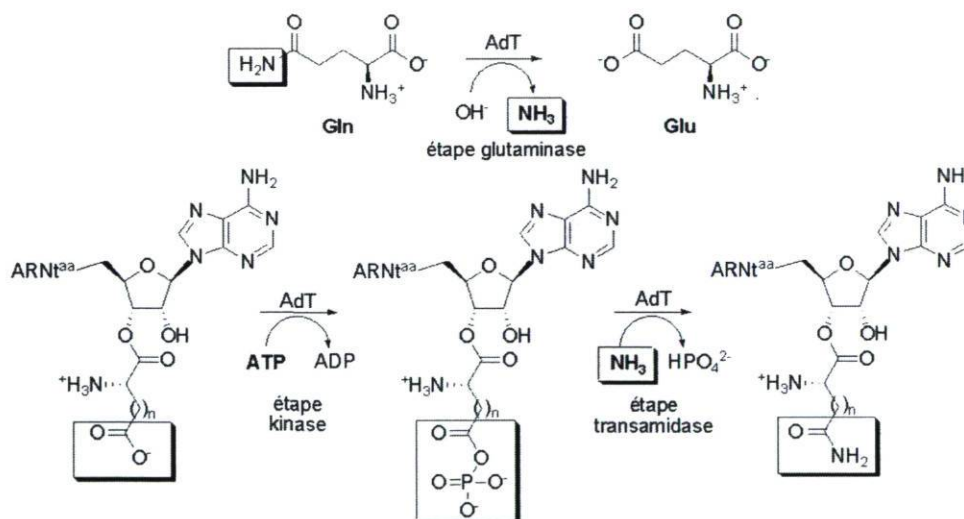


Figure 1.16. Mécanisme des aminoacyl-ARNt amidotransférases (AdT).

$\text{Glu-ARNt}^{\text{Gln}}$ amidotransférase : $n = 2$, $\text{ARNt}^{\text{aa}} = \text{ARNt}^{\text{Gln}}$

$\text{Asp-ARNt}^{\text{Asn}}$ amidotransférase : $n = 1$, $\text{ARNt}^{\text{aa}} = \text{ARNt}^{\text{Asn}}$

1.2.3. Classification des AdT

Deux types d' aminoacyl-ARNt amidotransférases sont connus : GatCAB (trimère codé par les gènes *gatA*, *gatB* et *gatC*) et GatDE (dimère codé par les gènes *gatD* et *gatE*). GatCAB catalyse la transamidation de l'Asp-ARNt^{Asn} et/ou du Glu-ARNt^{Gln}, alors que GatDE effectue uniquement la transamidation du Glu-ARNt^{Gln}.⁵⁶ L'enzyme *gatDE* est

associée aux archaea alors que GatCAB est largement répandue chez les bactéries.⁵⁷ Les chloroplastes et les mitochondries (organelles des eucaryotes) utiliseraient également l'enzyme GatCAB, ce qui supporte la théorie selon laquelle les organelles sont d'origine bactérienne.^{56,58} La synthèse du Gln-ARNt^{Gln} diffère donc dans les trois domaines du vivant.

Les structures des deux types d'AdT (GatDE et GatCAB) ont été obtenues par diffraction des rayons-X.⁵⁹⁻⁶¹ Les portions GatD et GatA sont responsables de la production d'ammoniac mais sont structurellement différentes : GatA est un analogue des amidases⁶² alors que GatD est un analogue des asparaginases de type I (AsnA).⁵⁶ Les portions GatE et GatB sont responsables de l'activité transamidase. L'unité GatC de GatCAB agirait comme une ceinture pour stabiliser le complexe GatAB. L'activité glutaminase des unités GatD et GatA est couplée au site actif de transamidation (gatE et gatB) par un canal protéique de 40 et 30 Å de longueur, respectivement.

1.2.4. Cibler les AdT pour de nouveaux antibiotiques

Les inhibiteurs des aminoacyl-ARNt amidotransférases sont des antibiotiques potentiels contre les microorganismes pathogènes utilisant la voie indirecte de formation du Gln-ARNt^{Gln} et/ou Asn-ARNt^{Asn}.⁶³ Les effets secondaires sur l'hôte eucaryotique devraient être faibles car il forme ces aa-ARNt par la voie directe dans le cytosol. Le tableau 1.2 rapporte des exemples de bactéries pathogènes utilisant la voie indirecte des amidotransférases ainsi que les maladies courantes associées.⁶⁴⁻⁶⁵

Tableau 1.2. Exemples de bactéries pathogènes utilisant la voie des AdT.

Organisme	aaRS absente	maladie associée
<i>Bacillus subtilis</i>	GlnRS	infections opportunistes
<i>Borrelia burgdorferi</i>	GlnRS	maladie de Lyme
<i>Enterococcus faecalis</i>	GlnRS	infections diverses
<i>Helicobacter pylori</i>	AsnRS, GlnRS	ulcères gastriques
<i>Mycobacterium leprae</i>	AsnRS, GlnRS	lèpre
<i>M. tuberculosis</i>	AsnRS, GlnRS	tuberculose
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	AsnRS	gonorrhée
<i>N. meningitidis</i>	AsnRS	méningite
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AsnRS	infections diverses
<i>Staphylococcus aureus</i>	GlnRS	syndrome du choc toxique
<i>Streptococcus pneumonia</i>	GlnRS	infections diverses
<i>Treponema pallidum</i>	GlnRS	pneumonie syphilis

1.2.5. Inhibiteurs des AdT

La recherche sur les inhibiteurs des AdT est limitée à quelques molécules synthétiques (design basé sur le mécanisme de la réaction enzymatique). Des chercheurs de la compagnie « DuPont Pharmaceuticals » ont montré que le glutamyl- γ -boronate (figure 1.17) est un bon inhibiteur de l'AdT de *S. pyogenes*.⁶⁶⁻⁶⁷ Les acides boroniques sont reconnus pour leur efficacité comme piège à sérine dans les protéases par la formation d'un acétal sérine-boronate. Le remplacement de la fonction amido-donneur de la glutamine par un acide boronique a donc été réalisé pour piéger par un lien covalent la sérine du site actif glutaminase. Les inhibiteurs présentés à la figure 1.18 sont actifs *in vivo* sur divers microorganismes utilisant les AdT (CMI $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ pour *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* et *E. faecalis*). Les relations structure-activité ont toutefois révélé que peu de changements sont tolérés pour conserver l'activité (optimisation difficile).

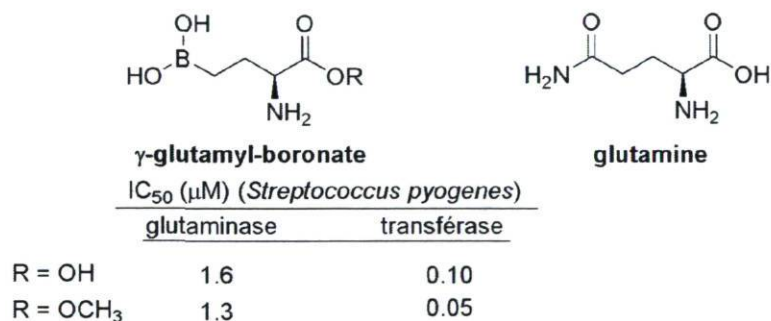


Figure 1.17. Acides boroniques en tant qu'inhibiteurs des aminoacyl-ARNt amidotransférases.

Plusieurs analogues de l'ATP ont été testés comme inhibiteurs des aminoacyl-ARNt amidotransférases (étapes kinase-transamidase).⁶⁸ L'ATP- γ S est un analogue de l'ATP où l'atome d'oxygène est remplacé par un soufre sur le phosphate γ (figure 1.18). Celui-ci est un inhibiteur modéré de l'AdT de *S. pyogenes* ($IC_{50} = 190 \mu\text{M}$).

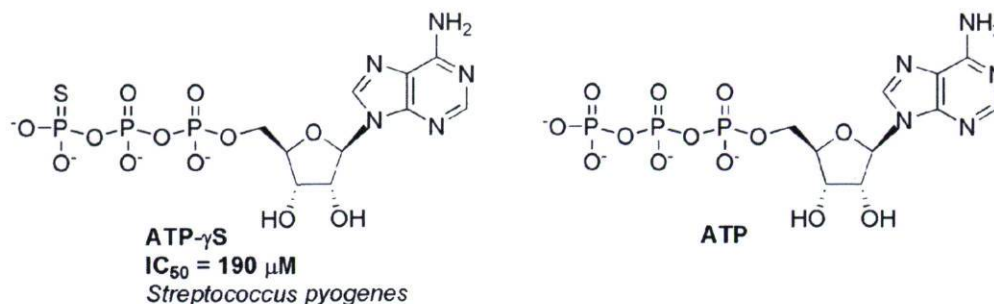


Figure 1.18. Exemple d'un analogue de l'ATP en tant qu'inhibiteur des aminoacyl-ARNt amidotransférases.

Ces inhibiteurs ne peuvent être sélectifs sur les AdT car ils ressemblent aux substrats de plusieurs autres voies métaboliques (la glutamine est utilisée dans d'autres transamidases et l'ATP se retrouve dans une multitude de processus biochimiques). Ils ont donc un potentiel plutôt limité pour le développement d'antibiotiques. Cependant, les analogues de la glutamine et de l'ATP sont intéressants pour effectuer des études mécanistiques ou structurales.

1.3. Objectifs généraux

La synthèse d'inhibiteurs des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) et des aminoacyl-ARNt amidotransférases (AdT) répond à plusieurs objectifs multidisciplinaires :

- Faciliter la cristallisation et la détermination des structures de ces enzymes par diffraction des rayons-X.
- Mieux comprendre les mécanismes d'aminocyclation des ARN de transfert.
- Contribuer à la recherche de nouveaux antibiotiques. L'inhibition sélective des aminoacyl-ARNt synthétases et des aminoacyl-ARNt amidotransférases a été identifiée comme une stratégie valable dans la quête de nouveaux antibiotiques.

1.4. Références

- 1) Ibba, M.; Soll, D. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 617-650.
- 2) Martinis, S. A.; Plateau, P.; Cavarelli, J.; Florentz, C. *Biochimie* **1999**, *81*, 683-700.

- 3) Eriani, G.; Delarue, M.; Poch, O.; Gangloff, J.; Moras, D. *Nature* **1990**, *347*, 203-206.
- 4) Cramer, F.; Freist, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 190-200.
- 5) Cusack, S.; Berthet-Colominas, C.; Härtleln, M.; Nassar, N.; Leberman, R. *Nature* **1990**, *347*, 249-255.
- 6) Leberman, R.; Härtleln, M.; Cusack, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1089*, 287-298.
- 7) Ruff, M.; Krishnaswamy, S.; Boeglin, M.; Poterszman, A.; Mitschler, A.; Podjarny, A.; Rees, B.; Thierry, J. C.; Moras, D. *Science* **1991**, *252*, 1682-1689.
- 8) Cusack, S.; Härtleln, M.; Leberman, R. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 3489-3498.
- 9) Cusack, S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 881-889.
- 10) Fraser, T. H.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 3044-3048.
- 11) Ochsner, U. A.; Sun, X.; Jarvis, T.; Critchley, I.; Janjic, N. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2007**, *16*, 573-593.
- 12) Schimmel, P.; Tao, J.; Hill, J. *FASEB J.* **1998**, *12*, 1599-1609.
- 13) Kim, S.; Lee, S. W.; Choi, E.-C.; Choi, S. Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 278-288.
- 14) Hurdle, J. G.; O'Neill, A. J.; Chopra, I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4821-4833.
- 15) Finn, J.; Tao, J. dans *The Aminoacyl tRNA synthetases*; Ibba, M., Francklyn, C., Cusack, S. Eds.; Landes Bioscience: Austin, TX, 2005; pp 405-413.
- 16) Hughes, J.; Mellows, G. *Biochem. J.* **1980**, *191*, 209-219.
- 17) Chênevert, R.; Bernier, S.; Lapointe, J. In *Translation Mechanisms*; Lapointe, J., Brakier Gingras, L., Eds.; Landes Bioscience/Kluwer Academic: Georgetown, TX/New York, 2003; pp 416-428.
- 18) Konishi, M.; Nishio, M.; Saitoh, K.; Miyaki, T.; Oki, T.; Kawaguchi, H. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1749-1755.
- 19) Cochereau, C.; Sanchez, D.; Bourhaoui, A.; Creppy, E. E. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1996**, *141*, 133-137.
- 20) Beaulieu, D.; Ohemeng, K. A. *Expert Opin. Ther. Targets* **1999**, *9*, 1021-1028.
- 21) Kanamura, T.; Nakano, Y.; Toyoda, Y.; Miyagawa, K.-I.; Tada, M.; Kaisho, T.; Nakao, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2455-2459.

- 22) Brown, M. J.; Carter, P. S.; Fenwick, A. E.; Fosberry, A. P.; Hamprecht, D. W.; Hibbs, M. J.; Jarvest, R. L.; Mensah, L.; Milner, P. H.; O'Hanlon, P. J.; Pope, A. J.; Richardson, C. M.; West, A.; Witty, D. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3171-3174.
- 23) Tanaka, K.; Tamaki, M.; Watanabe, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *195*, 244-245.
- 24) Kohno, T.; Kohda, D.; Haruki, M.; Yokoyama, S.; Miyazawa, T. *J. Biol. Chem.* **1990**, *12*, 6931-6935.
- 25) Konrad, I.; Roschenthaler, R. *FEBS Lett.* **1977**, *83*, 341-347.
- 26) Berger, J.; Lampolsky, L. M.; Goldberg, M. W. *Arch. Biochem.* **1949**, *22*, 476-478.
- 27) Ootoguro, K.; Ui, H.; Ishiyama, A.; Koboyashi, M.; Togashit, H.; Takahashi, Y.; Masuma, R.; Tanaka, H.; Tomoda, H.; Yamada, H.; Omura, S. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 727-729.
- 28) Ogilvie, A.; Wiebauer, K.; Kersten, W. *Biochem. J.* **1975**, *152*, 511-515.
- 29) Isono, K.; Uramoto, M.; Kusakabe, H.; Miyata, N.; Koyama, T.; Ubukata, M.; Sethi, S. K.; McCloskey, J. A. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 670-672.
- 30) Metlitskaya, A.; Kazakov, T.; Kommer, A.; Pavlova, O.; Praetorius-Ibba, M.; Ibba, M.; Krashennnikov, I.; Kolb, V.; Khmel, I.; Severinov, K. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18033-18042.
- 31) Sandrin, E.; Boissonnas, R. A. *Helv. Chim. Acta* **1966**, *49*, 76-82.
- 32) Cassio, D.; Lemoine, F.; Waller, J.-P.; Sandrin, E.; Boissonnas, R. A. *Biochemistry* **1967**, *6*, 827-836.
- 33) Desjardins, M.; Desgagnés, J.; Lacoste, L.; Yang, F.; Morin, M. P.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2363-2366.
- 34) Lee, J.; Kang, S. U.; Kim, S. Y.; Kim, S. E.; Jo, Y. J.; Kim, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 965-968.
- 35) Lee, J.; Kang, S. U.; Kim, S. Y.; Kim, S. E.; Kang, M. K.; Jo, Y. J.; Kim, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 961-964.
- 36) Lee, J.; Kang, S. U.; Kang, M. K.; Chun, M. W.; Jo, Y. J.; Kwak, J. H.; Kim, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1365-1370.
- 37) Brown, P.; Richardson, C. M.; Mensah, L. M.; O'Hanlon, P. J.; Osborne, N. F.; Pope, A. J.; Walker, G. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2473-2485.

- 38) Lee, J.; Kim, S. E.; Lee, J. Y.; Kim, S. Y.; Kang, S. U.; Seo, S. H.; Chun, M. W.; Kang, T.; Choi, S. Y.; Kim, H. O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1087-1092.
- 39) Moriguchi, T.; Yanagi, T.; Kunimori, M.; Wada, T.; Sekine, M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8229-8238.
- 40) Sekine, M.; Okada, K.; Seio, K.; Kakeya, H.; Osada, H.; Obata, T.; Sasaki, T. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 314-326.
- 41) Biryukov, A. I.; Ishmuratov, B. K.; Khomutov, R. M. *FEBS Lett.* **1979**, *91*, 249-252.
- 42) Balg, C.; Blais, S. P.; Bernier, S.; Huot, J. L.; Couture, M.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 295-304.
- 43) Sukuru, S. C. K.; Crepin, T.; Milev, Y.; Marsh, L. C.; Hill, J. B.; Anderson, R. J.; Morris, J. C.; Rohatgi, A.; O'Mahony, G.; Grotli, M.; Danel, F.; Page, M. G. P.; Härtlein, M.; Cusack, S.; Kron, M. A.; Kuhn, L. A. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2006**, *20*, 159-178.
- 44) Wu, Y.; Yu, K.; Xu, B.; Chen, L.; Chen, X.; Mao, J.; Danchin, A.; Shen, X.; Qu, D.; Jaing, H. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 502-509.
- 45) Jarvest, R. L.; Berge, J. M.; Berry, V.; Boyd, H. F.; Brown, M. J.; Elder, J. S.; Forrest, A. K.; Fosberry, A. P.; Gentry, D. R.; Hibbs, M. J.; Jaworski, D. D.; O'Hanlon, P. J.; Pope, A. J.; Rittenhouse, S.; Sheppard, R. J.; Slater-Radosti, C.; Worby, A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1959-1962.
- 46) Yu, X. Y.; Hill, J. M.; Yu, G.; Yang, Y.; Kluge, A. F.; Keith, D.; Finn, J.; Gallant, P.; Silverman, J.; Lim, A. *Bioorg. Med. Chem Lett.* **2001**, *11*, 541-544.
- 47) Farrera-Sinfreu, J.; Español, Y.; Geslain, R.; Guitard, T.; Albericio, F.; Ribas de Pouplana, L.; Royo, M. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 391-400.
- 48) Mittendorf, J.; Kunisch, F.; Matzke, M.; Militzer, H.-C.; Schmidt, A.; Schönfeld, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 433-436.
- 49) Ziegelbauer, K.; Babczinski, P.; Schönfeld, W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 2197-2205.
- 50) Schimmel, P.; Tao, J.; Hill, J. *FASEB J.* **1998**, *12*, 1599-1609.
- 51) Ochsner, U. A.; Young, C. L.; Stone, K. C.; Dean, F. B.; Janjic, N.; Critchley, I. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4253-4262.
- 52) Critchley, I. A.; Young, C. L.; Stone, K. C.; Ochsner, U. A.; Guiles, J.; Tarasow, T.; Janjic, N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4247-4252.

- 53) Feng, L.; Tumbula-Hansen, D.; Min, B.; Namgoog, S.; Salazar, J. C.; Orellana, O.; Söll, D. Transfer RNA-dependant amidotransferases: Key enzymes for Asn-tRNA and Gln-tRNA synthesis in nature, in *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*, Ibba, M.; Francklyn, C., Cusack, S. (Eds) Landes Biosciences, Georgetown, TX, 2005, pp. 314-319.
- 54) Min, B.; Pelaschier, J. T.; Graham, D. E.; Tumbula-Hansen, D.; Söll, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 2678-2683.
- 55) Feng, L.; Sheppard, K.; Tumbula-Hansen, D.; Söll, D. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8150-8155.
- 56) Tumbula, D. L.; Becker, H. D.; Chang, W.-Z.; Söll, D. *Nature* **2000**, *407*, 106-110.
- 57) Gagnon, Y.; Lacoste, L.; Champagne, N.; Lapointe, J. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 14856-14863.
- 58) Schön, A.; Kannangara, C. G.; Gough, S.; Söll, D. *Nature* **1988**, *331*, 187-190.
- 59) Nakamura, A.; Yao, M.; Chimnaronk, S.; Sakai, N.; Tanaka, I.; *Science* **2006**, *312*, 1954-1958.
- 60) Oshikane, H.; Sheppard, K.; Fukai, S.; Nakamura, Y.; Ishitani, R.; Numata, T.; Sherrer, R. L.; Feng, L.; Schmitt, E.; Panvert, M.; Blanquet, S.; Mechulam, Y.; Söll, D.; Nureki, O. *Science* **2006**, *312*, 1950-1954.
- 61) Schmitt, E.; Panvert, M.; Blanquet, S.; Mechulam, Y. *Structure* **2005**, *13*, 1421-1433.
- 62) Curnow, A. W.; Hong, K.; Yuan, R.; Kim, S.; Martins, O.; Winkler, W.; Henkin, T. M.; Söll, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 11819-11826.
- 63) Ataide, S. F.; Ibba, M. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 285-297.
- 64) Fritz, B.; Raczniak, G. A. *Biodrugs* **2002**, *16*, 331-337.
- 65) Raczniak, G.; Ibba, M.; Söll, D. *Toxicology* **2001**, *160*, 181-189.
- 66) Decicco, C. P.; Nelson, D. J.; Luo, Y.; Shen, L.; Horiuchi, K. Y.; Amsler, K. M.; Foster, L. A.; Spitz, S. M.; Merrill, J. J.; Sizemore, C. F.; Rogers, K. C.; Copeland, R. A.; Harpel, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2561-2564.
- 67) Harpel, M. R.; Horiuchi, K. Y.; Luo, Y.; Shen, L.; Jiang, W.; Nelson, D. J.; Rogers, K. C.; Decicco, C. P.; Copeland, R. A. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6398-6407.
- 68) Horiuchi, K. Y.; Harpel, M. R.; Shen, L.; Luo, Y.; Rogers, K. C.; Copeland, R. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6450-6457.

CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE D'ADÉNYLATES D'AMINOALCOOL

2.1. Introduction

Les adénylates d'aminoolcool sont les premiers inhibiteurs synthétisés dans le but de mimer l'intermédiaire activé de la réaction catalysée par les aminoacyl-ARNt synthétases (design basé sur le mécanisme de la réaction). Les premiers ont été développés par Sandrin et Boissonnas de la compagnie Sandoz en 1966 dans le cadre d'une étude sur les aaRS. Le design rationnel des inhibiteurs se basait alors sur le concept que : « les composés chimiquement stables et de structures voisines à l'adénylate d'aminoolcool devraient constituer des inhibiteurs spécifiques des aaRS, provoquant un ralentissement de la biosynthèse des protéines ».¹ Dans ce contexte, plusieurs analogues non-réactifs de l'anhydride mixte (adénylate d'aminoolcool) ont été synthétisés en remplaçant le groupement carbonyle par un méthylène (figure 2.1).

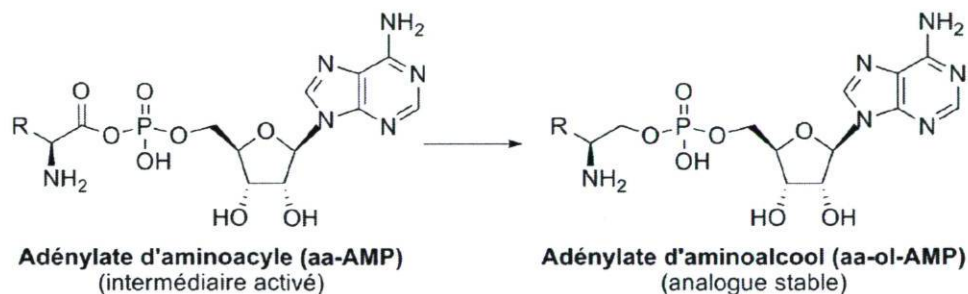


Figure 2.1. Adénylate d'aminoolcool, remplacement du carbonyle par un méthylène.

Par après, il a été démontré par des études de cinétique enzymatique que les adénylates d'aminoolcool sont des inhibiteurs spécifiques (IleRS, MetRS, ValRS, TyrRS, AlaRS et PheRS) avec une affinité considérable pour leurs aaRS correspondantes (K_i de l'ordre du nM).² L'affinité observée est nettement plus grande que celle des substrats naturels de l'enzyme (facteur d'environ 1000 par rapport aux acides aminés et à l'ATP), ce qui suggère que les adénylates d'aminoolcool occupent les deux sites de liaison des aaRS (aa et ATP). Cette nouvelle stratégie (analogue de l'intermédiaire activé) a permis le design de nombreux inhibiteurs des aaRS. Le tableau 2.1 résume les travaux réalisés à ce jour avec les adénylates d'aminoolcool. Les adénylates d'aminoolcool sont généralement de meilleurs

inhibiteurs des aaRS de classe I puisque dans ce groupe, le carbonyle de l'intermédiaire activé interagit peu avec l'enzyme (l'adénylate d'aminoolcool est dépourvu de ce carbonyle).³

Tableau 2.1. Inhibition des aminoacyl-ARNt synthétases par les adénylates d'aminoolcool.

aaRS	Source	Inhibition compétitive (aa) avec aa-ol-AMP	Références
Classe I			
ArgRS	<i>S. aureus</i>	IC ₅₀ = 7.5 nM	4
CysRS			
IleRS	<i>E. coli</i>	K _i = 7.4 nM	2
	<i>S. aureus</i>	IC ₅₀ = 780 nM	5
LeuRS			
LysRS I			
MetRS	<i>E. coli</i>	K _i = 8.6 nM	2
ValRS	<i>E. coli</i>	K _i = 29 nM	2
GlnRS	<i>E. coli</i>	K _i = 280 nM	6
GluRS	<i>E. coli</i>	K _i = 3 μM	7
	<i>T. thermophilus</i>	ligand	8
TrpRS			
TyrRS	<i>E. coli</i>	K _i = 29 nM	2
	<i>S. aureus</i>	IC ₅₀ = 11 nM	9
	<i>B. stearothermophilus</i>	IC ₅₀ = 6.3 nM	9
	<i>B. stearothermophilus</i>	ligand	10
Classe II			
GlyRS			
HisRS	<i>S. aureus</i>	20% à 300 μM	4
ProRS			
SerRS			
ThrRS	<i>S. aureus</i>	60% à 300 μM	4
AsnRS			
AspRS	<i>E. coli</i>	K _i = 45 μM	11
	<i>P. aeruginosa</i>	K _i = 41 μM	12
LysRS II			
AlaRS			
PheRS	<i>E. coli</i>	K _i = 1 μM	13
	<i>E. coli</i>	K _i = 2.5 μM	2

Plusieurs dérivés de l'adénylate de glutamol ont été évalués comme inhibiteurs de la glutamyl-ARNt synthétase en modifiant la base azotée du nucléoside (figure 2.2).⁷ L'enzyme interagit favorablement avec l'adénine (base azotée retrouvée dans l'intermédiaire activé) puisque les modifications apportées à ce niveau diminuent l'affinité des inhibiteurs pour la GluRS (K_i de 60 à 16700 μM).

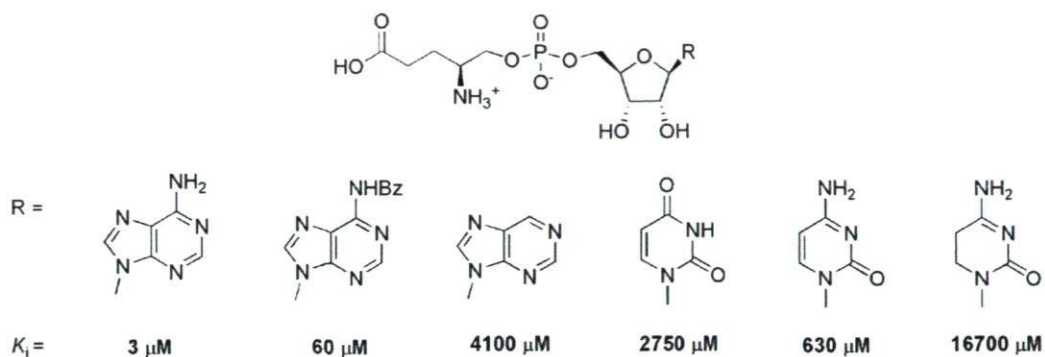


Figure 2.2. Dérivés de l'adénylate de glutamol.

L'adénylate de glutaminol est un inhibiteur beaucoup plus efficace que son analogue méthylé (figure 2.3).⁶ Cette différence est en accord avec le fait que la GlnRS interagit avec la charge négative du phosphate : une structure de la GlnRS de *E. coli* a été déterminée par diffraction des rayons-X et démontre que deux résidus (Lys270 et Glu34) pourraient stabiliser cette charge sur le phosphate.¹⁴

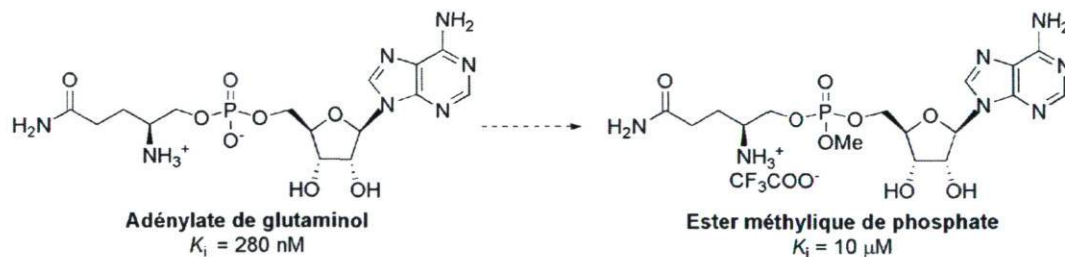


Figure 2.3. Dérivé de l'adénylate de glutaminol.

On peut constater dans le tableau 2.1 que beaucoup de données concernant l'inhibition des aaRS sont connues mais que plusieurs aaRS n'ont pas encore été étudiées avec les adénylates d'aminoalcool (CysRS, TrpRS, GlyRS, ProRS, SerRS, AsnRS et LysRS). De plus, l'usage en tant que ligand dans la détermination de structures par diffraction des rayons-X est assez limité jusqu'à présent (GluRS et TyrRS).^{8,10}

Les adénylates d'aminoalcool sont des inhibiteurs très utiles, particulièrement pour l'étude du mécanisme des aaRS et la détermination de leurs structures. Dans cette optique, plusieurs adénylates d'aminoalcool ont été synthétisés ici-même (visant la GlnRS,

l'AspRS, la GluRS, la TyrRS et la TrpRS). Les cinétiques enzymatiques de ces inhibiteurs ont été caractérisées pour divers microorganismes en collaboration avec le professeur Jacques Lapointe (Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique, Québec) et Yuxin Jin (State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai). Les adénylates d'aminoalcool ont également été utilisés comme ligands pour faciliter la cristallisation des aaRS et déterminer leurs structures par diffraction des rayons-X (collaboration avec l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg). De plus, certains composés ont été évalués *in vivo* sur des bactéries pathogènes par des tests d'inhibition de la croissance sur disque de culture (collaboration avec le professeur Paul H. Roy du Centre de Recherche en Infectiologie, Québec).

2.2. Synthèse d'adénylates d'aminoalcool

Les premiers adénylates d'aminoalcool ont été synthétisés et caractérisés en 1966.^{1,2} La stratégie de synthèse consistait alors à faire une condensation du N^6, O^2', O^3' -triacétyladénosine-5'-phosphate et des *N*-Cbz-aminoalcools avec l'agent de couplage DCC (schéma 2.1). Le dicyclohexylcarbodiimide est utilisé en large excès (10 équivalents), le temps de réaction est long (5 jours) et les rendements de couplage sont plutôt faibles (au plus 45%). Les synthèses développées ultérieurement utilisent plutôt la méthode des phosphoramidites-phosphites-triesters, connue notamment dans la synthèse de fragments d'acides nucléiques.¹⁵ C'est la technique qui a été privilégiée dans ce chapitre.

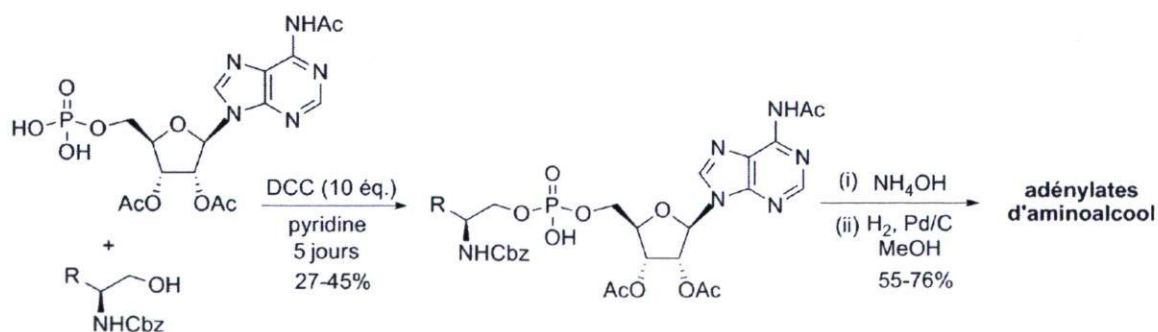


Schéma 2.1. Première synthèse des adénylates d'aminoalcool.

Certains des inhibiteurs présentés dans les prochaines sections sont déjà partiellement caractérisés dans la littérature (adénylate de glutaminol, adénylate d'aspartol et adénylate de tyrosinol).^{6,9,11} Toutefois, des modifications dans les synthèses ont été apportées au niveau des groupements protecteurs (adénylate de tyrosinol) et du procédé de déméthylation-déprotection (adénylate de glutaminol). Les autres composés sont essentiellement nouveaux (adénylate de tryptophanol et adénylate de pyroglutamol).

2.2.1. Synthèse des *N*-Boc-aminoalcools

La synthèse des aminoalcools protégés est effectuée d'après une méthode générale décrite dans la littérature.¹⁶ L'acide aminé est d'abord activé à partir du chloroformiate d'isobutyle en présence d'une base (triéthylamine dans ce cas-ci). L'anhydride formé est par la suite réduit par le borohydrure de sodium (schéma 2.2). Cette méthode a l'avantage d'être compatible avec le groupement *N*-Boc, lequel est sensible aux agents réducteurs très forts (LiAlH_4 et DIBAL par exemple). Les rendements varient de 74% (*N*-Boc-glutaminol **2.2a**) à 96% (*N*-Boc-tyrosinol **2.2c**) et aucune racémisation n'a été détectée par polarimétrie (comparaison avec les $[\alpha]_D$ connus). Il est également possible d'effectuer la réduction des *N*-Boc-acides aminés avec le borane-THF.¹⁷ Les rendements, la tolérance aux groupements fonctionnels et l'absence de racémisation sont comparables pour les deux méthodes.

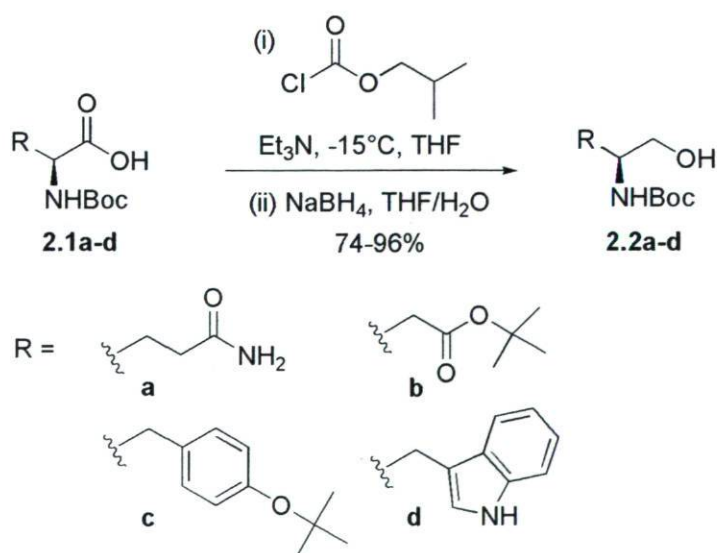


Schéma 2.2. Synthèse des *N*-Boc-aminoalcools.

2.2.2. Méthode des phosphoramidites-phosphites-triesters

La méthode des phosphoramidites-phosphites-triesters permet de coupler les aminoalcools à l'isopropylidène-adénosine en introduisant le groupement phosphate (schéma 2.3). Dans le protocole utilisé, l'isopropylidène-adénosine réagit avec le méthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite en présence d'une base (diisopropyléthylamine) pour donner un phosphoramidite intermédiaire **2.4**. Les aminoalcools **2.2a-d** peuvent par la suite réagir sur cet intermédiaire avec un agent activant (le triflate d'imidazolium). Les phosphites obtenus **2.5a-d** sont oxydés en phosphates **2.6a-d** par l'iode dans l'eau, complétant ainsi les 3 étapes (rendement global de 28 à 51%).

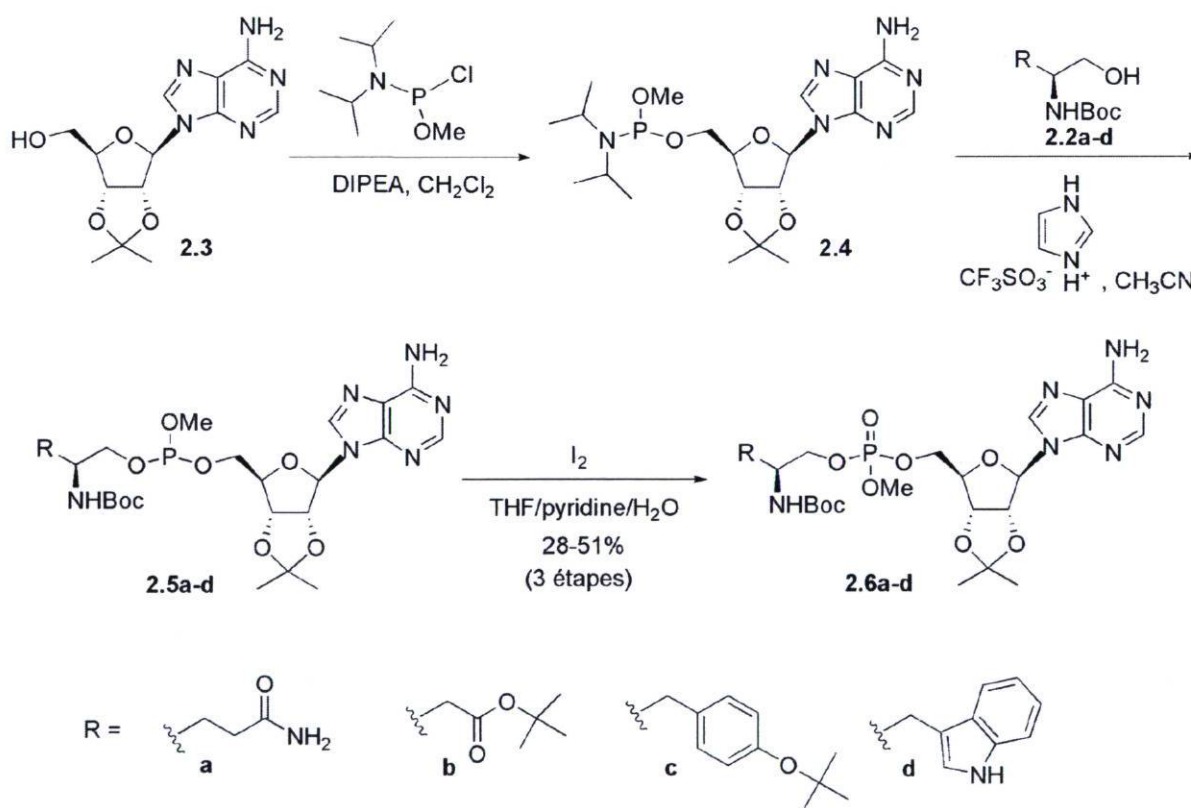


Schéma 2.3. Méthode des phosphoramidites-phosphites-triesters.

2.2.3. Déméthylation et déprotection

La séquence réactionnelle se poursuit avec la déméthylation des triesters de phosphate **2.6a-d** par la butylamine dans le méthanol (schéma 2.4). Pour faciliter la purification, il est avantageux d'isoler directement les sels correspondants (les phosphates de butylammonium **2.7a-d**). Plusieurs méthodes alternatives permettent d'effectuer ce type de déméthylation (les amines tertiaires, les thiolates, NaI et KCN par exemple).^{18,19} Pour compléter la synthèse, l'ester *tert*-butylique (Asp), l'éther *tert*-butylique (Tyr), le groupement protecteur *N*-Boc et l'isopropylidène sont enlevés par l'acide trifluoroacétique aqueux. Les groupements protecteurs sont enlevés simultanément avec de très bons rendements (87-100%). Une cristallisation avec un mélange méthanol-éther diéthylique permet d'isoler les adénylates d'aminoalcool **2.8a-d** sous la forme d'un zwitterion.

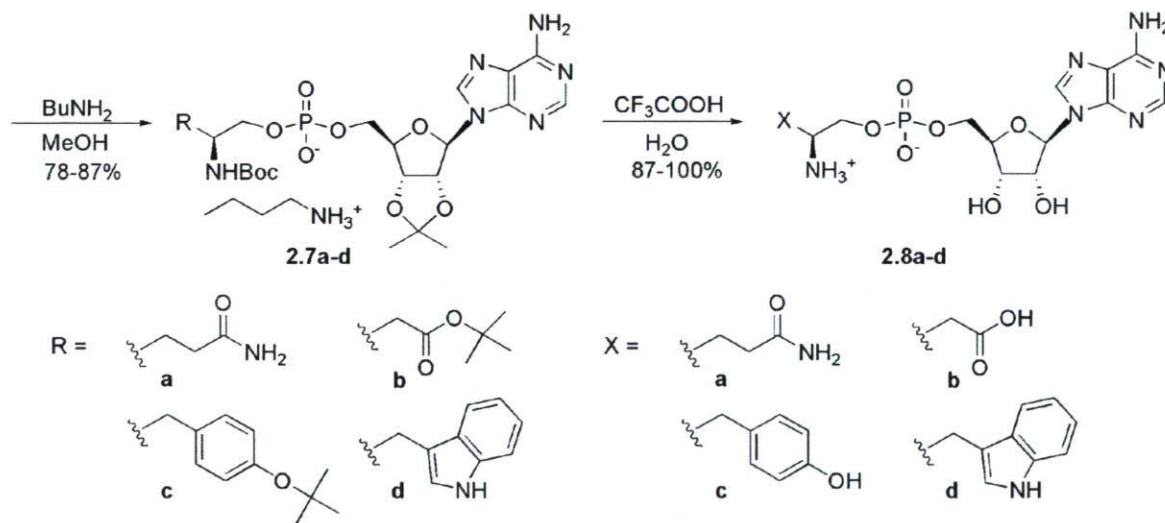


Schéma 2.4. Déméthylation et déprotection des triesters de phosphate.

2.2.4. Synthèse du pyroglutamol

Une voie alternative de réduction a été utilisée pour la synthèse du pyroglutamol.²⁰ Dans ce cas, l'acide pyroglutamique est d'abord estérifié avec le chlorure de thionyle et le MeOH (schéma 2.5). L'ester méthylique **2.10** est par la suite réduit par le borohydrure de sodium pour donner le pyroglutamol **2.11**.

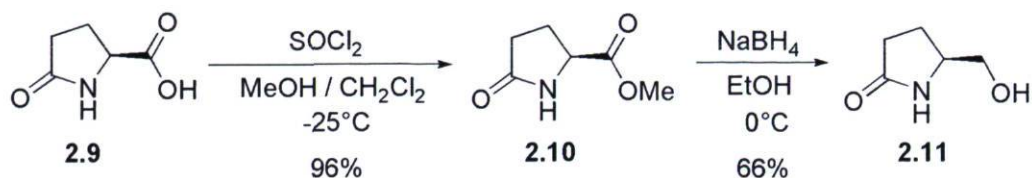


Schéma 2.5. Synthèse du pyroglutamol.

2.2.5. Synthèse de l'adénylate de pyroglutamol

Le pyroglutamol **2.11** est couplé par la méthode des phosphoramidites-triesters à l'isopropylidène-adénosine **2.3** (schéma 2.6, voir la section 2.2.2 pour la description de la méthode). Le triester de phosphate obtenu est déméthylé par la butylamine puis déprotégé, donnant ainsi l'adénylate de pyroglutamol **2.14**. Le triester de phosphate **2.12** peut également être déprotégé directement par l'acide trifluoroacétique aqueux pour donner le composé **2.15** (adénylate de pyroglutamol méthylé).

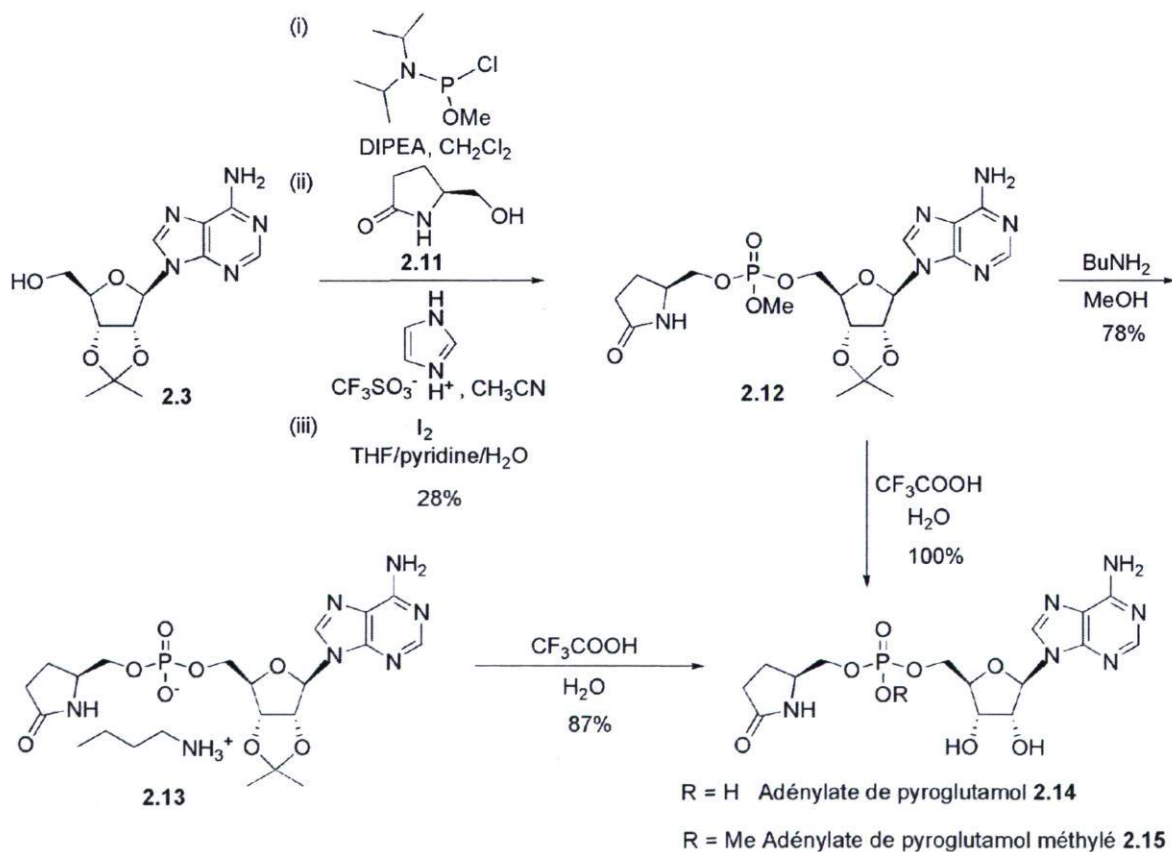


Schéma 2.6. Synthèse de l'adénylate de pyroglutamol.

2.3. Résultats biologiques

Les résultats obtenus à partir des adénylates d'aminoolcool **2.8a-d** et **2.14-2.15** sont résumés dans le tableau 2.2 (les contributions provenant d'autres chercheurs sont incluses). L'adénylate d'aspartol **2.8b** a été étudié en tant qu'inhibiteur d'AspRS de différentes sources (collaboration avec le Pr. Jacques Lapointe du Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique et le Pr. Richard Giegé de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire à Strasbourg).^{21,22} L'adénylate d'aspartol **2.8b** a également été utilisé dans des études de cristallographie qui ont mené à la détermination de la structure de l'AspRS de *T. thermophilus* complexée avec l'inhibiteur (collaboration avec le Pr. Richard Giegé de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire).²³ Les études de cinétique enzymatique, la détermination des structures par diffraction des rayons-X et l'activité antibiotique des inhibiteurs sont discutés dans les sections suivantes.

Tableau 2.2. Résumé des résultats obtenus à partir des adénylates d'aminoolcool

Composé	Constante d'inhibition de l'aaRS correspondante (K_i).	Ligand (structure par diffraction des rayons-X).	Activité antibiotique sur disque de culture.
Gln-ol-AMP 2.8a	280 nM (<i>E. coli</i>) ⁶	<i>D. radiodurans</i> (en cours)	<i>E. coli</i>
Asp-ol-AMP 2.8b	45 μ M (<i>E. coli</i>) ¹¹ 41 μ M (<i>P. aeruginosa</i>) ¹² 27 μ M (<i>B. taurus</i>) ²¹ 10 μ M (<i>H. sapiens</i> cyt.) ²¹ 4.6 μ M (<i>H. sapiens</i> mit.) ²¹ 800 nM (<i>P. falciparum</i>) ²² 330 nM (<i>H. sapiens</i> cyt.) ²²	<i>T. thermophilus</i> ²³	non
Tyr-ol-AMP 2.8c	6.3 nM (IC ₅₀ , <i>B. stearothermophilus</i>) 11 nM (IC ₅₀ , <i>S. aureus</i>) ⁹ 29 nM (<i>E. coli</i>) ²	<i>B. stearothermophilus</i> ⁹ <i>H. sapiens</i> mit. (en cours)	ND
Trp-ol-AMP 2.8d	ND	ND	ND
pGlu-ol-AMP 2.14	>2 mM (GluRS, <i>E. coli</i>) 877 μ M (GlnRS, <i>E. coli</i>)	ND	non
pGlu-ol-AMP 2.15	ND	ND	non

ND = résultat non déterminé

cyt. = cytoplasmique

mit. = mitochondrienne

2.3.1. Études de cinétique enzymatique

L'adénylate de glutaminol **2.8a** est un inhibiteur relativement fort de la GlnRS de *E. coli* ($K_i = 280$ nM) tandis que l'adénylate d'aspartol **2.8b** est un inhibiteur modéré de l'AspRS de *E. coli* ($K_i = 45$ μ M). La sélectivité de l'adénylate d'aspartol pour des AspRS d'origines diverses est intéressante. Il semble que les AspRS du cytosol de l'humain et du bœuf sont sensibles à l'adénylate d'aspartol ($K_i = 10$ et 27 μ M, respectivement). De plus, l'AspRS des mitochondries humaines ($K_i = 4.6$ μ M) est davantage affectée que celle de plusieurs microorganismes étudiés (*Peculiar inhibition of human mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase by adenylate analogs*, Messmer, M.; Blais, S. P.; Balg, C.; Chênevert, R.; Grenier, L.; Lagüe, P.; Sauter, C.; Sissler, M.; Giegé, R.; Lapointe, J.; Florentz, C. *Biochimie* **2009**, *91*, 596-603).²¹ L'adénylate d'aspartol est également un bon inhibiteur de l'AspRS de *P. falciparum* ($K_i = 0.8$ μ M), un parasite responsable de la malaria (*Plasmodial aspartyl-tRNA synthetases and peculiarities in Plasmodium falciparum*, Bour, T.; Akaddar, A.; Lorber, B.; Blais, S.; Balg, C.; Candolfi, E.; Frugier, M. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18893-18903).²² L'adénylate d'aspartol est donc peu sélectif aux organismes pathogènes. L'adénylate de tyrosinol **2.8c** est un excellent inhibiteur de la TyrRS de *S. aureus* et *E. coli* ($IC_{50} = 11$ nM et $K_i = 29$ nM, respectivement). L'adénylate de pyroglutamol **2.14** a été évalué en tant qu'inhibiteur de la GlnRS et de la GluRS (ressemblance avec l'intermédiaire activé de ces deux enzymes). Il s'agit d'un faible inhibiteur de la GlnRS de *E. coli* ($K_i = 877$ μ M) alors que la GluRS n'est pas affectée ($K_i > 2$ mM).

2.3.2. Détermination de structures par diffraction des rayons-X

L'adénylate de glutaminol **2.8a** est présentement utilisé comme ligand pour la cristallisation de la GlnRS de *D. radiodurans*. La TyrRS de *B. stearothermophilus* a déjà été cristallisée avec l'adénylate de tyrosinol **2.8c** dans le site actif.⁹ Des essais sont en cours pour obtenir la structure de la TyrRS des mitochondries humaines avec le même ligand. L'adénylate d'aspartol **2.8b** a été diffusé dans des cristaux d'AspRS de *T. thermophilus* et la structure du site actif de l'enzyme est visible en présence du ligand (figure 2.4) (*Agarose gel facilitates enzyme crystal soaking with a ligand analogue*, Sauter, C.; Balg, C.; Moreno,

A.; Dhoub, K.; Théobald-Dietrich, A.; Chênevert, R.; Giegé, R.; Lorber, B. *J. Appl. Cryst.* **2009**, 42, 279-283).²³ Les tests de cristallographie ont révélé que la présence d'un gel d'agarose stabilise les cristaux lors de la diffusion de l'adénylate d'aspartol (en l'absence de gel d'agarose, les cristaux craquent et deviennent amorphes). Ce procédé peu dispendieux a ainsi permis d'obtenir le patron de diffraction des cristaux d'AspRS avec l'inhibiteur dans le site actif. La formation de gels est une alternative chimique intéressante pour limiter l'instabilité causée par la convection dans le milieu de cristallisation.²⁴ D'autres méthodes permettent également de réduire la convection, tel que l'usage de tubes capillaires très minces²⁵, la formation de nano-gouttes²⁵, l'apesanteur²⁶, etc. Ces méthodes sont essentiellement physiques.

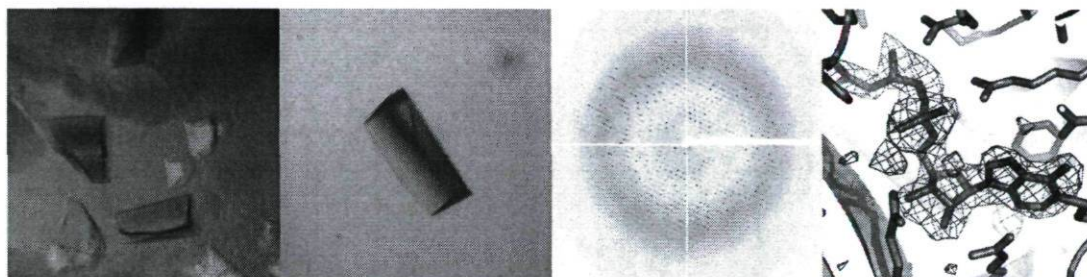


Figure 2.4. Cristallisation de l'AspRS de *T. thermophilus*. (A) Les cristaux d'AspRS se brisent lors de la diffusion de l'adénylate d'aspartol **2.8b** (B) Effet stabilisateur du gel d'agarose (C) Patron de diffraction (D) Adénylate d'aspartol complexé au site actif de l'AspRS.

2.3.3. Activité antibiotique sur disque de culture

L'adénylate de glutaminol **2.8a** possède une légère activité antimicrobienne sur disque de culture (*E. coli*). L'activité antimicrobienne en solution a également été évaluée mais la concentration minimale inhibitrice est plus grande que 128 µg/mL. Il est probable que la polarité des adénylates de glutaminol et d'aspartol **2.8a-b** soit un facteur limitant à leur diffusion dans les membranes bactériennes et leur efficacité *in vivo*.^{27,28} C'est pour répondre à cette problématique que le design des adénylates de pyroglutamol **2.14-2.15** a été réalisé (inhibiteurs potentiels de la GluRS). Dans ces analogues de l'adénylate de glutamol, l'acide carboxylique γ est condensé sur l'amine α (acide glutamique) pour donner un produit moins polaire (l'acide pyroglutamique). Dans le composé **2.15**, l'ester méthylique sur le phosphate a été conservé pour réduire la polarité davantage. Les

composés **2.14-2.15** peuvent donc théoriquement pénétrer les membranes bactériennes plus facilement. Par après, ils peuvent être transformés par des enzymes en métabolites plus actifs par hydrolyse du pyroglutamate ou de l'ester méthylique (les amides et les esters sont des pro-drogues fréquentes en chimie médicinale).²⁹ Ces modifications n'ont toutefois entraîné aucune amélioration des activités antibiotiques sur disque de culture par rapport à l'adénylate de glutamol (bactéries testées : *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*).

2.4. Références

- 1) Sandrin, E.; Boissonnas, R. A. *Helv. Chim. Acta* **1966**, *49*, 76-82.
- 2) Cassio, D.; Lemoine, F.; Waller, J.-P.; Sandrin, E.; Boissonnas, R. A. *Biochemistry* **1967**, *6*, 827-836.
- 3) Chênevert, R.; Bernier, S.; Lapointe, J. In *Translation Mechanisms*; Lapointe, J., Brakier Gingras, L., Eds.; Landes Bioscience/Kluwer Academic: Georgetown, TX/New York, 2003; pp 416-428.
- 4) Forrest, A. K.; Jarvest, R. L.; Mensah, L. M.; O'Hanlon, P. J.; Pope, A. J.; Sheppard, R. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1871-1874.
- 5) Pope, A. J.; Moore, K. J.; McVey, M.; Mensah, L.; Benson N.; Osbourne, N.; Broom, N.; Brown, M. J.; O'Hanlon, P. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31691-31701.
- 6) Bernier, S.; Dubois, D. Y.; Therrien, M.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2441-2444.
- 7) Desjardins, M.; Garneau, S.; Desgagnés, J.; Lacoste, L.; Yang, F.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *Bioorg. Chem.* **1998**, *26*, 1-13.
- 8) Sekine, S.; Nureki, O.; Dubois, D. Y.; Bernier, S.; Chênevert, R.; Lapointe, J.; Vassilyev, D. G.; Yokoyama, S. *EMBO J.* **2003**, *22*, 676-688.
- 9) Brown, P.; Richardson, C. M.; Mensah, L. M.; O'Hanlon, P. J.; Osborne, N. F.; Pope, A. J.; Walker, G. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2473-2485.
- 10) Brick, P.; Bhat, T. N.; Blow, D. M. *J. Mol. Biol.* **1989**, *208*, 83-98.
- 11) Bernier, S.; Akochy, P. M.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 69-75.

- 12) Bernard, D.; Akochy, P. M.; Bernier, S.; Fiset, O.; Côté-Brousseau, O.; Chênevert, R.; Roy, P. H.; Lapointe, J. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 77-82.
- 13) Santi, D. V.; Danenberg, P. V.; Satterly, P. *Biochemistry* **1971**, *10*, 4804-4812.
- 14) Rath, V. G.; Silvian, L. F.; Beijer, B.; Sproat, B. S.; Steitz, T. A. *Structure* **1998**, *6*, 439-449.
- 15) Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- 16) Rodriguez, M.; Llinares, M.; Doulut, S.; Heitz, A.; Martinez, J.; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 923-926.
- 17) Stanfield, C. F.; Parker, J. E.; Kanellis, P. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4797-4798.
- 18) Gray, M. D. M.; Smith, D. J. H. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 859-860.
- 19) Savignac, P.; Lavielle, G. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1978**, 7-8, 1506-1508.
- 20) Otsuka, M.; Masuda, T.; Haupt, A.; Ohno, M.; Shiraki, T.; Sugiura, Y.; Maeda, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 838-845.
- 21) Messmer, M.; Blais, S. P.; Balg, C.; Chênevert, R.; Grenier, L.; Lagüe, P.; Sauter, C.; Sissler, M.; Giegé, R.; Lapointe, J.; Florentz, C. *Biochimie* **2009**, *91*, 596-603.
- 22) Bour, T.; Akaddar, A.; Lorber, B.; Blais, S.; Balg, C.; Candolfi, E.; Frugier, M. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18893-18903.
- 23) Sauter, C.; Balg, C.; Moreno, A.; Dhoub, K.; Théobald-Dietrich, A.; Chênevert, R.; Giegé, R.; Lorber, B. *J. Appl. Cryst.* **2009**, *42*, 279-283.
- 24) Gonzales-Ramirez, L. A.; Caballero, A. G.; Garcia-Ruiz, J. M. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 4291-4296.
- 25) Sauter, C.; Dhoub, K.; Lorber, B. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 2247-2250.
- 26) Meyer, A.; Rypniewski, W.; Szymanski, M.; Voelter, M.; Barciszewski, J.; Betzel, C. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 1590-1595.
- 27) Kim, S.; Lee, S. W.; Choi, E.-C.; Choi, S. Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 278-288.
- 28) Hurdle, J. G.; O'Neill, A. J.; Chopra, I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4821-4833.
- 29) Etmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement, B.; Testa, B. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2394-2404.

CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE DES AMINOACYLSULFAMOYL-ADÉNOSINES

3.1. Introduction

Le groupement sulfamate est un analogue stable de l'anhydride carboxylique-phosphorique de l'intermédiaire activé de la réaction catalysée par les aaRS (figure 3.1). Le sulfamate comporte une charge négative partielle car le pK_a du proton porté par l'azote est semblable au pH physiologique (le pH est généralement près de 7-8 dans les systèmes biologiques). Cette charge négative est délocalisée et permet donc d'imiter partiellement la charge retrouvée sur le phosphate de l'intermédiaire activé. L'usage des sulfamates comme inhibiteurs des aminoacyl-ARNt synthétases a débuté après la découverte de l'ascamycine (figure 3.2), un antibiotique naturel isolé dans le genre bactérien *Streptomyces*.¹ Cette molécule diffère de l'alanylsulfamoyl-adenosine par la présence d'un atome de chlore sur la base azotée. L'ascamycine est sélective aux bactéries *Xanthomonas* (pathogènes chez les plantes) car cet organisme contient dans sa membrane une enzyme spécifique qui libère le métabolite cytotoxique (la déalanylascamycine).¹⁻³ Les premières synthèses des aminoacylsulfamoyl-adenosines (aa-AMS) ont donc été réalisées pour étudier l'ascamycine et ses dérivés.⁴⁻⁶ Plusieurs sulfamates ont par la suite été développés pour inhiber les aminoacyl-ARNt synthétases (tableau 3.1).

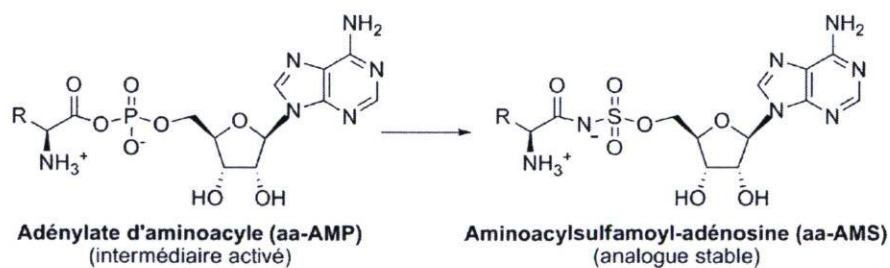


Figure 3.1. Les aminoacylsulfamoyl-adenosines comme analogues de l'adénylate d'aminocyle.

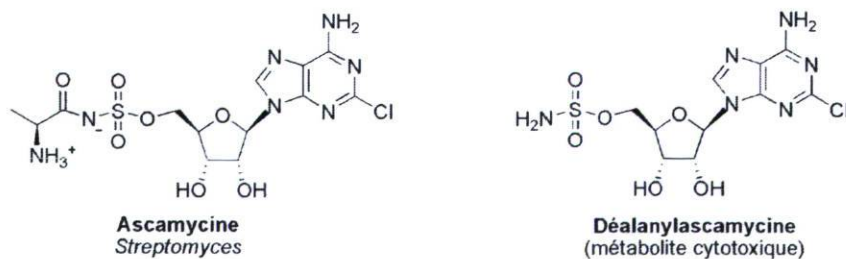


Figure 3.2. Structure de l'ascamycine et de son métabolite cytotoxique.

Tableau 3.1. Inhibition des aminoacyl-ARNt synthétases par les aminoacylsulfamoyl-adénosines respectifs.

aaRS	Source	Inhibition compétitive (aa ou ATP)	Références
Classe I			
ArgRS	<i>S. aureus</i>	IC ₅₀ = 4.5 nM	7
CysRS			
IleRS	<i>S. aureus</i>	IC ₅₀ = 4 nM	8
	<i>E. coli</i>	IC ₅₀ = 98 nM	9
LeuRS	<i>E. coli</i>	ligand	10
LysRS I			
MetRS	<i>E. coli</i>	IC ₅₀ = 7 nM	9
ValRS	<i>T. thermophilus</i>	ligand	11
GlnRS	<i>E. coli</i>	K _i = 1.32 μM	12
GluRS	<i>E. coli</i>	K _i = 2.8 nM	13
	<i>B. taurus</i>	K _i = 70 nM	13
	<i>T. thermophilus</i>	ligand	14
TrpRS			
TyrRS	<i>S. aureus</i>	IC ₅₀ = 26 nM	15
Classe II			
GlyRS			
HisRS	<i>S. aureus</i>	IC ₅₀ = 130 nM	7
	<i>E. coli</i>	ligand	16
ProRS	<i>E. coli</i>	4.3 nM	17
	<i>H. sapiens</i>	1.7 nM	17
SerRS	<i>E. coli</i>	ligand	18
ThrRS	<i>S. aureus</i>	IC ₅₀ = 15 nM	7
AsnRS	<i>T. thermophilus</i>	ligand	19
AspRS	<i>E. coli</i>	K _i = 45 μM	20
LysRS II	<i>T. thermophilus</i>	ligand	21
AlaRS			
PheRS			

Les aminoacylsulfamoyl-adénosines ont récemment été étudiés comme agents immunosuppresseurs chez les mammifères. Les aa-AMS ont une activité significative entre 0.1 et 10 μM (test *in vitro* pour prédire le rejet d'organes transplantés).²² Le mécanisme d'action repose probablement sur l'inhibition des aaRS et de la biosynthèse des protéines (la réponse immunitaire dépend des protéines).

D'autre part, des dérivés dipeptidiques des aminoacylsulfamoyl-adénosines ont été synthétisés afin d'évaluer leurs activités antibiotiques (figure 3.3).²³ Ces composés ont été testés sur des disques de culture (*E. coli* et *S. aureus*) et comparés avec les aminoacylsulfamoyl-adénosines correspondants (Leu-AMS, Ala-AMS, Met-AMS, Trp-AMS, Phe-AMS et Asp-AMS). Les propriétés antibiotiques sont dans certains cas

fortement altérées en terme d'efficacité et de spectre d'activité. L'activité antibiotique de ces dérivés est relativement faible par rapport aux antibiotiques classiques (acide pseudomonique par exemple).

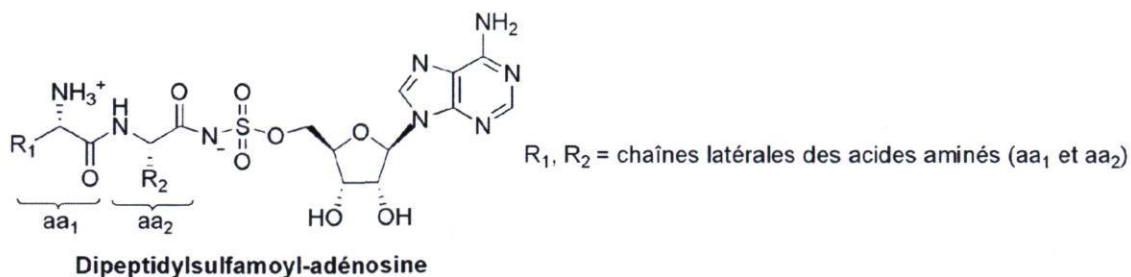


Figure 3.3. Dérivés dipeptidiques des aminoacylsulfamoyl-adénosines.

La compagnie « Cubist pharmaceuticals » a évalué le potentiel de plusieurs analogues de l'isoleucylsulfamoyl-adénosine modifiés au niveau de la base azotée (adénine). Le composé CB432 est un inhibiteur puissant et sélectif de l'isoleucine-ARNt synthétase bactérienne (figure 3.4).²⁴ Cet inhibiteur est également efficace dans un modèle animal d'infection avec *S. pyogenes*. Il est toutefois peu biodisponible dans le sang (grande affinité avec les protéines du sérum) et nécessiterait un dosage trop élevé pour être utilisé en médecine clinique.

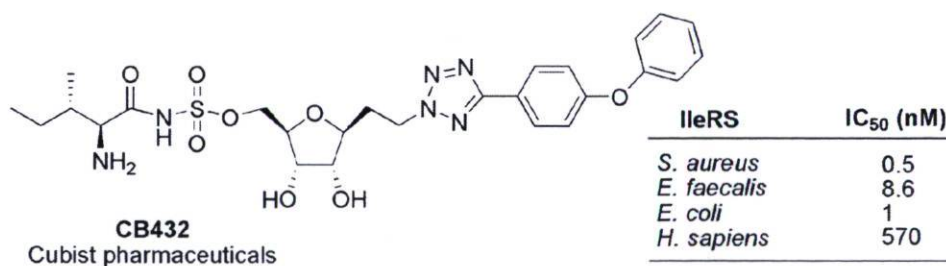


Figure 3.4. Le composé CB432, un analogue de l'isoleucylsulfamoyl-adénosine.

La microcine C est une pro-drogue qui est hydrolysée dans le cytosol des bactéries par une peptidase au niveau du lien Ala-Asp (figure 3.5). Le métabolite est un inhibiteur de l'AspRS (ressemblance avec l'adénylate d'aspartyle). Plusieurs analogues de cet antibiotique naturel ont été synthétisés en remplaçant le groupement phosphoramidate par un sulfamate.²⁵ La substitution de l'acide aspartique par l'acide glutamique ou la leucine permet d'obtenir des inhibiteurs de la GluRS et la LeuRS, respectivement, avec des propriétés antibiotiques intéressantes.

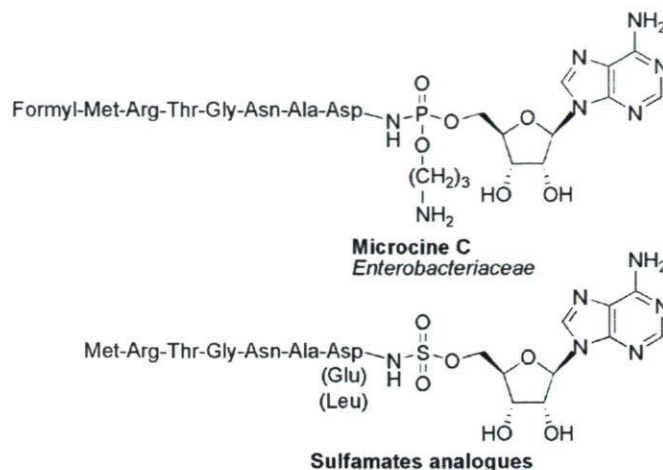


Figure 3.5. Sulfamates analogues à la microcine C.

3.2. Synthèse des aminoacylsulfamoyl-adénosines

La synthèse des aminoacylsulfamoyl-adénosines a évolué depuis la synthèse de l'ascamycine par la méthode de Ubukata et Castro-Pichet.⁴⁻⁶ La conversion de l'alcool en « *O*-sulfamoyl » était alors réalisée en formant un éther de tributylétain qui réagissait ensuite avec un excès de chlorure de sulfonamide (figure 3.6). L'usage de cette voie réactionnelle provient d'une synthèse réalisée antérieurement pour obtenir la nucléocidine (un antibiotique analogue au 5'-*O*-sulfamoyl-adénosine).²⁶ Différentes bases (CaCO₃ et NaH par exemple) sont maintenant privilégiées pour effectuer cette réaction de substitution entre l'alcool et le chlorure de sulfonamide. Le groupement protecteur « R » sur l'amine de la base azotée n'est pas essentiel mais il facilite la synthèse et la purification, notamment en ralentissant la dégradation du 5'-*O*-sulfamoyl-adénosine (figure 3.7).

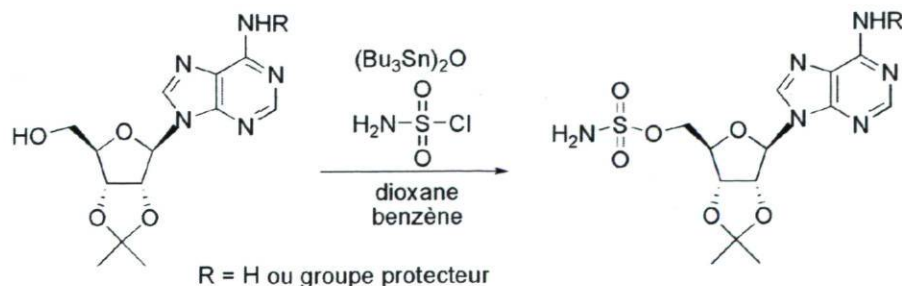


Figure 3.6. Synthèse des dérivés du 5'-*O*-sulfamoyl-adénosine par la formation d'un éther de tributylétain.

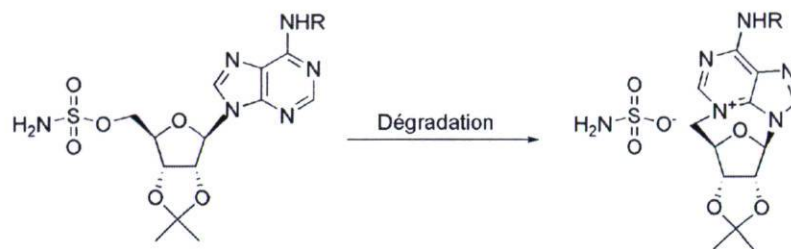
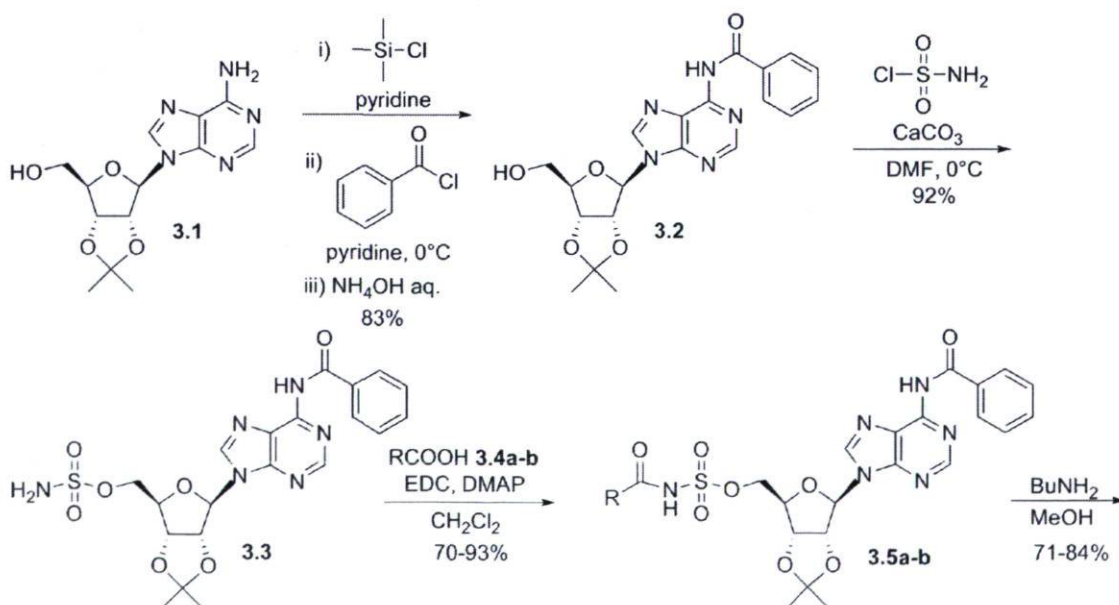


Figure 3.7. Voie de dégradation des dérivés du 5'-*O*-sulfamoyl-adénosine.

3.2.1. Synthèse du pyroglutamylsulfamoyl-adénosine et du γ -méthyl ester du glutamylsulfamoyl-adénosine

La synthèse du pyroglutamylsulfamoyl-adénosine¹³ **3.7a** et du γ -méthyl ester du glutamylsulfamoyl-adénosine **3.7b** est décrite dans le schéma 3.1. L'alcool libre de l'isopropylidène-adénosine **3.1** est d'abord protégé en éther silylé avec le chlorure de triméthylsilyle dans la pyridine puis l'adénine est benzoylée avec le chlorure de benzoyle. Un traitement à l'ammoniaque hydrolyse l'éther silylé afin de libérer le *N*⁶-benzoyl-2',3'-isopropylidène-adénosine **3.2**. Celui-ci réagit par la suite avec le chlorure de sulfonamide (préalablement préparé à partir du chlorosulfonylisocyanate dans l'acide formique) en présence d'une base pour donner le 5'-*O*-sulfamoyl-*N*⁶-benzoyl-2',3'-isopropylidène-adénosine **3.3**. Celui-ci est condensé avec l'agent de couplage EDC et la *N,N*-diméthylaminopyridine avec l'acide aminé correspondant (**3.4a** et **3.4b**). Les produits de couplage (**3.5a** et **3.5b**) sont débenzoylés avec la butylamine. Les groupements protecteurs sont finalement enlevés par l'acide trifluoroacétique aqueux.



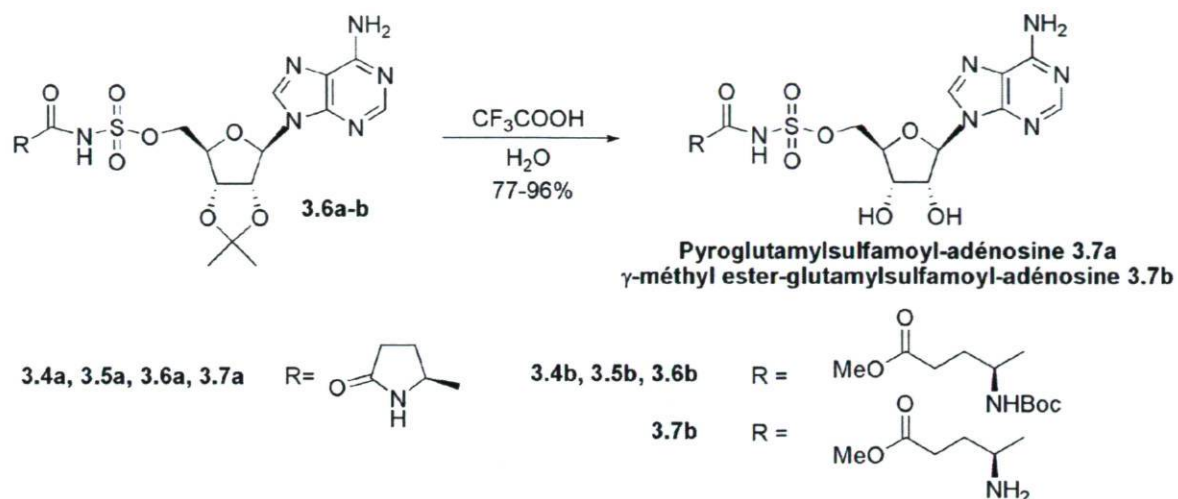


Schéma 3.1. Synthèse du pyroglutamylsulfamoyl-adenosine et du γ -méthyl ester-glutamylsulfamoyl-adenosine.

3.2.2. Synthèse du tryptophanysulfamoyl-adenosine

La synthèse du tryptophanysulfamoyl-adenosine a été réalisée par une méthode permettant d'éviter l'étape de déprotection du groupement benzoyle (schéma 3.2). Le benzoyle a donc été remplacé par un *tert*-butyloxycarbonyle (Boc), pouvant être déprotégé à la dernière étape de la séquence réactionnelle. La 2',3'-isopropylidène adénosine **3.1** réagit avec Boc_2O en présence de DMAP catalytique pour donner un intermédiaire (trois groupement Boc) et les deux groupements Boc instables sont hydrolysés avec NaHCO_3 aqueux pour donner le N^6 -Boc-2',3'-isopropylidène-adenosine **3.8**. Le groupement sulfamoyl est par la suite introduit avec le chlorure de sulfonamide en présence de CaCO_3 . Le sulfamoyl **3.9** est par après condensé avec le *N*-Boc-tryptophane **3.10**. Finalement, l'ensemble des groupements protecteurs est enlevé avec l'acide trifluoroacétique aqueux. Le produit **3.12** est sous la forme d'un zwitterion (précipitation à partir d'un mélange de méthanol et d'éther diéthylique).

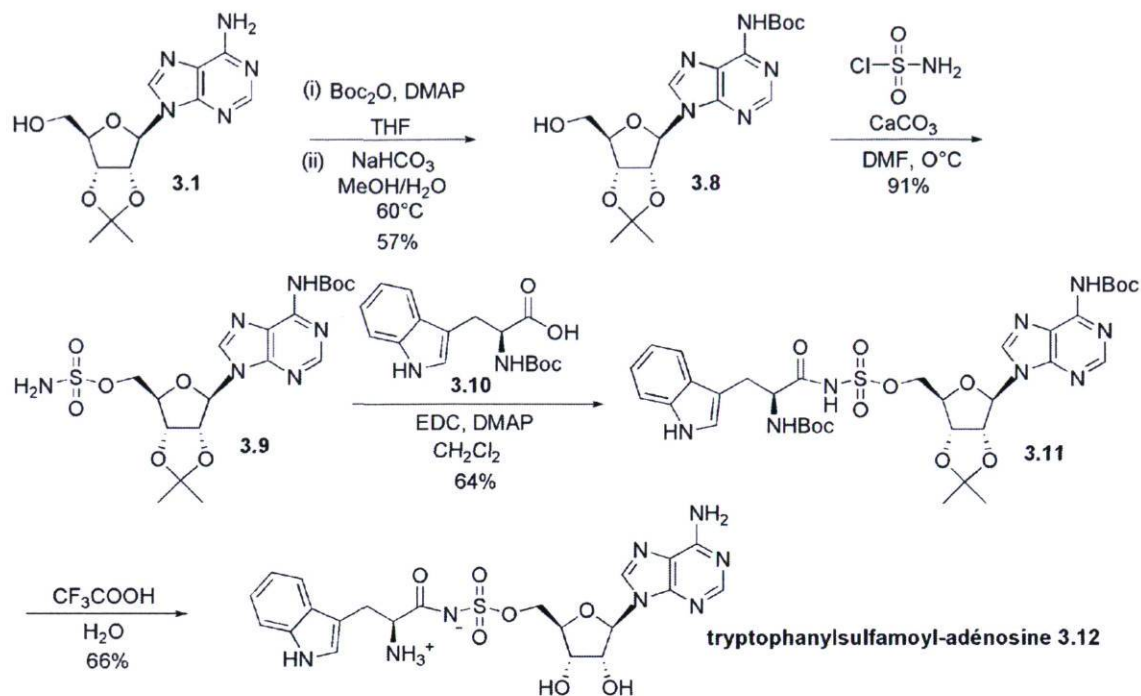


Schéma 3.2. Synthèse du tryptophanysulfamoyl-adénosine.

3.3. Résultats biologiques

Les résultats de cinétique enzymatique qui sont présentés dans ce chapitre proviennent d'une collaboration avec le laboratoire du professeur Jacques Lapointe (Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique, Québec). D'autres études cinétiques sont également en cours avec le professeur Yuxin Jin (State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai) pour étudier le tryptophanysulfamoyl-adénosine en tant qu'inhibiteur de la TrpRS. Les tests d'activité antibiotique ont été réalisés en collaboration avec le professeur Paul H. Roy (Centre de Recherche en Infectiologie, Québec).

3.3.1. Études de cinétique enzymatique

Le pyroglutamylsulfamoyl-adénosine **3.7a** a déjà été caractérisé, mais uniquement comme inhibiteur de la glutamyl-ARNt synthétase de *E. coli* ($K_i = 15 \mu\text{M}$).¹³ Celui-ci est légèrement sélectif sur l'enzyme bactérienne ($K_i = 43 \mu\text{M}$ pour *B. taurus*). Malgré sa

similitude avec l'intermédiaire activé de la réaction catalysée par la glutamyl-ARNt synthétase, il est un très faible inhibiteur de cette enzyme ($K_i = 2.6$ mM pour *E. coli*).

3.3.2. Activité antibiotique sur disque de culture

La grande polarité des analogues de l'intermédiaire activé des aaRS est généralement reconnue comme étant un facteur limitant à leur diffusion dans les membranes bactériennes, et par conséquent à leur efficacité *in vivo*.²⁷⁻²⁸ Le remplacement de l'acide glutamique par l'acide pyroglutamique et l'incorporation d'un ester méthylique ont été privilégiés afin d'obtenir des dérivés moins polaires du glutamylsulfamoyl-adénosine (les esters méthyliques sont également des pro-drogues fréquentes en chimie médicinale). L'activité antibiotique du pyroglutamylsulfamoyl-adénosine **3.12** et du γ -méthyl ester-glutamylsulfamoyl-adénosine **3.7b** a été évaluée. Le tableau 3.2 décrit les souches bactériennes testées et démontre que seul le pyroglutamylsulfamoyl-adénosine **3.12** a une activité significative (faible).

Tableau 3.2. Inhibition de la croissance bactérienne sur disque de culture avec le pyroglutamylsulfamoyl-adénosine et le γ -méthyl ester-glutamylsulfamoyl-adénosine.

Bactérie	Dose pour observer une inhibition	
	pGlu-AMS 3.12	γ -méthyl-Glu-AMS 3.7b
<i>E.coli</i>	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	250 μ g	-
<i>P. aeruginosa</i>	250 μ g	-
<i>S. aureus</i>	250 μ g	-
<i>E. faecalis</i>	-	-

3.4. Références

- 1) Isono, K.; Uramoto, M.; Kusakabe, H.; Miyata, N.; Ubukata, M.; Sethi, S. K.; McCloskey, J. A. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 670-672.
- 2) Osada, H.; Isono, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 230-233.

- 3) Osada, H.; Isono, K. *Biochem. J.* **1986**, *233*, 459-463.
- 4) Ubukata, M.; Isono, K. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3907-3908.
- 5) Ubukata, M.; Osada, H.; Magae, J.; Isono, K. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 1117-1122.
- 6) Castro-Pichel, J.; García-López, M. T.; De las Heras, F. G. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 383-389.
- 7) Forrest, A. K.; Jarvest, R. L.; Mensah, L. M.; O'Hanlon, P. J.; Pope, A. J.; Sheppard, R. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1871-1874.
- 8) Pope A. J.; Moore, K. J.; McVey, M.; Mensah, L.; Benson, N.; Osbourne, N.; Broom, N.; Brown, M. J. B.; O'Hanlon, P. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31691-31701.
- 9) Lee, J.; Kim, S. E.; Lee, J. Y.; Kim, S. Y.; Kang, S. U.; Seo, S. H.; Chun, M. W.; Kang, T.; Choi, S. Y.; Kim, H. O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1087-1092.
- 10) Cusack, S.; Yaremchuk, A.; Tukalo, M. *EMBO J.* **2000**, *19*, 2351-2361.
- 11) Fukai, S.; Nureki, O.; Sekine, S.; Shimada, A.; Tao, J.; Vassilyev, D. G.; Yokoyama, S. *Cell* **2000**, *103*, 793-803.
- 12) Rath, V. G.; Silvian, L. F.; Beijer, B.; Sproat, B. S.; Steitz, T. A. *Structure* **1998**, *6*, 439-449.
- 13) Bernier, S.; Dubois, D. Y.; Habegger-Polomat, C.; Gagnon, L.-P.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2005**, *20*, 61-67.
- 14) Sekine, S.; Shichiri, M.; Bernier, S.; Chênevert, R.; Lapointe, J.; Yokoyama, S. *Structure* **2006**, *14*, 1791-1799.
- 15) Brown, P.; Richardson, C. M.; Mensah, L. M.; O'Hanlon, P. J.; Osborne, N. F.; Pope, A. J.; Walker, G. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2473-2485.
- 16) Bovee, M. L.; Yan, W.; Sproat, B. S.; Francklyn, C. S. *Biochemistry* **1999**, *38*, 13725-13735.
- 17) Heacock, D.; Forsyth, C. J.; Shiba, K.; Musier-Forsyth, K. *Bioorg. Chem.* **1996**, *24*, 273-289.
- 18) Belrhali, H.; Yaremchuk, A.; Tukalo, M.; Larsen, K.; Berthet-Colominas, C.; Leberman, R.; Beijer, B.; Sproat, B.; Als-Nielsen, J.; Grübel, G.; Cusack, S. *Science* **1994**, *263*, 1432-1436.
- 19) Berthet-Colominas, C.; Seignovert, L.; Härtlelin, M.; Grotli, M.; Cusack, S.; Leberman, R. *EMBO J.* **1998**, *17*, 2947-2960.

- 20) Bernier, S.; Akochy, P. M.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 69-75.
- 21) Cusack, S.; Yaremchuk, A.; Tukalo, M. *EMBO J.* **1996**, *15*, 6321-6334.
- 22) Van de Vijver, P.; Ostrowski, T.; Sproat, B.; Goebels, J.; Rutgeerts, O.; Van Aerschot, A.; Waer, M.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3020-3029.
- 23) Van de Vijver, P.; Vondenhoff, G. H. M.; Denivelle, S.; Rozenski, J.; Verhaegen, J.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 260-269.
- 24) Schimmel, P.; Tao, J.; Hill, J. *FASEB J.* **1998**, *12*, 1599-1609.
- 25) Van de Vijver, P.; Vondenhoff, G. H. M.; Kazakov, T. S.; Semenova, E.; Kuznedelov, K.; Metlitskaya, A.; Van Aerschot, A.; Severinov, K. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 6273-6280.
- 26) Jenkins, I. D.; Verheyden, J. P. H.; Moffatt, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3346-3357.
- 27) Kim, S.; Lee, S. W.; Choi, E.-C.; Choi, S. Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 278-288.
- 28) Hurdle, J. G.; O'Neill, A. J.; Chopra, I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4821-4833.

CHAPITRE 4

Synthèse d'analogues β -cétophosphonate des adénylates de glutamyle et de glutaminyle et inhibition sélective des aminoacyl-ARNt synthétases bactériennes correspondantes.

Synthesis of β -ketophosphonate analogs of glutamyl and glutaminyl adenylate, and selective inhibition of the corresponding bacterial aminoacyl-tRNA synthetases.

Christian Balg,^a Sébastien P. Blais,^b Stéphane Bernier,^a Jonathan Huot,^b Manon Couture,^b Jacques Lapointe^b and Robert Chênevert^a

^a*Département de chimie, Centre de recherche sur la fonction, la structure et l'ingénierie des protéines (CREFSIP), Faculté des sciences et de génie, Université Laval, Québec, Canada G1K 7P4*

^b*Département de biochimie et de microbiologie, Centre de recherche sur la fonction, la structure et l'ingénierie des protéines (CREFSIP), Faculté des sciences et de génie, Université Laval, Québec, Canada G1K 7P4*

Article publié dans la revue *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 295-304.

4.1. Préambule

J'ai contribué de plusieurs façons à cet article, notamment au niveau de la synthèse du glutaminyl-phosphonate-adénosine (inhibiteur de la glutaminyl-ARNt synthétase) et de la préparation des échantillons. J'ai également participé à la préparation du manuscrit et à l'élaboration des schémas.

4.2. Résumé

Les β -cétophosphonates sont des groupements isostériques à l'anhydride mixte présent dans les adénylates d'aminocyle (intermédiaires activés de la réaction catalysée par les aminoacyl-ARNt synthétases). Le glutamyl- β -cétophosphonate-adénosine et le glutaminyl- β -cétophosphonate-adénosine ont donc été synthétisés en tant qu'analogues stables de cet intermédiaire. Des études de cinétique enzymatique avec ces inhibiteurs ont été effectuées sur la glutamyl-ARNt synthétase (GluRS) et la glutaminyl-ARNt synthétase (GlnRS) de deux sources différentes (*Escherichia coli* et cytoplasme des mammifères). Le glutamyl- β -cétophosphonate-adénosine est un inhibiteur compétitif de la GluRS de *E. coli* ($K_i = 18 \mu\text{M}$) alors que la GluRS des mammifères est très faiblement inhibée ($K_i = 2.6 \text{ mM}$). D'un autre côté, le glutaminyl- β -cétophosphonate-adénosine est un inhibiteur faible et compétitif (inhibition à deux sites distincts) de la GlnRS de *E. coli* ($K_i = 0.65 \text{ mM}$). Les résultats obtenus sont en accord avec le fait que la GluRS des mammifères est évolutivement similaire à la GlnRS des bactéries : le glutamyl-phosphonate-adénosine est 145 fois plus efficace sur la GluRS bactérienne. Cette divergence du site actif de la GluRS bactérienne est prometteuse pour le développement de nouveaux inhibiteurs sélectifs (antibiotiques).

4.3. Abstract

The aminoacyl- β -ketophosphonate-adenosines (aa-KPA) are stable analogs of the aminoacyl adenylates, which are high-energy intermediates in the formation of aminoacyl-tRNA catalyzed by aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS). We have synthesized glutamyl- β -

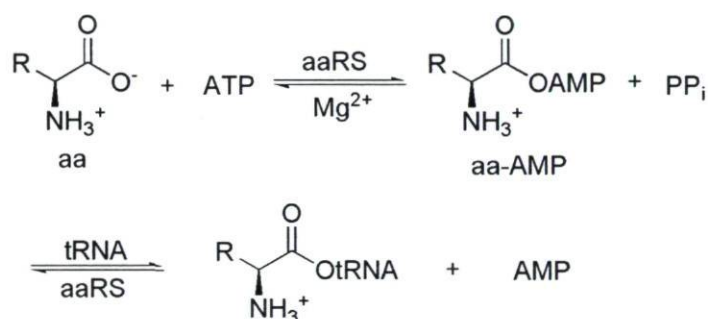
ketophosphonate-adenosine (Glu-KPA) and glutaminy- β -ketophosphonate-adenosine (Gln-KPA), and have tested them as inhibitors of their cognate aaRS, and of a non-cognate aaRS. Glu-KPA is a competitive inhibitor of *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase (GluRS) with a K_i of 18 μ M with respect to its substrate glutamate, and binds at one site on this monomeric enzyme; the non-cognate Gln-KPA also binds this GluRS at one site, but is a much weaker ($K_i = 2.9$ mM) competitive inhibitor. By contrast, Gln-KPA inhibits *E. coli* glutaminyl-tRNA synthetase (GlnRS) by binding competitively but weakly at two distinct sites on this enzyme (average K_i of 0.65 mM); the non-cognate Glu-KPA shows one-site weak ($K_i = 2.8$ mM) competitive inhibition of GlnRS. These kinetic results indicate that the glutamine and the AMP modules of Gln-KPA, connected by the β -ketophosphonate linker, cannot bind GlnRS simultaneously, and that one Gln-KPA molecule binds the AMP-binding site of GlnRS through its AMP module, whereas another Gln-KPA molecule binds the glutamine-binding site through its glutamine module. This model suggests that similar structural constraints could affect the binding of Glu-KPA to the active site of mammalian cytoplasmic GluRSs, which are evolutionarily much closer to bacterial GlnRS than to bacterial GluRS. This possibility was confirmed by the fact that Glu-KPA inhibits bovine liver GluRS 145-fold less efficiently than *E. coli* GluRS by competitive weak binding at two distinct sites (average $K_i = 2.6$ mM). Moreover, these kinetic differences reveal that the active sites of bacterial GluRSs and mammalian cytoplasmic GluRSs have substantial structural differences that could be further exploited for the design of better inhibitors specific for bacterial GluRSs, promising targets for antimicrobial therapy.

4.4. Introduction

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) play a key role in protein biosynthesis in all living organisms. These enzymes catalyze the esterification of amino acids to cognate tRNA in a two-step process¹⁻³ (scheme 4.1). First, ATP reacts with the amino acid (aa) to form an enzyme-bound aminoacyl adenylate intermediate (aa-AMP) with displacement of pyrophosphate (PPi). In aminoacyl adenylates, the high-energy mixed anhydride bond activates the carboxyl group of the amino acid. In the second step, the aminoacyl group is

transferred to the 2'- or 3'-OH at the 3' end of the tRNA, generating aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) and adenosine monophosphate (AMP).

AaRSs are classified into two main groups of ten enzymes each on the basis of common structural and mechanistic features.³ GluRS and GlnRS belong to class I whereas AspRS is a member of class II. GluRS and GlnRS have the characteristic, shared only by ArgRS and class I LysRS, of requiring the presence of their cognate tRNA to catalyze the activation of the amino acid substrate.¹

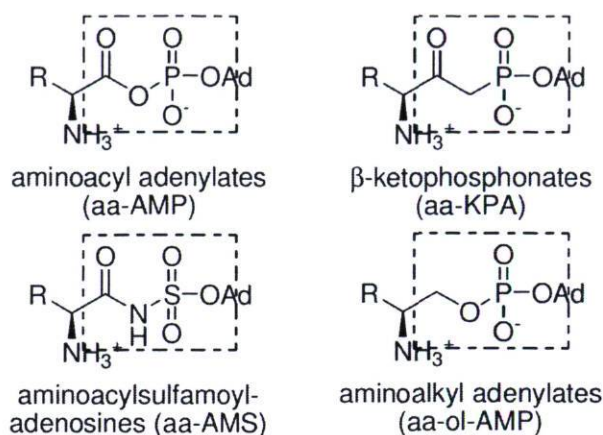


Scheme 4.1

Several natural products with various chemical structures have been identified as inhibitors of aaRSs.^{4,5} These enzymes have been subjected to significant evolutionary divergence, and selective inhibition of bacterial enzymes has been observed. Pseudomonic acid, a secondary metabolite from *Pseudomonas fluorescens* is the sole aaRS inhibitor currently used as an antibiotic.⁶ This natural product is a potent ($K_i = 6$ nM for *E. coli* IleRS) and selective (10^4 -fold selectivity for bacterial versus mammalian IleRS) inhibitor of bacterial IleRS.⁷

AaRSs are amenable to high throughput screening of compound libraries.⁸ Rationally designed synthetic inhibitors of aaRS are typically stable analogs of aminoacyl adenylates (aa-AMP on scheme 4.1).^{4,5} The stability is achieved by replacement of the labile mixed anhydride function by nonhydrolyzable bioisosteres. Several aminoacylsulfamoyladenines or aminoalkyl adenylates have been synthesized and shown to be inhibitors of corresponding aaRSs. The β -ketophosphonate function can also serve as

a stable surrogate for the reactive acylphosphate subunit of aminoacyl adenylates in the design of aaRS inhibitors (scheme 4.2).^{9,10}



Scheme 4.2

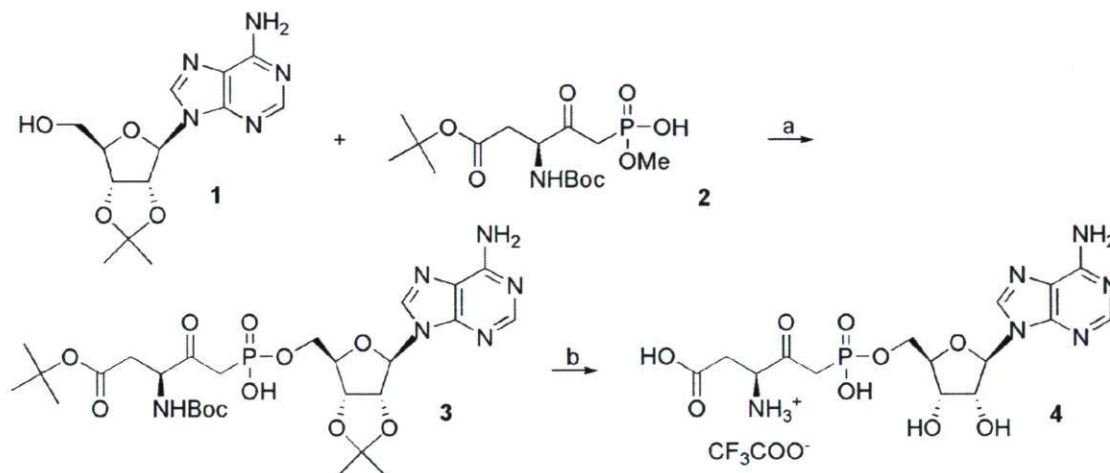
Herein we report the synthesis of β -ketophosphonate analogs of glutamyl and glutamyl adenylates, and their interaction with their cognate aaRSs. We discuss the structural significance of the unusual kinetics of *E. coli* GlnRS inhibition by Gln- β -ketophosphonate and of a mammalian GluRS by Glu- β -ketophosphonate; we also underline the high specificity of Glu- β -ketophosphonate for a bacterial GluRS versus a mammalian cytoplasmic GluRS, and we discuss its interest for the design of novel antibiotics targeting bacterial GluRSs.

4.5. Results and discussion

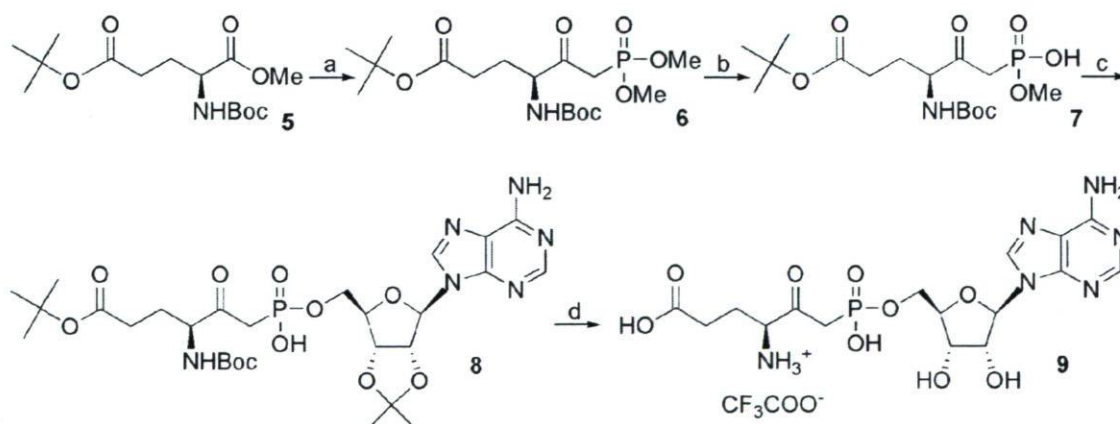
4.5.1. Synthesis of β -ketophosphonates 4, 9 and 15

We recently reported the synthesis of ketophosphonate **4**.⁹ This synthesis relied upon the activation of phosphonic monoester **2** with *p*-tosyl chloride in the presence of pyridine as a base, followed by condensation with isopropylideneadenosine **1** to give ketophosphonate **3** (scheme 4.3). Although this condensation–deprotection reaction provided pure **3**, reaction times were long (14 days) and yields were low (30%). We sought to improve the synthesis of β -ketophosphonates, so we explored alternative strategies for

the activation of phosphonic esters. The synthesis of glutamic ketophosphonate **9** is outlined in scheme 4.4. Condensation of known glutamic ester **5**¹¹ with the lithium salt of dimethyl methylphosphonate provided β -ketophosphonate **6**. Phosphonic monoester **7** was obtained by selective demethylation of **6** with *tert*-butylamine.¹² The phosphonic ester **8** was obtained by esterification of **7** with isopropylideneadenosine **1** in the presence of *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) as a coupling reagent, followed by demethylation of the phosphonic methyl ester with pyridine/water at 55°C.¹³ Reaction of **8** with wet trifluoroacetic acid provoked the removal of the three remaining protecting groups (*tert*-butyl ester, *N*-Boc, isopropylidene acetal) to give glutamic β -ketophosphonate.⁹

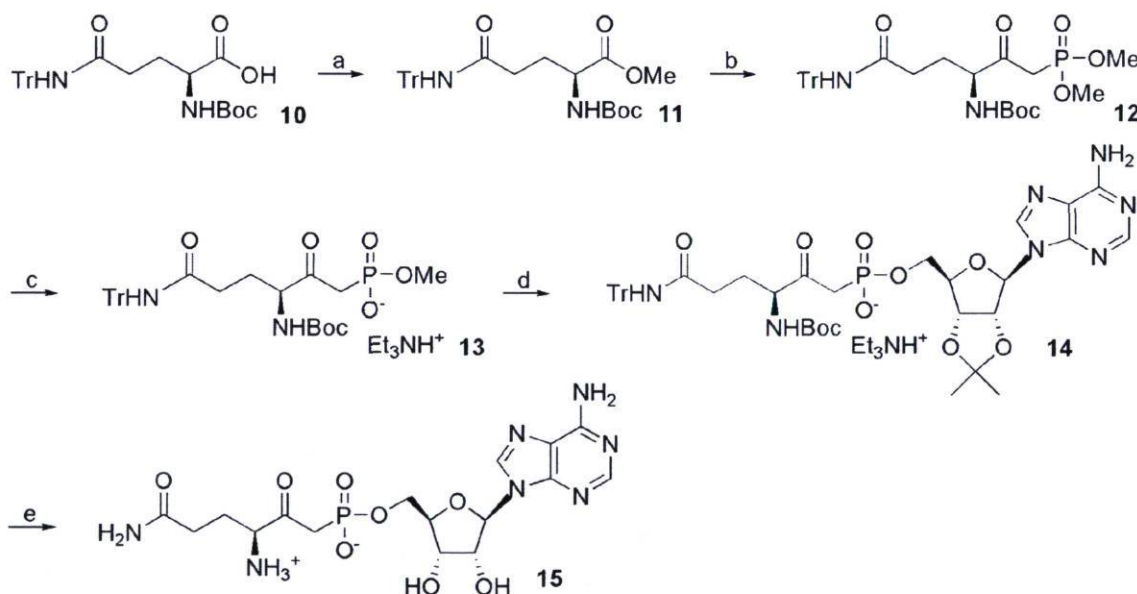


Scheme 4.3. Reagents and conditions: (a) TsCl, pyridine, rt, 14 days (b) CF₃COOH / H₂O, rt, 15 min.



Scheme 4.4. Reagents and conditions: (a) LiCH₂P(O)(OCH₃)₂, THF, -78°C, 1 h; (b) (i) *t*-BuNH₂, reflux, 24 h (ii) HCl; (c) (i) HBTU, *i*-Pr₂NEt, 2',3'-isopropylideneadenosine **1**, DMF, rt, 8.5 h (ii) pyridine/H₂O, 55°C, 10 h; (d) CF₃COOH / H₂O, rt, 15 min.

The synthesis of glutamine ketophosphonate **15** is summarized in scheme 4.5. Glutamine methyl ester **11** was prepared by the reaction of the cesium salt of glutamine derivative **10** with CH_3I in DMF.¹⁴ Condensation of ester **11** with the lithium anion of dimethyl methylphosphonate afforded dimethyl β -ketophosphonate **12**.¹⁵ Selective monodemethylation of **12** with $\text{PhSH} / \text{Et}_3\text{N}$ provided monoester **13**. Esterification of phosphonic salt **13** with adenosine derivative **1** by the HBTU procedure, followed by demethylation of the phosphonic methyl ester gave phosphonic ester **14**. We have observed that the intermediate phosphonic methyl ester is unstable but the corresponding salt **14** was easily isolated. The overall yield for this key two-step sequence was 57%. Treatment of **14** with $\text{CF}_3\text{COOH} / \text{H}_2\text{O}$ resulted in simultaneous cleavage of the Boc, trityl and isopropylidene groups to provide glutamine β -ketophosphonate **15**. This compound is stable in the solid state but decomposes slowly in solutions.



Scheme 4.5. Reagents and conditions: (a) (i) Cs_2CO_3 , $\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$ (ii) MeI , DMF, rt, 1 h; (b) $\text{LiCH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_3)_2$, THF, -78°C , 2 h; (c) PhSH , Et_3N , THF / DMF, rt, 48 h; (d) (i) HBTU, DMAP, 2',3'-isopropylideneadenosine **1**, DMF, 3.5 h (ii) PhSH , Et_3N , DMF, rt, 24 h; (e) $\text{CF}_3\text{COOH} / \text{H}_2\text{O}$, rt, 15 min.

4.5.2. Inhibition of *E. coli* GluRS by Glu- β -ketophosphonate-adenosine **9** (Glu-KPA), and specificity of this inhibition

The comparison of the double-reciprocal plots of the aminoacylation kinetic data at various concentrations of Glu-KPA (fig. 4.1A) show that it is essentially a competitive inhibitor of *E. coli* GluRS with respect to glutamate, as revealed by the intersection of the

lines near the axis $1/[S] = 0$. A K_i value of $18 \mu\text{M}$ was obtained from a replot of the slopes of the above-mentioned lines versus $[\text{inhibitor}]^{16}$ (fig. 4.1B). This competitive character of Glu-KPA inhibition with respect to glutamate is also revealed by the fitting of the kinetic relation $v_i/v_0 = f([\text{inhibitor}])$ with the competitive inhibition equation 1 (fig. 4.2A, left curve; see experimental part). This curve-fitting procedure led to the same K_i value of $18 \mu\text{M}$ Glu-KPA for *E. coli* GluRS, and thus was used for identifying the other cases of competitive inhibition reported here, and for measuring the K_i values (fig. 4.2, except for the left curve of fig. 4.2B). The related compound Gln-KPA **15**, which inhibits *E. coli* GlnRS (see below), evolutionarily related to GluRS¹⁷, is a 170-fold weaker inhibitor ($K_i = 2.9 \text{ mM}$) of *E. coli* GluRS (fig. 4.2A, right curve, and table 4.1) than is Glu-KPA.

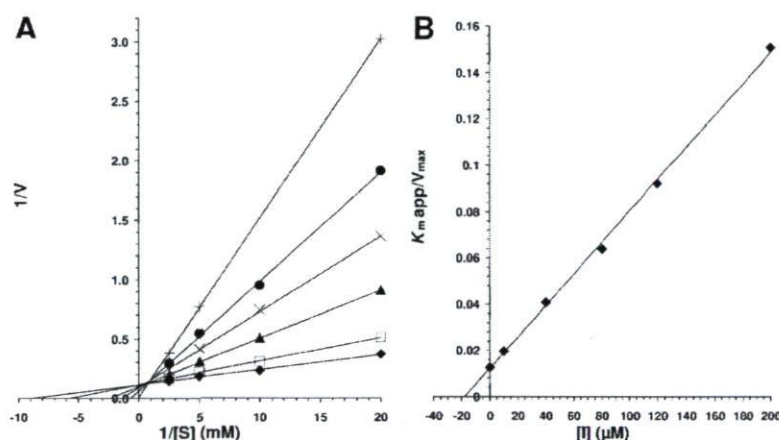


Figure 4.1. Inhibition of *Escherichia coli* GluRS by Glu-KPA **9**: A) Determination of the apparent K_m for glutamate in the presence of several concentrations of this inhibitor: $0 \mu\text{M}$ (\blacklozenge), $10 \mu\text{M}$ (\square), $40 \mu\text{M}$ (\blacktriangle), $80 \mu\text{M}$ (\times), $120 \mu\text{M}$ (\bullet) and $200 \mu\text{M}$ ($+$). B) Determination of the K_i value for this inhibitor with respect to glutamate, from the linear relation between the slopes of the reciprocal plots presented in A, as a function of the inhibitor concentration.

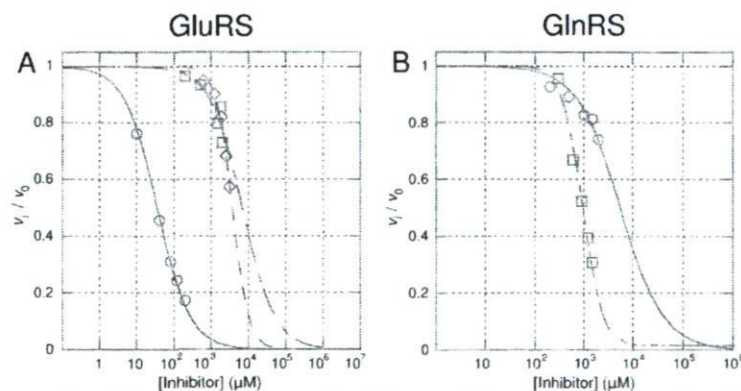


Figure 4.2. Inhibition by Glu-KPA **9** (\circ) and by Gln-KPA **15** (\square) of: (A) *E. coli* GluRS; and inhibition of a mammalian GluRS by Glu-KPA **9** (\diamond); (B) *E. coli* GlnRS.

Table 4.1. K_i for the inhibition of various GluRS and of *E. coli* GlnRS by aa-AMP analogs.

aa-AMP analog	<i>E. coli</i> GlnRS	<i>E. coli</i> GluRS	Mammalian liver GluRS	Ratio K_i mammalian / K_i <i>E. coli</i>	Ref.
Gln-KPA	0.65 mM	2.9 mM	ND	ND	This work
Glu-KPA	2.8 mM	18 μ M	2.6 mM	145	This work
Glu-AMS	ND	2.8 nM	70 nM	25	25

ND: not determined

4.5.3. Inhibition of *E. coli* GlnRS by Gln- β -ketophosphonate-adenosine 15 (Gln-KPA), and specificity of this inhibition

The kinetics of *E. coli* GlnRS inhibition by Gln-KPA (fig. 4.2B) cannot be explained by a simple competitive inhibition, represented by the less tilted curve of $v_i/v_0 = f([\text{inhibitor}])$, but trace a steeper curve fitting correctly the data. As these aa-AMP analogs are made of two modules (aminoacyl and AMP), we considered the possibility that Gln-KPA binds at two sites on GlnRS, possibly the glutamine and the AMP sites, through its corresponding modules (fig. 4.3). We thus used the mechanism of cooperative pure competitive inhibition by two different nonexclusive inhibitors¹⁶ shown in figure 4.4A, adapted to our situation where the two inhibitory components are part of the same Gln-KPA molecule. The velocity equation for this system under rapid equilibrium conditions, and the corresponding relation for $v_i/v_0 = f([\text{inhibitor}])$ are shown in figure 4.4B. This equation 1 fits very well our experimental data (the steeper curve in figure 4.2B), which supports the above-mentioned two-site model.

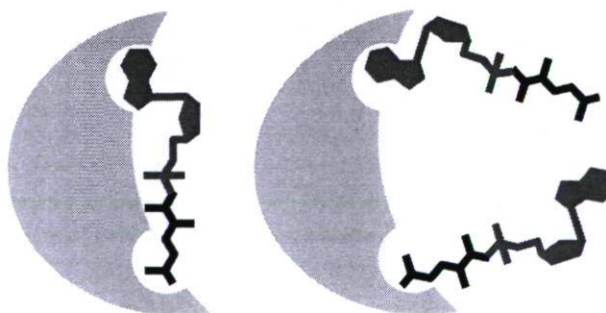


Figure 4.3. Schematic models of the binding of one molecule of aa-AMP to an aaRS (left), and of two molecules of Gln-KPA 15 to *E. coli* GlnRS (right).

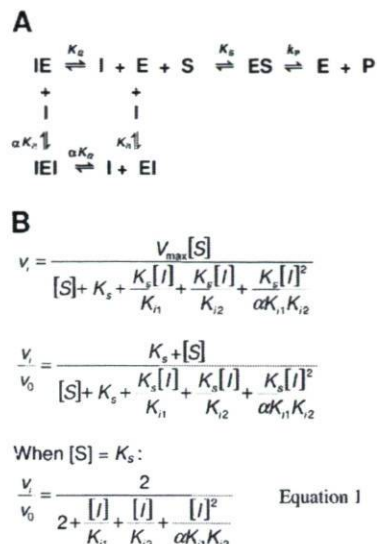


Figure 4.4. Cooperative pure competitive inhibition by two different nonexclusive inhibitors: A) Scheme of this mechanism under rapid equilibrium conditions; velocity equation for this system, and the corresponding relation for $v_i/v_0 = f([\text{inhibitor}])$.

This curve fitting yields a value of 0.42 mM^2 for the product $\alpha K_{i1} K_{i2}$, where K_{i1} and K_{i2} are the competitive inhibition constants for the interaction of Gln-KPA with GlnRS through its aminoacyl and AMP modules, respectively, and where α expresses the cooperativity between the binding of Gln-KPA at these two sites. If we assume that $\alpha = 1$ (i.e. no cooperativity), and that $K_{i1} = K_{i2}$, then we obtain an average value of 0.65 mM for the K_i of Gln-KPA with GlnRS (fig. 4.2B). To obtain information on each of these three parameters, we sought to evaluate the inhibitory action of two inhibitors which share with Gln-KPA either its aminoacyl module or its AMP module. Glu-KPA fulfills the conditions for binding to the AMP-binding site of GlnRS and not to its amino acid-binding site; therefore, its K_i for *E. coli* GluRS (2.8 mM ; see figure 4.2A and table 4.1) is an estimate of K_{i2} . On the other hand, none of the glutamine analogs that we tested inhibited GlnRS. Therefore, we cannot estimate the value of α .

The unusual inhibitory properties of Gln-KPA for *E. coli* GlnRS (2 sites, and K_i of 0.65 mM) compared to those of Gln-ol-AMP¹⁸ (1 site, $K_i = 280 \text{ nM}$, structure on Scheme 4.2) and of Gln-AMS¹⁹ (1 site and $K_i = 1.32 \text{ }\mu\text{M}$, structure on scheme 4.2), may be due to a steric hindrance between the hinge, connecting the two modules of this inhibitor, and the active site area of GlnRS, thus preventing the simultaneous binding of the two modules to

each of their sites on this enzyme. This unusual Gln-KPA/GlnRS interaction, and the fact that the two modules of Glu-KPA can bind simultaneously to *E. coli* GluRS, reveals structural differences between the active sites of GlnRS and of GluRS. Considering that bacterial GlnRSs are evolutionarily closer to eukaryotic GluRSs than to bacterial GluRSs²⁰⁻²², Glu-KPA could inhibit bacterial GluRSs much more efficiently than mammalian GluRSs. This model is supported by the fact Glu-KPA does not inhibit significantly bovine liver GluRS (see below).

4.5.4. Inhibition of a mammalian cytoplasmic GluRS by Glu-KPA 9.

Glu-KPA inhibits the cytoplasmic GluRS of calf liver, competitively with respect to glutamate (fig. 4.2A, \diamond), with a K_i of 2.6 mM. This inhibition is 145-fold weaker than that of *E. coli* GluRS (table 4.1).

4.6. Discussion

Among all the known stable analogs of aminoacyl adenylates (aa-AMP) which inhibit aaRSs⁴, Gln-KPA is the only one for which the presence of two binding sites on the cognate aaRS (GlnRS) was revealed by inhibition kinetics. Considering the bimodular structure (aminoacyl and adenosine) of these inhibitors, this property of Gln-KPA suggests that its two structural modules cannot bind simultaneously to GlnRS. A possible model is that one Gln-KPA molecule binds GlnRS via its aminoacyl module, whereas the other binds it via its adenosine module (see figure 4.3). This model is consistent with the fact that GlnRS inhibition by Gln-KPA is 40-fold weaker than that of GluRS by Glu-KPA (table 4.1) whose two modules can bind simultaneously to GluRS (fig. 4.1). The joint binding of two covalently linked modules of a ligand to a protein is generally much stronger than that of each of the corresponding free modules; for instance, the covalent linking of the modules phenylalanine and AMP to form phenylalanyl adenylate leads to a much stronger binding of the latter ($K_d = 4$ nM) to phenylalanyl-tRNA synthetase than that of phenylalanine ($K_d = 30$ μ M) or of AMP ($K_d = 1$ mM).²³

The two main types of stable aa-AMP analogs that have been characterized as aaRS inhibitors are the aminoalkyl adenylates (aa-ol-AMP) and the aminoacylsulfamoyladenines (aa-AMS).⁴ In some cases, large differences between the K_i of the aa-ol-AMP and of the aa-AMS specific to a given aaRS have been reported; for instance, these values for *E. coli* GluRS are 3 μ M and 2.8 nM, respectively.²⁴⁻²⁵ The novel Glu-AMP analog presented here, Glu-KPA, has a K_i of 18 μ M. These differences between aa-AMP analogs which share the same aminoacyl and adenosine modules but differ by the hinges linking them, may be due to the binding properties of their hinges to the active site area, and/or their flexibility, including their vibrational modes on the enzyme.²⁶

The only other aminoacyl-KPA characterized so far as an inhibitor is Asp-KPA.⁹ It inhibits *E. coli* aspartyl-tRNA synthetase (AspRS) competitively with respect to aspartate. It has one binding site on this enzyme, and is much more efficient ($K_i = 123$ nM) than are Glu-KPA with GluRS (18 μ M) and Gln-KPA with GlnRS (0.65 mM). As AspRS is a member of the class II aaRSs, which have no evolutionary linkage with the class I aaRSs²² to whom GluRS and GlnRS belong, these inhibitory properties of Asp-KPA suggest that the linker between its two modules does not interfere with their optimal binding in the AspRS active site. It remains to be determined if this is a general property of the β -ketophosphonates (not yet synthesized) corresponding to the nine other class II aaRSs.

The facts that Glu-KPA and Glu-AMS inhibit *E. coli* GluRS much more efficiently than mammalian cytoplasmic GluRSs (table 4.1) reveal the existence of important structural differences between the active sites of these orthologous enzymes. These differences make bacterial GluRSs promising targets for antimicrobial therapy.

4.7. Experimental

4.7.1. General

Chemical reagents were purchased from Aldrich-Sigma Chemical Company. Flash column chromatography was carried out using 40-63 μ M (230-400 mesh) silica gel. Optical

rotations were measured using a JASCO DIP-360 digital polarimeter (c as g of compound per 100 mL). Infrared spectra were recorded on a Bomem MB-100 spectrometer. NMR spectra were recorded on a Varian Inova AS400 spectrometer (400 MHz).

For enzyme purification and assay, the following compounds were of the highest quality available, and were purchased from the indicated companies: [^{14}C]labelled L-amino acids from PerkinElmer Life and Analytical Sciences; unfractionated tRNA from *E. coli* MRE 600 and DNase I from Roche Diagnostics (Laval, Québec); unlabelled L-amino acids, ATP, the reducing agents 2-mercaptoethanol (2-ME) and dithiothreitol (DTT), and chicken egg white lysozyme from Sigma-Aldrich Canada Ltd.; isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG), imidazole and the buffers tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) from Laboratoire MAT (Beauport, Québec). Ni-NTA agarose columns from Qiagen Inc. (Canada).

4.7.2. Dimethyl β -ketophosphonate **6**

To a solution of dimethyl methylphosphonate (0.43 mL, 3.97 mmol) in anhydrous THF (20 mL) at -78°C was added dropwise (30 min) *n*-BuLi in hexane (2.5 M, 1.51 mL, 3.78 mmol). A solution of ester **5** (600 mg, 1.89 mmol) in THF (5 mL) was added and the solution was stirred at -78°C for 1 h. The reaction was quenched by dropwise addition of sat. aq. NH_4Cl (30 mL) and THF was evaporated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 X 50 mL) and the organic layer was washed with sat. aq. NH_4Cl and brine, dried over MgSO_4 and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (gradient CH_2Cl_2 / EtOAc, 3:2 to 1:1) to give **6** (555 mg, 72%) as a colorless oil: $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ 1.1 (c 3.3, CHCl_3); IR (neat) 3600-3100, 2978, 2929, 1713, 1518, 1250, 1158, 1031 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.26 (s, 18H), 1.59-1.69 (m, 1H), 1.79-2.14 (m, 3H), 3.03 (dd, $J = 22.0$ and 14.4 Hz, 1H), 3.17 (dd, $J = 22.6$ and 14.4 Hz, 1H), 3.60 (d, $J = 11.4$ Hz, 3H), 3.61 (d, $J = 11.4$ Hz, 3H), 4.14-4.19 (m, 1H), 5.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 25.7, 28.0, 28.2, 31.2, 37.4 (d, $J = 130.4$ Hz), 52.9 (d, $J = 6.9$ Hz), 53.0 (d, $J = 6.1$ Hz), 59.6, 79.5, 80.3, 155.6, 172.0, 201.1 (d, $J = 6.1$ Hz); ^{31}P NMR

(162 MHz, CDCl₃) δ 23.1; HRMS (CI, NH₃) calcd for C₁₇H₃₃NO₈P (M+H)⁺ 410.1944, found 410.1933.

4.7.3. Methyl β -ketophosphonate **7**

A solution of dimethyl β -ketophosphonate **6** (558 mg, 1.36 mmol) in *tert*-butylamine (30 mL) was heated at reflux for 24 h. The solvent was evaporated and the solid residue was dissolved in CH₂Cl₂ (50 mL). A solution of HCl in dioxane (4 M, 0.34 mL, 1.36 mmol) was added and the mixture was diluted in ethyl acetate (100 mL). The organic phase was washed with brine, dried over MgSO₄ and evaporated. Flash chromatography (gradient EtOAc to MeOH / EtOAc, 2:3) provided **7** (507 mg, 94%) as a white solid: mp 103-105°C; $[\alpha]_D^{25}$ 0.2 (c 0.55, MeOH), IR (KBr) 3600-3100, 2978, 2934, 1703, 1508, 1241, 1163, 1046 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.44-1.46 (m, 18H), 1.74-1.79 (m, 1H), 2.13-2.22 (m, 1H), 2.29-2.33 (m, 2H), 3.00 (dd, J = 21.2 and 12.8 Hz, 1H), 3.18 (dd, J = 21.8 and 12.8 Hz, 1H), 3.59 (d, J = 10.9 Hz, 3H), 4.39-4.44 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 26.9, 28.5, 28.9, 32.7, 52.5 (d, J = 5.6 Hz), 60.6, 80.9, 81.7, 158.1, 174.2, 206.8 (d, J = 5.4 Hz); ³¹P NMR (162 MHz, CD₃OD) δ 16.6; LRMS (ESI) 418.1 (M+Na)⁺.

4.7.4. Phosphonate **8**

To a solution of **7** (350 mg, 0.855 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) were added 2',3'-isopropylideneadenosine (408 mg, 1.32 mmol), HBTU (402 mg, 1.06 mmol) and *i*-Pr₂NEt (0.62 mL, 3.54 mmol), and the solution was stirred at room temperature for 8.5 h. The reaction mixture was diluted with AcOEt (120 mL), washed with 1 M HCl, sat. aq. NaHCO₃, brine and the organic layer was dried (MgSO₄) and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc to 20% MeOH/AcOEt) to give the coupled product partially contaminated by 2',3'-isopropylideneadenosine. This mixture was stirred with pyridine/H₂O (27 mL / 3 mL) at 55°C for 10 h. The solvents were evaporated and the residue was purified by flash chromatography (15% MeOH / CH₂Cl₂ to 40% MeOH / CH₂Cl₂) to give **8** (208 mg, 35%) as a white solid: mp 147°C (dec); $[\alpha]_D^{25}$ -34.7 (c 0.65, MeOH); IR (KBr) 3600-3100, 1709, 1212, 1156, 1064, 856 cm⁻¹; ¹H NMR

(400 MHz, CD₃OD) δ 1.35-1.41 (m, 2H), 1.57 (s, 3H), 1.65-1.75 (m, 1H), 2.08-2.17 (m, 1H), 2.19-2.25 (m, 2H), 2.85-3.18 (m, 2H), 4.04-4.08 (m, 2H), 4.32-4.37 (m, 1H), 4.44 (br s, 1H), 4.85-5.11 (m, 1H), 5.28 (dd, $J = 6.0$ and 3.2 Hz, 1H), 6.17-6.19 (m, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.44 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 24.4, 25.5, 26.3, 27.2, 27.6, 31.3, 59.3, 59.4, 64.6, (d, $J = 4.8$ Hz), 64.7 (d, $J = 4.8$ Hz), 79.6, 79.7, 80.43, 80.45, 82.0, 82.1, 84.55, 84.56, 85.5 (d, $J = 7.6$ Hz), 90.6, 113.9, 114.0, 119.0, 140.3, 140.4, 149.2, 149.3, 152.8, 156.1, 156.7, 156.8, 172.9, 205.0; ³¹P NMR (162 MHz, CD₃OD) δ 18.0; HRMS (FAB) calcd for C₂₈H₄₄N₆O₁₁P (M+H)⁺ 671.2805, found 671.2800.

4.7.5. Glutamic ketophosphonate **9**

A solution of compound **8** (40 mg, 59.6 μ mol) in trifluoroacetic acid / water (9 mL / 1 mL) was stirred at room temperature for 15 min. The solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was co-evaporated with water, then with MeOH / Et₂O to give **9** (34 mg, 97%) as a white solid: mp 122°C (dec); $[\alpha]_D^{21}$ -21.4 (c 1.0, DMF); IR (KBr) 3600-2800, 1684, 1201, 1130 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 1.87-1.96 (m, 1H), 2.16-2.26 (m, 1H), 2.33-2.40 (m, 2H), 3.96-4.06 (m, 2H), 4.18-4.21 (m, 1H), 4.22-4.25 (m, 1H), 4.29-4.33 (m, 1H), 4.55-4.58 (m, 1H), 6.00 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.42 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 23.6, 29.08, 29.12, 38.2-40.0 (m, C-D coupling, H-D exchange with D₂O), 58.8, 64.0, 64.1, 64.2, 69.9, 70.0, 74.51, 74.54, 83.7 (d, $J = 7.6$ Hz), 88.3, 88.4, 116.2 (q, $J = 289.0$ Hz, TFA), 118.53, 118.54, 142.48, 142.53, 144.7, 148.23, 148.24, 149.8, 162.6 (q, $J = 35.0$ Hz, TFA), 175.8, 175.9, 200.9, 201.0; ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ 16.1; LRMS (ESI) 475.1 (M+H)⁺.

4.7.6. Glutamine methyl ester **11**

N- α -Boc-*N*- γ -trityl-L-glutamine **10** (2.62 g, 5.36 mmol) was dissolved in MeOH/H₂O (10:1, 35 mL) and the solution was titrated to pH 7.0 with a 20% aqueous solution of Cs₂CO₃. The solvents were evaporated and the residue co-evaporated with toluene. The solid cesium salt was stirred with methyl iodide (0.370 mL, 5.90 mmol) in dry DMF (25 mL) for 1 h at room temperature. The reaction mixture was diluted with EtOAc

(250 mL) and the organic phase was washed with aq. sat. NaHCO_3 and brine, dried over MgSO_4 , evaporated and then co-evaporated with toluene to remove residual DMF. The crude product was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2 / EtOAc, 10:1) to give **11** (2.37 g, 88%) as a white solid: mp 153-154°C, lit.¹⁵ 153-154°C; $[\alpha]_D^{21}$ 15.2 (c 1.01, CHCl_3); IR (KBr) 3600-3100, 2971, 1746, 1714, 1638, 1210, 710 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.44 (s, 9H), 1.80-1.96 (m, 1H), 2.11-2.26 (m, 1H), 2.28-2.49 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 4.27-4.38 (m, 1H), 5.24 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.17-7.39 (m, 15H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 28.3, 29.2, 33.7, 52.5, 70.7, 80.2, 127.0, 128.2, 129.0, 144.7, 155.9, 170.9, 172.8.

4.7.7. Dimethyl β -ketophosphonate **12**

To a solution of dimethyl methylphosphonate (10.40 mL, 96.00 mmol) in anhydrous THF (70 mL) at -78°C was added dropwise *n*-BuLi in hexane (1.6 M, 60.00 mL, 96.00 mmol) and the mixture was stirred for 45 min. A solution of ester **11** (2.01 g, 4.00 mmol) in anhydrous THF (100 mL) was added and the solution was stirred at -78°C for 1 h, then at -30°C for another 1 h. The reaction was quenched by the addition of saturated aqueous NH_4Cl (50 mL). The reaction mixture was extracted with ethyl acetate and the organic phase was washed with water, brine, dried over MgSO_4 and concentrated to 20 mL. Petroleum ether was added and filtration after 24 h at room temperature provided **12** (1.92 g, 81%) as a white solid: mp 181-182°C, lit.¹⁵ 183-184°C; $[\alpha]_D^{21}$ -18.9 (c 1.08, MeOH); IR (KBr) 3600-3100, 3030, 2978, 2957, 1717, 1674, 1650, 1256, 1035 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.43 (s, 9H), 1.73-1.90 (m, 1H), 2.13-2.29 (m, 1H), 2.30-2.51 (m, 2H), 3.06 (dd, $J = 21.8$ and 14.4 Hz, 1H), 3.24 (dd, $J = 22.2$ and 14.5 Hz, 1H), 3.73 (d, $J = 11.1$ Hz, 3H), 3.75 (d, $J = 11.3$ Hz, 3H), 4.27-4.37 (m, 1H), 5.55 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.16-7.35 (m, 15H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 27.0, 28.3, 33.1, 37.7 (d, $J = 134.1$ Hz), 53.1, 60.1, 70.6, 80.3, 127.0, 127.9, 128.8, 144.7, 155.9, 171.2, 201.1 (d, $J = 6.2$ Hz); ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 23.0.

4.7.8. Methyl β -ketophosphonate **13**

To a solution of phosphonate **12** (1.60 g, 2.70 mmol) in THF / DMF (15 mL / 5 mL) were added triethylamine (2.00 mL) and benzenethiol (1.00 mL). The solution was stirred at room temperature for 48 h. The solvents were evaporated and then co-evaporated with toluene. The crude product was purified by flash chromatography (1% Et₃N / 10% MeOH / 89% CH₂Cl₂) to give **13** (1.82 g, 98%) as a white solid: mp 156-158°C; [α]_D²¹-0.5 (c 1.04, MeOH); IR (KBr) 3600-3100, 3058, 2981, 2948, 2678, 2491, 1697, 1492, 1214, 1167, 1050, 701 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.27 (t, J = 7.3 Hz, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.78-1.94 (m, 1H), 2.21-2.40 (m, 3H), 2.86 (dd, J = 20.9 and 12.1 Hz, 1H), 2.94-3.06 (m, 6H), 3.34 (dd, J = 21.9 and 12.2 Hz, 1H), 3.59 (d, J = 11.1 Hz, 3H), 4.30-4.40 (m, 1H), 6.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.17-7.33 (m, 15H), 7.39 (s, 1H), 12.01 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 8.5, 28.3, 28.4, 33.8, 41.0 (d, J = 112.4 Hz), 45.6, 52.3, 59.9, 70.4, 80.0, 126.8, 127.8, 128.8, 144.9, 156.3, 171.6, 204.8; ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 13.6; LRMS (ESI) 682.3 (M+H)⁺.

4.7.9. Phosphonate **14**

A solution of phosphonate **13** (0.830 g, 1.17 mmol), isopropylideneadenosine **1** (0.504 g, 1.64 mmol), DMAP (0.162 g, 1.33 mmol) and HBTU (1.33 g, 3.51 mmol) in anhydrous DMF (8 mL) was stirred at room temperature for 3.5 h. The mixture was partitioned between ethyl acetate and saturated aqueous NH₄Cl and the organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, evaporated and then co-evaporated with toluene. The product was purified by flash chromatography (2% MeOH in CH₂Cl₂ to 5% MeOH in CH₂Cl₂). To a solution of this product in DMF (6 mL) were added triethylamine (0.50 mL) and benzenethiol (0.25 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solution was evaporated and then co-evaporated with toluene. The crude product was purified by flash chromatography (1% Et₃N / 20% MeOH / 79% CH₂Cl₂) to give phosphonate **14** (0.923 g, 57% for 2 steps) as a white solid: mp 169-171°C; [α]_D²¹-25.0 (c 1.04, MeOH); IR (KBr) 3600-3100, 3058, 2978, 2936, 2678, 1691, 1491, 1214, 1164, 1064 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.20 (t, J = 7.3 Hz, 9H), 1.35 (s, 3H), 1.40 (s, 9H),

1.61 (s, 3H), 1.77-1.95 (m, 1H), 2.22-2.41 (m, 3H), 2.74-2.92 (m, 1H), 2.95 (q, J = 7.3 Hz, 6H), 3.20-3.38 (m, 1H), 3.98-4.12 (m, 2H), 4.29-4.43 (m, 1H), 4.45-4.53 (m, 1H), 5.03-5.11 (m, 1H), 5.13-5.23 (m, 1H), 6.20-6.26 (m, 1H), 6.48 (br s, 2H), 7.10-7.32 (m, 15H), 7.44 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.37 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 8.5, 25.3, 27.2, 28.4, 29.7, 33.7, 41.5 (d, J = 113.6 Hz), 45.6, 59.9, 65.0, 70.4, 79.6, 81.7, 85.0, 85.8, 90.8, 114.0, 119.4, 126.8, 127.8, 128.8, 139.9, 144.8, 149.5, 152.3, 155.1, 156.3, 171.6, 204.9; ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 12.0; LRMS (ESI) 856.3 (M+H) $^+$.

4.7.10. β -ketophosphonate **15**

A solution of compound **14** (142 mg, 0.242 mmol) in trifluoroacetic acid / water (5.4 mL / 0.6 mL) was stirred at room temperature for 15 min. The solvents were evaporated under reduced pressure and the solid residue co-evaporated with Et_2O / MeOH. The crude product was dissolved in a minimum of MeOH and precipitated by the addition of Et_2O (10 mL). The precipitate is filtered and washed with Et_2O / MeOH to give **15** as a white solid (78 mg, 68%): mp 133-135°C (dec); $[\alpha]_D^{21}$ -8.2 (c 0.10, H_2O); IR (KBr) 3600-2700, 2977, 2934, 1677, 1203, 1132, 1065 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 2.04-2.17 (m, 1H), 2.27-2.53 (m, 3H), 3.03-3.45 (m, 2H), 4.16-4.24 (m, 2H), 4.36-4.44 (m, 2H), 4.49-4.55 (m, 1H), 4.72-4.84 (m, 1H), 6.17 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.55-8.56 (2s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 27.1, 33.1, 42.7 (d, J = 116.8 Hz), 61.7, 66.9, 72.9, 77.2, 86.8, 91.1, 121.5, 145.4, 147.6, 151.2, 152.8, 176.1, 204.0; ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ 15.9; LRMS (ESI) 474.1 (M+H) $^+$.

4.7.11. Enzyme purifications

Glutamyl-tRNA synthetase (GluRS): The *E. coli* His-tagged GluRS was produced in the *E. coli* strain JP1449[DE3]pLysS containing the pET28cTXERS plasmid (Dubois, D.Y., unpublished results), by induction with 0.5 mM IPTG at $A_{600\text{ nm}} = 0.4$ and over-night culture at room temperature to avoid the formation of inclusion bodies. Cells were resuspended in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.9) containing 5 mM imidazole. The lysis was performed by the addition of lysozyme from chicken egg white and one tablet of

“Complete, Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail” (Roche Diagnostics). DNase I was added to the lysate and the mixture stirred on ice until the viscosity was significantly reduced; then, 1 mM 2-ME was added. The lysate was centrifuged for 45 minutes at 17 500 x g, and the supernatant was clarified by passage through a 0.22 µm filter. The enzyme was purified by affinity chromatography on a 5 ml Ni-NTA agarose column equilibrated in 20 mM Tris-HCl (pH 7.9) and 5 mM imidazole. The column was successively washed with this Tris buffer containing 5 mM and 25 mM imidazole. The enzyme was eluted with 1 M imidazole in the same buffer. The washing and elution buffers also contain 1 mM 2-ME. The GluRS was concentrated and dialysed against the storage buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.2, 45% glycerol, 5 mM 2-ME).

Glutamyl-tRNA synthetase (GlnRS): The gene of the *E. coli* His-tagged GlnRS cloned in the pQRST plasmid (kindly provided by Prof. John Perona, Univ. Calif. Santa Barbara) was over-expressed in BL21[DE3]pLysS by induction with 1 mM IPTG at $A_{600\text{ nm}} = 0.5$ for 4 hours at 37°C. Cells were resuspended in 50 mM HEPES-KOH buffer (pH 7.2) containing 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole and 15 mM MgCl₂. The lysis and protein extract preparation were performed as for the GluRS. The purification and storage of the enzyme were performed as described.²⁷

Mammalian GluRS and tRNA: A partially purified fraction of bovine liver containing aaRSs was obtained from Bio S&T Inc. (Montreal, Canada). Transfer RNA from calf liver was obtained from Sigma-Aldrich Canada Ltd.

4.7.12. Enzyme activity and inhibition assays

E. coli. GluRS: The tRNA glutamylation reactions were carried out in 50 mM HEPES-KOH pH 7.2, 16 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 3 mM DTT, 5 µM tRNA^{Glu} in *E. coli* tRNA, and 50 to 400 µM L-[¹⁴C(U)]glutamate (adapted from Tremblay et al.²⁸). The reaction was initiated by adding the pre-incubated enzyme to a final concentration of 2 nM. The amount of glutamyl-tRNA formed was determined by measuring the radioactivity present in 5% trichloroacetic acid precipitates of reaction mixture aliquots, as previously

described.²⁹ The initial rates of the reaction were determined by measuring the amounts of [¹⁴C]-glutamyl-tRNA formed in 40 µl aliquots taken at 2 minutes intervals over 12 minutes. The inhibitor, Glu-KPA **9**, freshly prepared as a 25 mM solution in 50 mM HEPES-KOH, pH 7.2 buffer, was added at various final concentrations (0 to 200 µM) just before pre-incubating the reaction medium at 37°C for 2 minutes. No significant decrease of inhibitory activity was observed for Glu-KPA after 10 months in the above buffer at 4°C. Analysis of this fraction by electrophoresis on polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) (Figure 5) indicates that this GluRS is pure, as it migrates as a single band, and has the expected molecular mass of about 55 kDa with the (His)₆ tag.³⁰

Mammalian GluRS: The aminoacylation reactions were carried out in 50 mM HEPES-KOH pH 7.2, 50 mM KCl, 10 mM ATP, 8 mM MgCl₂, 3 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 192 µM L-[¹⁴C(U)]glutamate (the *K_m* value). The partially purified fraction of bovine liver aaRSs was added in a proportion of 2% v/v. The reaction was initiated after a 20 minutes pre-incubation period at 37°C, by the addition of 100 µM of pre-incubated, unfractionated calf liver tRNA. Aliquots of 20 µl were taken at 5 minutes intervals and treated as described for the *E. coli* GluRS assay.

E. coli. GlnRS: The tRNA glutamylation reactions were carried out as described above for GluRS, except for the following differences in the reaction medium: 50 mM HEPES-KOH pH 7.2, 10 mM Mg acetate, 2 mM ATP, 6 µM tRNA^{Gln} in *E. coli* MRE 600 unfractionated tRNA, and 15 to 100 µM L-[3,4-³H(N)]glutamine (adapted from Hong *et al.*³¹). The enzyme was added to a final concentration of 1 nM. The inhibitor, Gln-KPA **15**, freshly prepared as a 25 mM solution in 50 mM HEPES-KOH, pH 7.2 buffer, was added at various final concentrations (0 to 1.5 mM). Analysis of this fraction by SDS-PAGE (Figure 4.5) indicates that this GlnRS is pure, as it migrates as a single band, and has the expected molecular mass of about 64.2 kDa with the (His)₆ tag.³²

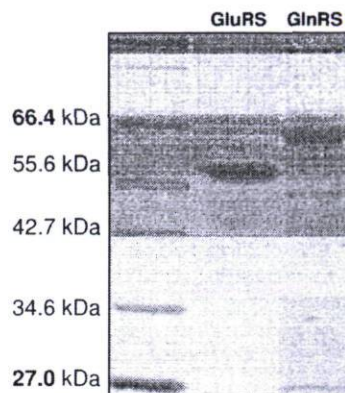


Figure 4.5. SDS-PAGE (10%) of the purified fractions of *E. coli* GluRS and GlnRS (5 μ g per lane).

4.7.13. Determination of the inhibition type and constant (K_i)

The K_m and K_m^{app} for the amino acid substrate were first calculated from Lineweaver-Burk plots. The K_m values for the amino acids were respectively of 113 μ M for the GluRS and 25 μ M for the GlnRS. The K_i values were calculated from the K_m^{app} vs [I] plot. The K_i values for the inhibitors with respect for the amino acid substrates were determined by measuring the apparent K_m for the amino acid in the presence of saturating concentrations of both ATP and tRNA, and of various fixed concentrations of the inhibitor. Alternatively, the rate “ v_i ” of the aminoacylation reaction in the presence of various inhibitor concentrations [I] was determined at the amino acid concentration corresponding to K_m , in the presence of saturating concentrations of both ATP and tRNA, and the ratio v_i/v_0 (where v_0 is the rate in the absence of inhibitor under the same substrate concentrations) was plotted as a function of [I]. Curve-fitting of these data using the theoretical functions for v_i/v_0 for various types of inhibition¹⁶ was made with the software Kaleidagraph (version 4.0), and was used to identify the types of inhibition and the K_i values.

For competitive inhibition with one binding site for the inhibitor, the velocity equation for this system under rapid equilibrium conditions, and the corresponding relation for $v_i/v_0 = f([\text{inhibitor}])$ are :

$$v_i = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \frac{v_i}{v_0} = \frac{[S] + K_m}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

$$\text{When } [S] = K_m \quad \frac{v_i}{v_0} = \frac{2}{2 + \frac{[I]}{K_i}} \quad \text{Equation 2}$$

This last equation was used for the curve-fittings presented in fig. 4.2, except for the left curve of fig. 4.2B and for the curve in fig. 4.2A describing mammalian GluRS inhibition (\diamond).

4.8. Acknowledgements

This work was supported by Grant OGP 0009597 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, to J.L.) and by Grant PR-105-092 from the “Fonds de recherche sur la nature et les technologies, Québec” (to R.C. and J.L.).

4.9. References and notes

- 1) Ibba, M.; Söll, D. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 617.
- 2) Martinis, S. A.; Plateau, P.; Cavarelli, J.; Florentz, C. *Biochimie* **1999**, *81*, 683.
- 3) Eriani, G.; Delarue, M.; Poch, O.; Gangloff, J.; Moras, D. *Nature* **1990**, *347*, 203.
- 4) Chênevert, R.; Bernier, S.; Lapointe, J. In *Translation Mechanisms*; Lapointe, J., Brakier Gingras, L. Eds.; Landes Bioscience/Kluwer Academic: Georgetown, TX/New York, 2003; pp 416-428.
- 5) Kim, S.; Lee, S. W.; Choi, E. C.; Choi, S. Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 278.
- 6) Hurdle, J. G.; O'Neill, A. J.; Chopra, I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4821.
- 7) Hugues, J.; Mellow, G.; *Biochem. J.* **1980**, *191*, 209.
- 8) Jarvest, R. L.; Berge, J. M.; Berry, V.; Boyd, H. F.; Brown, M. J.; Elder, J. S.; Forrest, A. K.; Fosberry, A. P.; Gentry, D. R.; Hibbs, M. J.; Jaworsky, D. D.; O'Hanlon, P. J.; Pope, A. J.; Rittenhouse, S.; Sheppard, R. J.; Slater-Radosti, C.; Worby, A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1959.

- 9) Bernier, S.; Akochy, P. M.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 69.
- 10) Southgate, C. C. B.; Dixon, H. B. F. *Biochem. J.* **1978**, *175*, 461.
- 11) Chauvel, E. N.; Coric, P.; Llorens-Cortes, C.; Wilk, S.; Roques, B. P.; Fournie-Zalusky, M. C. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1339.
- 12) Gray, M. D. M.; Smith, D. J. H. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 859.
- 13) Vercerkova, H.; Smrt, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1983**, *48*, 1323.
- 14) Wang, S. S.; Gisin, B. F.; Winter, D. P.; Makofske, R.; Kulesha, I. D.; Tzougraki, C.; Meienhofer, J. *J. Org. Chem.* **1997**, *42*, 1286.
- 15) Brewer, H.; James, C. A.; Rich, D. H. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4779.
- 16) Segel, I. H. *Enzyme kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*; John Wiley & Sons: New York, 1975.
- 17) Dubois, D. Y.; Lapointe, J.; Sekine, S. I. In *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*; Ibba, M.; Francklyn, C.; Cusack, S. Eds; Landes Bioscience, Georgetown, Texas, 2005; chapter 10.
- 18) Bernier, S.; Dubois, D.; Therrien, M.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2441.
- 19) Rath, V. L.; Silvian, L. F.; Beijer, B.; Sproat, B. S.; Steitz, T. A. *Structure* **1998**, *6*, 439.
- 20) Lamour, V.; Quevillon, S.; Diriong, S.; N'Guyen, V. C.; Lipinski, M.; Mirande, M. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1994**, *91*, 8670.
- 21) Gagnon, Y.; Lacoste, L.; Champagne, N.; Lapointe, J. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 14856.
- 22) Woese, C. R.; Olsen, G. J.; Ibba, M.; Söll, D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 202.
- 23) Lin, S. X.; Baltzinger, M.; Remy, P. *Biochemistry* **1983**, *22*, 681.
- 24) Desjardins, M.; Garneau, S.; Desgagnés, J.; Lacoste, L.; Yang, F.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *Bioorg. Chem.* **1998**, *26*, 1.
- 25) Bernier, S.; Dubois, D. Y.; Habegger-Polomat, C.; Gagnon, L. P.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2005**, *20*, 61.
- 26) Schramm, V. L. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 604.
- 27) Uter, N. T.; Gruic-Sovulj, I.; Perona, J. J. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 23966.
- 28) Tremblay, T. L.; Lapointe, J. *Biochem. Cell. Biol.* **1986**, *64*, 315.
- 29) Lapointe, J.; Levasseur, S.; Kern, D. *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 42.

- 30) Breton, R.; Papayannopoulos, I.; Biemann, K.; Lapointe, J. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 10610.
- 31) Hong, K. W.; Ibba, M.; Weygand-Đurašević, I.; Rogers, M. J.; Thomann, H. U.; Söll, D. *EMBO J.* **1996**, *15*, 1983
- 32) Rould, M. A.; Perona, J. J.; Söll, D.; Steitz, T. A. *Science* **1989**, *246*, 1135.

CHAPITRE 5

Mécanisme de l'amidotransférase GatCAB : l'aspartyl-ARNt synthétase augmente son affinité pour l'Asp-ARNt^{Asn} et de nouveaux analogues de l'aminocyl-ARNt sont des inhibiteurs compétitifs.

Mechanism of a GatCAB amidotransferase: aspartyl-tRNA synthetase increases its affinity for Asp-tRNA^{Asn}, and novel aa-tRNA analogs are competitive inhibitors.

Jonathan L. Huot,[‡] Christian Balg,[§] Dieter Jahn,^{||} Jürgen Moser,^{||} Audrey Émond,[‡]
Sébastien P. Blais,[‡] Robert Chênevert,[§] Jacques Lapointe^{*‡}

*Centre de Recherche sur la Fonction, la Structure et l'Ingénierie des Protéines,
Département de Biochimie et de Microbiologie et Département de Chimie, Université
Laval, Québec, Québec, Canada G1K 7P4, and Institute of Microbiology, Technical
University Braunschweig, Spielmannstrasse 7, D-38106 Braunschweig, Germany.*

Article publié dans la revue *Biochemistry* **2007**, *46*, 13190-13198.

5.1. Préambule

J'ai contribué à cette publication au niveau de la synthèse des inhibiteurs de l'aminocyl-ARNt amidotransférase GatCAB (l'asparticine, la glutamycine et le (*R*)-4-oxo-5-phosphononorvaline-méthyl ester). J'ai également participé à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LCMS) qui démontre que l'asparticine n'est pas un substrat de l'AdT. Finalement, j'ai écrit la section décrivant la synthèse des nouveaux inhibiteurs et élaboré certains schémas du manuscrit.

5.2. Résumé

L'amidotransférase GatCAB est une enzyme trimérique qui catalyse la transamidation de l'Asp-ARNt^{Asn} et/ou du Glu-ARNt^{Gln} pour former les ARNt correctement appariés : l'Asn-ARNt^{Asn} et/ou le Gln-ARNt^{Gln}. Cette enzyme est nécessaire chez les bactéries et les archaea qui ne possèdent par l'asparaginy-ARNt synthétase et/ou la glutaminy-ARNt synthétase. Les ARNt incorrectement appariés doivent préalablement être synthétisés par une aminocyl-ARNt synthétase non-discriminante (ND-AspRS ou ND-GluRS). La présence de l'aspartyl-ARNt synthétase non-discriminante augmente l'affinité de l'amidotransférase GatCAB d'*Helicobacter pylori* pour son substrat (diminution du K_m pour l'Asp-ARNt^{Asn}). De nouveaux inhibiteurs de GatCAB ont été synthétisés et caractérisés sous ces conditions : l'asparticine et la glutamycine. Ceux-ci inhibent l'amidotransférase GatCAB de *H. pylori* de manière compétitive, en mimant l'ARNt aminocylé en 3' (K_i respectifs de 134 μM et 105 μM). Malgré la ressemblance de ces inhibiteurs avec les substrats de l'enzyme, il s'avère que l'asparticine n'est pas transformée par la GatCAB en son analogue « amide ». Ces nouveaux composés sont une source d'inspiration pour le design d'autres inhibiteurs des aminocyl-ARNt amidotransférases. La biosynthèse indirecte des Asn-ARNt^{Asn} et Gln-ARNt^{Gln} est une cible prometteuse pour la découverte d'antibiotiques car cette voie métabolique est absente dans le cytoplasme des eucaryotes et essentielle chez plusieurs bactéries.

5.3. Abstract

The trimeric GatCAB aa-tRNA amidotransferases catalyze the amidation of Asp-tRNA^{Asn} and/or Glu-tRNA^{Gln} to Asn-tRNA^{Asn} and/or Gln-tRNA^{Gln}, respectively, in bacteria and archaea lacking an asparaginyl-tRNA synthetase and/or a glutamyl-tRNA synthetase. The two misacylated tRNA substrates of these amidotransferases are formed by the action of nondiscriminating aspartyl-tRNA synthetases and glutamyl-tRNA synthetases. We report here that the presence of a physiological concentration of a nondiscriminating aspartyl-tRNA synthetase in the transamidation assay decreases the K_m of GatCAB for Asp-tRNA^{Asn}. These conditions, which were practical for the testing of potential inhibitors of GatCAB, also allowed us to discover and characterize two novel inhibitors, asparycin and glutamycin. These analogs of the 3'-ends of Asp-tRNA and Glu-tRNA, respectively, are competitive inhibitors of the transamidase activity of *Helicobacter pylori* GatCAB with respect to Asp-tRNA^{Asn}, with K_i values of 134 μ M and 105 μ M, respectively. Although the 3' end of asparycin is similar to the 3' end of Asp-tRNA^{Asn}, this analog was neither phosphorylated nor transamidated by GatCAB. These novel inhibitors could be used as lead compounds for designing new types of antibiotics targeting GatCABs, since the indirect pathway for Asn-tRNA^{Asn} or Gln-tRNA^{Gln} synthesis catalyzed by these enzymes is not present in eukaryotes, and is essential for the survival of the above-mentioned bacteria.

5.4. Introduction

The specific aminoacylation of tRNAs is at the center of the faithful translation of nucleic acid sequence information into proteins. This process involves mainly the aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS), but also enzymes involved in the editing or in the maturation of aminoacyl-tRNAs whose aminoacyl moiety does not correspond to the anticodon moiety according to the genetic code (reviewed by Ataide and Ibba).¹ Some of these misacylated tRNAs are deacylated by editing domains present in certain aaRSs or by free deacylases²⁻³, whereas others are modified on their aminoacyl moiety. The aminoacyl-tRNA amidotransferase (AdT)⁴ is such a modifying enzyme used in the indirect pathway of Gln-tRNA^{Gln} and/or Asn-tRNA^{Asn} biosynthesis from Glu-tRNA^{Gln} and/or Asp-tRNA^{Asn}, in archaea and bacteria that lack the aminoacyl-tRNA synthetases specific for glutamine

(GlnRS) and/or asparagine (AsnRS). The misacylated Glu-tRNA^{Gln} and Asp-tRNA^{Asn}, which are substrates of AdT, are synthesized by nondiscriminating glutamyl-tRNA synthetases (ND-GluRS) and aspartyl-tRNA synthetases (ND-AspRS), respectively, which also charge glutamic acid and aspartic acid onto tRNA^{Glu} and tRNA^{Asp}, respectively. This indirect pathway of Asn-tRNA^{Asn} synthesis is also used for the biosynthesis of free asparagine in organisms such as *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*, which have an AsnRS but no asparagine synthetase⁵⁻⁷, and in *Bifidobacterium longum* where asparagine synthetases (AsnA and AsnB) and AsnRS are absent.⁸

Two types of AdT have been found: a trimeric one (GatCAB) present in most bacteria and some archaea, can use both Glu-tRNA^{Gln} and Asp-tRNA^{Asn} as substrates, whereas a dimeric GatDE, present only in archaea, uses only Glu-tRNA^{Gln} (reviewed by Ibba *et al.*)⁹ The crystallographic structures of members of each type have been determined recently.¹⁰⁻¹² In this work, we have tested the influence of two analogs of the 3' end of Asp-tRNA and of Glu-tRNA on the transamidation activity of the trimeric AdT of *Helicobacter pylori*, a gram-negative bacteria which has neither AsnRS nor GlnRS.¹³ This GatCAB, as well as those characterized from other bacteria or archaea, can use as substrate *in vitro* either Glu-tRNA^{Gln} or Asp-tRNA^{Asn}. Whether a GatCAB amidotransferase performs one or both of these functions inside a cell is related to the presence or absence of GlnRS, AsnRS, and asparagine synthetase.

The presence of a trimeric AdT in most bacteria, and the absence of either dimeric or trimeric AdT in the cytoplasm of eukaryotes, identify GatCAB as a promising target for the development of new types of antibiotics. Moreover, Gln-tRNA^{Gln} and Asn-tRNA^{Asn} synthesis in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*, and possibly of all eukaryotes, are catalyzed by a GlnRS and an AsnRS, respectively¹⁴ (reviewed by Ataide and Ibba and by Kern *et al.*)^{1,15} Therefore, AdT inhibitors will target protein biosynthesis in the above-mentioned bacteria, without affecting it in mammalian cytoplasm or mitochondria.

So far, few AdT inhibitors have been developed, in part because of the absence of a convenient assay. Some analogs of ATP and glutamine inhibit AdT, and were useful to

study its mechanism¹⁶⁻¹⁸; however, as these analogs will likely interfere with several other enzymatic processes within mammalian cells, they cannot be lead compounds for the design of novel antibiotics. These studies included the first thorough kinetic analyses of AdT, yielding K_m values for glutamine and ATP, and an estimate of the K_m for Glu-tRNA^{Gln}. In our search for inhibitors specific to AdT, we looked for analogs of the 3' ends of its aa-tRNA substrates; one of them, glutamycin (fig. 5.1), is a puromycin analog that is a weak inhibitor of glutamyl-tRNA^{Glu} reductase, the first enzyme of the tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis pathway.¹⁹ Having noticed that instability of the AdT substrates and products could be a handicap for the kinetic characterization of this and other inhibitors of the transamidation reaction, we chose conditions that could minimize the effect of any deacylation. In doing so, we found evidence of Asp-tRNA^{Asn} channelling between the ND-AspRS that synthesizes it and the GatCAB AdT that uses it as a substrate. We also report here the characterization of the two first AdT inhibitors competitive with respect to their misacylated aa-tRNA substrates.

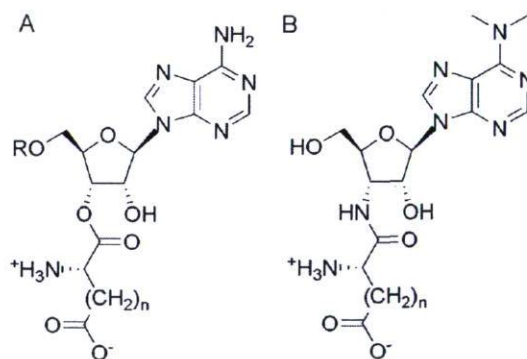


Figure 5.1. AdT aminoacyl-tRNA substrates and analogues. (A), Asp-tRNA^{Asn} when $n = 1$ and Glu-tRNA^{Gln} when $n = 2$: tRNA continues past the terminal adenosine at R. (B), Glutamycin and aspartycin, analogs of Glu-tRNA and Asp-tRNA, respectively. This figure represents glutamycin when $n = 2$ and aspartycin when $n = 1$. The terminal adenosine of the substrate is kept, with only the replacement of two hydrogen atoms by two methyl groups, and the ester bond between the tRNA and the amino acid is replaced by an amide bond.

5.5. Materials and methods

General information on inhibitor synthesis. Chemical reagents were purchased from Aldrich-Sigma Chemical Company except for *N*-Boc-L-aspartic acid β -*tert*-butyl ester

(Novabiochem). Flash column chromatography was carried out using 40-63 μM (230-400 mesh) silica gel. Reverse phase HPLC chromatography was performed on a Hewlett-Packard 1050 liquid chromatograph (Vydac C_{18} column). Optical rotations were measured using a JASCO DIP-360 digital polarimeter (c as g of compound per 100 mL). Infrared spectra were recorded on a Bomem MB-100 spectrometer. NMR spectra were recorded on a Varian Inova AS400 spectrometer (400 MHz). (*R*)-4-Oxo-5-phosphonorvaline methyl ester (Asp-KP) (fig. 5.2) was synthesized in three steps from L-aspartic acid dimethyl ester hydrochloride according to a known procedure.²⁰ Synthesis of 3'-deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(L-glutamyl-amido)adenosine (glutamycin) (fig. 5.1) has already been published.²¹

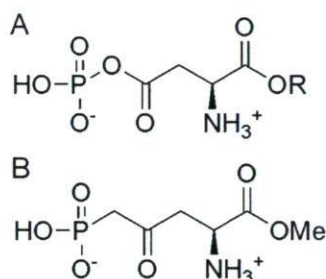


Figure 5.2. (A), β -phosphoryl-aspartyl-tRNA^{Asn}, a reaction intermediate in transamidation. Shown here is the amino acid portion alone, with R indicating the position of the tRNA. (B), Asp-KP, a stable analog of a part of β -phosphoryl-aspartyl-tRNA^{Asn}. The activating phosphate is replaced by a stable phosphonate group, while tRNA is entirely replaced by a methyl group.

*Synthesis of 3'-deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(*N*^α-Boc- β -tert-butyl-L-aspartyl-amido)adenosine (aspartycin synthesis intermediate).* A suspension of 3'-amino-3'-deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyladenosine (puromycin aminonucleoside; 40.0 mg, 136 μmol) in anhydrous DMF (1.2 ml) was added to *N*-Boc-L-aspartic acid β -tert-butyl ester (43.3 mg, 150 μmol), *N*-hydroxysuccinimide (25.8 mg, 224 μmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (33.2 mg, 173 μmol). The mixture was stirred at 0°C for 30 min, then at room temperature for 24 h. The solvent was co-evaporated with toluene and the residue was purified by flash chromatography (4% MeOH / CH_2Cl_2) to give the coupling product (65.5 mg, 85%) as a white solid: mp 96-98°C; $[\alpha]_D^{21}$ -35.5 (c 1.14, MeOH); IR (KBr) 3408, 2979, 2933, 1721, 1671, 1602, 1368, 1162, 1039 cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.42 (s, 18H), 2.54 (dd, J = 16.0 & 7.9 Hz, 1H), 2.74 (dd, J = 16.1 & 5.9 Hz,

1H), 3.42 (br s, 6H), 3.71 (dd, J = 12.5 & 2.9 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 12.5 & 1.6 Hz, 1H), 4.12-4.18 (m, 1H), 4.47 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.53-4.62 (m, 2H), 5.98 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.30 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 27.1, 27.5, 37.4, 37.9, 50.8, 51.5, 61.2, 73.9, 79.8, 81.2, 84.0, 90.8, 120.3, 138.0, 149.2, 151.7, 154.8, 156.5, 170.2, 172.9; HRMS (ESI) calcd for C₂₅H₃₉N₇O₈ (M+H)⁺ 566.2933, found 566.2945.

Synthesis of 3'-deoxy-N⁶,N⁶-dimethyl-3'-(L-aspartyl-amido)adenosine (aspartycin).

A solution of the previously prepared compound (40.0 mg, 70.7 μmol) in trifluoroacetic acid (1.0 ml) was stirred at room temperature for 12 min. The solvent was co-evaporated under reduced pressure with CH₃CN at 35°C. The solid residue was dissolved in a minimum of MeOH (2.0 ml) and precipitated by the addition of Et₂O (10 ml). After filtration, this crude product was purified by HPLC on reverse phase (C₁₈; 0% to 75% CH₃CN / H₂O). Evaporation of the relevant fractions provided aspartycin (22.3 mg, 77%) as a colorless solid: mp 105-107 (dec); [α]_D²¹ -4.4 (c 0.46, MeOH); IR (KBr) 3430, 2928, 1678, 1604, 1204, 1137, cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.89 (dd, J = 17.7 & 8.1 Hz, 1H), 2.99 (dd, J = 17.7 & 4.9 Hz, 1H), 3.59 (br s, 6H), 3.69 (dd, J = 12.6 & 2.9 Hz, 1H), 3.91 (dd, J = 12.6 & 2.3 Hz, 1H), 4.18 (dt, J = 7.8 & 2.4 Hz, 1H), 4.26 (dd, J = 7.9 & 5.0 Hz, 1H), 4.58 (dd, J = 5.6 & 2.5 Hz, 1H), 4.69 (dd, J = 7.9 & 5.7 Hz, 1H), 6.09 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.51 (s, 1H) ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 35.0, 49.8, 50.9, 60.6, 74.2, 83.6, 91.0, 120.2, 139.4, 147.6, 148.2, 151.6, 168.6, 171.4; HRMS (ESI) calcd for C₁₆H₂₃N₇O₆ (M+H)⁺ 410.1783, found 410.1783.

Bacterial strains and plasmids. *Pseudomonas aeruginosa* ADD1976, carrying the pUCPKS plasmid containing the *P. aeruginosa* PAO1 *aspS* gene was used to produce His-tagged ND-AspRS, as previously described.²² *E. coli* DH5 α, carrying the pQE-80L plasmid containing the *H. pylori* ND-AspRS gene, was kindly provided by Prof. Tamara Hendrickson (Johns Hopkins University). Plasmid pET15b containing the *gatCAB* operon of *H. pylori* was kindly provided by Prof. Dieter Söll (Yale University), and used to transform *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) according to the manufacturer's specifications. *E. coli* XL1-blue, carrying the pGFIB-HptRNA^{Asn} plasmid for overexpression of the *H. pylori* tRNA^{Asn} gene, was also a gift from Prof. Söll.

Production of ND-AspRS from P. aeruginosa and H. pylori. ADD1976/pUCPKS-*AspS* growth and *P. aeruginosa* ND-AspRS overproduction and purification by affinity chromatography on nickel-nitrilotriacetate (Ni-NTA) were conducted as previously described²², except that the resin-bound extract was washed successively with 20 and 60 mM imidazole to reduce the amount of contaminants; AspRS was then eluted with 300 mM imidazole, and was pure to over 99% homogeneity. *H. pylori* ND-AspRS was produced with *E. coli* DH5 α /pQE-80L-*AspS*, as previously described.²³

Production of H. pylori GatCAB. *E. coli* BL21 (DE3)/pET15b-*gatCAB* was grown in LB medium which was altered to allow overproduction by autoinduction. This medium was prepared by supplementing LB medium with glycerol (0.5%), glucose (0.05%), lactose (0.2%), NaH₂PO₄ (50 mM), KH₂PO₄ (50 mM) and (NH₄)₂SO₄ (25 mM), as indicated for ZYP-5052.²⁴ A 1% inoculation was made from a preculture in the exponential growth phase, itself prepared from a recently transformed single colony. Cultures were incubated overnight at 37°C in the presence of 100 μ g/ml ampicillin, and harvested by centrifugation. *H. pylori* GatCAB was then purified to over 99% homogeneity by affinity chromatography as described above for ND-AspRS.

Partial purification of tRNA enriched with H. pylori tRNA^{Asn}. *E. coli* XL1-blue/pGFIB-HptRNA^{Asn} was grown in LB medium containing 250 μ g/ml ampicillin. Cultures were incubated at 30°C for 24 h. Cells were then harvested by centrifugation, and unfractionated tRNA was partially purified as previously described.²² The tRNA^{Asn} concentration of the resulting stock unfractionated tRNA solution was determined with a transamidation plateau, as described below.

Preparation of aspartyl-tRNA. Asp-tRNA was formed in the following reaction mixture: 50 mM HEPES-KOH pH 7, 15 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM ATP and 70 μ M [¹⁴C]aspartic acid (207 mCi/mmol, GE Healthcare). Unfractionated tRNA was added at a concentration yielding 20 μ M tRNA^{Asn}, and *P. aeruginosa* ND-AspRS was added at a concentration of 1 μ M. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 45

minutes, before one volume of sodium acetate (0.6 M, pH 5.2) was added. The resulting solution was submitted to an acid-buffered (pH 5.2) phenol/chloroform extraction, and precipitated with 2.5 volumes of 95% ethanol. After centrifugation, the Asp-tRNA substrate was rinsed twice with 70% ethanol, and resuspended in deionized water and kept on ice for immediate use.

Half-life measurements. Purified Asp-tRNA prepared as described above was added to the same reaction mixture used for aminoacylation, except that [^{14}C]aspartic acid, ND-AspRS and unfractionated tRNA were omitted. Reaction mixtures were incubated at 37 °C. Aliquots taken at various intervals were transferred onto 1 cm x 2 cm filter papers (Whatman) and quenched in trichloroacetic acid (5%). The filter papers were then washed and assayed by liquid scintillation counting, as previously described.²²

Transamidase activity assay. Reaction conditions were the following: 50 mM Hepes-KOH pH 7, 15 mM MgCl_2 , 25 mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM ATP, and 1.28 mM L-glutamine. Asp-tRNA, prepared as described above, was added to each reaction mixture prior to each experiment. Before addition of GatCAB to the reaction mixture, an aliquot was taken and incubated at 37 °C in the presence of an excess (6.3 μM) of GatCAB for 2 minutes before being quenched and precipitated as indicated below. Meanwhile, GatCAB (16.4 nM) was added to the main reaction mixture, and aliquots were taken at 15 second intervals and then quenched in one volume of 0.6 M sodium acetate pH 5.2, kept on ice until 2.5 volumes of 95% ethanol could be added, and placed at -80 °C for 30 min. The aliquots were then centrifuged for 30 min at 14000g. The supernatant was carefully removed, and the nucleic acid pellets were left to dry for 10 min at room temperature. The precipitate was then resuspended in 10 μl 50 mM KOH and heated at 65 °C for 8 min to deacylate the aa-tRNA. Pellets were not completely dried, to ensure a more complete resuspension at the next step, nor were they washed in 70% ethanol, in order to minimize aa-tRNA loss. A small amount of each aliquot was then spotted onto a 20 cm x 20 cm cellulose-poly(ethylenimine) (PEI) plate. Migration was done in a 4:1 mixture of ethanol:ammonium hydroxide, inside a chamber that had been allowed to equilibrate for at least 30 min. Migration took approximately 2.5h, after which the TLC plate was allowed to

dry under ventilation. The aliquots that had contained an excess of GatCAB, in which the substrate was completely transamidated, were used to determine the initial Asp-tRNA^{Asn} concentrations in each reaction mixture. Because these values indicated Asp-tRNA^{Asn} concentrations existing after the preparative phenol/chloroform extraction, they were used for the calculation of kinetic parameters.

Aminoacylation and transamidation assay. When aminoacylation and transamidation were performed sequentially in the same reaction mixture, as is the case for transamidation plateau and inhibition experiments, this mixture was composed of: 50 mM Hepes-KOH pH 7, 15 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 70 μM [¹⁴C]aspartic acid (207 mCi/mmol) and 1.28 mM L-glutamine. The indicated concentrations were reached once the mixture was combined with tRNA and enzymes. The reactions took place at 37°C, usually in a final volume of 135 μL. tRNA was added at the indicated concentrations. Once ND-AspRS was added to a concentration of 300 nM, reaction mixtures were incubated for 90 min (unless otherwise stated), and then put on ice for 15 min, with inhibitors if indicated. The reaction mixtures, and AdT in 20 mM Hepes-KOH pH 7, were then incubated at 37°C for 2 min before being combined to start the transamidation reaction. When potential inhibitors were tested, 5-9 nM GatCAB was used, and aliquots were taken at intervals of 20 seconds, then quenched and treated as described above. When the tRNA^{Asn} concentration of an unfractionated tRNA stock was determined, 250 nM GatCAB was used to rapidly obtain a plateau by taking aliquots at various intervals. In both of these cases, the cellulose-PEI plates were soaked for 2h in deionised water and then dried at ambient temperature, before use.

TLC data analysis. Quantification of the amino acids rests upon the application of a series of radioactivity standard solutions. Using [¹⁴C]aspartic acid, standards were prepared with concentrations of 9, 3, 1, 0.33, 0.11, and 0.037 μM. The precision of this set of standards was confirmed by liquid scintillation counting. After the migration, 1 μL of each standard was spotted onto each TLC plate in duplicate (figure 5.3). After drying, the plates were wrapped in a thin plastic membrane (Saran Wrap), and then exposed overnight against a phosphorimager plate (FujiFilm). Data were collected from the phosphorimager plate

with a Typhoon Imager by use of the ImageQuant software (GE Healthcare). Intensity at each point of interest was measured, and background intensity was subtracted. From the radioactivity standards, a curve was plotted for signal intensity = f (pmol of aspartic acid). This relation was linear ($R^2 > 0,999$) for the entire range of concentrations tested. This curve was then used to convert signal intensity for each point of interest into absolute amino acid quantities.

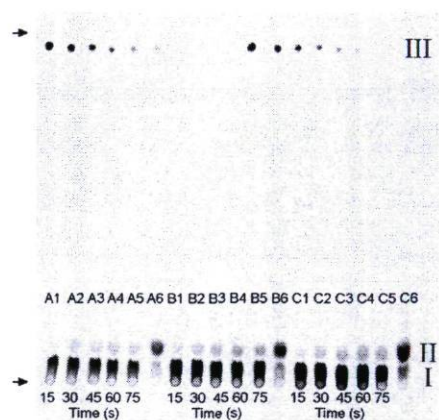


Figure 5.3. An example of the transamidation assay, using Asp/Asn separation by thin-layer chromatography. Reaction mixture aliquots taken at various times were precipitated, resuspended, deacylated and dotted onto a 20 x 20 cm sheet of polyester-backed cellulose-PEI at the level indicated by the lower arrow. Separation was done over 2 to 3h in a 4:1 ethanol:ammonium hydroxide mixture with the solvent front rising to the upper arrow. Asparagine (II) migrated further than aspartic acid (I). Radioactivity standards were deposited in duplicate (III). In each of the three kinetic reactions shown, Asp-tRNA^{Asn} concentrations were verified as described in Materials and Methods for lanes A6, B6 and C6, which were subjected to a rapid transamidation in the presence of 6.3 μ M GatCAB. In these three lanes, we could also see that our Asp-tRNA substrate contained about 4 times more Asp-tRNA^{Asn} than Asp-tRNA^{Asp}. Lanes 1-5 of kinetic reactions A, B and C therefore show the amount of Asn-tRNA^{Asn} formed by 16.4 nM GatCAB, with concentrations of 1.11 μ M, 2.43 μ M and 3.93 μ M Asp-tRNA^{Asn} as substrate, respectively.

Nitrocellulose binding assay. Nitrocellulose filters, which bind proteins but not nucleic acids, were used to measure what fraction of Asp-tRNA could be retained by various concentrations of *H. pylori* ND-AspRS and GatCAB, and by BSA as a control. The reaction mixtures contained 207 nM Asp-tRNA, which was prepared as described above. Experiments took place under the conditions used for the transamidase activity assay, except that the pH was of 7.2, and that glutamine was absent to prevent GatCAB from transamidating Asp-tRNA. The nitrocellulose assay was adapted from previous work²⁵⁻²⁶, with 250 μ L of reaction mixture for each filter. Tests were performed in duplicate.

Mass spectrometric analysis of asparticin and derivatives - Samples were analyzed by liquid chromatography/mass spectrometry (LCMS) using an Agilent 1100 system. A few microliters were injected on a ZORBAX 300 SB-C18 narrow-bore 2.1 mm X 150 mm reversed-phase column (particles size 5 μ m), protected by a Zorbax 300 SB-C18 analytical guard-column 4.6 mm X 12.5 mm (Agilent Technologies, Montréal, Québec, Canada). Separation was carried out at a flow rate of 200 μ L/min, delivered by an Agilent 1100 HPLC1 quaternary pump. Mobile phase A was composed of HPLC grade water containing 0.1% formic acid. A gradient of mobile phase B (HPLC grade acetonitrile containing 0.1 % formic acid) was imposed, starting from 5 % up to 0.5 min, increased linearly to 30% at 3.0 min, 70% at 23 min, 98% at 29 min, maintained until 32.5 min, then brought back to 5% at 36 min and maintained at that value until 52 min. The eluted molecules were monitored by UV absorption at 214, 220 and 280 nm using a diode array detector (Agilent). The autosampler maintained the samples at 4°C and the column temperature was kept at 40°C. The molecular mass of purified analytes was determined by an Agilent 1100 MSD ESI mass spectrometer in the positive electrospray ionization mode. The fragmentor and capillary voltages were set at 70 V and 3250 V, respectively. Nitrogen was used both as the nebulizer at 20 psig and as the drying gas at a flow rate of 10 L/min and a temperature of 350 °C. The mass spectrometer was operated in full scan mode from 50 to 550 m/z with a step of 0.1 and a cycle time of 1.18 s.

5.6. Results

Adapting the [¹⁴C]Asp-tRNA^{Asn} transamidase assay. The difficulty in developing a satisfying assay for measuring the kinetic parameters of the tRNA-dependent amidotransferase reaction is highlighted by the fact that the first report of such values¹⁸ was published 4 years after the first cloning of an AdT gene, that of *Bacillus subtilis gatCAB*, and the first characterization of this novel heterotrimeric enzyme.⁴ The assay used for these measurements included unlabeled Glu-tRNA^{Gln} as substrate, and HPLC analysis of the glutamine released by the deacylation of the aa-tRNA product. These authors indicated that they had obtained only an approximate K_m for Glu-tRNA^{Gln} in the transamidation reaction,

because the low concentrations of this substrate needed to obtain a precise value resulted in product concentrations too close to the detection limit of their method.

Since then, and during the preparation of this paper, a few different approaches have been used to quantitatively measure aa-tRNA-dependent transamidation. Precise K_m values were reported for Asp-tRNA^{Asn} by the *Neisseria meningitidis* GatCAB²⁷, with [¹⁴C]aspartic acid, and for Asp-tRNA^{Asn} and Glu-tRNA^{Gln} by the *H. pylori* GatCAB, with mischarged ³²P76-labeled tRNA.¹³ An electrophoretic assay was also published²⁸, although kinetic results obtained with it have yet to be published. The *N. meningitidis* study used a variation of the method used by Curnow *et al.*⁴, while the *H. pylori* study employed a method adapted from work done with aminoacyl-tRNA synthetases.²⁹ In another adaptation of the assay by Curnow *et al.*⁴, our transamidation experiments were conducted under conditions similar to those used in the ³²P assay, with consistent differences being a more acidic pH (7.0), lower ATP concentration (2 mM) and the use of unfractionated tRNA charged with [¹⁴C]aspartic acid. Due to these differences, the values of the kinetic parameters that we present below for Asp-tRNA^{Asn} in the absence of ND-AspRS differ from those presented in the detailed study by Sheppard *et al.*¹³

The use of tRNA mischarged with ¹⁴C-labeled glutamate or aspartic acid, or of mischarged ³²P76-labeled tRNA allowed the detection of the product even with low concentrations of tRNA, but the kinetics revealed that the half-lives of these mischarged aa-tRNAs, and especially their transamidated products, were relatively short (fig. 5.4).²⁷ This problem was resolved by measuring initial rates during periods much shorter than these half-lives. Also, the phenol extraction and ethanol wash steps were omitted because they introduced a high level of variability in asparagine quantification, likely due to erosion of the aa-tRNA pellet. Only in the tests during which aminoacylation and transamidation were done in the same mixture did this result in high levels of unbound [¹⁴C]aspartic acid. However, this did not hinder the aa-tRNA deacylation or the chromatographic separation of aspartic acid and asparagine. In tests with phenol / chloroform-extracted Asp-tRNA, the ethanol precipitation steps reduced unbound [¹⁴C]aspartic acid to trace amounts (figure 5.3,

lanes A6, B6 and C6). The use of a standard curve to quantify asparagine allowed us to obtain precise measurements with unfractionated tRNA.

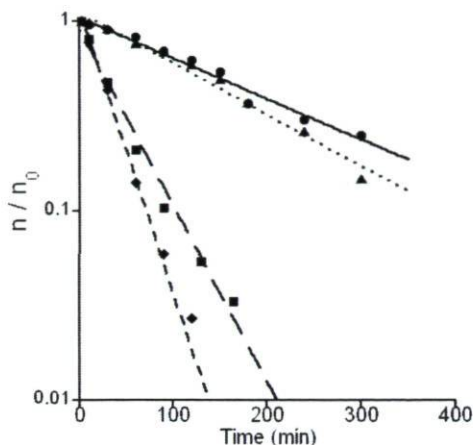


Figure 5.4. Asp-tRNA^{Asn} was prepared as described in Materials and Methods, and added to the reaction mixture used for the transamidase assay. Half-lives were determined using a filter paper and TCA precipitation assay (see Materials and Methods). The data are presented as the fraction of aa-tRNA remaining (n/n_0), as a function of the incubation time at 37°C. The longest half-life was that of Asp-tRNA^{Asn} in the absence of GatCAB, which was of 136 ± 10 min (●). This was followed by Asp-tRNA^{Asn} in the presence of GatCAB, but in the absence of glutamine, with a half-life of 123 ± 6 min (▲). With L-glutamine present to allow a rapid transformation of Asp-tRNA^{Asn} into Asn-tRNA^{Asn}, the half-life was of 20 ± 0.4 min (◆). When ND-AspRS was added to this reaction mixture, the half-life increased to 32 ± 1 min (■). Curve-fitting was done with the standard exponential equation: $n/n_0 = e^{-kt}$, where n/n_0 is the remaining fraction of aa-tRNA, k is the decay constant, and t is the time. All reactions were performed in duplicate.

Effects of GatCAB and ND-AspRS on aminoacyl-tRNA half-lives. Deacylation of Asp-tRNA^{Asn} and Asn-tRNA^{Asn} was measured in duplicate using a filter paper and TCA assay (figure 5.4). *E. coli* tRNA^{Asp} and tRNA^{Asn} were contaminants, but did not contribute more than 20 % or 15 % or all aa-tRNA formed, respectively. In the absence of GatCAB, Asp-tRNA^{Asn} had a half-life of 136 ± 10 min, which decreased to 123 ± 6 min when in the presence of GatCAB which was inactive due to the absence of L-glutamine. The fact that this difference is not significant (figure 5.4) indicates that GatCAB does not stabilize the ester linkage of Asp-tRNA^{Asn} under these conditions. When glutamine was added in another experiment, the 250 nM concentration of GatCAB allowed a rapid transformation of Asp-tRNA^{Asn} into Asn-tRNA^{Asn}, which had a half-life of 20 ± 0.4 min. When 800 nM *H. pylori* ND-AspRS was added, the half-life of Asn-tRNA^{Asn} increased to 32 ± 1 min.

Determining the tRNA^{Asn} concentration of an unfractionated tRNA stock. The aminoacylation and transamidation assay was used to quantify tRNA^{Asn} concentrations in unfractionated tRNA stocks that contained *E. coli* tRNA^{Asn}, *E. coli* tRNA^{Asp}, and RNA contaminants in addition to the overproduced *H. pylori* tRNA^{Asn}. A 5 μM aliquot of this stock as determined by absorbance at 260 nm was incubated with 800 nM *P. aeruginosa* ND-AspRS for 90 min, which ensured complete aminoacylation. GatCAB was then added as described in Materials and Methods, allowing the transformation of *E. coli* and *H. pylori* Asp-tRNA^{Asn} into Asn-tRNA^{Asn}. The value of the transamidation plateau was then compared to the total concentration (A_{260}), to obtain the tRNA^{Asn} percentage of the unfractionated solution (figure 5.5).

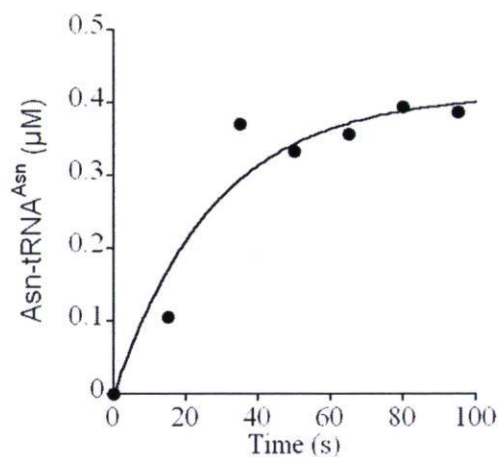


Figure 5.5. Determining tRNA^{Asn} concentrations with a transamidation plateau. The assay was performed in the basic reaction mixture containing 5 μM unfractionated tRNA enriched with *H. pylori* tRNA^{Asn} (see Materials and Methods). ND-AspRS was used at a concentration of 300 nM, and the reaction mixture was then incubated for 90 min. GatCAB was then added at a concentration of 250 nM in order to use all available substrate before deacylation of the substrate or of the product could become significant (●). The resulting Asn-tRNA^{Asn} plateau corresponded to the tRNA^{Asn} concentration. This concentration was determined using a standard product formation curve: $P(t) = S_0(1 - e^{-kt})$, where k is the kinetic constant for product formation, t is the time and S_0 the initial substrate (or tRNA^{Asn}) concentration as calculated by best fit. The ratio of tRNA^{Asn} usable by GatCAB against that of total RNA as measured by absorbance at 260 nm was determined to be 8.25% for this particular stock.

Effect of ND-AspRS on K_m values for Asp-tRNA^{Asn}. The GatCAB transamidation assay, described above, allowed us to determine the K_m and k_{cat} values for Asp-tRNA^{Asn} in the absence of ND-AspRS (figure 5.6). We then used this same method to determine those same kinetic values in the presence of *P. aeruginosa* and *H. pylori* ND-AspRS, as well as in the presence of an equivalent concentration of bovine serum albumin (BSA) as a control.

These results, presented in figure 5.6, indicate that the ND-AspRS concentrations used decreased the K_m of GatCAB for Asp-tRNA^{Asn}. It was recently shown that *E. coli* tRNA^{Asn} can be transamidated by *H. pylori* AdT²³, and this was our finding as well (results not shown). The values obtained for *H. pylori* Asp-tRNA^{Asn} are not significantly affected by the presence of *E. coli* Asp-tRNA^{Asn} since only approximately 10-15% of tRNA^{Asn} that was used is from *E. coli*; moreover, recent information suggests that differences between *H. pylori* and *E. coli* tRNA^{Asn} are likely to be of minimal importance to enzyme binding.^{10,27}

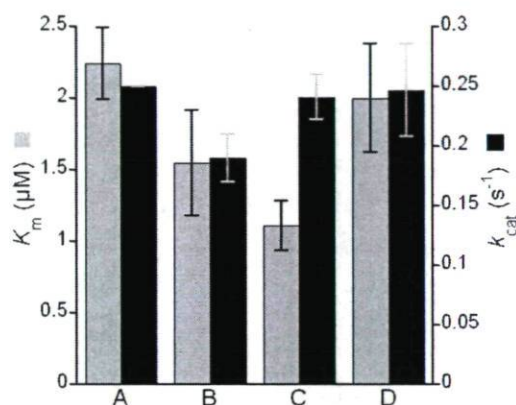


Figure 5.6. ND-AspRS increases *H. pylori* GatCAB affinity for Asp-tRNA^{Asn}. K_m values for Asp-tRNA^{Asn} (grey columns) and k_{cat} values (black columns) were determined in the transamidation reaction, in the absence of ND-AspRS (A), and in the presence of 800 nM of ND-AspRS from *P. aeruginosa* (B) and *H. pylori* (C). An experiment was also performed in the presence of an equivalent amount of BSA (52.35 $\mu\text{g/ml}$) but in the absence of ND-AspRS (D). All experiments were performed in duplicate. In the absence of ND-AspRS, the K_m was 2.24 μM , while the k_{cat} was 0.25 s^{-1} . In the presence of *P. aeruginosa* and *H. pylori* ND-AspRS, the K_m was 1.4 and 2.0 times lower, respectively. In the presence of BSA, the K_m was reduced only by a factor of 1.1. In all cases, the k_{cat} did not change significantly, except for *P. aeruginosa* ND-AspRS which had a K_{cat} 1.3 times lower than when ND-AspRS was absent.

H. pylori ND-AspRS binds Asp-tRNA. Under conditions very similar to those used for the transamidase activity assay (see Materials and Methods), *H. pylori* ND-AspRS was able to bind significantly more Asp-tRNA than did BSA, which was used as a control (see Discussion). When no protein was present in the reaction mixture, only 2.7% \pm 0.5 % of 207 nM Asp-tRNA was retained on the nitrocellulose filters, while in the presence of 800 nM BSA, 4.33% \pm 0.13 % was retained. GatCAB at concentrations of 400 μM and 1000 μM bound 12.76% \pm 0.93 % and 17.8% \pm 0.35 % of Asp-tRNA, respectively. A concentration of 800 nM of *H. pylori* ND-AspRS bound 10.58% \pm 0.85% of Asp-tRNA, a proportion significantly higher than what we detected with BSA or no protein at all.

Novel inhibitors of the transamidation reaction catalyzed by GatCAB. Asp-KP, an analog of the β -phosphoryl-Asp-tRNA^{Asn} intermediate (figure 5.2), did not inhibit GatCAB up to a concentration of 1 mM (figure 5.7). Aspartycin and glutamycin, analogs of the 3'-ends of Asp-tRNA and Glu-tRNA, respectively (figure 5.1), did inhibit that reaction competitively with respect to Asp-tRNA^{Asn}, as indicated by excellent curve-fitting with the competitive inhibition equation (figure 5.7), with K_i values of 134 μ M and 105 μ M, respectively.

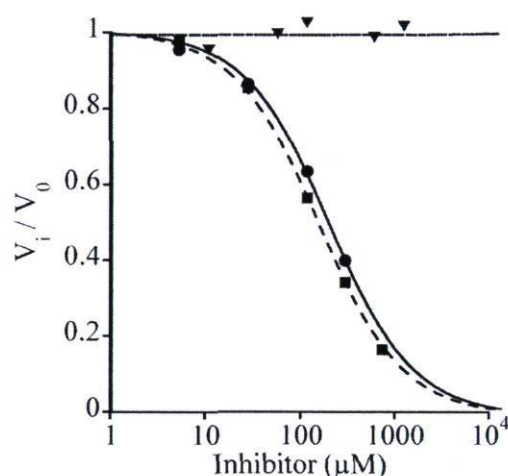


Figure 5.7. Competitive inhibition of *H. pylori* AdT by aspartycin (●) and glutamycin (■). Reactions were performed in the basic reaction mixture, using 0.40 μ M Asp-tRNA^{Asn} and 6 nM AdT. If V_0 is the uninhibited rate of product formation, V_{max} is the maximum rate, S is the substrate concentration, V_i is the inhibited rate and I the inhibitor concentration: according to Michaelis-Menten, $V_0 = (V_{max} S) / (S + K_m)$, while competitive inhibition states that $V_i = (V_{max} S) / (S + K_m (1 + (I / K_i)))$. Therefore, if S is equal to K_m , V_i / V_0 is equal to $2 / (2 + (I / K_i))$; this equation was used for these curve fittings. Inhibition was competitive in the case of aspartycin and glutamycin, having K_i values of 134 μ M and of 105 μ M respectively. Asp-KP (▼) did not inhibit AdT, even at concentrations up to 1 mM.

Aspartycin is not a substrate of AdT. The similarity between the two inhibitors and the corresponding misacylated tRNA substrates prompted us to investigate whether they could be transamidated by GatCAB. Samples were prepared in which high concentrations of this enzyme (450 nM) and of aspartycin (1 mM) had been incubated for 5 h at 37 °C in the basic reaction mixture; aspartic acid was omitted, and 25 mM NH₄Cl was added to enable a bypass of the glutaminase activity. These samples were then fractionated by reverse-phase chromatography and analyzed by mass spectrometry (see Materials and Methods). Since the amidation of aspartycin decreases its molecular mass by one unit at the

low pH used for these experiments, asparticin and its amidated product should be easily distinguished by MS. While unmodified asparticin was easily detected, there were no signs of inhibitor modification by the enzyme (figure 5.8).

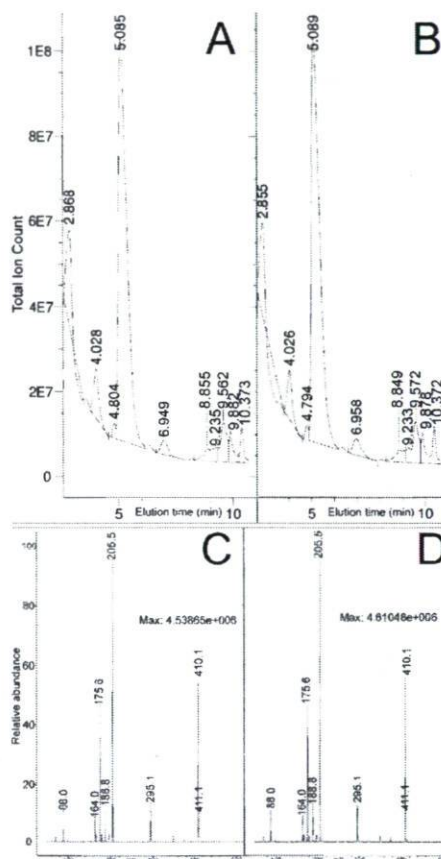


Figure 5.8. Asparticin is not a substrate for GatCAB. Samples containing 1 mM asparticin, in the basic reaction mixture supplemented with 25 mM NH_4Cl , were incubated with 0 or 450 nM GatCAB for 5 h at 37°C. A separation of the samples by reverse-phase chromatography (see Materials and Methods) was conducted before analysis by mass spectrometry. Asparticin and its putative amidated product have similar hydrophobicity, and therefore are expected to be eluted in the same region. In the absence of GatCAB, asparticin was eluted after approximately 5.1 min (A). This peak was also present in the sample containing GatCAB (B), and there was no reduction in its importance nor formation of new peaks in the region. In panel C, we see that the 5.1 min elution peak contained asparticin ions with a single positive charge ($m/z = 410.1$) and with two positive charges ($m/z = 205.5$). The spectral data in panel D is identical to the data in panel C, showing no decrease in the abundance of either asparticin ion, and no new peaks corresponding to the putative modified asparticin. This putative amidated asparticin, under the acidic conditions used, would have a mass that is lesser than that of asparticin by 1 unit; this difference being detectable in the performed analysis, we conclude that asparticin cannot be modified by GatCAB.

5.7. Discussion

The original objective of this study was to identify aa-tRNA analogs that would inhibit GatCAB competitively. The aminoacylation and transamidation assay was convenient for the testing of these analogs, as discussed below. To measure the K_i values for these analogues, we first sought to determine the K_m and k_{cat} for Asp-tRNA^{Asn}. Since the inhibitor tests are conducted in the presence of ND-AspRS, we considered that there could be some form of interaction between ND-AspRS and GatCAB, as was suggested by molecular modeling for ND-GluRS and GatDE.¹² This model, which shows that binding of ND-GluRS to GatDE is unobstructed and possible, also indicates that the presence of an AspRS-like domain on GatDE would prevent the docking of ND-AspRS. As GatCAB does not contain this AspRS-like domain and is able to transamidate both Glu-tRNA^{Gln} and Asp-tRNA^{Asn}, the existence of a ND-AspRS / GatCAB complex is conceivable. To explore this possibility, we decided to determine the kinetic parameters for Asp-tRNA^{Asn} in the transamidase reaction in the absence of ND-AspRS, as well as in the presence of ND-AspRS from both *P. aeruginosa* and *H. pylori*. As a control, K_m and k_{cat} values were also determined for Asp-tRNA^{Asn} in the presence of BSA. These experiments revealed that the presence of ND-AspRS from *H. pylori* reduces the K_m for Asp-tRNA^{Asn} by a factor of 2.0, while ND-AspRS from *P. aeruginosa* reduced the K_m by a factor of 1.4 (figure 5.6). The transamidation assay we used to determine these values minimized the effect of deacylation, which was primarily of concern for Asn-tRNA^{Asn} and its 20 min half-life, by reducing reaction times to 2 min or less. Unbound aspartic acid, which was the result of whatever deacylation may have occurred with Asp-tRNA, was not found in concentrations high enough to allow significant reacylation to occur in reaction mixtures containing added ND-AspRS. The control experiment performed using BSA indicates that excluded volume effects are not responsible for the drop in K_m values seen in the presence of ND-AspRS. We thus propose that a transfer of Asp-tRNA^{Asn} from ND-AspRS onto GatCAB decreases the K_m for Asp-tRNA^{Asn} through increased interactions made possible by the synthetase. This is consistent with the fact that ND-AspRS binds about half as much Asp-tRNA as does GatCAB. The observed binding of [¹⁴C]Asp-tRNA to GatCAB cannot be attributed solely to Asp-tRNA^{Asp}, as the unfractionated stock we used contained about 4 times more

tRNA^{Asn} than tRNA^{Asp}, while ND-AspRS bound approximately half as much Asp-tRNA as does GatCAB. Considering that the K_m of *H. pylori* ND-AspRS for its homologous tRNA^{Asp} is 0.77 μM ²³, and that the concentration of *E. coli* Asp-tRNA^{Asp} in our binding assays was about 0.05 μM , it is very unlikely that the Asp-tRNA bound could be mainly composed of Asp-tRNA^{Asp}.

These facts are compatible with channeling of Asp-tRNA^{Asn} from ND-AspRS to GatCAB. If this binding rendered Asp-tRNA^{Asn} unusable by GatCAB, we should have seen an increase in our K_m values, rather than a decrease. As we did not succeed at isolating a ND-AspRS/GatCAB complex (results not shown), and as no other investigator reported the detection of such a complex, we suggest that this mechanism could involve the formation of a transient ternary complex. If short-lived, this complex would allow for a more efficient transit of tRNA^{Asn} through the aspartylation and transamidation steps. A longer-lasting complex could also exist, involving contact of ND-AspRS from the acceptor stem to the anticodon loop on the variable loop face of Asp-tRNA^{Asn}³⁰, as well as contact between the acceptor arm and GatCAB.¹⁰ While our results suggest that the binding of Asp-tRNA^{Asn} by ND-AspRS or both enzymes may be weaker than the binding of canonical aa-tRNAs³¹ or even misacylated aa-tRNAs³² by EF-Tu, the obstruction of parts of the Asp-tRNA^{Asn} acceptor arm, especially by GatCAB, could prevent the binding of EF-Tu. It is interesting to note that GatCAB appears to bind aa-tRNA in a way similar to EF-Tu, making contact with the acceptor arm and ester bond region.³³ In conjunction with GatCAB, ND-AspRS increases the stability of Asn-tRNA^{Asn} (figure 5.4), like EF-Tu does for all canonical aa-tRNAs. Asp-tRNA^{Asn} might therefore not be released by ND-AspRS, but rather taken directly to GatCAB, forming a complex which prevents the docking of EF-Tu and offers stabilization of the ester bond.

The stability of the aminoacyl ester bonds of aminoacyl-tRNAs (aa-tRNA) depends on the nature of the amino acid, but not on that of tRNA³⁴⁻³⁵ (reviewed by Söll and Schimmel).³⁶ The half-lives of *E. coli* Asp-tRNA^{Asp} and Asn-tRNA^{Asn} at 37°C are identical³⁴, but in the case of the two GatCAB-containing bacteria *H. pylori* and *N. meningitidis*²⁷, the half-life of Asn-tRNA^{Asn} is much shorter than that of Asp-tRNA^{Asn}

(figure 5.4). These results are in accordance with the documented role of GatCAB in synthesizing asparagine in organisms which are, or were at one point, devoid of an asparagine synthase (see the Introduction). The above-mentioned ternary complex might also slow the uptake of Asn-tRNA^{Asn} by EF-Tu, allowing additional asparagine to be released.

At the onset of this study, we expected Asp-tRNA^{Asn} to have the shorter half-life of both aa-tRNAs, as it could have then benefited from a protection of the ester bond between its amino acid and tRNA moieties, provided by its binding of ND-AspRS. This protection, which might have been similar to the one described above, could have explained the lower K_m values seen for Asp-tRNA^{Asn} with GatCAB in the presence of ND-AspRS. As Asp-tRNA^{Asn} has a half-life of 136 min under the conditions tested (figure 5.4), this putative stabilization remains possible but seems unnecessary. The presence of ND-AspRS in this experiment could not lead to tRNA aspartylation because Asp-tRNA was prepared in another reaction mixture and purified before being used, resulting in an insufficient amount of aspartic acid. The presence of active GatCAB in the reaction mixture also ensures that any amino acid freed by deacylation would be Asn, and therefore not usable by ND-AspRS. Given its role in asparagine synthesis in many organisms, it is possible that the deacylation of Asn-tRNA^{Asn} has a higher chance of occurring during its separation from GatCAB than afterwards. Further experiments are needed to verify this possibility, but the influence of ND-AspRS on the half-life of Asn-tRNA^{Asn} remains indicative of a contact between this enzyme and GatCAB. A practical aspect of these results is that when testing potential inhibitors using our combined aminoacylation and transamidation assay, the K_m for Asp-tRNA^{Asn} that must be used is the one obtained in the presence of *P. aeruginosa* ND-AspRS.

Glutamycin, an analog of the 3'-end of glutamyl-tRNA, was first designed as a potential inhibitor of the glutamyl-tRNA reductase (GluTR).²¹ Although it was only a weak inhibitor of GluTR (K_i on the order of 1.5 mM), it was very useful in facilitating GluTR crystallization, and its localization on the enzyme at 1.9 Å resolution provided information about GluTR mechanism¹⁹; in particular, modeling based on the well-defined location of

glutamycin allowed the positioning of the acceptor stem of *T. thermophilus* tRNA^{Glu} into the active site, and revealed an extensive GluTR/glutamyl-tRNA interface. This model and the weak binding of glutamycin to GluTR, indicate that this enzyme has only a few contacts with the glutamyl-adenosine at the 3'-end of glutamyl-tRNA and that it recognizes this substrate mostly by other structural elements of this tRNA. The situation is quite different in the case of the interaction of this analogue with GatCAB: it inhibits it more strongly ($K_i = 0.105$ mM, which is about 14-fold more efficient than for GluTR). This result is compatible with the fact that GatCAB has two different aminoacyl-tRNA substrates whose nucleotide sequences differ significantly, a situation that may have led to more interactions with their common 3'-terminal features. The absence of AdT inhibition by the Asp-KP analogue (figure 5.2), which lacks the adenosyl module, also suggests that a significant portion of binding occurs at the 3' end of the tRNA, although further experimentation is needed to determine to what extent its structural differences with the β -phosphoaspartate side chain affect its binding.

The part of aspartycin that is similar to Asp (figure 5.1: the only differences are a NH replacing one of the O of the α -carboxy of Asp and two methyl residues on the adenine base) has a side chain identical to that of aspartic acid, and thus its β -carboxyl group could conceivably be phosphorylated and then transamidated by AdT. Our attempts at detecting these modified forms of aspartycin revealed that this inhibitor is not a substrate of AdT (figure 5.8), which indicates that its β -carboxyl group is not positioned in the active site exactly as is that of Asp-tRNA^{Asn}. This suggests that the proposed interactions between the tRNA acceptor arm and GatB have a role not only in substrate binding, but also in ensuring the proper orientation of the 3' end in the active site.¹⁰

5.8. Acknowledgment

We thank Dr Alain Garnier and Lise Lemieux for the LCMS analyses. We are also thankful to Dr Dieter Söll and Dr Tamara Hendrickson for providing us with the overproducing strains for *H. pylori* GatCAB, tRNA^{Asn} and ND-AspRS.

5.9. References

- 1) Ataide, S. F.; Ibba, M. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 285-297.
- 2) Hendrickson, T. L.; Schimmel, P. (2003) Transfer RNA-dependent amino acid discrimination by aminoacyl-tRNA synthetases, in *Translation Mechanisms* (Lapointe J., and Brakier Gingras, L., Ed.) pp 34-64, Landes Biosciences / Eureka.com and Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- 3) Ruan, B.; Söll, D. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25887-25891.
- 4) Curnow, A. W.; Hong, K.; Yuan, R.; Kim, S.; Martins, O.; Winkler, W.; Henkin, T. M.; Söll, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 11819-11826.
- 5) Becker, H. D.; Kern, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 12832-12837.
- 6) Curnow, A. W.; Tumbula, D. L.; Pelaschier, J. T.; Min, B.; Söll, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 12838-12843.
- 7) Min, B.; Pelaschier, J. T.; Graham, D. E.; Tumbula-Hansen, D.; Söll, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 2678-2683.
- 8) Schell, M. A.; Karmirantzou, M.; Snel, B.; Vilanova, D.; Berger, B.; Pessi, G.; Zwahlen, M. C.; Desiere, F.; Bork, P.; Delley, M.; Pridmore, R. D.; Arigoni, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 14422-14427.
- 9) Ibba, M.; Becker, H. D.; Stathopoulos, C.; Tumbula, D. L.; Söll, D. *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 311-316.
- 10) Nakamura, A.; Yao, M.; Chimnaronk, S.; Sakai, N.; Tanaka, I. *Science* **2006**, *312*, 1954-1958.
- 11) Schmitt, E.; Panvert, M.; Blanquet, S.; Mechulam, Y. *Structure* **2005**, *13*, 1421-1433.
- 12) Oshikane, H.; Sheppard, K.; Fukai, S.; Nakamura, Y.; Ishitani, R.; Numata, T.; Sherrer, R. L.; Feng, L.; Schmitt, E.; Panvert, M.; Blanquet, S.; Mechulam, Y.; Söll, D.; Nureki, O. *Science* **2006**, *312*, 1950-1954.
- 13) Sheppard, K.; Akochy, P. M.; Salazar, J. C.; Söll, D. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 11866-11873.
- 14) Rinehart, J.; Krett, B.; Rubio, M. A.; Alfonzo, J. D.; Söll, D. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 583-592.

- 15) Kern, D.; Roy, H.; Becker, H. D. (2005) Asparaginyl-tRNA synthetase, in *The Aminoacyl-tRNA Synthetases* (Ibba, M., Francklyn, C., and Cusack, S., Eds.) pp 193-209, Eurekah.com/Landes Bioscience, Georgetown, Texas.
- 16) Decicco, C. P.; Nelson, D. J.; Luo, Y.; Shen, L.; Horiuchi, K. Y.; Amsler, K. M.; Foster, L. A.; Spitz, S. M.; Merrill, J. J.; Sizemore, C. F.; Rogers, K. C.; Copeland, R. A.; Harpel, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2561-2564.
- 17) Harpel, M. R.; Horiuchi, K. Y.; Luo, Y.; Shen, L.; Jiang, W.; Nelson, D. J.; Rogers, K. C.; Decicco, C. P.; Copeland, R. A. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6398-6407.
- 18) Horiuchi, K. Y.; Harpel, M. R.; Shen, L.; Luo, Y.; Rogers, K. C.; Copeland, R. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6450-6457.
- 19) Moser, J.; Schubert, W. D.; Beier, V.; Bringemeier, I.; Jahn, D.; Heinz, D. W. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6583-6590.
- 20) Rudisill, D. E.; Whitten, J. P. *Synthesis* **1994**, *8*, 851-854.
- 21) Moser, J.; Lorenz, S.; Hubschwerlen, C.; Rompf, A.; Jahn, D. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30679-30685.
- 22) Akochy, P. M.; Bernard, D.; Roy, P. H.; Lapointe, J. *J. Bacteriol.* **2004** *186*, 767-776.
- 23) Chuawong, P.; Hendrickson, T. L. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8079-8087.
- 24) Studier, F. W. *Protein Expression Purif.* **2005**, *41*, 207-234.
- 25) Yarus, M.; Berg, P. *Anal. Biochem.* **1970**, *35*, 450-465.
- 26) Roy, H.; Becker, H. D.; Mazauric, M. H.; Kern, D. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3420-3430.
- 27) Bailly, M.; Giannouli, S.; Blaise, M.; Stathopoulos, C.; Kern, D.; Becker, H. D. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 6083-6094.
- 28) Cathopoulos, T. J.; Chuawong, P.; Hendrickson, T. L. *Anal. Biochem.* **2007**, *360*, 151-153.
- 29) Wolfson, A. D.; Pleiss, J. A.; Uhlenbeck, O. C. *RNA* **1998**, *4*, 1019-1023.
- 30) Moulinier, L.; Eiler, S.; Eriani, G.; Gangloff, J.; Thierry, J. C.; Gabriel, K.; McClain, W. H.; Moras, D. *EMBO J.* **2001**, *20*, 5290-5301.
- 31) LaRiviere, F. J.; Wolfson, A. D.; Uhlenbeck, O. C. *Science* **2001**, *294*, 165-168.
- 32) Asahara, H.; Uhlenbeck, O. C. *Biochemistry* **2005**, *44*, 11254-11261.

- 33) Nissen, P.; Kjeldgaard, M.; Thirup, S.; Clark, B. F.; Nyborg, J. *Biochimie* **1996**, *78*, 921-933.
- 34) Hentzen, D.; Mandel, P.; Garel, J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *281*, 228-232.
- 35) Strickland, J. E.; Jacobson, K. B. *Biochemistry* **1972**, *11*, 2321-2323.
- 36) Söll, D.; Schimmel, P. R. (1974) Aminoacyl-tRNA synthetase, in *The Enzymes* (Boyer, P. D., Ed.) pp 489-538, Academic Press, San Diego, CA.

5.10. Annexe

Le (*R*)-4-oxo-5-phosphonorvaline méthyl ester **5.4** a été synthétisé en 3 étapes par une méthode décrite dans la littérature (schéma 5.1).²⁰ Le diméthyl ester de l'acide aspartique **5.1** est protégé avec le groupement trityle. Ce groupement génère un encombrement stérique important, de sorte que l'attaque du lithien du diméthylméthylphosphonate est favorisée en position 4 (rendement de 64%). Le β-cétophosphonate est ensuite déprotégé avec l'iodure de triméthylsilyle pour donner le produit **5.4**.

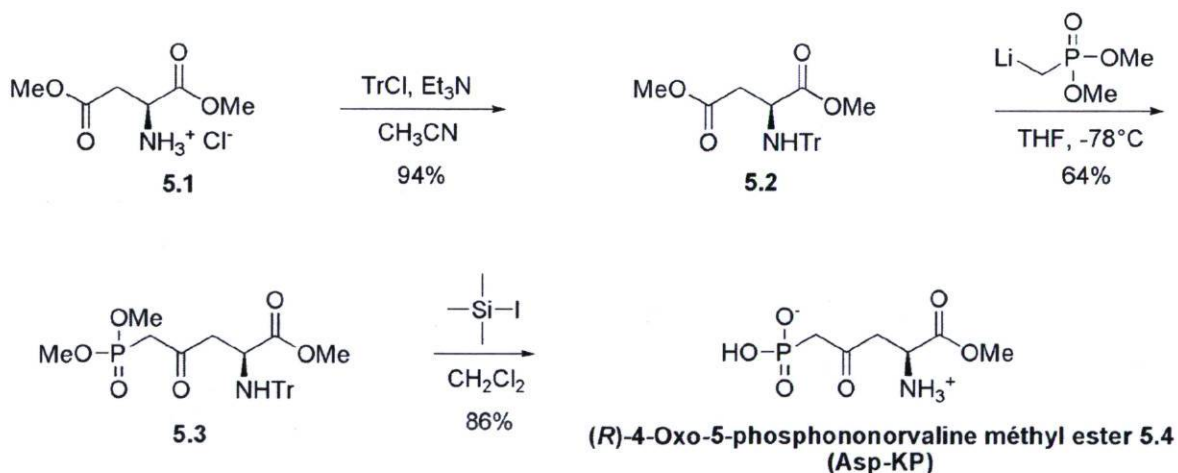


Schéma 5.1. Voie de synthèse du (*R*)-4-oxo-5-phosphonorvaline méthyl ester.

L'absence d'inhibition pour le (*R*)-4-oxo-5-phosphonorvaline méthyl ester **5.4** (même à une concentration élevée de 1 mM) est surprenante étant donné la ressemblance de cette molécule avec l'intermédiaire activé de la réaction catalysée par les AdT (β -

phosphoryl-Asp-tRNA^{Asn}). D'autre part, la glutamycine et l'asparticine inhibent l'AdT gatCAB d'*Helicobacter pylori* (K_i respectifs de 105 et 134 μM) et ressemblent aux substrats de la réaction catalysée par les AdT (Glu-tRNA^{Gln} et Asp-tRNA^{Asn}). Les constantes cinétiques obtenues suggèrent que l'AdT interagit avec le motif « adénosine » terminal présent dans ces ARNt. D'autres molécules imitant le motif « 3'-aminoacyl-adénosine » ont donc été synthétisées (chapitre 6-7).

CHAPITRE 6

Inhibition de l' aminoacyl-ARNt amidotransférase d'*Helicobacter pylori* par des analogues de la puromycine

Inhibition of *Helicobacter pylori* aminoacyl-tRNA amidotransferase by puromycin analogues

Christian Balg,[†] Jonathan L. Huot,[‡] Jacques Lapointe,[‡] and Robert Chênevert^{*,†}

Département de chimie, Département de Biochimie et de Microbiologie, Centre de Recherche sur la Fonction, la Structure et l'Ingénierie des Protéines (CREFSIP), Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Québec, Canada, G1K 7P4.

Article publié dans la revue *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 3264-3265.

6.1. Préambule

J'ai contribué à cette publication au niveau de la synthèse des inhibiteurs de l'aminacyl-ARNt amidotransférase d'*Helicobacter pylori*. J'ai également participé à la préparation des échantillons, à l'écriture du manuscrit et à l'élaboration des schémas.

6.2. Résumé

Plusieurs procaryotes ne possèdent pas l'asparaginyl-ARNt synthétase (AsnRS) et/ou la glutaminyl-ARNt synthétase (GlnRS) nécessaires à la synthèse de leurs ARN de transfert correctement appariés (Asn-ARNt^{Asn} et Gln-ARNt^{Gln}). Ils utilisent plutôt une voie indirecte dans laquelle l'ARNt est d'abord chargé par une aminacyl-ARNt synthétase non-discriminante (ND-AspRS et/ou ND-GluRS) pour générer les ARNt incorrectement aminacylés (Asp-ARNt^{Asn} et Glu-ARNt^{Gln}). L'acide carboxylique de la chaîne latérale des acides aminés (Asp et Glu) est par la suite transformé en amide par une aminacyl-ARNt amidotransférase (AdT) pour donner les ARNt correctement appariés (Asn-ARNt^{Asn} et Gln-ARNt^{Gln}). En s'inspirant du mécanisme de cette réaction, des dérivés de la puromycine (analogues des aminacyl-ARNt) ont été synthétisés en tant qu'inhibiteurs de l'AdT GatCAB d'*Helicobacter pylori*. Les meilleurs inhibiteurs obtenus miment l'état de transition de la réaction catalysée par l'enzyme (K_i jusqu'à 4 μM). Ces inhibiteurs pourront être utilisés en tant que ligands pour la détermination de structures par diffraction des rayons-X et comme outils pour des études mécanistiques sur les AdT.

6.3. Abstract

Recent genomic studies revealed the absence of glutaminyl-tRNA synthetase and/or asparaginyl-tRNA synthetase in many bacteria and archaea. The survival of microorganisms missing one or both of these essential enzymes implies an alternative pathway for the formation of Gln-tRNA^{Gln} and Asn-tRNA^{Asn}. This indirect pathway involves misacylation of tRNA^{Gln} with Glu (or tRNA^{Asn} with Asp) by a nondiscriminating synthetase and subsequent transamidation of the misacylated aa-tRNA by an

amidotransferase. Analogues of the natural product puromycin have been developed to inhibit this class of enzymes which has been only recently investigated at the mechanistic and structural levels. The widespread use of the indirect transamidation pathway among prominent human pathogens and its absence in mammalian cells identifies aminoacyl-tRNA amidotransferases as an interesting target for the development of antimicrobial agents with a novel mode of action. These mechanism-based inhibitors will provide useful probes for further mechanistic investigations and ligands for X-ray crystallography.

6.4. Inhibition of *Helicobacter pylori* aminoacyl-tRNA amidotransferase by puromycin analogues

The biosynthesis of aminoacylated tRNAs (aa-tRNA) is a critical step in the faithful translation of the genetic code into proteins. In most organisms, the 20 amino acids (aa) are esterified to their corresponding tRNA by 20 different aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS), each of which is specific for one amino acid and a corresponding set of tRNAs (direct aminoacylation pathway).¹

Recent genomic studies revealed the absence of glutaminyl-tRNA synthetase (GlnRS) and/or asparaginyl-tRNA synthetase (AsnRS) in archaeobacteria, Gram-positive eubacteria, and many Gram-negative eubacteria. The survival of microorganisms missing one or both of these essential enzymes implies an alternative pathway for the formation of Gln-tRNA^{Gln} and Asn-tRNA^{Asn}. This indirect pathway involves the misacylation of tRNA^{Gln} with Glu (or tRNA^{Asn} with Asp) by a nondiscriminating aminoacyl-tRNA synthetase (ND-aaRS), and the subsequent transamidation of the misacylated aa-tRNA by an amidotransferase (AdT) (figure 6.1).²

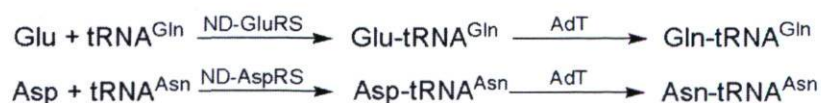


Figure 6.1. Indirect pathway for Gln-tRNA^{Gln} and Asn-tRNA^{Asn} biosynthesis.

The dissemination of antibiotic resistance has become a major problem in clinical medicine, and there is a critical need to develop anti-bacterial agents with novel modes of

action.³ The widespread use of the indirect transamidation pathway among prominent human pathogens⁴ and its absence in the mammalian cytoplasm identifies AdT as an interesting target for the development of new and highly specific antimicrobial agents.⁵ Here we report the synthesis and biological evaluation of puromycin analogues as mechanism-based inhibitors of aminoacyl-tRNA amidotransferases.

The proposed mechanism for the transamidation reaction catalyzed by amidotransferases is a three-step event (figure 6.2). First, the hydrolysis of the amido donor, glutamine, forms glutamic acid and enzyme-bound NH_3 (glutaminase step). The second step is the activation of the side-chain carboxyl group of the amino acid fixed on the tRNA ($\text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}}$ or $\text{Asp-tRNA}^{\text{Asn}}$) resulting from the reaction of this carboxyl group with ATP to form a mixed anhydride (kinase step). In this intermediate, the high-energy anhydride bond activates the carboxyl group. Finally, the aminolysis of the activated amido acceptor by enzyme-bound NH_3 (transamidase step) forms the final product ($\text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}}$ or $\text{Asn-tRNA}^{\text{Asn}}$). The overall reaction is the simple conversion of the side chain carboxylic acid (Glu or Asp) into an amide (Gln or Asn) while the amino acid is still attached to a tRNA (pretranslational modification).

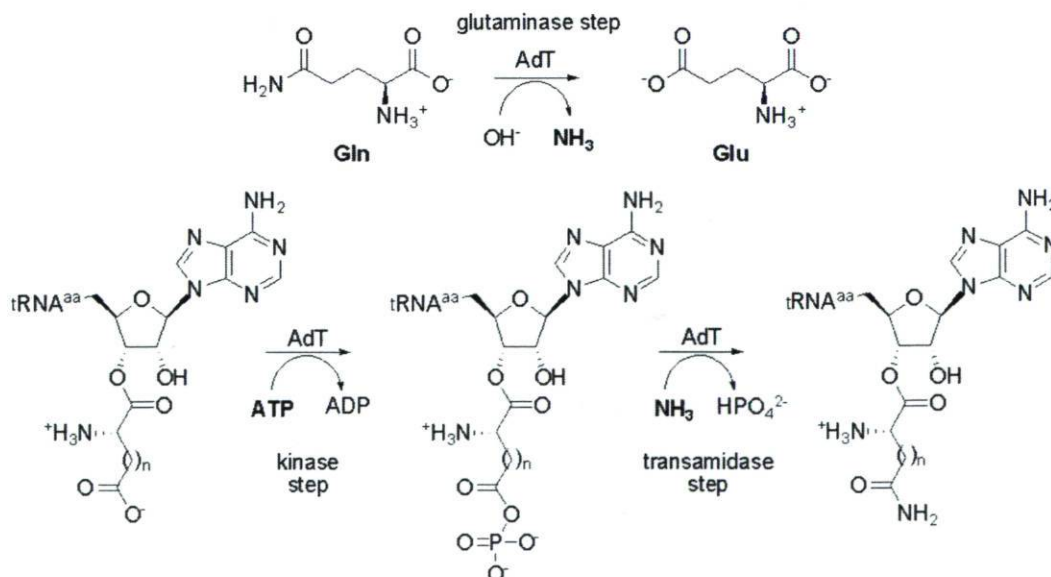
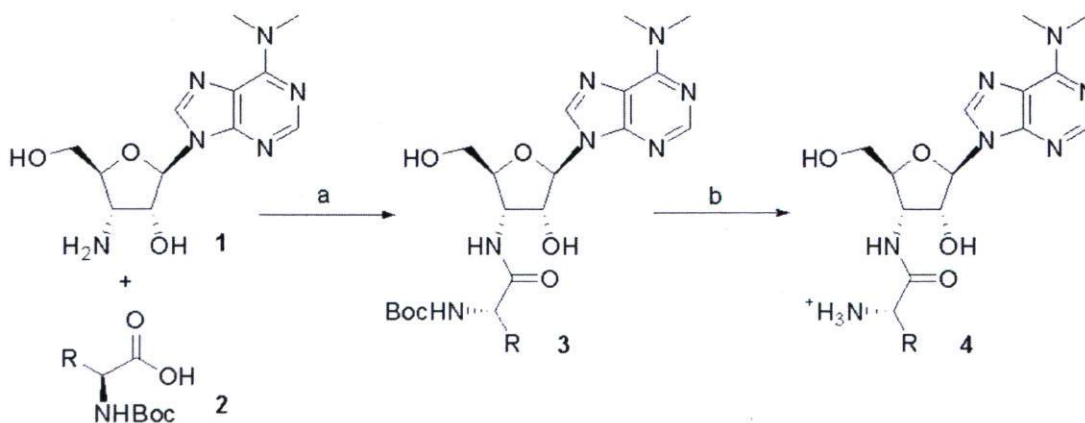


Figure 6.2. Reaction mechanism: Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase (GluAdT), $n = 2$, tRNA^{aa} = tRNA^{Gln}. Asp-tRNA^{Asn} amidotransferase (AspAdT), $n = 1$, tRNA^{aa} = tRNA^{Asn}.

Two types of amidotransferases have been identified so far in nature. GatCAB are heterotrimeric proteins encoded by genes named *gatC*, *gatA*, and *gatB*. These enzymes found in both archaea and bacteria can transamidate both Glu-tRNA^{Gln} and Asp-tRNA^{Asn}. The second type, heterodimeric GatDE, occurs only in archaea and functions solely as a GluAdT. The first crystal structures of members of each type have been determined recently.⁶ Up to recently, only a few AdT inhibitors have been reported in part because of the absence of a convenient assay. Some analogues of glutamine and ATP were useful to study the reaction mechanism⁷, but these inhibitors are likely to interfere with many other enzymes acting on the same substrates.

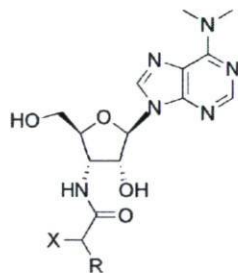
The general synthetic approach to the puromycin analogues is outlined in scheme 6.1 (see Supporting Information for full details of each synthesis). The coupling of puromycin aminonucleoside **1** with *N*-*tert*-butyloxycarbonyl (*N*-Boc) protected amino acids **2** using *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) / *N*-hydroxysuccinimide (NHS) provided amides **3** in high yields (72%-91%) despite the presence of two unprotected hydroxyl groups on the ribose. Removal of the Boc protecting group under standard conditions with CF₃COOH gave products **4** but glycosyl bond cleavage and depurination lowered the yields. In contrast, Boc removal with 4M HCl / dioxane proceeded without difficulty to furnish the final product **4** in high yields (89-100%).







Scheme 6.1. General synthetic approach to inhibitors. Conditions: (a) EDC, *N*-hydroxysuccinimide, DMF, 72-91%; (b) 4 M HCl, dioxane, 89-100%.

With a series of compounds in hand, we set out to evaluate their inhibitory activities against *Helicobacter pylori* GatCAB amidotransferase (table 6.1). Enzyme production and kinetic experiments were carried out as previously described.⁸ Competitive inhibition of *H. pylori* AdT by compounds **4a-4h**, with respect to Asp-tRNA^{Asn}, was characterized in the presence of saturating concentrations of the two other substrates (2 mM ATP and 1.28 mM L-glutamine), and of 0.50-1.25 μ M Asp-tRNA^{Asn}. The decrease of the transamidation rate from its value V_0 in the absence of inhibitor, to its value V_i in the presence of various inhibitor concentrations, was used to identify the competitive nature of the inhibitor and to obtain the K_i value, as described in the Supporting Information (see fig. 6.S1).

Table 6.1. Inhibition of *Helicobacter pylori* GatCAB amidotransferase.



compound	X	R	K_i (μ M)
4a	(L)-NH ₂	-CH ₂ - 	4100 \pm 300
4b	(L)-NH ₂	-CH ₂ COO ⁻	134 \pm 4
4c	(L)-NH ₂	-(CH ₂) ₂ COO ⁻	105 \pm 2
4d	(L)-OH	-(CH ₂) ₂ COO ⁻	130 \pm 16
4e	(L)-NH ₂	-(CH ₂) ₂ CONH ₂	45 \pm 6
4f	(D,L)-NH ₂	-(CH ₂) ₂ - 	33 \pm 3
4g	(L)-NH ₂	-(CH ₂) ₂ - 	11 \pm 0.7
4h	(L)-NH ₂	-(CH ₂) ₂ - 	4 \pm 0.2

We initially assayed the parent compound puromycin **4a**, an aminonucleoside antibiotic produced by *Streptomyces alboniger*. This natural product mimics the charged 3'-terminus of aminoacylated tRNA and has been widely used as a basic tool for the study of protein synthesis on the ribosomes. Puromycin is a very weak inhibitor of AdT (K_i = 4 mM).

The amino acid chain of puromycin is related to tyrosine and differs from the aspartic and glutamic side chains transformed by AdT (figure 6.2). Replacement of the methoxyphenyl moiety of puromycin by carboxylic acid derivatives considerably enhances the ability to inhibit AdT. Compounds **4b** and **4c**, analogues of the 3'-ends of Asp-tRNA and Glu-tRNA are competitive inhibitors with similar K_i values of 134 μM and 105 μM respectively. This is consistent with the fact that the enzyme is equally efficient in transamidation of both Asp-tRNA^{Asn} and Glu-tRNA^{Gln}.⁹

Replacement of the α -amino group by a hydroxyl (**4d**) slightly increases the K_i ($K_i = 105 \mu\text{M}$ for **4c** vs 130 μM for **4d**). The amide variant **4e** has structural homology to the final product of the enzymatic reaction and shows improved activity ($K_i = 45 \mu\text{M}$) over the carboxylic acid analogues **4b** and **4c**.

Various phosphorus- and sulfur- containing derivatives have been previously proposed as analogues of tetrahedral intermediates formed transiently during enzymatic reactions involving formation or hydrolysis of amide bonds.¹⁰ As stable analogues of the transition state in the last step of the transamidation process, we designed **4f**, **4g** and **4h** where the carbonyl to be attacked by ammonia is replaced by a tetrahedral phosphorus or sulfur atom with a methyl group mimicking ammonia. Racemic **4f** prepared from (D,L)-phosphinothricin did inhibit transamidase activity with a $K_i = 33 \mu\text{M}$. Likewise, a $K_i = 11 \mu\text{M}$ was determined for the diastereomerically mixed L-methionine (*R,S*)-sulfoxide **4g**. The sulfone **4h** exhibited the highest activity with a $K_i = 4 \mu\text{M}$. Competitive inhibition with respect to Asp-tRNA^{Asn} was observed for all puromycin analogues.

In conclusion, we have identified analogues of the natural product puromycin that have inhibitory activity against bacterial aminoacyl-tRNA amidotransferases. These mechanism-based inhibitors will provide useful chemical probes for further mechanistic investigations, ligands for X-ray crystallography, and a potential avenue to develop antibiotics with a novel mode of action.¹¹ Investigations along these lines are currently underway.

6.5. Acknowledgment

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and the “Fonds de recherche sur la nature et les technologies, Québec (FQRNT)”.

6.6. References

- 1) (a) Ibba, M.; Francklyn, C.; Cusack, S. (Eds). *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*. Eurekah.com/Landes Bioscience, Georgetown, TX (2005). (b) Lapointe, J.; Brakier-Gingras, L. (Eds). *Translation Mechanisms*. Landes Biosciences/Eurekah.com and Kluwer Academic/Plenum Publishers (2003).
- 2) Feng, L.; Tumbula-Hansen, D.; Min, B.; Namgoog, S.; Salazar, J. C.; Orellana, O.; Söll, D. Transfer RNA-dependant amidotransferases: Key enzymes for Asn-tRNA and Gln-tRNA synthesis in nature, in *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*, Ibba, M.; Francklyn, C., Cusack, S. (Eds) Landes Biosciences, Georgetown, TX, 2005, pp. 314-319.
- 3) Walsh, C. T., Wright, G. D. (Eds) *Chem. Rev.* **2005**, *105*, no. 2; special issue on antibiotic resistance.
- 4) (a) Fritz, B.; Raczniak, G. A. *Biodrugs* **2002**, *16*, 331-337. (b) Raczniak, G.; Ibba, M.; Söll, D. *Toxicology* **2001**, *160*, 181-189.
- 5) Ataide, S. F.; Ibba, M. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 285-297.
- 6) (a) Nakamura, A.; Yao, M.; Chimnaronk, S.; Sakai, N.; Tanaka, I.; *Science* **2006**, *312*, 1954-1958. (b) Oshikane, H.; Sheppard, K.; Fukai, S.; Nakamura, Y.; Ishitani, R.; Numata, T.; Sherrer, R. L.; Feng, L.; Schmitt, E.; Panvert, M.; Blanquet, S.; Mechulam, Y.; Söll, D.; Nureki, O. *Science* **2006**, *312*, 1950-1954. (c) Schmitt, E.; Panvert, M.; Blanquet, S.; Mechulam, Y. *Structure* **2005**, *13*, 1421-1433.
- 7) (a) Harpel, M. R.; Horiuchi, K. Y.; Luo, Y.; Shen, L.; Jiang, W.; Nelson, D. J.; Rogers, K. C.; Decicco, C. P.; Copeland, R. A. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6398-6407. (b) Decicco, C. P.; Nelson, D. J.; Luo, Y.; Shen, L.; Horiuchi, K. Y.; Amsler, K. M.; Foster, L. A.; Spitz, S. M.; Merrill, J. J.; Sizemore, C. F.; Rogers, K. C.; Copeland, R. A.; Harpel, M. R. *Biorg.*

Med. Chem. Lett. **2001**, *11*, 2561-2564. (c) Horiuchi, K. Y.; Harpel, M. R.; Shen, L.; Luo, Y.; Rogers, K. C.; Copeland, R. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6450-6457.

8) Huot, J. L.; Balg, C.; Jahn, D.; Moser, J.; Émond, A.; Blais, S. P.; Chênevert, R.; Lapointe, J. *Biochemistry* **2007**, *46*, 13190-13198.

9) Sheppard, K., Akochy, P. M., Salazar, J. C.; Söll, D. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 11866-11873.

10) Hiratake, J. *Chem. Rec.* **2005**, *5*, 209-228.

11) In a preliminary evaluation using a standard disk diffusion assay, **4h** showed a moderate antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, a Gram-positive bacteria lacking GlnRS.

6.7. Supporting information

6.7.1. Typical enzyme assay

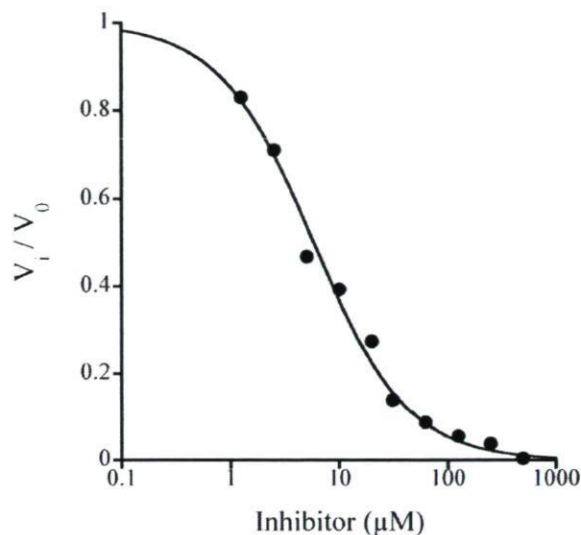


Figure 6.S1. Compound **4h** is a competitive inhibitor of *H. pylori* AdT with respect to *H. pylori* Asp-tRNA^{Asn}.

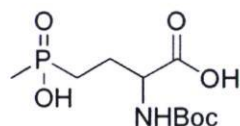
Competitive inhibition of *H. pylori* AdT by compound **4h**, with respect to Asp-tRNA^{Asn}, was characterized in 50 mM HEPES-KOH pH 7, 15 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM ATP, and 1.28 mM L-glutamine, 0.50 μM Asp-tRNA^{Asn} and 6 nM AdT. V_0 is the uninhibited rate of product formation under these conditions, V_{max} the maximum rate, S the substrate concentration, V_i the inhibited rate and I the inhibitor concentration. According to Michaelis-Menten, in the absence of inhibitor, $V_0 = (V_{max}S) / (S + K_m)$, while in the presence of a competitive inhibitor, the reaction rate is $V_i = (V_{max}S) / (S + K_m (1 + I / K_i))$. Therefore, $V_i / V_0 = (S + K_m) / (S + K_m (1 + I / K_i))$. Curvefitting of the data to this equation was used to identify the competitive nature of this inhibition with respect to Asp-tRNA^{Asn}, and to calculate the K_i value.

6.7.2. Chemistry: experimental procedures

6.7.2.1. General

Chemical reagents were purchased from Aldrich-Sigma, Novabiochem (*N*-Boc-methionine sulfone and *N*-Boc-methionine sulfoxide), Advanced Chemtech (*N*-Boc-glutamine) and Matrix Scientific (DL-phosphinothricin). Flash chromatography was carried out using 40-63 μM (230-400 mesh) silica gel. Optical rotations were measured using a JASCO DIP-360 digital polarimeter (c as g of compound per 100 mL). Infrared spectra were recorded on a Bomem MB-100 spectrometer. NMR spectra were recorded on a Varian Inova AS400 spectrometer (400 MHz). Compound **4b** was prepared as described previously.¹

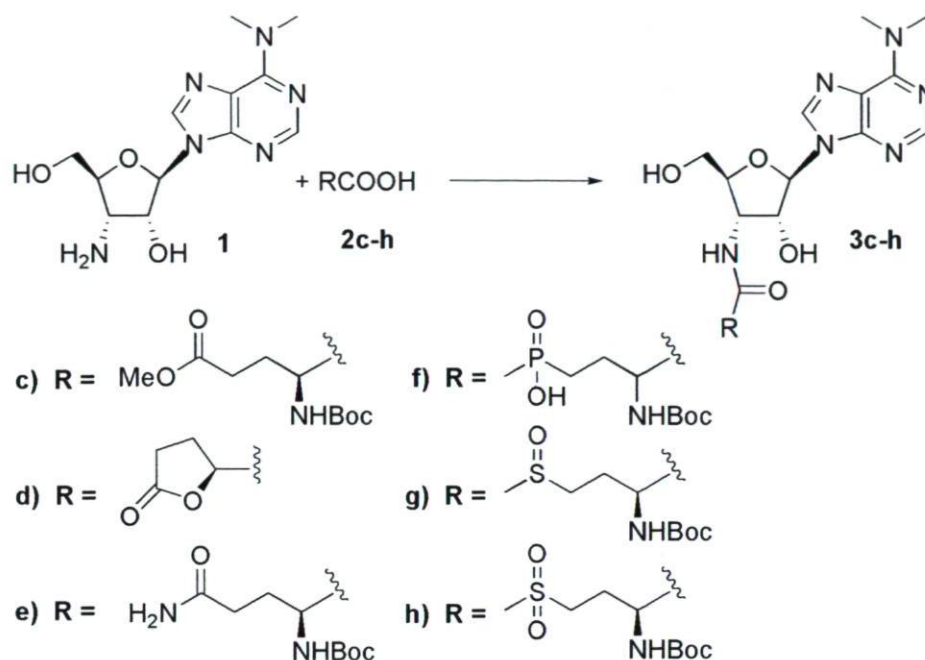
6.7.2.2. *N*-Boc-DL-phosphinothricin **2f**



A solution of DL-phosphinothricin (70.0 mg, 386 μmol), NaHCO_3 (99.3 mg, 1.18 mmol) and Boc_2O (119 mg, 545 μmol) in dioxane/ H_2O (0.5 mL: 0.3 mL) was stirred at room temperature for 18 h. Additional portions of Boc_2O (2 X 119 mg, 2 X 545 μmol) were added at two hour intervals. The mixture was taken up in MeOH, preadsorbed on silica gel, and subjected to flash chromatography (1% HCOOH / 20% MeOH / 79% CH_2Cl_2) to afford **2f** (81.0 mg, 75%) as a white solid: mp 182-185°C (dec); IR (KBr) 3396, 2980, 1704, 1523, 1368, 1306, 1248, 1168, 1050, 1027 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.34 (d, $J = 13.2$ Hz, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.64-1.76 (m, 2H), 1.79-1.94 (m, 1H), 1.97-2.13 (m, 1H), 4.07-4.14 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 14.0 (d, $J = 90.3$ Hz), 24.9, 26.6, 27.5, 54.2, 79.4, 156.9, 174.3; ^{31}P NMR (121 MHz, CD_3OD) δ 52.8; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 282.1101, found 282.1103.

¹ Huot, J. L.; Balg, C.; Jahn, D.; Moser, J.; Émond, A.; Blais, S. P.; Chênevert, R.; Lapointe, J. *Biochemistry* **2007**, *46*, 13190-13198.

6.7.2.3. Coupling reaction of puromycin aminonucleoside **1** with carboxylic acids **2c-h**



A suspension of puromycin aminonucleoside **1** (20.0 mg, 68.0 μmol) in anhydrous DMF (0.60 mL) was added to carboxylic acid **2c-h** (74.8 μmol), *N*-hydroxysuccinimide (8.6 mg, 74.8 μmol) and EDC (**2c-e** and **2g-h**: 15.6 mg, 81.6 μmol ; **2f**: 22.2 mg, 115 μmol). The mixture was stirred 30 min at 0°C and then 24 h at room temperature. The solvent was coevaporated with toluene and the residue was purified by flash chromatography.

3'-Deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(*N* ^{α} -Boc- γ -methyl-L-glutamyl-amido)adenosine (3c).

Eluant: gradient 5-7% MeOH / CH₂Cl₂; (30.0 mg, 82%); white solid: mp 82-85°C; $[\alpha]_D^{21}$ -31.9 (c 1.35, CH₂Cl₂ / MeOH 1:1); IR (KBr) 3353, 2933, 1717, 1677, 1601, 1520, 1368, 1250, 1221, 1166, 1039 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.41 (s, 9H), 1.81-1.92 (m, 1H), 2.00-2.10 (m, 1H), 2.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.47 (br s, 6H), 3.64 (s, 3H), 3.70 (dd, *J* = 12.6 and 3.2 Hz, 1H), 3.90 (dd, *J* = 12.6 and 2.2 Hz, 1H), 4.05-4.12 (m, 1H), 4.12-4.17 (m, 1H), 4.53-4.63 (m, 2H), 6.01 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.34 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 27.2, 27.5, 37.8, 50.8, 51.0, 54.2, 61.0, 74.0, 79.7, 83.7, 90.8, 120.3, 138.0, 149.4, 151.8, 155.0, 156.8, 173.8; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₃H₃₆N₇O₈ [M+H]⁺ 538.2620, found 538.2635.

3'-Deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(L-5-oxo-2-tetrahydrofuran-carboxamide)adenosine (3d).

Eluant: gradient 7-9% MeOH / CHCl₃; (24.7 mg, 91%); white solid: mp 110-112 °C; [α]_D²¹ -1.8 (c 0.39, DMSO); IR (KBr) 3426, 2936, 1783, 1675, 1605, 1428, 1146, 1100 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 2.02-2.11 (m, 1H), 2.33-2.50 (m, 3H), 3.17-3.60 (m, 7H), 3.63-3.69 (m, 1H), 3.99-4.04 (m, 1H), 4.42-4.50 (m, 2H), 4.94 (dd, J = 7.9 and 5.3 Hz, 1H), 5.18 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 5.95 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.05 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.27 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.40 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 26.5, 27.7, 38.6, 51.0, 61.5, 73.6, 77.3, 83.5, 89.9, 120.3, 138.6, 150.3, 152.5, 154.9, 170.6, 177.7; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₂₃N₆O₆ [M+H]⁺ 407.1674, found 407.1676.

3'-Deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(*N*^α-Boc-L-glutaminy-amido)adenosine (3e).

Eluant: gradient 10-15% MeOH / CH₂Cl₂; (28.0 mg, 79%); white solid: mp 194 °C (dec); [α]_D²¹ -33.6 (c 0.52, MeOH); IR (KBr) 3415, 3323, 2932, 1662, 1602, 1526, 1424, 1166 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.41 (s, 9H), 1.81-1.91 (m, 1H), 1.97-2.07 (m, 1H), 2.30 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.45 (s, 6H), 3.71 (dd, J = 12.7 and 3.1 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 12.6 and 2.1 Hz, 1H), 4.08 (dd, J = 8.9 and 5.2 Hz, 1H), 4.12-4.17 (m, 1H), 4.53-4.57 (m, 1H), 4.61 (dd, J = 7.5 and 5.8 Hz, 1H), 6.01 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.33 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 27.6, 27.9, 31.3, 37.8, 50.8, 54.5, 61.0, 74.0, 79.7, 83.6, 90.8, 120.3, 137.9, 149.4, 151.8, 154.9, 156.8, 174.0, 176.6; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₂H₃₅N₈O₇ [M+H]⁺ 523.2623, found 523.2624.

3'-Deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(*N*^α-Boc-DL-phosphinothricyl-amido)adenosine (3f).

Eluant: 1% HCOOH / 22% MeOH / CH₂Cl₂. The relevant fractions were evaporated and the product was precipitated from a solution of MeOH (1.0 mL) with Et₂O (10 mL) to give **3f** (27.3 mg, 72%); white solid: mp 195-200 °C (dec); [α]_D²¹ -17.6 (c 0.23, MeOH); IR (KBr) 3426, 2929, 1661, 1603, 1531, 1368, 1298, 1164, 1044 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.19 (d, J = 12.9 Hz, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.49-1.64 (m, 2H), 1.78-1.90 (m, 1H), 1.90-2.03 (m, 1H), 3.46 (br s, 6H), 3.67-3.75 (m, 1H), 3.90 (br d, J = 12.8 Hz, 1H), 4.08-4.18 (m, 2H), 4.52-4.68 (m, 2H), 5.99-6.02 (m, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.32, 8.34 (2s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 15.2 (d, J = 96.2 Hz), 26.1, 27.5, 28.5, 37.9, 50.6, 55.7, 61.1, 73.8, 79.6,

84.0, 90.9, 120.3, 138.0, 149.3, 151.8, 154.9, 156.8, 174.4; ^{31}P NMR (121 MHz, CD_3OD) δ 43.3; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_8\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 558.2436, found 558.2434.

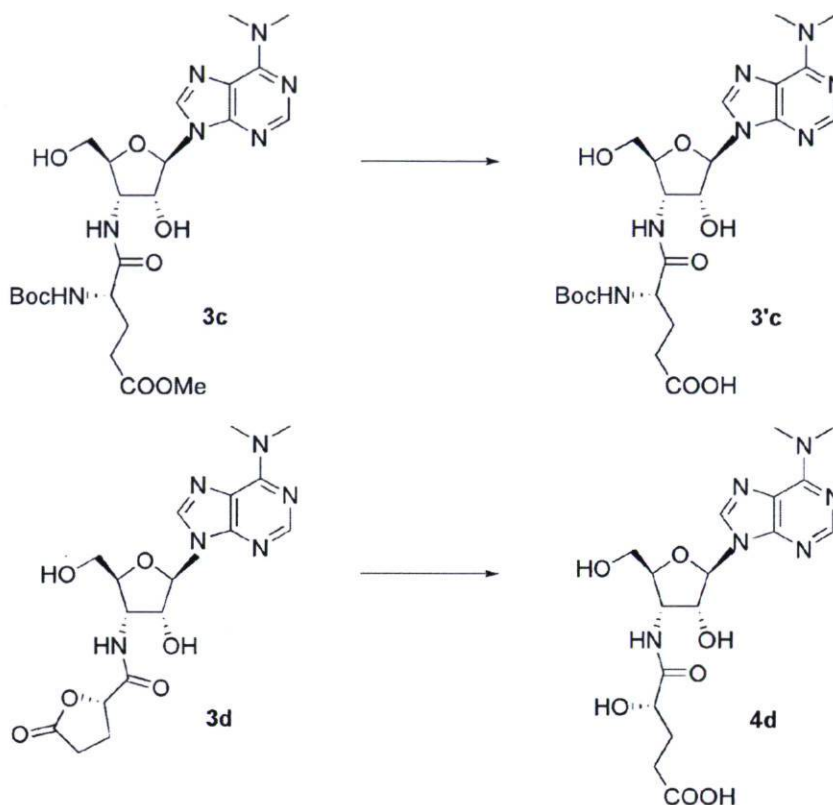
3'-Deoxy- N^6,N^6 -dimethyl-3'-(N^a -Boc-L-methionyl-(R,S)-sulfoxyde-amido)adenosine

(3g). Eluant: gradient 11-13% MeOH / CH_2Cl_2 ; (32.0 mg, 87%); white solid: mp 82-84 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -10.0 (c 0.31, DMSO); IR (KBr) 3424, 2930, 1710, 1602, 1527, 1218, 1164, 1039 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 1.34 (s, 9H), 1.76-2.01 (m, 2H), 2.47, 2.48 (2s, 3H), 2.56-2.80 (m, 2H), 3.17-3.70 (m, 8H), 3.92-3.98 (m, 1H), 4.05-4.14 (m, 1H), 4.38-4.48 (m, 2H), 5.14 (t, $J = 5.3\text{Hz}$, 1H), 5.95 (d, $J = 2.6\text{ Hz}$, 1H), 6.01-6.05 (m, 1H), 6.99 (d, $J = 7.4\text{ Hz}$, 1H), 7.94 (t, $J = 7.7\text{ Hz}$, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.40 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 25.9, 28.8, 38.5, 38.7, 50.1, 50.4, 51.0, 54.0, 54.1, 61.5, 73.7, 79.0, 84.0, 90.0, 120.3, 138.5, 150.3, 152.5, 154.9, 155.9, 172.2, 173.4; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 542.2391, found 542.2389.

3'-Deoxy- N^6,N^6 -dimethyl-3'-(N^a -Boc-L-methionyl-sulfone-amido)adenosine (3h).

Eluant: gradient 6-8% MeOH / CH_2Cl_2 ; (33.9 mg, 89%); white solid: mp 208-210 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -17.2 (c 0.43, DMSO); IR (KBr) 3328, 2936, 1661, 1603, 1520, 1295, 1162, 1120 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 1.34 (s, 9H), 1.84-1.96 (m, 1H), 1.96-2.07 (m, 1H), 2.93 (s, 3H), 2.96-3.14 (m, 2H), 3.20-3.55 (m, 7H), 3.62-3.70 (m, 1H), 3.92-3.98 (m, 1H), 4.06-4.14 (m, 1H), 4.39-4.48 (m, 2H), 5.15 (t, $J = 5.2\text{ Hz}$, 1H), 5.95 (d, $J = 2.7\text{ Hz}$, 1H), 6.07 (d, $J = 4.7\text{ Hz}$, 1H), 7.03 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$, 1H), 7.94 (d, $J = 7.1\text{ Hz}$, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.40 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 25.8, 28.8, 38.6, 51.0, 51.3, 53.4, 61.5, 73.7, 79.1, 84.0, 90.0, 120.3, 138.5, 150.3, 152.5, 154.9, 155.9, 171.9; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 558.2341, found 558.2337.

6.7.2.4. Procedure for the hydrolysis of esters 3c-d



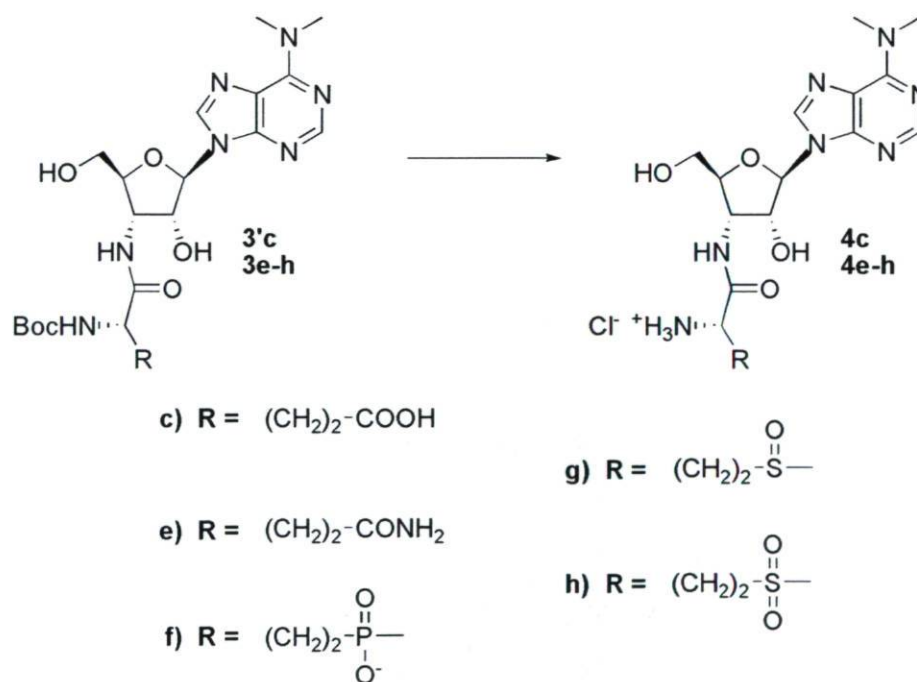
Esters (**3c**: 30.0 mg, 55.8 μmol ; **3d**: 26.0 mg, 64.0 μmol) were dissolved in 4.0 mL of dioxane and 1.0 mL of 2 M NaOH. The solution was stirred 15 min at 0°C and the solvent was evaporated. The residue was preadsorbed on silica gel with MeOH and purified by flash chromatography (1% HCOOH / 23% MeOH / CH₂Cl₂) to give corresponding carboxylic acids:

3'-Deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(*N*^α-Boc-L-glutamyl-amido)adenosine (3'c). (28.0 mg, 96%); white solid: mp 130-133 °C; $[\alpha]_D^{21}$ -30.4 (c 1.40, MeOH); IR (KBr) 3407, 2932, 1692, 1602, 1529, 1165, 1039 cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.41 (s, 9H), 1.80-1.91 (m, 1H), 1.98-2.08 (m, 1H), 2.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.45 (s, 6H), 3.71 (dd, *J* = 12.7 and 3.1 Hz, 1H), 3.90 (dd, *J* = 12.5 and 2.1 Hz, 1H), 4.10 (dd, *J* = 8.9 and 5.2 Hz, 1H), 4.12-4.17 (m, 1H), 4.52-4.48 (m, 1H), 4.61 (dd, *J* = 7.5 and 5.8 Hz, 1H), 6.01 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.34 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 27.4, 27.5, 30.4, 37.8, 50.8, 54.4, 61.0,

74.0, 79.7, 83.7, 90.8, 120.3, 138.0, 149.4, 151.8, 154.9, 156.8, 174.1; HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{22}H_{34}N_7O_8$ $[M+H]^+$ 524.2463, found 524.2484.

3'-Deoxy- N^6,N^6 -dimethyl-3'-(L-2-hydroxyglutaryl-amido)adenosine (4d). (24.7 mg, 91%); white solid: mp 165-167 °C; $[\alpha]_D^{21}$ -3.9 (c 0.47, DMF); IR (KBr) 3409, 2931, 1603, 1567, 1425, 1100, 1040 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 1.76-1.86, (m, 1H), 1.94-2.04 (m, 1H), 2.24 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 3.18 (s, 6H), 3.69 (dd, J = 13.0 and 3.7 Hz, 1H), 3.89 (dd, J = 13.0 and 2.2 Hz, 1H), 4.17 (dd, J = 7.9 and 4.1 Hz, 1H), 4.21-4.27 (m, 1H), 4.56 (dd, J = 7.8 and 6.0 Hz, 1H), 4.60 (dd, J = 5.9 and 2.7 Hz, 1H), 5.93 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 8.13 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ : 30.6, 33.2, 39.1, 60.8, 66.3, 71.4, 73.7, 82.8, 89.7, 119.2, 137.9, 148.5, 151.9, 154.2, 177.0, 182.4; HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{17}H_{25}N_6O_7$ $[M+H]^+$ 425.1779, found 425.1794.

6.7.2.5. General procedure for the cleavage of the *N-tert*-butoxycarbonyl groups



Boc-protected amino acids **3'c** and **3e-h** were stirred with 2.0 mL of 4 M HCl in dioxane (commercially available) at room temperature for 17 min. The solvent was

evaporated at 35 °C and co-evaporated with CH₃CN. CH₃OH was added until complete dissolution and the product was precipitated with Et₂O.

3'-Deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(L-glutamyl-amido)adenosine (4c). Compound **3c** (27.8 mg, 53.1 μmol) was deprotected using the general procedure to give **4c**² (22.4 mg, quant.); white solid: mp 155 °C (dec); [α]_D²¹ 4.39 (c 0.50, MeOH); IR (KBr) 3425, 3073, 2944, 1663, 1600, 1410, 1216, 1097, 1060 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.08-2.18 (m, 2H), 2.48 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.72 (dd, J = 12.5 and 2.8 Hz, 1H), 3.95 (dd, J = 12.6 and 2.3 Hz), 4.01 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 4.24 (dt, J = 8.4 and 2.5 Hz, 1H), 4.58 (dd, J = 5.5 and 2.0 Hz, 1H), 4.69 (dd, J = 8.4 and 5.5 Hz, 1H), 6.17 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.68 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 26.6, 29.0, 50.8, 52.6, 52.7, 60.4, 74.4, 83.3, 91.0, 91.2, 120.1, 140.2, 145.5, 147.7, 150.0, 169.2, 174.5.

3'-Deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(L-glutaminyl-amido)adenosine (4e). Compound **3e** (28.0 mg, 53.1 μmol) was deprotected using the general procedure to give **4e** (21.9 mg, 89%); white solid: mp 148-150 °C (dec); [α]_D²¹ 4.9 (c 0.35, MeOH); IR (KBr) 3404, 3073, 2942, 1663, 1598, 1410, 1218, 1098, 1061 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.05-2.18 (m, 2H), 2.45 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.40 (br s, 3H), 3.82-4.11 (m, 5H), 4.24 (dt, J = 8.3 and 2.4 Hz, 1H), 4.58 (dd, J = 5.4 and 2.0 Hz, 1H), 4.69 (dd, J = 8.3 and 5.5 Hz, 1H), 6.17 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.68 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 27.0, 30.4, 39.0, 50.8, 52.9, 60.3, 74.4, 83.3, 91.1, 120.0, 140.5, 144.5, 147.4, 149.3, 169.3, 175.7; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₂₇N₈O₅ [M]⁺ 423.2099, found 423.2097.

3'-Deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(DL-phosphinothricyl-amido)adenosine (4f). Compound **3f** (26.9 mg, 48.2 μmol) was deprotected using the general procedure (reaction time was extended to 30 min and acetone was used for the final precipitation step instead of Et₂O) to give **4f** (19.6 mg, 89%); white solid: mp 144-145 °C (dec); [α]_D²¹ -10.3 (c 0.72, MeOH); IR (KBr) 3433, 2927, 1665, 1491, 1412, 1307, 1210, 1100, 1040 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.46, 1.48 (2d, J=13.8 Hz, 3H), 1.78-1.97 (m, 2H), 2.08-2.20 (m, 2H), 2.22-2.34 (m, 2H), 2.90-3.04 (m, 2H), 3.60 (br s, 6H), 3.68-3.78 (m, 1H), 3.94 (br d, J = 11.7 Hz,

² Moser, J.; Lorenz, S.; Hubschwerlen, C.; Rompf, A.; Jahn, D. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30679-30685.

1H), 4.05-4.12 (m, 1H), 4.21-4.27 (m, 1H), 4.56-4.63 (m, 1H), 4.67-4.74 (m, 1H), 6.13, 6.16 (2d, J=1.7 and 1.5Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.63, 8.64 (2s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 13.8 (d, J=90.9Hz), 24.4, 24.9, 39.7, 50.9, 53.2, 60.5, 74.3, 83.6, 91.1, 120.1, 140.1, 145.7, 147.7, 150.2, 186.7; ³¹P NMR (121 MHz, CD₃OD) δ 55.1 and 55.5; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₂₉N₇O₆P [M+H]⁺ 458.1911, found 458.1920.

3'-Deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(L-methionyl-(*R,S*)-sulfoxyde-amido)adenosine (4g).

Compound **3g** (27.0 mg, 49.9 μmol) was deprotected using the general procedure (reaction time was extended to 45 min) to give **4g** (22.9 mg, 96%); white solid: mp 141-142 °C (dec); [α]_D²¹ 10.6 (c 0.27, MeOH); IR (KBr) 3424, 2933, 1660, 1596, 1410, 1217, 1098, 1036 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.25-2.42 (m, 2H), 2.67, 2.69 (2s, 3H), 2.81-2.91 (m, 1H), 2.97-3.10 (m, 1H), 3.70-3.77 (m, 1H), 3.94 (dd, J = 12.4 and 2.5 Hz, 1H), 4.11-4.18 (m, 1H), 4.23-4.28 (m, 1H), 4.59 (dd, J = 5.4 and 2.1 Hz, 1H), 4.67-4.73 (m, 1H), 6.18 (d, J = 2.0Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.67 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 24.7, 25.3, 51.0, 52.2, 60.4, 74.5, 83.2, 83.3, 91.1, 120.1, 140.5, 144.6, 147.5, 149.4, 168.6, 168.7; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₂₈N₇O₅S [M]⁺ 442.1867, found 442.1870.

3'-Deoxy-*N*⁶,*N*⁶-dimethyl-3'-(L-methionyl-sulfone-amido)adenosine (4h). Compound **3h** (33.9 mg, 60.8 μmol) was deprotected using the general procedure to give **4h** (27.6 mg, 92%); white solid: mp 153-155 °C (dec); [α]_D²¹ 2.4 (c 0.58, DMF); IR (KBr) 3424, 2926, 1662, 1601, 1411, 1287, 1131 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 2.35-2.47 (m, 2H), 3.10 (s, 3H), 3.30-3.82 (m, 11H), 3.90 (dd, J = 13.0 and 2.5 Hz, 1H), 4.23-4.31 (m, 2H), 6.17 (d, J = 2.16 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.47 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 23.7, 40.2, 43.5, 49.2, 51.3, 51.9, 60.5, 73.8, 82.6, 90.4, 119.8, 140.8, 145.6, 147.9, 149.1, 169.0; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₂₈N₇O₆S [M]⁺ 458.1816, found 458.1814.

6.8. Annexe

D'autres analogues de la puromycine ont été synthétisés en vue d'inhiber l'aminocyl-ARNt amidotransférase GatCAB d'*Helicobacter pylori* et sont présentés dans cette section. Comme il a déjà été démontré, l'acide aminé porté par les analogues de la puromycine influence grandement le degré d'inhibition (K_i de 4 μM à 4100 μM). C'est pourquoi plusieurs dérivés ont été synthétisés avec de nouveaux acides aminés (section 6.8.1 et 6.8.2). Une étude de la portion nucléoside a également été réalisée en s'inspirant du meilleur inhibiteur obtenu : le 3'-déoxy- N^6,N^6 -diméthyl-3'-(L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine. En premier lieu, un groupement phosphate a été introduit en 5' du nucléoside pour mimer plus étroitement l'ARNt (l'ARNt est une succession de nucléosides liés de 3' à 5' par des phosphates). Par la suite, l'influence du groupement $\text{N}(\text{Me})_2$ a été évaluée en synthétisant l'analogue NH_2 (le 3'-déoxy-3'-(L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine, voir section 6.8.4).

6.8.1. Synthèse de l'acide *N*-Boc homocystéique et de l'acide (*S*)-2-[*N*-(Boc)]-5-(diméthoxy-phosphoryl)-4-oxo-pentanoïque.

L'acide homocystéique **6.1** est protégé au niveau de l'amine avec le Boc_2O et une base (NaHCO_3) pour donner l'acide *N*-Boc homocystéique **6.2** correspondant (schéma 6.2). La synthèse de l'acide (*S*)-2-[*N*-(Boc)]-5-(diméthoxy-phosphoryl)-4-oxo-pentanoïque **6.6** est décrite dans le schéma 6.3. Les deux premières étapes (protection avec le Boc_2O et addition-élimination avec le lithien du diméthylméthylphosphonate) s'inspirent de la littérature.¹ Le produit **6.5** est déprotégé en présence d'une quantité limitée d'acide trifluoroacétique (2.2 équivalents) puis hydrolysé en milieu basique pour donner l'acide (*S*)-2-[*N*-(Boc)]-5-(diméthoxy-phosphoryl)-4-oxo-pentanoïque **6.6**.

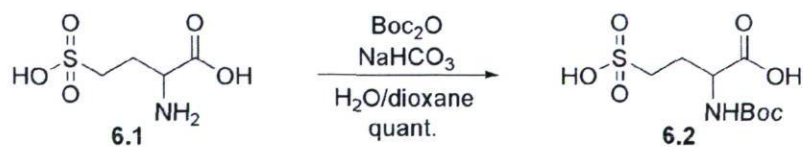


Schéma 6.2. Synthèse de l'acide *N*-Boc homocystéique.

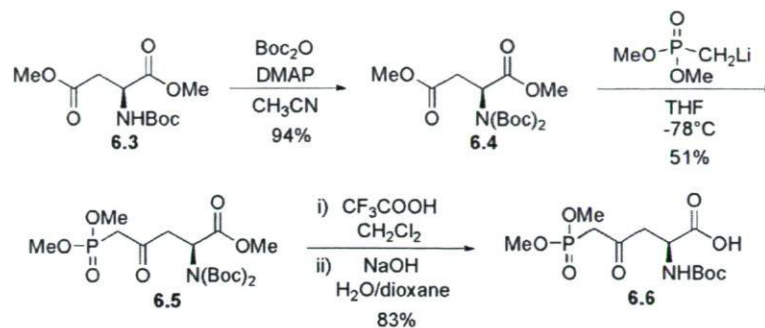


Schéma 6.3. Synthèse de l'acide (S)-2-[N-(Boc)]-5-(diméthoxy-phosphoryl)-4-oxo-pentanoïque.

6.8.2. Synthèse d'analogues de la puromycine (variation de l'acide aminé).

L'approche générale utilisée au schéma 6.4 est identique à celle qui a été présentée préalablement (couplage de l'acide aminé protégé avec le nucléoside **6.10** en présence de l'agent de condensation EDC puis déprotection du *N*-Boc avec HCl dans le dioxane). Le diméthylphosphonate **6.12** a été déméthylé avec le bromure de lithium à 65°C pour générer le produit **6.13**. L'ester **6.14** a été converti en hydrazide **6.15** par un excès d'hydrazine dans le méthanol.

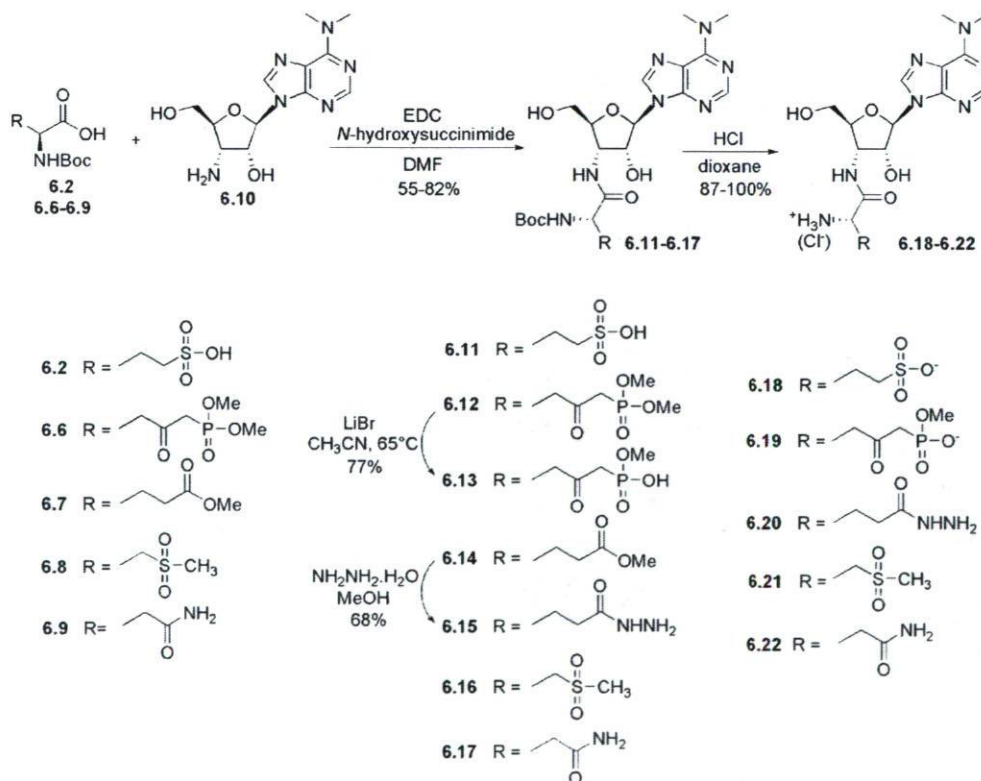


Schéma 6.4. Synthèse d'analogues de la puromycine (variation de l'acide aminé).

6.8.3. Synthèse du 3'-déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-5'-méthylphosphoryl-3'-(*L*-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.26.

Le 3'-déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(*L*-méthionyl-sulfone-amido) adénosine **6.23** réagit avec le diméthylchlorophosphate en présence de *N*-méthylimidazole pour donner régiosélectivement le produit **6.24** substitué en 5' (schéma 6.5). Cette méthode est une adaptation de la littérature et n'a jamais été appliquée aux nucléosides.²⁻³ Le produit **6.24** est déméthylé avec LiBr / CH₃CN puis le groupement *N*-Boc est déprotégé dans les conditions habituelles. Le produit **6.26** est précipité dans l'éther diéthylique sous la forme du zwitterion.

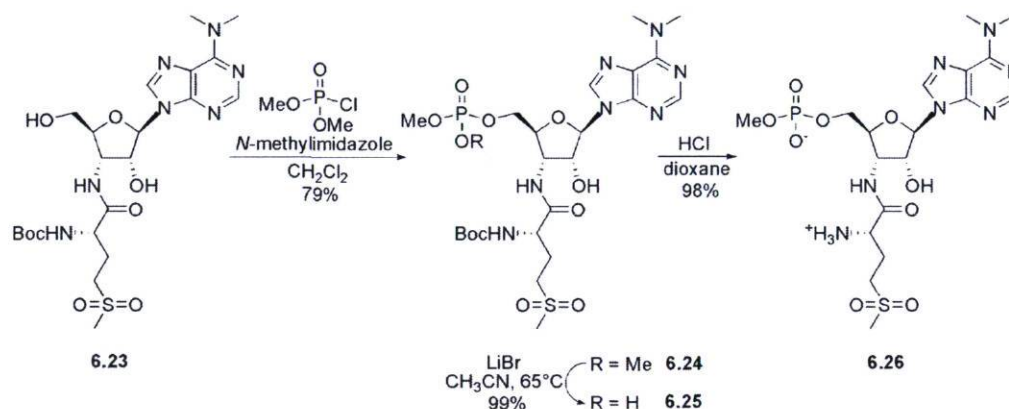


Schéma 6.5. Synthèse du 3'-déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-5'-méthylphosphoryl-3'-(*L*-méthionyl-sulfone-amido) adénosine.

6.8.4. Synthèse du 3'-déoxy-3'-(*L*-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.30.

Le 3'-déoxy-3'-(*L*-méthionyl-sulfone-amido) adénosine **6.30** a été synthétisé à partir du 3'-déoxy-3'-amino-adénosine **6.27** et de la *N*-Boc-méthionine sulfone **6.28** par l'intermédiaire d'un couplage puis d'une déprotection (schéma 6.6).

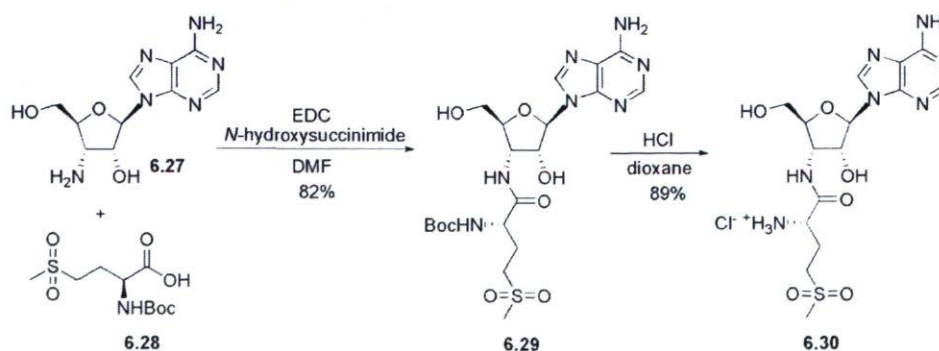


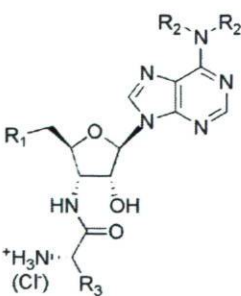
Schéma 6.6. Synthèse du 3'-déoxy-3'-(*L*-méthionyl-sulfone-amido) adénosine.

6.8.5. Résultats

Les inhibiteurs ont été évalués sur l'amidotransférase GatCAB d'*Helicobacter pylori* (tableau 6.2). L'hydrazide **6.20** est un bon inhibiteur de l'AdT mais sa faible solubilité dans l'eau est limitante pour la détermination du K_i (un IC_{50} de 50 μM a été estimé). De manière surprenante, la sulfone **6.21** est un mauvais inhibiteur, en dépit du fait qu'elle est un dérivé de la 3'-déoxy- N^6,N^6 -diméthyl-3'-(L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine **6.23** ($K_i = 4 \mu\text{M}$). La sulfone **6.21** est un analogue de l'état de transition de l'étape transamidase permettant la conversion du β -phosphoryl-Asp-ARNt^{Asn} en Asn-ARNt^{Asn}.

L'ajout d'un groupement « méthyl-phosphoryl » (composé **6.26**) diminue l'affinité pour l'AdT ($K_i = 100 \mu\text{M}$ par rapport à 4 μM pour la 3'-déoxy- N^6,N^6 -diméthyl-3'-(L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine **6.23**). La 3'-déoxy-3'-(L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine **6.30**, malgré sa plus grande ressemblance avec le substrat naturel de l'AdT, est un moins bon inhibiteur ($K_i = 120 \mu\text{M}$) que son composé méthylé correspondant **6.23**.

Tableau 6.2. Inhibition de l'aminoacyl-ARNt amidotransférase GatCAB d'*Helicobacter pylori* avec les nouveaux analogues de la puromycine.

Analogue de la puromycine	Constante d'inhibition (K_i) (μM)
 6.18 $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{Me}$ $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NH}_2$	430
6.19 $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{Me}$ $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)CH}_2\text{P(=O)(OMe)O}^-$	60
6.20 $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{Me}$ $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)NHNH}_2$	50 (IC_{50})
6.21 $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{Me}$ $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$	> 1000
6.22 $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{Me}$ $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)NH}_2$	84
6.26 $R_1 = \text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OMe})\text{O}^-$ $R_2 = \text{Me}$ $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$	100
6.30 $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$	120

6.8.6. Références

- 1) Padrón, J. M.; Kokotos, G.; Martín, T.; Markidis, T.; Gibbons, W. A.; Martín, V. S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 3381-3394.
- 2) Cox, R. J.; Gibson, J. S.; Hadfield, A. T. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2255-2260.
- 3) Xu, Y.; Qian, L.; Ponsler, A. V.; McIntyre, T. M.; Prestwich, G. D. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 43-49.
- 4) Grijalvo, S.; Llebaria, A.; Delgado, A. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 2737-2751.

CHAPITRE 7

Inhibition de l'aminocyl-ARNt amidotransférase d'*Helicobacter pylori* par des analogues du chloramphénicol**Inhibition of *Helicobacter pylori* aminocyl-tRNA amidotransferase by chloramphenicol analogues**

Christian Balg^a, Maria De Mieri^c, Jonathan L. Huot^b, Sébastien P. Blais^b, Jacques Lapointe^b, Robert Chênevert^{a,*}

^a*Département de Chimie, PROTEO, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6*

^b*Département de Biochimie et de Microbiologie, PROTEO, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6*

^c*Dipartimento di Chimica, Biochimica e Biotecnologie per la Medicina, Università degli Studi di Milano, 20133 Milano, Italy*

Article publié dans la revue *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 7868-7872.

7.1. Préambule

J'ai contribué à cette publication au niveau de la synthèse des inhibiteurs de l'aminocyl-ARNt amidotransférase d'*Helicobacter pylori*. J'ai également participé à la préparation des échantillons, à l'écriture du manuscrit et à l'élaboration des schémas.

7.2. Résumé

Des études génomiques récentes ont révélé l'absence de glutaminyl-ARNt synthétase et/ou d'asparaginyl-ARNt synthétase chez plusieurs bactéries et dans l'ensemble des archées. Pour ces microorganismes, le glutaminyl-ARNt^{Gln} et/ou l'asparaginyl-ARNt^{Asn} sont synthétisés par une voie indirecte qui implique l'amidation de la chaîne latérale des ARNt incorrectement appariés glutamyl-ARNt^{Gln} (Glu-ARNt^{Gln}) et aspartyl-ARNt^{Asn} (Asp-ARNt^{Asn}) par une amidotransférase. Plusieurs analogues du chloramphénicol ont été synthétisés et étudiés comme inhibiteurs de l'aminocyl-ARNt amidotransférase d'*Helicobacter pylori*. Le composé **7a** est l'inhibiteur compétitif de l'activité transamidase le plus actif par rapport à l'Asp-ARNt^{Asn} ($K_m = 2 \mu\text{M}$), avec une valeur de K_i de $27 \mu\text{M}$.

7.3. Abstract

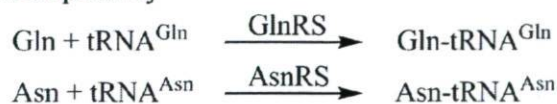
Genomic studies revealed the absence of glutaminyl-tRNA synthetase and/or asparaginyl-tRNA synthetase in many bacteria and all known archaea. In these microorganisms, glutaminyl-tRNA^{Gln} (Gln-tRNA^{Gln}) and/or asparaginyl-tRNA^{Asn} (Asn-tRNA^{Asn}) are synthesized via an indirect pathway involving side chain amidation of misacylated glutamyl-tRNA^{Gln} (Glu-tRNA^{Gln}) and/or aspartyl-tRNA^{Asn} (Asp-tRNA^{Asn}) by an amidotransferase. A series of chloramphenicol analogues have been synthesized and evaluated as inhibitors of *Helicobacter pylori* GatCAB amidotransferase. Compound **7a** was identified as the most active competitive inhibitor of the transamidase activity with respect to Asp-tRNA^{Asn} ($K_m = 2 \mu\text{M}$), with a K_i value of $27 \mu\text{M}$.

7.4. Introduction

The specific aminoacylation of tRNAs is essential for the faithful translation of the genetic information into proteins. Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are the enzymes that catalyze the esterification reaction between an amino acid and its cognate tRNA.¹⁻² In the cytoplasm of eucaryotic cells, the pairing of glutamine and asparagine with their corresponding tRNA proceeds through a direct pathway involving a glutaminyl-tRNA synthetase (GlnRS) and an asparaginyl-tRNA synthetase (AsnRS) respectively (Figure 7.1A). Genomic studies revealed the absence of GlnRS and/or AsnRS in all known archaea, in many bacteria, and in some organelles. The alternative indirect pathway for the formation of Gln-tRNA^{Gln} and Asn-tRNA^{Asn} involves the misacylation of tRNA^{Gln} with Glu (or tRNA^{Asn} with Asp) by a nondiscriminating aminoacyl-tRNA synthetase (ND-aaRS) followed by the transamidation of the misacylated aa-tRNA by an amidotransferase (AdT) (Figure 7.1B).³⁻⁴

Two types of AdT are found in nature, a heterotrimeric (GatCAB) and a heterodimeric protein (GatDE). GatCAB uses both Glu-tRNA^{Gln} and Asp-tRNA^{Asn} as substrates and is present in bacteria, archaea and some organelles, while GatDE functions solely as a Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase and is found only in archaea.⁵ Crystal structures of GatCAB and GatDE have been determined recently.⁶⁻⁹

A) Direct pathway



B) Indirect pathway

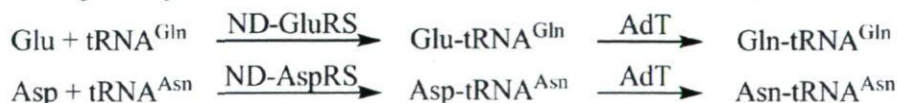


Figure 7.1. Glutaminyl-tRNA and asparaginyl-tRNA biosynthetic pathways. ND-aaRS = nondiscriminating aminoacyl-tRNA synthetase; AdT = amidotransferase.

The transamidation of the misacylated Glu-tRNA^{Gln} and/or Asp-tRNA^{Asn} by the GatCAB-type aminoacyl-tRNA amidotransferase (AdT) involves three distinct events (Figure 7.2). Glutamine is hydrolysed in the GatA subunit serine-based glutaminase site to generate ammonia, which reaches GatB through a molecular tunnel. In the GatB subunit, the side-chain carboxyl group of the misacylated-tRNA is activated by ATP to form a phosphoryl-Glu-tRNA^{Gln} or a phosphoryl-Asp-tRNA^{Asn} intermediate (kinase step). In the final transamidase step, the enzyme-bound ammonia reacts with the high-energy mixed anhydride to yield the corresponding amide side-chain (Gln-tRNA^{Gln} or Asn-tRNA^{Asn}). The small GatC subunit wraps around the interface of the A- and B-subunits, suggesting that it may stabilize the complex.

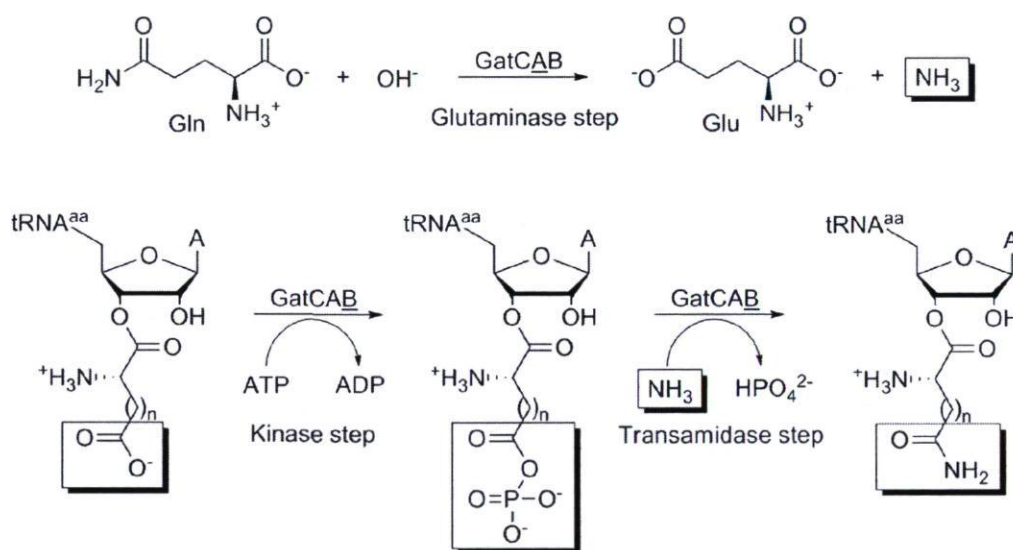


Figure 7.2. Reaction mechanism of GatCAB aminoacyl-tRNA amidotransferase. A = Adenine; aa = Asn, n = 1; aa = Gln, n = 2. For each of the three reactions represented here, the catalysis takes place in the subunit whose symbol (A or B) is underlined in GatCAB.

For bacteria lacking a GlnRS or AsnRS, AdT activity is essential for protein biosynthesis.¹⁰ Therefore, inhibition of this enzyme could provide a novel basis for the development of selective antimicrobial agents.¹¹ Only a few AdT inhibitors have been reported so far. Some analogs of ATP were useful to study the reaction mechanism.¹² Glutamyl- γ -boronate derivatives were evaluated as serine inactivators in the AdT-glutaminase active site; these inhibitors provided potent inhibition *in vitro* and displayed antibacterial activities for many AdT-dependent bacteria.¹³ Recently, we reported the inhibition of *Helicobacter pylori* GatCAB aminoacyl-tRNA amidotransferase by

puromycin (**1**, Figure 7.3) analogues.¹⁴⁻¹⁵ Compound **2** was found to have the most potent inhibitory activity against GatCAB ($K_i = 4 \mu\text{M}$ with respect to Asp-tRNA^{Asn}). Our strategy was based on the premise that the sulfone moiety mimics the transition state in the transamidation reaction (last step in Figure 7.2).

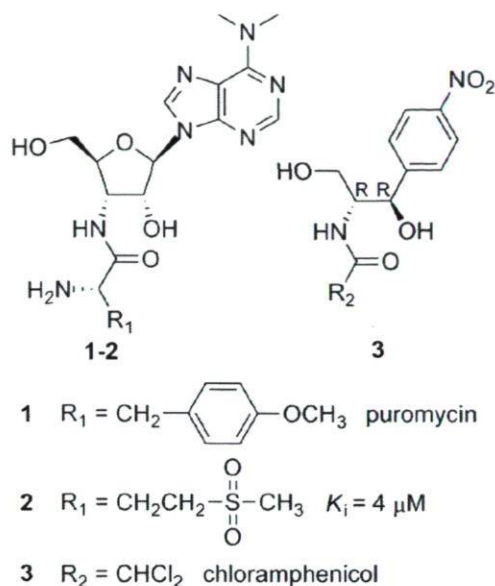


Figure 7.3. Chemical structures of puromycin **1**, AdT inhibitor **2** and chloramphenicol **3**.

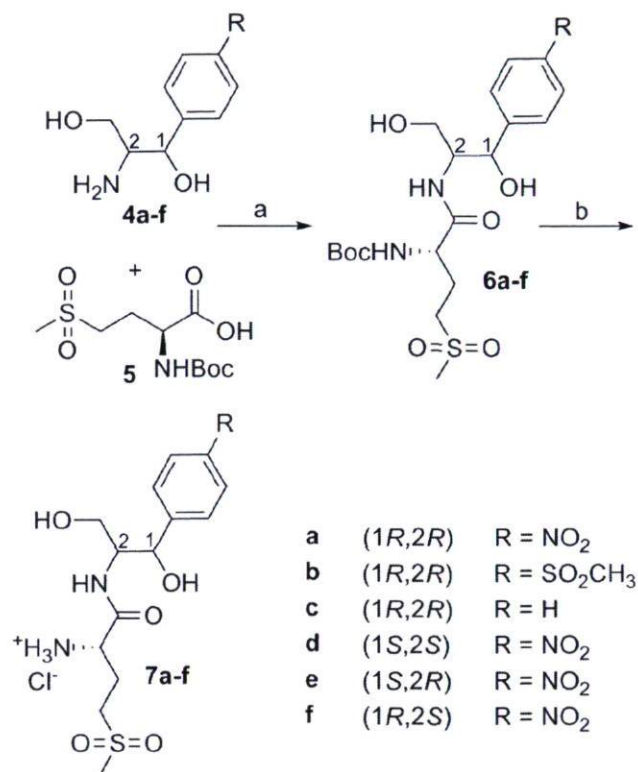
The antibiotic chloramphenicol **3** inhibits protein synthesis by binding to the peptidyl transferase region of the ribosome, and overlaps the binding site of puromycin.¹⁶ In the search of novel AdT inhibitors, this similarity and the structural relationship of the two compounds led us to explore the potential of L-methionine-sulfone derivatives of chloramphenicol as inhibitors of GatCAB aminoacyl-tRNA amidotransferase.

7.5. Results and discussion

7.5.1. Synthesis of chloramphenicol derivatives (7a-f)

The synthesis of chloramphenicol analogues **7a-f** is outlined in Scheme 7.1. Amines **4a-f** were condensed with commercially available *N*-Boc-methionine-sulfone **5** under standard conditions using 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)/*N*-hydroxysuccinimide in DMF. Amino-alcohol **4a-d** are commercially available whereas **4e** and **4f** were prepared from **4a** and **4d** respectively using a literature

procedure.¹⁷ Treatment of **6a-f** with 4 M HCl/dioxane resulted in cleavage of the *N*-tert-butoxycarbonyl group to provide the corresponding amides **7a-f**. These compounds were isolated after precipitation in Et₂O as the hydrochloride salts.

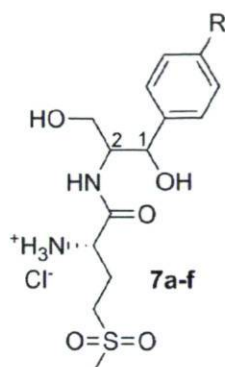


Scheme 7.1. Reagents and conditions: (a) EDC, *N*-hydroxysuccinimide, DMF, 24 h (b) 4 M HCl / dioxane, 40 min.

7.5.2. Inhibition of *Helicobacter pylori* GatCAB amidotransferase (AdT)

Chloramphenicol **3** and analogs **7a-f** were evaluated for *in vitro* inhibitory activity against *H. pylori* GatCAB aminoacyl-tRNA amidotransferase (Table 7.1). Enzyme production and kinetic experiments were carried out as previously described.¹⁴ Competitive inhibition with respect to Asp-tRNA^{Asn} was observed for all compounds.

Table 7.1. Inhibition of *H. pylori* GatCAB aminoacyl-tRNA amidotransferase (AdT) by chloramphenicol and several analogues.



Compound	R	Stereochemistry	K_i (μM) \pm standard error
Chloramphenicol 3	NO_2	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)	1850 ± 550
7a	NO_2	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)	27 ± 6
7b	SO_2CH_3	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)	120 ± 24
7c	H	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)	400 ± 100
7d	NO_2	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)	160 ± 20
7e	NO_2	(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)	2800 ± 500
7f	NO_2	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	370 ± 40

Standard errors were calculated by curve-fitting of our data, using KaleidaGraph 4.0 (Synergy Software). Values calculated from averages of two distinct experiments (four, for **7a**), weighting by inverse variance.¹⁸

The parent compound chloramphenicol **3** is a very weak inhibitor of GatCAB ($K_i \approx 1.9$ mM). Replacement of the dichloroacetyl moiety of chloramphenicol by L-methionyl-sulfone considerably enhances the activity and **7a** was identified as the most active inhibitor with a K_i value of 27 μM . Replacement of the *para*-nitro group by a sulfone (**7b**, related to thiamphenicol) or a hydrogen (**7c**) decreased the ability to inhibit GatCAB ($K_i = 120$ and 400 μM , respectively). In order to complete this structure-activity relationship study, we evaluated the effect of the configurations at C-1 and C-2 stereogenic centers on the activity. The (1*S*,2*S*) enantiomer **7d** exhibited a moderate 5-fold decrease in activity ($K_i = 160$ μM for **7d** vs 27 μM for **7a**). Diastereoisomers (1*S*,2*R*)-**7e** and (1*R*,2*S*)-**7f** were less active derivatives ($K_i = 2.8$ mM and 370 μM , respectively) and, in particular, the loss in potency was more marked for the (1*S*,2*R*) analogue than for the (1*R*,2*S*) isomer.

The structural similarity of puromycin, chloramphenicol and the aminoacyl-adenosyl terminus of tRNA has already been stressed. Aminoacyl analogs of chloramphenicol were evaluated as inhibitors of the peptide bond formation in a ribosomal cell-free system derived from *E. coli*.¹⁹⁻²¹ There is however a major difference between the ribosomal peptidyl transferase and the amidotransferase reactions. In the peptidyl transfer, the ester (α -position) of the P-site peptidyl-tRNA is attacked by the α -amino group of the A-site aminoacyl-tRNA. In contrast, the aminoacyl-tRNA amidotransferase reaction is the simple conversion of the side chain carboxylic acid (β -position for Asp, γ -position for Glu) into an amide (Asn or Gln) while the amino acid is still attached to a tRNA (pretranslational modification). The enzyme is equally efficient in transamidation of both Asp-tRNA^{Asn} and Glu-tRNA^{Gln}.³ Although the detailed interactions of inhibitors **7a-f** with GatCAB are yet to be defined, the sulfone moiety of **7a** can be considered as a stable analogue of the transition state in the last step of the transamidation process, where the carbonyl to be attacked by ammonia is replaced by a tetrahedral sulfur atom with a methyl group mimicking ammonia (Figure 7.4). Various sulfur or phosphorus-containing derivatives have been proposed as analogues of the tetrahedral intermediate formed during enzymatic reactions involving hydrolysis or formation of amide functionalities.²² The *p*-nitro group and the (1*R*,2*R*) stereochemistry of chloramphenicol combined with the L-methionyl-sulfone moiety appeared to be optimal in this series. Given the much smaller number of possible contacts between **7a** and GatCAB when compared to those possible for Asp-tRNA^{Asn}, it is noteworthy that the K_i for **7a** is only ten times greater than the K_m for the natural substrate.

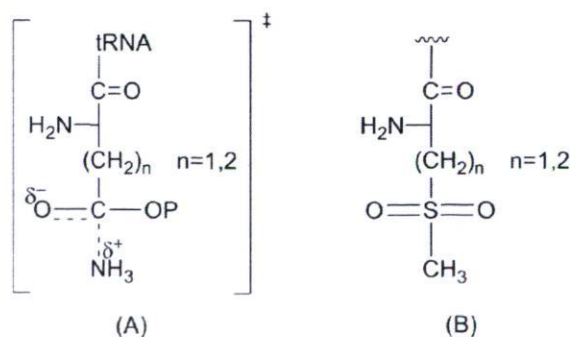


Figure 7.4. Analogy between a putative transition state of the transamidase step (A) and the sulfone side chain of inhibitors **7a-f** (B).

Chloramphenicol analogues **7a-f** represent a new class of AdT inhibitors and may provide the basis for the design of other low-molecular weight inhibitors. Further investigation is currently underway to find more potent inhibitors of GatCAB amidotransferase based on compound **7a**.

7.6. Experimental

7.6.1. General

Chemical reagents were purchased from Aldrich-Sigma Chemical Company. Flash column chromatography was carried out using 40-63 μM (230-400 mesh) silica gel. Optical rotations were measured using a JASCO DIP-360 digital polarimeter (c as g of compound per 100 mL). Infrared spectra were recorded on a Bomem MB-100 spectrometer. NMR spectra were recorded on a Varian Inova AS400 spectrometer (400 MHz). Mass spectra were obtained on an Agilent 6210 ESI TOF mass spectrometer.

7.6.2. Typical procedure for preparation of amides **6a-f**

Amine **4a** (25.0 mg, 118 μmol), *N*-Boc-L-methionine-sulfone **5** (36.5 mg, 130 μmol), *N*-hydroxysuccinimide (14.9 mg, 130 μmol) and EDC (27.1 mg, 141 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (1.0 mL). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solvent was coevaporated with toluene and the residue was purified by flash chromatography (7-8% MeOH/CH₂Cl₂) to yield **6a** (42.3 mg, 76%).

7.6.2.1. (1*R*,2*R*)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(*N*^α-Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6a**).** White solid; mp 77-79°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -43.5 (c 0.84, CH₂Cl₂); IR (KBr) 3400, 2979, 1666, 1521, 1349, 1294, 1164, 1129 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.42 (s, 9H), 1.85-1.97 (m, 1H), 1.97-2.07 (m, 1H), 2.89 (s, 3H), 3.01 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 3.55 (dd, J = 10.8 and 6.5 Hz, 1H), 3.74 (dd, J = 10.8 and 6.9 Hz, 1H), 4.06-4.15 (m, 2H), 5.07 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.14 (d, J = 8.8 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 25.0, 27.5, 39.3, 50.6, 53.2, 56.5, 61.4, 70.4, 79.8, 123.0, 127.2, 147.3, 150.6, 156.4, 172.3; HRMS (ESI) calculated for C₁₉H₂₉N₃O₉SNa [M+Na]⁺ 498.1517, found 498.1514.

7.6.2.2. (1R,2R)-1-(4-Methylsulfonylphenyl)-2-(*N*^α-Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6b). White solid; yield 52%; mp 90-92°C; $[\alpha]_D^{21}$ -32.6 (c 0.60, MeOH); IR (KBr) 3370, 2931, 1668, 1523, 1299, 1149 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.44 (s, 9H), 1.85-1.96 (m, 1H), 1.96-2.07 (m, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.98-3.06 (m, 2H), 3.07 (s, 3H), 3.53 (dd, $J = 10.7$ and 6.4 Hz, 1H), 3.72 (dd, $J = 10.8$ and 7.0 Hz, 1H), 4.05-4.13 (m, 2H), 5.04-5.08 (m, 1H), 7.63 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.86 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 24.9, 27.5, 39.4, 43.4, 50.7, 53.5, 56.5, 61.3, 70.4, 79.9, 127.0, 127.2, 139.6, 149.4, 156.5, 172.3; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 531.1441, found 531.1448.

7.6.2.3. (1R,2R)-1-Phenyl-2-(*N*^α-Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6c). White solid; yield 81%; mp 55-57°C; $[\alpha]_D^{21}$ -41.1 (c 0.38, MeOH); IR (KBr) 3387, 2979, 1694, 1664, 1521, 1292, 1165, 1128, 1053 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.44 (s, 9H), 1.89-2.02 (m, 1H), 2.02-2.14 (m, 1H), 2.89 (s, 3H), 2.96-3.10 (m, 2H), 3.44 (dd, $J = 10.0$ and 6.4 Hz, 1H), 3.63 (dd, $J = 10.2$ and 6.2 Hz, 1H), 4.01-4.09 (m, 1H), 4.09-4.18 (m, 1H), 7.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.29 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 25.0, 27.5, 39.3, 50.6, 53.5, 57.1, 61.2, 71.4, 79.9, 126.2, 127.3, 128.1, 142.4, 156.5, 172.3; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 453.1666, found 453.1669.

7.6.2.4. (1S,2S)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(*N*^α-Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6d). White solid; yield 87%; mp 82-85°C; $[\alpha]_D^{21}$ -0.58 (c 0.90, MeOH); IR (KBr) 3409, 2979, 1665, 1521, 1350, 1294, 1164, 1128 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.42 (s, 9H), 1.70-1.83 (m, 1H), 1.93-2.05 (m, 1H), 2.78-2.97 (m, 5H), 3.57 (dd, $J = 10.9$ and 5.9 Hz, 1H), 3.74 (dd, $J = 10.8$ and 7.3 Hz, 1H), 4.08 (dd, $J = 8.5$ and 5.2 Hz, 1H), 4.11-4.17 (m, 1H), 5.10 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 8.16 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 25.3, 27.5, 39.3, 50.6, 53.0, 56.6, 61.4, 70.1, 79.8, 123.1, 127.1, 147.4, 150.8, 156.4, 172.2; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 498.1517, found 498.1511.

7.6.2.5. (1S,2R)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(*N*^α-Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6e). White solid; yield 84%; mp 171-173°C (dec); $[\alpha]_D^{21}$ -18.4 (c 0.96, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1); IR (KBr) 3426, 3342, 2982, 1681, 1658, 1522, 1348, 1285, 1163,

1129, 1051 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.39 (s, 9H), 1.83-1.95 (m, 1H), 1.95-2.08 (m, 1H), 2.89 (s, 3H), 3.03 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 3.64 (dd, $J = 10.9$ and 2.8 Hz, 1H), 3.78 (dd, $J = 10.8$ and 6.4 Hz, 1H), 4.00-4.14 (m, 2H), 4.80 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 8.24 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 25.1, 27.4, 39.3, 50.6, 53.3, 56.6, 60.3, 72.3, 79.8, 123.0, 127.8, 147.5, 150.0, 156.4, 172.0; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 498.1517, found 498.1530.

7.6.2.6 (1R,2S)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(*N*^α-Boc-L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (6f). White solid; yield 72%; mp 175-176°C (dec); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -10.8 (c 1.70, MeOH); IR (KBr) 3424, 3357, 2978, 1681, 1660, 1523, 1350, 1294, 1166, 1131, 1053 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.43 (s, 9H), 1.64-1.74 (m, 1H), 1.80-1.88 (m, 1H), 2.87 (s, 3H), 2.83-2.89 (m, 2H), 3.70 (dd, $J = 11.2$ and 3.7 Hz, 1H), 3.86 (dd, $J = 11.3$ and 5.5 Hz, 1H), 4.03 (dd, $J = 8.5$ and 5.1 Hz, 1H), 4.15-4.19 (m, 1H), 4.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 8.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 26.5, 28.7, 40.6, 51.8, 54.4, 57.6, 61.9, 73.4, 81.1, 124.6, 129.3, 149.0, 151.4, 157.7, 173.1; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 498.1517, found 498.1505.

7.6.3. Typical procedure for the cleavage of the *N*-tert-butoxycarbonyl groups

A solution of compound **6a** (41.9 mg, 88.1 μmol) in 4 M HCl/dioxane (2.0 mL) was stirred at room temperature for 40 min. The solvent was coevaporated under reduced pressure with MeOH. The residue was dissolved in a minimum of EtOH (2.0 mL) and the product was precipitated by the addition of Et₂O (20 mL). The product was collected by filtration and washed with Et₂O to give **7a** (30.3 mg, 84%).

7.6.3.1. (1R,2R)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7a). White solid; mp 140-143°C (dec); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ 14.6 (c 0.19, MeOH/H₂O 1:1); IR (KBr) 3386, 2926, 1683, 1520, 1351, 1286, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 2.21-2.39 (m, 2H), 2.99 (s, 3H), 3.27 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.54 (dd, $J = 10.9$ and 7.4 Hz, 1H), 3.77 (dd, $J = 10.9$ and 5.4 Hz, 1H), 4.03 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.17-4.25 (m, 1H), 5.02 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.17 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 24.4, 39.6, 49.1, 51.5, 57.4, 61.6, 70.7, 123.1, 127.3, 147.5, 150.4, 167.8; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 376.1173, found 376.1184.

7.6.3.2. (1*R*,2*R*)-1-(4-Methylsulfonylphenyl)-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7b). White solid; yield quant.; mp 135-137°C (dec); $[\alpha]_D^{21}$ 8.3 (c 0.39, MeOH); IR (KBr) 3434, 2924, 1679, 1286, 1147 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 2.21-2.40 (m, 2H), 2.99 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.28 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 3.52 (dd, $J = 10.9$ and 7.3 Hz, 1H), 3.75 (dd, $J = 11.0$ and 5.4 Hz, 1H), 4.05 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.17-4.23 (m, 1H), 5.00 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 24.4, 39.6, 43.2, 49.1, 51.5, 57.5, 61.5, 70.8, 127.2, 127.3, 139.8, 149.2, 167.8; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 409.1098, found 409.1099.

7.6.3.3. (1*R*,2*R*)-1-Phenyl-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7c). White solid; yield quant.; mp 120-125°C (dec); $[\alpha]_D^{21}$ 0.65 (c 0.48, MeOH); IR (KBr) 3425, 2923, 1684, 1561, 1496, 1285, 1133, 1056 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 2.24-2.43 (m, 2H), 2.99 (s, 3H), 3.25-3.35 (m, 2H), 3.41 (dd, $J = 10.9$ and 7.2 Hz, 1H), 3.61 (dd, $J = 11.0$ and 4.6 Hz, 1H), 4.07 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.12-4.19 (m, 1H), 4.81 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) 24.3, 39.7, 49.2, 51.7, 57.9, 61.2, 72.1, 126.4, 127.6, 128.2, 142.2, 167.9; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 331.1322, found 331.1319.

7.6.3.4. (1*S*,2*S*)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7d). White solid; yield 91%; mp 85-90°C (dec); $[\alpha]_D^{21}$ 19.4 (c 0.53, MeOH); IR (KBr) 3426, 2925, 1679, 1519, 1351, 1285, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.95-2.14 (m, 2H), 2.71-2.82 (m, 1H) 2.84-2.94 (m, 4H), 3.60 (dd, $J = 10.9$ and 6.3 Hz, 1H), 3.78 (dd, $J = 10.9$ and 6.5 Hz, 1H), 4.00 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.23-4.30 (m, 1H), 5.09 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 8.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 24.3, 39.6, 49.2, 51.6, 57.0, 61.5, 70.2, 123.3, 127.1, 147.5, 150.8, 167.7; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 376.1173, found 376.1167.

7.6.3.5. (1*S*,2*R*)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7e). White solid; yield 81%; mp 185-190°C (dec); $[\alpha]_D^{21}$ 18.0 (c 0.58, MeOH); IR (KBr) 3351, 2927, 1683, 1519, 1351, 1285, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 2.20-2.40 (m, 2H), 2.98 (s, 3H), 3.27 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.63-3.74 (m, 2H), 3.99 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.15-4.22 (m, 1H), 4.88 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 24.6, 39.6, 49.1, 51.6, 57.3, 59.8, 72.4, 123.2, 127.5,

147.6, 149.9, 167.6; HRMS (ESI) calculated for $C_{14}H_{22}N_3O_7S$ $[M+H]^+$ 376.1173, found 376.1186.

7.6.3.6. (1*R*,2*S*)-1-(4-Nitrophenyl)-2-(L-methionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol (7f).

White solid; yield 75%; mp 165-170°C (dec); $[\alpha]_D^{21}$ -1.8 (c 1.00, MeOH); IR (KBr) 3409, 2925, 1683, 1520, 1352, 1286, 1135 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.88-2.09 (m, 2H), 2.70-2.90 (m, 2H), 2.92 (s, 3H), 3.72-3.86 (m, 2H), 3.90-3.99 (m, 1H), 4.23-4.33 (m, 1H), 4.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 8.22 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 25.2, 40.7, 50.2, 52.8, 57.5, 61.7, 73.1, 124.5, 129.2, 148.9, 150.9, 168.4; HRMS (ESI) calculated for $C_{14}H_{22}N_3O_7S$ $[M+H]^+$ 376.1173, found 376.1185.

7.6.4. Typical enzyme assay

Competitive inhibition of *H. pylori* AdT by compound **7a** (Figure 7.5), with respect to Asp-tRNA^{Asn}, was characterized in 50 mM Hepes-KOH pH 7, 15 mM $MgCl_2$, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM ATP, and 1.28 mM L-glutamine, 0.50-2.00 μM Asp-tRNA^{Asn} and 6 nM AdT. V_0 is the uninhibited rate of product formation under these conditions, V_{max} the maximum rate, S the substrate concentration, V_i the inhibited rate and I the inhibitor concentration. According to Michaelis-Menten, in the absence of inhibitor, $V_0 = (V_{max}S) / (S + K_m)$, while in the presence of a competitive inhibitor, the reaction rate is $V_i = (V_{max}S) / (S + K_m (1 + I / K_i))$. Therefore, $V_i / V_0 = (S + K_m) / (S + K_m (1 + I / K_i))$. Curvefitting of the data to this equation was used to identify the competitive nature of this inhibition with respect to Asp-tRNA^{Asn}, and to calculate the K_i value. In all cases (except for compound **7e** which was poorly soluble) the K_i values obtained (Table 7.1) were within the range of the inhibitor concentrations tested: chloramphenicol: 125-2000 μM ; **7a**: 5-1000 μM ; **7b**: 10-1660 μM ; **7c**: 100-1660 μM ; **7d**: 60-1000 μM ; **7e**: 60-1000 μM ; **7f**: 60-1000 μM .

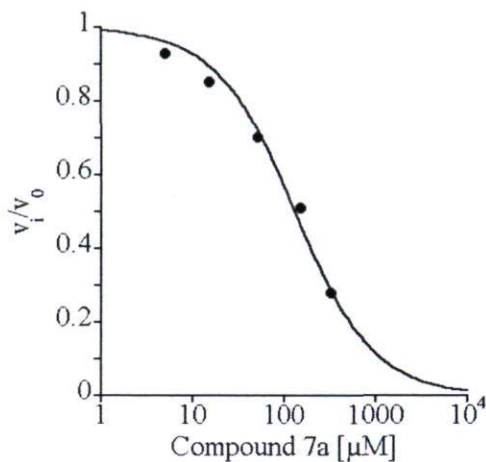


Figure 7.5. Compound **7a** is a competitive inhibitor of *H. pylori* AdT with respect to *H. pylori* Asp-tRNA^{Asn}. A K_i of $27 \pm 6 \mu\text{M}$ was obtained by fitting the data points to the competitive inhibition equation described above for four experiments, and the calculated values were weighted by inverse variance.

7.7. Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the “Fonds de recherche sur la nature et les technologies, Québec (FQRNT)”. C. B. and J. H. thank NSERC and FQRNT for graduate scholarships, respectively.

7.8. References

- 1) Ibba, M; Francklyn, C.; Cusack, S., Eds. *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*. Eureka.com/Landes Bioscience: Georgetown, TX, 2005.
- 2) Lapointe, J.; Brakier-Gingras, L., Eds. *Translation Mechanisms*. Landes Biosciences/Eureka.com and Kluwer Academic/Plenum Publishers: 2003.
- 3) Huot, J. L.; Lapointe, J.; Chênevert, R.; Bailly, M.; Kern, D. Glutaminyl-tRNA and Asparaginyl-tRNA Biosynthetic Pathways. In *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*; Mander, L.; Liu H. W., Eds.; Elsevier: Oxford, 2010; Vol. 5, pp. 383-431.
- 4) Feng, L.; Tumbula-Hansen, D.; Min, B.; Namgoog, S.; Salazar, J. C.; Orellana, O.; Söll, D. Transfer RNA-dependant amidotransferases: Key enzymes for Asn-tRNA and Gln-tRNA synthesis in nature, in *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*; Ibba, M., Francklyn, C., Cusack, S., Eds. Landes Biosciences: Georgetown, TX, 2005, pp. 314-319.
- 5) Sheppard, K.; Sherrer, R. L.; Söll, D. *J. Mol. Biol.* **2008**, *377*, 845-853.

- 6) Schmitt, E.; Panvert, M.; Blanquet, S.; Mechulam, Y. *Structure* **2005**, *13*, 1421-1433.
- 7) Nakamura, A.; Yao, M.; Chimnaronk, S.; Sakai, N.; Tanaka, I.; *Science* **2006**, *312*, 1954-1958.
- 8) Oshikane, H.; Sheppard, K.; Fukai, S.; Nakamura, Y.; Ishitani, R.; Numata, T.; Sherrer, R. L.; Feng, L.; Schmitt, E.; Panvert, M.; Blanquet, S.; Mechulam, Y.; Söll, D.; Nureki, O. *Science* **2006**, *312*, 1950-1954.
- 9) Wu, J.; Bu, W.; Sheppard, K.; Kitabatake, M.; Kwon, S.-T.; Söll, D.; Smith, J. L. *J. Mol. Biol.* **2009**, *391*, 703-716.
- 10) Curnow, A. W.; Hong, K.-W.; Yuan, R.; Kim, S.-I.; Martins, O.; Winkler, W.; Henkin, T. M.; Söll, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 11819-11826.
- 11) Ataide, S. F.; Ibba, M. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 285-297.
- 12) Horiuchi, K. Y.; Harpel, M. R.; Shen, L.; Luo, Y.; Rogers, K. C.; Copeland, R. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6450-6457.
- 13) Decicco, C. P.; Nelson, D. J.; Luo, Y.; Shen, L.; Horiuchi, K. Y.; Amsler, K. M.; Foster, L. A.; Spitz, S. M.; Merrill, J. J.; Sizemore, C. F.; Rogers, K. C.; Copeland, R. A.; Harpel, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2561-2564.
- 14) Huot, J. L.; Balg, C.; Jahn, D.; Moser, J.; Émond, A.; Blais, S. P.; Chênevert, R.; Lapointe, J. *Biochemistry* **2007**, *46*, 13190-13198.
- 15) Balg, C.; Huot, J. L.; Lapointe, J.; Chênevert, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3264-3265.
- 16) Schlünzen, F.; Zarivach, R.; Harms, J.; Bashan, A.; Tocilj, A.; Albrecht, R.; Yonath, A.; Franceschi, F. *Nature* **2001**, *413*, 814-821.
- 17) Moersch, G. W.; Hylander, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1703-1704.
- 18) Marín-Martínez, F.; Sánchez-Meca, J. *Educ. Psychol. Meas.* **2010**, *70*, 56-73.
- 19) Drainas, D.; Mamos, P.; Coutsogeorgopoulos, C. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3542-3545.
- 20) Vince, R.; Almquist, R. G.; Ritter, C. L.; Daluge, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1975**, *8*, 439-443.
- 21) Michelinaki, M.; Mamos, P.; Coutsogeorgopoulos, C.; Kalpaxis, D. L. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*, 139-146.
- 22) Hiratake, J. *Chem. Rec.* **2005**, *5*, 209-228.

7.9. Annexe

Le (1*S*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol **7.6** a été synthétisé à partir du (1*R*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol selon la méthode de Moersch et al. (schéma 7.2).¹⁷ Cette voie de synthèse avait été utilisée initialement pour la conversion du diastéréoisomère (1*S*,2*S*) en (1*R*,2*S*). Dans le cas présent, l'inversion du centre C1 a été réalisée de façon similaire pour la conversion du diastéréoisomère (1*R*,2*R*) en (1*S*,2*R*).

Le (1*R*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol est d'abord protégé sélectivement avec le chlorure de benzoyle pour donner le (1*R*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-(*N*-benzoyl)-3-benzoyloxypropane **7.1**. L'alcool secondaire est par la suite transformé en groupement partant avec le chlorure de mésyle. Le groupement ester du (1*R*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-1-mésyloxy-2-(*N*-benzoyl)-3-benzoyloxypropane **7.2** est hydrolysé pour faciliter la purification dans le reste de la synthèse (cristallisation des produits). La réaction du mésylate avec le groupement benzamide voisin génère l'oxazoline **7.4** (étape clé permettant l'inversion du centre C1). Cette oxazoline est hydrolysée en condition acide (le groupement benzoyle migre par après en condition basique) pour donner exclusivement le (1*S*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-(*N*-benzoyl)-1,3-propadiol **7.5**. Une hydrolyse forte (6M HCl à reflux) permet finalement d'obtenir le (1*S*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol **7.6**. Le produit a été chromatographié avec un ajout de 1% de NH₄OH dans l'éluant afin d'isoler l'amine libre (neutralisation du HCl).

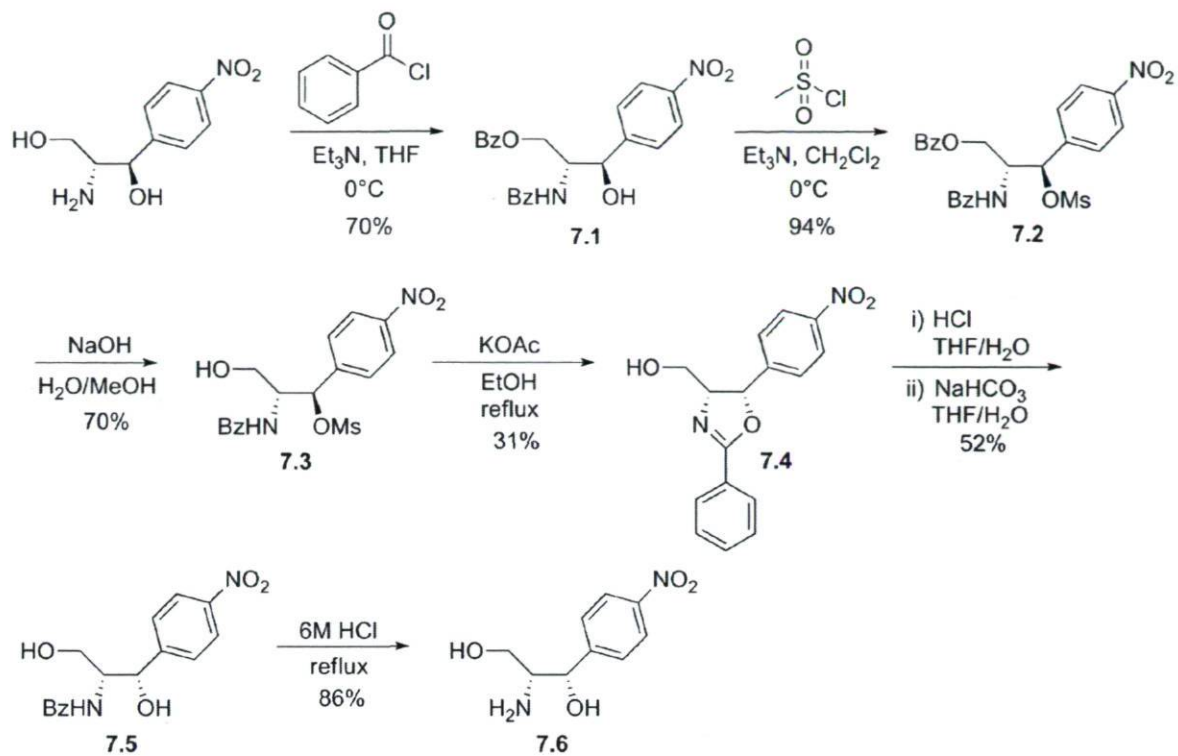


Schéma 7.2. Synthèse du (1*S*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol 7.6.

CHAPITRE 8: CONCLUSION

Les analogues stables de l'adénylate d'aminocycle (intermédiaire instable de la réaction catalysée par les aminoacyl-ARNt synthétases) sont des inhibiteurs efficaces des aaRS correspondantes (tableau 2.1, 3.1 et 4.1). Ces inhibiteurs sont particulièrement utiles pour étudier les mécanismes d'aminocyclation des ARNt et déterminer les structures des aaRS par diffraction des rayons-X. Ils permettent aussi de caractériser les aaRS dans une perspective médicale, car toutes les aaRS sont des cibles potentielles pour le développement d'antibiotiques.

L'adénylate d'aspartol **2.8b** a été diffusé dans des cristaux d'AspRS de *T. thermophilus* afin de révéler la structure de son site actif (figure 2.4). Il a été démontré dans ce cas qu'un gel d'agarose stabilise les cristaux d'AspRS lors de la diffusion de l'adénylate d'aspartol. Cet inhibiteur ne présente aucune sélectivité pour les AspRS des microorganismes pathogènes étudiés car il affecte fortement l'AspRS humaine (cytoplasmique et mitochondriale). À l'opposé, la sélectivité du glutamyl-phosphonate-adénosine (chapitre 4) envers la GluRS bactérienne est très prononcée (facteur 145, voir tableau 4.1). L'évolution divergente entre les aaRS explique que des inhibiteurs analogues à l'adénylate d'aminocycle puissent interagir de façons différentes entre deux sources (bactériennes et humaines, par exemple). Malgré qu'ils soient parfois sélectifs aux procaryotes, les analogues de l'adénylate d'aminocycle sont peu adaptés au développement d'antibiotiques en raison de leur trop grande polarité (mauvaise diffusion dans les membranes bactériennes, voir tableau 2.2 et 3.2).

D'autre part, les structures détaillées des sites actifs des aaRS fournissent des renseignements précieux pour le design de nouveaux inhibiteurs. Par exemple, la bioinformatique permet de modéliser les interactions aaRS-inhibiteur visibles dans ces structures afin de proposer de nouveaux composés adaptés au site actif. Ce principe a été exploré en collaboration avec le professeur Patrick Lagüe (Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique). Nous avons synthétisé un dérivé de l'adénylate de glutamyle (figure 8.1), modélisé à partir du site actif de la GluRS de *E. coli* complexée avec

l'adénylate de glutamol. Cette molécule simplifiée est toutefois inactive sur la GluRS de *E. coli* (résultats préliminaires).

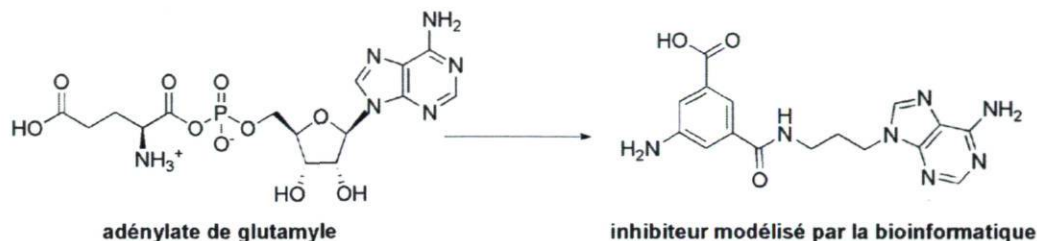


Figure 8.1. Modélisation d'un inhibiteur par la bioinformatique.

Les inhibiteurs des aminoacyl-ARNt amidotransférases sont peu nombreux (figures 1.17-1.18), possiblement en raison de la complexité des mesures cinétiques sur cette enzyme. La figure 8.2 résume les récents développements réalisés à partir de la glutamycine, un dérivé de la puromycine.

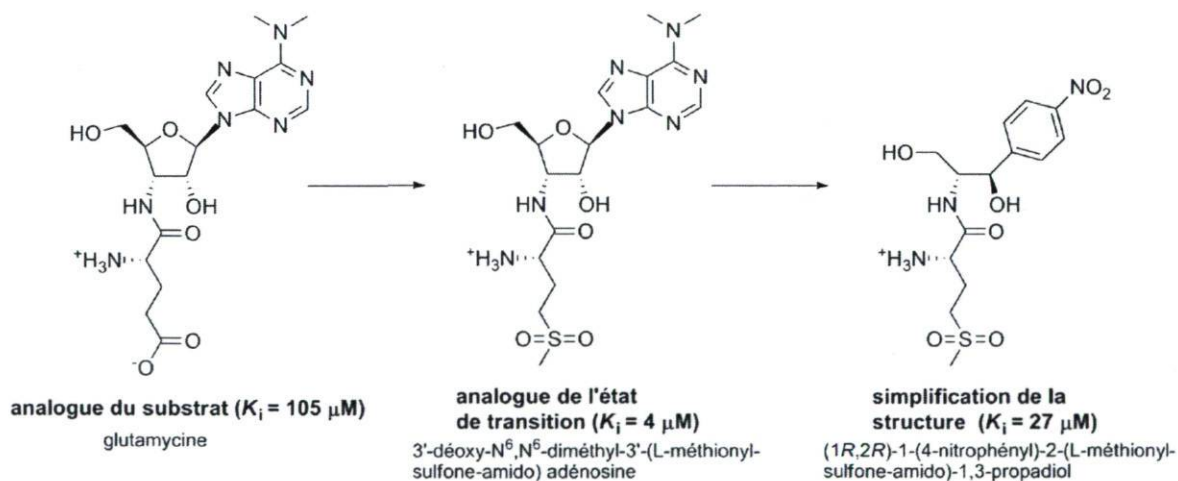


Figure 8.2. Résumé des modifications apportées sur les inhibiteurs des AdT.

Tel que présenté au chapitre 5, la glutamycine et l'aspartycine sont des analogues des substrats de l'enzyme (Glu-ARNt^{Gln} et Asp-ARNt^{Asn}, respectivement) et ne sont pas transformés par l'AdT. Le chapitre 6 a démontré que les analogues de l'état de transition de l'étape transamidase sont particulièrement efficaces (la 3'-déoxy- N^6,N^6 -diméthyl-3'-(L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine a un K_i de 4 μM). Les changements mineurs apportés à cet inhibiteur ont toutefois entraîné une perte d'activité : ajout d'un groupement

phosphoryl (6.26), remplacement de groupement $N(\text{Me})_2$ par un groupement NH_2 (6.30), diminution d'un méthylène sur la chaîne latérale de l'acide aminé (6.21).

Le remplacement de la portion nucléosidique de la 3'-déoxy- N^6,N^6 -diméthyl-3'-(L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine par un motif plus simple dérivé du chloramphénicol a permis de générer une nouvelle famille d'inhibiteurs (chapitre 7). Le composé représentatif (le (1*R*,2*R*)-1-(4-nitrophényl)-2-(L-méthionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol) est un inhibiteur compétitif de l'aminocyl-ARNt amidotransférase GatCAB d'*Helicobacter pylori* ($K_i = 27 \mu\text{M}$). Il est surprenant de constater qu'une molécule aussi simple puisse compétitionner avec un aa-ARNt pour occuper le site actif de l'AdT (différence marquée de taille). Cette simplicité est bénéfique car elle facilite l'élaboration d'une étude de relations structure-activité (figure 8.3). Éventuellement, les inhibiteurs optimisés pourront être évalués comme antibiotiques sur diverses bactéries nécessitant l'activité des AdT.

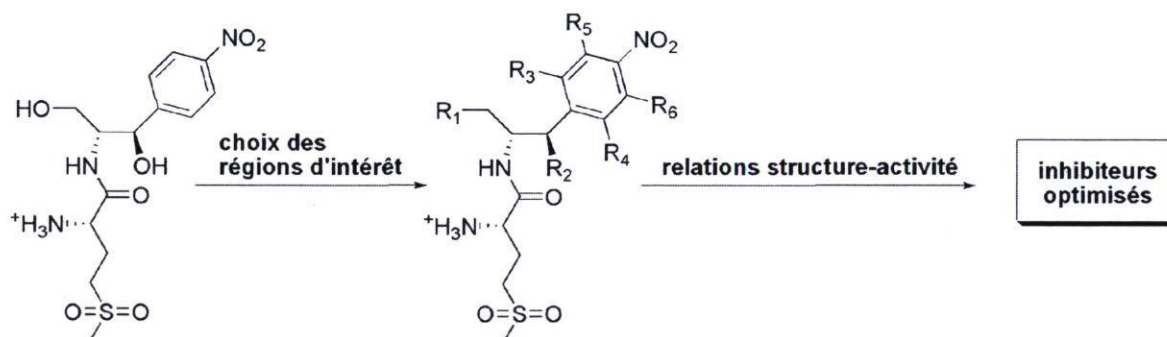


Figure 8.3. Optimisation du (1*R*,2*R*)-1-(4-nitrophényl)-2-(L-méthionyl-sulfone-amido)-1,3-propadiol en tant qu'inhibiteur des AdT par une étude de relations structure-activité.

Il est également possible d'étudier d'autres séries d'inhibiteurs des AdT en s'inspirant de la grande variété de molécules interagissant avec le ribosome. Le ribosome permet la biosynthèse des protéines en catalysant la réaction peptidyl-transférase (figure 8.4A). Les substrats de cette réaction (peptidyl-ARNt et aminocyl-ARNt) sont structurellement très proches des substrats des AdT (figure 8.4B). Dans la réaction peptidyl-transférase, le groupement amine d'un aminocyl-ARNt s'additionne sur le carbonyle α du peptidyl-ARNt alors que la réaction de transamidation catalysée par les AdT s'effectue sur la chaîne latérale d'un aminocyl-ARNt. Cette analogie explique que les

dérivés de la puromycine et du chloramphénicol (molécules interférant avec la réaction peptidyl-transférase dans le ribosome) sont des inhibiteurs efficaces des AdT, en mimant le substrat de l'enzyme (un ARNt aminoacylé). La figure 8.5 fournit quelques exemples de molécules actives au niveau du ribosome qui pourraient être éventuellement adaptées pour l'inhibition des AdT.

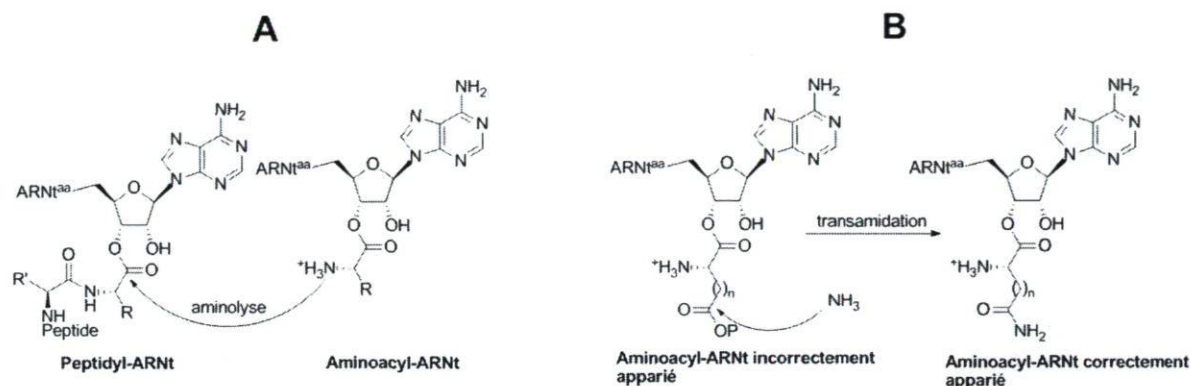


Figure 8.4. (A) Réaction peptidyl-transférase dans le ribosome. (B) Réaction de transamidation des AdT.

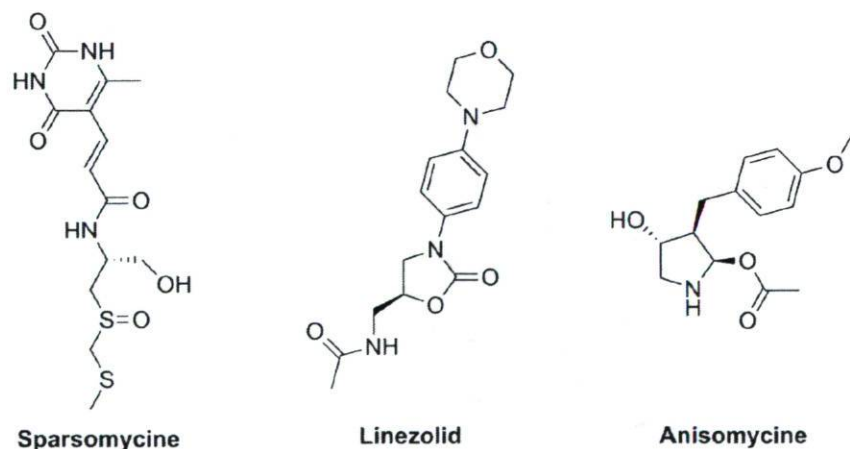


Figure 8.5. Exemples de molécules actives sur le ribosome pouvant être utilisées pour le design de nouveaux inhibiteurs des AdT.

CHAPITRE 9 : PARTIE EXPÉRIMENTALE

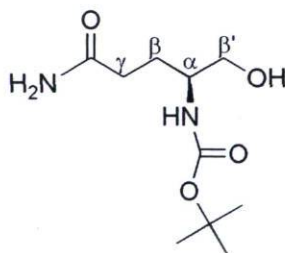
9.1. Généralités

Les réactifs chimiques proviennent de la compagnie Sigma-Aldrich. Les acides aminés protégés (*N*-Boc) sont de deux sources différentes (Advanced Chemtech et Novabiochem). La 3'-déoxy-3'-amino-adénosine provient de la compagnie Carbosynth. Les solvants anhydres ont été distillés sous N₂, soit sur Na/benzophénone (THF et Et₂O) ou sur CaH₂ (CH₃CN, CH₂Cl₂). Les chromatographies sur gel de silice ont été réalisées avec du gel de silice 40-63 μM (230-400 mesh).

Le pouvoir rotatoire a été déterminé avec un polarimètre digital JASCO DIP-360 (c représente la concentration en g / 100 mL). Les spectres infrarouges ont été enregistrés avec un spectromètre Bomem MB-100. Les températures de fusion ont été mesurées à partir d'un appareil Thomas Hoover 6427-H10. Les spectres RMN ont été enregistrés avec un spectromètre Varian Inova AS400 (400 MHz) et un spectromètre Bruker AC300 (300 MHz). Les spectres de masse ont été réalisés au centre de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal et à l'Université Laval (LCMS Agilent 6210).

9.2. Synthèse de l'adénylate de glutaminol 2.8a

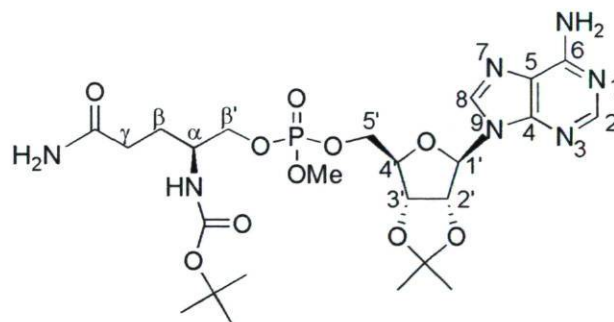
9.2.1 *N*-Boc-glutaminol 2.2a



La *N*-Boc-glutamine **2.1a** (1.50 g, 6.09 mmol) est dissous dans 15 mL de THF anhydre, auquel on ajoute Et₃N (1.70 mL, 12.2 mmol). La solution est refroidie à -15°C et le chloroformiate d'isobutyle (1.59 mL, 12.2 mmol) est additionné. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à cette température pendant 30 min. Une suspension de NaBH₄

(705 mg, 18.6 mmol) dans un mélange THF / H₂O 12 mL:3 mL est par la suite ajoutée. La réaction est laissée sous agitation durant deux heures à la température de la pièce. Le milieu est acidifié jusqu'à un pH de 6 et le solvant est évaporé. Le produit est extrait à l'AcOEt et lavé au NaHCO₃ sat. / NaCl saturé. La phase aqueuse est extraite à nouveau avec plusieurs petites portions d'AcOEt. La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice (5% à 15% MeOH / AcOEt) pour donner un solide blanc (1.06 g, 74%). T_f 119-121°C; [α]_D²¹ -7.8 (c 1.12, MeOH); IR (KBr) 3345 (large, NH, OH), 2955 (CH aliphatique), 1650 (C=O), 1532 (NH), 1173 (C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (CD₃OD) δ 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.58-1.69 (m, 1H, H_β), 1.84-1.94 (m, 1H, H_β), 2.20-2.33 (m, 2H, H_γ), 3.43-3.58 (m, 3H, H_α et H_β'); RMN ¹³C (CD₃OD) δ : 28.6 (C_β), 28.8 (C(CH₃)₃), 33.2 (C_γ), 53.6 (C_α), 65.3 (C_β'), 80.1 (C(CH₃)₃), 158.4 (NHCO₂tBu), 178.8 (CONH₂).

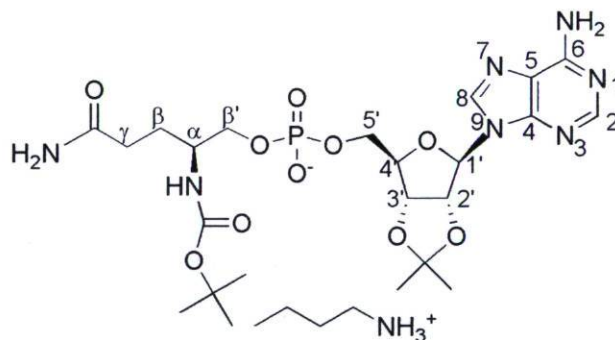
9.2.2. Triester de phosphate 2.6a



L'isopropylidène-adénosine **2.3** (564 mg, 1.83 mmol) est dissous dans 10 mL de CH₂Cl₂ anhydre, auquel on ajoute Et₃N (340 μL, 2.45 mmol) et le méthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (372 μL, 1.93 mmol). Le tout est agité 30 min à la température de la pièce puis le mélange est dilué avec 40 mL de CH₂Cl₂, lavé au NaCl sat., séché sur MgSO₄ et évaporé. Le résidu est solubilisé dans 17 mL de CH₃CN anhydre et le glutaminol protégé **2.2a** (354 mg, 1.22 mmol) ainsi que le triflate d'imidazolium (400 mg, 1.83 mmol) sont additionnés. La réaction est laissée sous agitation pendant 5h à la température de la pièce. Une solution d'iode (610 mg, 2.40 mmol) dans 15 mL de THF / H₂O / pyridine 1:1:1 est par la suite ajoutée jusqu'à ce que la couleur jaune persiste dans le mélange réactionnel. Après dilution avec 100 mL d'AcOEt, le produit est lavé au Na₂S₂O₃ sat., au HCl 1N, au NaHCO₃ sat., au NaCl sat., séché sur MgSO₄ et évaporé. La

purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice avec un gradient 10% MeOH à 30% MeOH / AcOEt. Le triester de phosphate **2.6a** est alors isolé sous la forme d'un solide blanc (345 mg, 46%). T[°]f 78°C; $[\alpha]_D^{21}$ -22.9 (c 1.88, MeOH); IR (KBr) 3337 (large, NH), 2979 (CH aliphatique), 1651 (C=O), 1251 (P=O, C-O), 1168 (C-O), 1031 (P-O-C, C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 1.40 et 1.41 (2s, 12H, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂), 1.52-1.70 (m, 4H, C(CH₃)₂ et H β), 1.73-1.89 (m, 1H, H β), 2.24 (t, J = 6.8 Hz, H γ), 3.62-3.77 (m, 4H, POCH₃ et H α), 3.84-3.99 (m, 2H, H β'), 4.18-4.32 (m, 2H, H5'), 4.41-4.50 (m, 1H, H4'), 5.15 (dd, J = 6.0 Hz et 3.0 Hz, 1H, H3'), 5.50 (dd, J = 6.1 Hz et 1.5 Hz, 1H, H2'), 6.25 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H1'), 8.24 et 8.27 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 25.6, 27.5 (C(CH₃)₂), 27.8 (C β), 28.8 (C(CH₃)₃), 32.8 (C γ), 51.7 (C α), 55.5 (2d, J = 5.6 Hz, POCH₃), 68.7 (d, J = 4.3 Hz, C5'), 70.7 (d, J = 5.4 Hz, C β'), 80.4 (C(CH₃)₃), 82.8, 82.9 (C3'), 85.4 (C2'), 86.7 (d, J = 7.3 Hz, C4'), 91.8, 91.9 (C1'), 115.7 (C(CH₃)₂), 120.7 (C5), 141.8 (C8), 150.3 (C4), 154.2 (C2), 157.5, 158.1 (C6 et NHCO₂tBu), 178.1 (CONH₂); RMN ³¹P (121 MHz, CD₃OD) δ 4.09, 4.16.

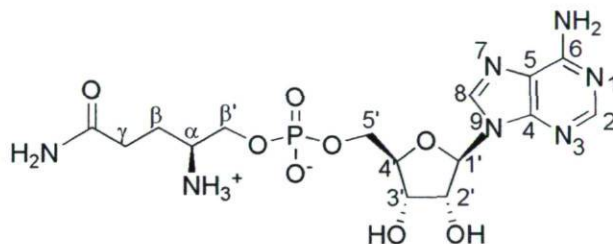
9.2.3. Diester de phosphate **2.7a**



Le triester de phosphate **2.6a** (187 mg, 304 μ mol) est dissous dans 10 mL de MeOH et 10 mL de BuNH₂. Le mélange est agité à la température de la pièce pendant 60 heures. Le solvant est évaporé et le produit brut est purifié par chromatographie en phase inverse (gradient 5-30% MeOH / H₂O) pour donner **2.7a**, un solide blanc (172 mg, 84%). T[°]f 111-113°C; $[\alpha]_D^{21}$ -45.2 (c 1.67, MeOH); IR (KBr) 3354 (large, NH), 2971, 2934 (CH aliphatique), 1663 (C=O), 1244 (P=O, C-O), 1153 (C-O), 1067 (P-O-C, C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 0.91 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H δ BuNH₃⁺), 1.28-1.47 (m, 14H, C(CH₃)₃, C(CH₃)₂, H γ BuNH₃⁺), 1.50-1.74 (m, 6H, C(CH₃)₂, H β BuNH₃⁺, H β), 1.77-1.90

(m, 1H, H β), 2.22 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H γ), 2.87 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H α BuNH $_3^+$), 3.56-3.67 (m, 1H, H α), 3.68-3.82 (m, 2H, H β'), 4.01 (t, J = 4.5 Hz, 2H, H5'), 4.43-4.48 (m, 1H, H4'), 5.09 (dd, J = 5.9 Hz et 1.9 Hz, H3'), 5.34 (dd, J = 6.0 Hz et 3.1 Hz, 1H, H2'), 6.20 (d, J = 3.1 Hz, H1'), 8.19 (s, 1H, H2), 8.43 (s, 1H, H8); RMN ^{13}C (75 MHz, CD $_3\text{OD}$) δ 12.8 (C δ BuNH $_3^+$), 19.5 (C γ BuNH $_3^+$), 24.4, 26.4 (C(CH $_3$) $_2$), 27.5 (C β), 27.6 (C(CH $_3$) $_3$), 29.4 (C β BuNH $_3^+$), 31.8 (C γ), 39.3 (C α BuNH $_3^+$), 50.7 (d, J = 8.1 Hz, C α), 65.5 (C5'), 67.1 (d, J = 5.5 Hz, C β'), 78.9 (C(CH $_3$) $_3$), 82.1 (C3'), 84.6 (C2'), 85.5 (d, J = 8.1 Hz, C4'), 90.5 (C1'), 114.0 (C(CH $_3$) $_2$), 119.0 (C5), 140.2 (C8), 149.3 (C4), 152.6 (C2), 156.0, 156.8 (C6 et NHCO $_2t\text{Bu}$), 177.3 (CONH $_2$); RMN ^{31}P (121 MHz, CD $_3\text{OD}$) δ 4.66.

9.2.4. Adénylate de glutaminol 2.8a

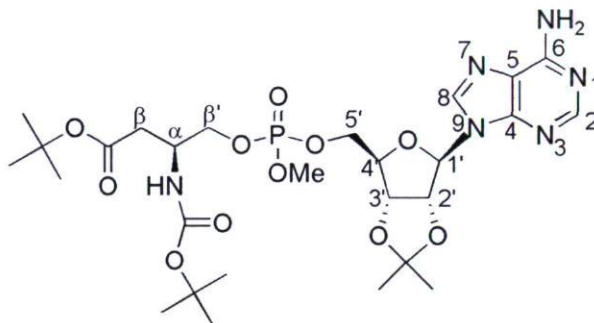


Le diester de phosphate **2.7a** (83.4 mg, 124 μmol) est déprotégé à la température de la pièce dans un mélange TFA / H $_2\text{O}$ (4.3 mL : 0.7 mL) pendant 15 minutes. Le solvant est par la suite évaporé sous pression réduite puis co-évaporé avec MeOH / Et $_2\text{O}$. Le résidu est dissous dans 2 mL de MeOH puis le produit est précipité par l'addition de 5 mL d'Et $_2\text{O}$. L'adénylate de glutaminol **2.8a** (solide blanc) est isolé par filtration (56.9 mg, 99%). T $^{\circ}\text{f}$ 142 $^{\circ}\text{C}$ (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -7.6 (c 0.53, H $_2\text{O}$); IR (KBr) 3393 (large, NH, OH), 2971 (CH aliphatique), 1688 (C=O), 1205 (P=O, C-O), 1135 (C-O), 1069 (P-O-C, C-O) cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, D $_2\text{O}$) δ 1.84-1.94 (m, 2H, H β), 2.33 (t, J = 7.8 Hz, 2H, C γ), 3.44-3.51 (m, 1H, C α), 3.88-3.95 (m, 1H, C β'), 3.99-4.05 (m, 1H, C β'), 4.10-4.21 (m, 1H, H5'), 4.32-4.39 (m, 1H, H4'), 4.50 (t, J = 4.9 Hz, 1H, H3'), 4.74 (t, J = 5.0 Hz, 1H, H2'), 6.17 (d, J = 4.9 Hz, 1H, H1'), 8.41, 8.57 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ^{13}C (100 MHz, D $_2\text{O}$) δ 24.5 (C β), 30.7 (C γ), 51.1 (d, J = 8.3 Hz, C α), 64.3, 64.9 (2d, J = 4.9 Hz et 5.0 Hz, C5' et C β'), 70.1

(C3'), 74.4 (C2'), 83.8 (d, $J = 8.4$ Hz, C4'), 88.2 (C1'), 118.7 (C5), 142.2, 145.5 (C2 et C8), 148.5, 150.5 (C4 et C6), 177.3 (CONH₂); RMN ³¹P (121 MHz, D₂O) δ 2.87.

9.3. Synthèse de l'adénylate d'aspartol **2.8b**

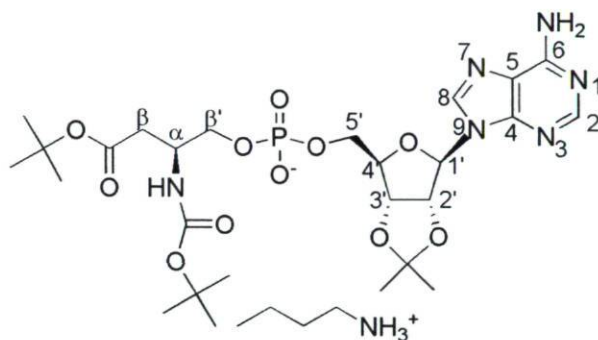
9.3.1. Triester de phosphate **2.6b**



L'isopropylidène-adénosine **2.3** (477 mg, 1.55 mmol) est dissous dans 10 mL de CH₂Cl₂ anhydre, auquel on ajoute DIPEA (354 μ L, 2.07 mmol) et le méthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (300 μ L, 1.55 mmol). Le tout est agité 30 min à la température de la pièce puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans 15 mL de CH₃CN anhydre et l'aspartol protégé **2.2b** (256 mg, 930 μ mol) ainsi que le triflate d'imidazolium (338 mg, 1.55 mmol) sont additionnés. La réaction est laissée sous agitation pendant 5h à la température de la pièce. Une solution d'iode (525 mg, 2.07 mmol) dans 10 mL de THF / H₂O / pyridine 1:1:1 est par la suite ajoutée jusqu'à ce que la couleur orangée persiste dans le mélange réactionnel. Les solvants sont évaporés puis le résidu est dilué dans 150 mL d'AcOEt, lavé au Na₂S₂O₃ sat. (30 mL), au HCl 1N (30 mL), au NaHCO₃ sat. (30 mL), au NaCl sat. (30 mL), séché sur MgSO₄ et évaporé. La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice (10% MeOH / AcOEt). Le triester de phosphate **2.6b** est alors isolé sous la forme d'un solide blanc (246 mg, 40%). T[°]f 75-77°C; [α]_D²¹ -18.1 (c 2.08, MeOH); IR (KBr) 3428, 3213 (NH,OH), 2980, 2937 (CH aliphatique), 1718, 1646 (C=O), 1253 (P=O, C-O), 1160 (C-O), 1036 (P-O-C, C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 1.40 (2s, 12H, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.61 (s, 3H, C(CH₃)₂), 2.30-2.39 (m, 1H, H β), 2.43-2.52 (m, 1H, H β), 3.69 (2d, $J = 11.3$ Hz, 3H, POCH₃), 3.92-4.00 (m, 2H, H β'), 4.07-4.17 (m, 1H, H α), 4.20-4.34 (m, 2H, H5'),

4.44-4.49 (m, 1H, H4'), 5.16 (dd, J = 6.3 Hz et 3.2 Hz, 1H, H3'), 5.47-5.52 (m, 1H, H2'), 6.25 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H1'), 8.24 et 8.27 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 24.3, 26.2 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 27.1, 27.5 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 36.9 ($\text{C}\beta$), 48.0 ($\text{C}\alpha$), 54.2 (2d, J = 5.8 Hz, POCH_3), 67.4 (2d, J = 6.1 Hz, $\text{C5}'$), 68.9 (d, J = 5.5 Hz, $\text{C}\beta'$), 79.2 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 81.0 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 81.5, 81.6 ($\text{C3}'$), 84.1 ($\text{C2}'$), 85.4 ($\text{C4}'$), 90.5, 90.6 ($\text{C1}'$), 114.5 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2$), 119.4 (C5), 140.5 (C8), 149.0 (C4), 152.9 (C2), 156.2 (C6 et NHCO_2tBu), 170.3 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2t\text{Bu}$); RMN ^{31}P (121 MHz, CD_3OD) δ 4.01, 4.09.

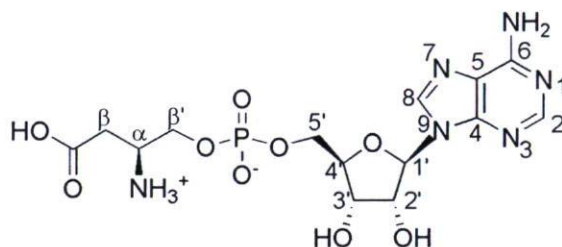
9.3.2. Diester de phosphate **2.7b**



Le triester de phosphate **2.6b** (240 mg, 0.364 mmol) est dissous dans 10 mL de MeOH et 10 mL de BuNH_2 . Le mélange est agité à la température de la pièce pendant 48 heures. Le solvant est évaporé et le produit brut est purifié par chromatographie en phase inverse (gradient 25-35% MeOH / H_2O). Les fractions contenant le composé sont évaporées pour obtenir **2.7b**, un solide blanc (213 mg, 81%). $T^{\circ}\text{f}$ 183-185 $^{\circ}\text{C}$ (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -41.8 (c 1.78, MeOH); IR (KBr) 3369, 3196 (NH), 2978, 2936 (CH aliphatique), 1720, 1675 ($\text{C}=\text{O}$), 1212 ($\text{P}=\text{O}$, $\text{C}-\text{O}$), 1162 ($\text{C}-\text{O}$), 1056 ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}$) cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 3H, $\text{H}\delta$ BuNH_3^+), 1.31-1.48 (m, 23H, 2 X $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $\text{H}\gamma$ BuNH_3^+), 1.56-1.68 (m, 5H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $\text{H}\beta$ BuNH_3^+), 2.36 (dd, J = 8.6 Hz et 15.4 Hz, 1H, $\text{H}\beta$), 2.53 (dd, J = 5.6 Hz et 15.4 Hz, 1H, $\text{H}\beta$), 2.91 (t, J = 7.7 Hz, 2H, $\text{H}\alpha$ BuNH_3^+), 3.73-3.80 (m, 1H, $\text{H}\beta'$), 3.81-3.87 (m, 1H, $\text{H}\beta'$), 4.01-4.10 (m, 3H, $\text{H}\alpha$ et $\text{H5}'$), 4.46-4.51 (m, 1H, $\text{H4}'$), 5.13 (dd, J = 2.0 Hz et 6.1 Hz, 1H, $\text{H3}'$), 5.36 (dd, J = 3.3 Hz et 6.0 Hz, 1H, $\text{H2}'$), 6.23 (d, J = 3.4 Hz, 1H, $\text{H1}'$), 8.22 (s, 1H, H2), 8.47 (s, 1H, H8); RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 12.7 ($\text{C}\delta$ BuNH_3^+), 19.4 ($\text{C}\gamma$ BuNH_3^+), 24.4, 26.4 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 27.1, 27.5 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 29.4 ($\text{C}\beta$ BuNH_3^+), 37.4 ($\text{C}\beta$), 39.3 ($\text{C}\alpha$ BuNH_3^+), 48.3 ($\text{C}\alpha$), 65.5 ($\text{C5}'$), 66.8

(d, $J = 5.8$ Hz, C β'), 78.9 (C(CH $_3$) $_3$), 80.6 (C(CH $_3$) $_3$), 82.1 (C3'), 84.5 (C2'), 85.3 (d, $J = 8.3$ Hz, C4'), 90.5 (C1'), 114.0 (C(CH $_3$) $_2$), 119.0 (C5), 140.1 (C8), 149.3 (C4), 152.7 (C2), 156.1, 156.2 (C6 et NHCO $_2$ tBu), 171.0 (CO $_2$ tBu); RMN 31 P (121 MHz, CD $_3$ OD) δ 4.56.

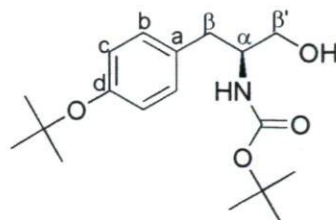
9.3.3. Adénylate d'aspartol 2.8b



Le composé **2.7b** (138 mg, 192 μ mol) est déprotégé dans un mélange de TFA / H $_2$ O 4.0 : 0.6 mL pendant 15 min. Le solvant est par la suite évaporé puis co-évaporé avec Et $_2$ O / MeOH jusqu'à l'obtention d'un résidu solide. Ce produit brut est solubilisé dans 3 mL de MeOH et précipité avec 7 mL d'Et $_2$ O. Le précipité est filtré et lavé avec Et $_2$ O pour donner un solide blanc (85.0 mg, 99%). T $^{\circ}$ f 154-156 $^{\circ}$ C (déc.); $[\alpha]_D^{21}$ -21.9 (c 0.22, MeOH / H $_2$ O 1 : 1); IR (KBr) 3600-2400 (NH,OH), 1693 (C=O), 1205 (P=O, C-O), 1132 (C-O), 1058 (P-O-C, C-O) cm $^{-1}$; RMN 1 H (400 MHz, D $_2$ O) δ 2.69 (d, $J = 6.7$ Hz, H β), 3.78-3.85 (m, 1H, C α), 3.92-3.99 (m, 1H, H β'), 4.02-4.08 (m, 1H, H β'), 4.10-4.23 (m, 2H, H5'), 4.35-4.40 (m, 1H, H4'), 4.51 (t, $J = 4.8$ Hz, H3'), 4.75 (t, $J = 5.1$ Hz, H2'), 6.15 (d, $J = 5.0$ Hz, H1'), 8.37 (s, 1H, H2), 8.54 (s, 1H, H8); RMN 13 C (100 MHz, D $_2$ O) δ 33.7 (C β), 48.6 (d, $J = 8.5$ Hz, C α), 64.8, 65.0 (2d, $J = 5.0$ Hz et $J = 5.4$ Hz, C β' et C5'), 70.3 (C1'), 74.5 (C2'), 83.9 (d, $J = 8.5$ Hz, C4'), 88.2 (C1'), 118.8 (C5), 142.0 (C8), 146.4 (C2), 148.7, 151.2 (C4 et C6), 174.4 (CO $_2$ H); RMN 31 P (121 MHz, D $_2$ O) δ 2.77.

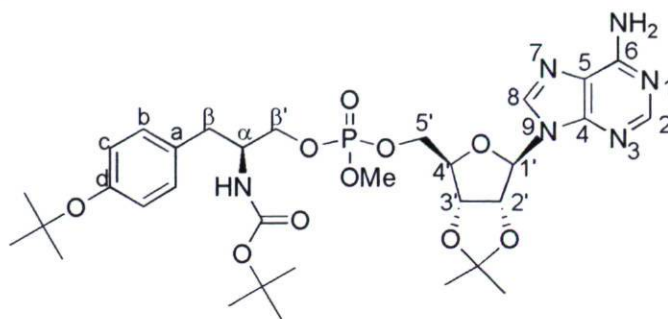
9.4. Synthèse de l'adénylate de tyrosinol 2.8c

9.4.1. *N*-Boc-*O*(*t*Bu)-tyrosinol 2.2c



La *N*-Boc-*O*(*t*Bu)-tyrosine **2.1c** (1.00 g, 2.96 mmol) est dissoute dans 20 mL de THF anhydre, auquel on ajoute Et₃N (866 μ L, 6.22 mmol). La solution est refroidie à -15°C et le chloroformiate d'isobutyle (776 μ L, 5.93 mmol) est additionné. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à cette température pendant 30 min. Une suspension de NaBH₄ (561 mg, 14.8 mmol) dans un mélange THF / H₂O 12 mL : 3 mL est par la suite ajoutée. La réaction est laissée sous agitation durant deux heures à la température de la pièce. Le milieu est acidifié jusqu'à un pH de 6 et le solvant est évaporé. Le produit est extrait à l'AcOEt et lavé au NaHCO₃ / NaCl saturé. La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice (30% à 45% AcOEt / hexane) pour donner un solide blanc (916 mg, 96%). T_f 57-58°C; [α]_D²¹ -19.6 (c 6.23, CHCl₃); IR (KBr) 3377 (large, NH, OH), 2980, 2871 (CH aliphatique), 1687 (C=O), 1525 (NH et C-C aromatique), 1164, 1008 (C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.31 (s, 9H, ArOC(CH₃)₃), 1.40 (s, 9H, NHCO₂C(CH₃)₃), 2.77 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H β), 3.50 (dd, J = 11.1 Hz et 5.2 Hz, 1H, H β '), 3.61 (dd, J = 11.1 Hz et 3.9 Hz, 1H, H β ''), 3.77-3.85 (m, 1H, H α), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_b), 7.09 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H_c); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 28.5, 29.1 (2XC(CH₃)₃), 37.1 (C β), 54.2 (C α), 64.3 (C β ''), 78.6, 80.0 (2XC(CH₃)₃), 124.5 (C_b), 130.0 (C_c), 133.0 (C_a), 154.0 (C_d), 156.5 (NHCO₂*t*Bu); SMHR (ESI) calculé pour C₁₈H₃₀NO₄ [M+H]⁺ 346.1989, expérimental 346.1984.

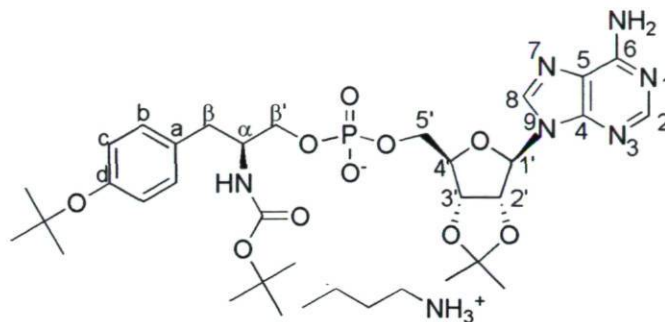
9.4.2. Triester de phosphate **2.6c**



L'isopropylidène-adénosine **2.3** (713 mg, 2.32 mmol) est dissous dans 12 mL de CH_2Cl_2 anhydre, auquel on ajoute DIPEA (529 μL , 3.09 mmol) et le méthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (470 μL , 2.43 mmol). Le tout est agité 30 min à la température de la pièce puis le mélange est dilué avec 40 mL de CH_2Cl_2 , lavé au NaCl sat., séché sur MgSO_4 et évaporé. Le résidu est solubilisé dans 20 mL de CH_3CN anhydre et le tyrosinol protégé **2.2c** (500 mg, 1.55 mmol) ainsi que le triflate d'imidazolium (505 mg, 2.32 mmol) sont additionnés. La réaction est laissée sous agitation pendant 5h à la température de la pièce. Une solution d'iode (785 mg, 3.09 mmol) dans 15 mL de THF / H_2O / pyridine 1:1:1 est par la suite ajoutée jusqu'à ce que la couleur jaune persiste dans le mélange réactionnel. Après dilution avec 100 mL d'AcOEt, le produit est lavé au $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ sat., au HCl 1N, au NaHCO_3 sat., au NaCl sat., séché sur MgSO_4 et le solvant est évaporé. La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice avec un gradient 0-8% MeOH / CH_2Cl_2 . Le triester de phosphate **2.6c** est alors isolé sous la forme d'un solide blanc (342 mg, 31%). T^{of} 79-80°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -20.6 (c 2.34, MeOH); IR (KBr) 3330, 3198 (NH), 2978, 2933 (CH aliphatique), 1599 (C-C aromatique), 1710 (C=O), 1645 (C=N), 1248 (P=O, C-O), 1162 (C-O), 1031 (P-O-C et C-O) cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 1.26 (s, 9H, $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_3$), 1.30 (s, 9H, $\text{NHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.35 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.57 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.53-2.63 (m, 1H, H_β), 2.64-2.74 (m, 1H, H_β), 3.65 et 3.66 (2d, $J = 11.2$ Hz, 3H, POCH_3), 3.80-3.98 (m, 3H, H_β' et H_α), 4.16-4.30 (m, 2H, H_5'), 4.40-4.46 (m, 1H, H_4'), 5.10-5.14 (m, 1H, H_3'), 5.42-5.48 (m, 1H, H_2'), 6.21 (2d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H_1'), 6.85 (2d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_b), 7.06 (2d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_c), 8.19 et 8.22 (2s, 2H, H_2 et H_8); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 24.3, 26.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27.5, 28.0 ($2\text{XC}(\text{CH}_3)_3$), 36.1 (C_β), 52.2, 52.3 (C_α), 54.2, 54.3 (POCH_3), 67.4 (C_5'), 69.0, 69.1 (C_β'), 78.2, 79.0 ($2\text{XC}(\text{CH}_3)_3$), 81.4, 81.5 (C_3'), 84.1 (C_2'), 85.3, 85.4 (C_4'), 90.5, 90.6 (C_1'), 114.4, 114.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 119.4 (C5),

124.0 (Cb), 129.6 (Cc), 133.0 (Ca), 140.5 (C8), 149.0 (C4), 152.9 (C2), 153.9 (Cd), 156.2, 156.6 (C6 et NHCO_2tBu); RMN ^{31}P (121 MHz, CDCl_3) δ 4.14 et 4.20; SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 707.3164, expérimental 707.3170.

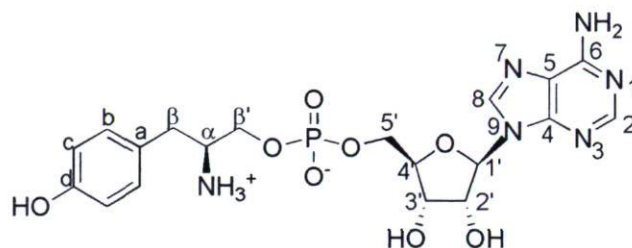
9.4.3. Diester de phosphate 2.7c



Le triester de phosphate **2.6c** (189 mg, 267 μmol) est dissous dans 10 mL de MeOH et 10 mL de BuNH_2 . Le mélange est agité à la température de la pièce pendant 48 heures. Le solvant est évaporé et le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient 20-25% MeOH / CH_2Cl_2) pour donner **2.7c**, un solide blanc (178 mg, 87%). $T^{\circ}\text{f}$ 165-166 $^{\circ}\text{C}$ (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -33.4 (c 3.32, MeOH); IR (KBr) 3348, 3208 (NH), 2978, 2934 (CH aliphatique), 2491 (P-OH), 1708 (C=O), 1643 (C=N), 1238 (P=O, C-O), 1162 (C-O), 1067 (P-O-C et C-O) cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $\text{H}\delta$ BuNH_3^+), 1.15-1.43 (m, 23H, $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_3$, $\text{NHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\text{H}\gamma$ BuNH_3^+), 1.48-1.62 (m, 5H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ et $\text{H}\beta$ BuNH_3^+), 2.50 (dd, $J = 13.8$ Hz et 8.9 Hz, 1H, $\text{H}\beta$), 2.72 (dd, $J = 13.8$ Hz et 5.0 Hz, 1H, $\text{H}\beta$), 2.88 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, $\text{H}\alpha$ BuNH_3^+), 3.68-3.80 (m, 2H, $\text{H}\beta'$), 3.80-3.89 (m, 1H, $\text{H}\alpha$), 3.98-4.09 (m, 2H, $\text{H}5'$), 4.41-4.46 (m, 1H, $\text{H}4'$), 5.04 (dd, $J = 5.9$ Hz et 2.0 Hz, 1H, $\text{H}3'$), 5.31 (dd, $J = 6.1$ Hz et 2.6 Hz, 1H, $\text{H}2'$), 6.18 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, $\text{H}1'$), 6.77 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, Hb), 7.00 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, Hc), 8.16 (s, 1H, $\text{H}2$), 8.39 (s, 1H, $\text{H}8$); RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 12.8 ($\text{C}\delta$ BuNH_3^+), 19.5 ($\text{C}\gamma$ BuNH_3^+), 24.5, 26.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27.7, 28.1 ($2\text{XC}(\text{CH}_3)_3$), 29.4 ($\text{C}\beta$ BuNH_3^+), 36.6 ($\text{C}\beta$), 39.3 ($\text{C}\alpha$ BuNH_3^+), 52.5, 52.6 ($\text{C}\alpha$), 65.6, 65.7 ($\text{C}5'$), 67.1, 67.2 ($\text{C}\beta'$), 78.1, 78.9 ($2\text{XC}(\text{CH}_3)_3$), 81.9 ($\text{C}3'$), 84.6 ($\text{C}2'$), 85.8, 85.9 ($\text{C}4'$), 90.6 ($\text{C}1'$), 114.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 119.0 ($\text{C}5$), 123.9 (Cb), 129.7 (Cc), 133.6 (Ca), 140.5 (C8), 149.2 (C4), 152.9 (C2), 153.6 (Cd), 156.1, 156.6 (C6 et

NHCO₂tBu); RMN ³¹P (121 MHz, CD₃OD) δ 1.17; SMHR (ESI) calculé pour C₃₁H₄₄N₆O₁₀P [M-H]⁻ 681.2862, expérimental 681.2850.

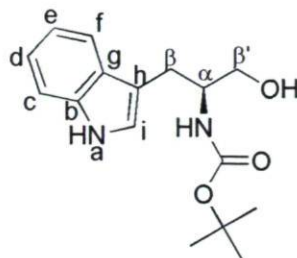
9.4.4. Adénylate de tyrosinol 2.8c



Le diester de phosphate **2.7c** (146 mg, 191 μmol) est agité 15 min dans un mélange TFA / H₂O 4 mL : 0.6 mL, à la température de la pièce. Le solvant est par la suite évaporé puis co-évaporé avec Et₂O / MeOH. Le résidu est solubilisé dans 5 mL de MeOH et le produit est précipité par l'ajout de 10 mL d'Et₂O. Le composé **2.8c** est récolté par filtration sous la forme d'un solide blanc (94.0 mg, quantitatif). T^{of} 145°C (déc.); [α]_D²¹ -3.2 (c 0.29, H₂O); IR (KBr) 3400-2600 (NH, OH et CH aliphatique), 1693 (C=N), 1204 (P=O, C-O), 1135 (C-O), 1075 (P-O-C, C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 2.62 (dd, J = 14.1 Hz et 8.5 Hz, 1H, H_β), 2.73 (dd, J = 14.2 Hz et 6.8 Hz, 1H, H_β'), 3.53-3.63 (m, 1H, H_α), 3.78-3.85 (m, 1H, H_β'), 3.90-3.97 (m, 1H, H_β'), 4.06-4.13 (m, 1H, H_{5'}), 4.14-4.20 (m, 1H, H_{5'}), 4.29-4.34 (m, 1H, H_{4'}), 4.40 (t, J = 5.3 Hz, 1H, H_{3'}), 4.61 (t, J = 4.6 Hz, 1H, H_{2'}), 6.05 (d, J = 4.2 Hz, 1H, H_{1'}), 6.56 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H_b), 6.89 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H_c), 8.28 (s, 1H, H₂), 8.38 (s, 1H, H₈); RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 33.8 (C_β), 52.7 (d, J = 8.7 Hz, C_α), 64.2, 64.8 (d, J = 4.5 Hz et 5.1 Hz, C_{5'} et C_β'), 69.7 (C_{3'}), 74.5 (C_{2'}), 83.4 (d, J = 8.7 Hz, C_{4'}), 88.4 (C_{1'}), 115.3 (C_b), 118.6 (C₅), 126.5, 130.3 (C_a et C_c), 141.6 (C₈), 146.0 (C₂), 148.1, 150.6 (C₄ et C₆), 154.6 (C_d); RMN ³¹P (121 MHz, D₂O) δ 2.81.

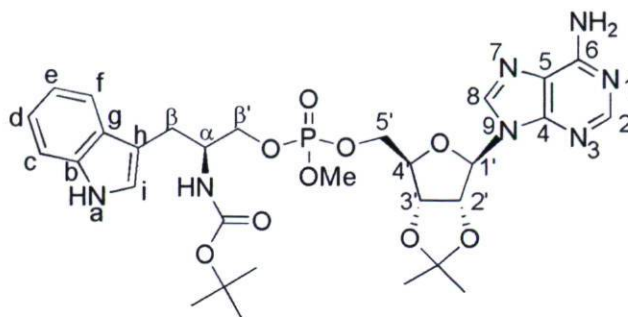
9.5. Synthèse de l'adénylate de tryptophanol 2.8d

9.5.1. *N*-Boc-tryptophanol 2.2d



Le *N*-Boc-tryptophane **2.1d** (1.00 g, 3.29 mmol) est dissous dans 20 mL de THF anhydre, auquel on ajoute Et₃N (960 µL, 6.91 mmol). La solution est refroidie à -10°C et le chloroformate d'isobutyle (860 µL, 6.58 mmol) est additionné. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à cette température pendant 30 min. Une suspension de NaBH₄ (621 mg, 16.4 mmol) dans un mélange THF / H₂O 12 mL : 3 mL est par la suite ajoutée. La réaction est laissée sous agitation durant 15 min à la température de la pièce. Le milieu est acidifié jusqu'à un pH de 6 et le solvant est évaporé. Le produit est extrait à l'AcOEt (100 mL) et lavé au NaCl sat. (50 mL). La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice (70% AcOEt / hexane) pour donner un solide blanc (721 mg, 76%). T^{of} 113-115°C; [α]_D²¹ -28.5 (c 0.98, MeOH); IR (KBr) 3401 (NH, OH), 2980 (CH aliphatique), 1687 (C=O), 1529 (NH, C-C aromatique), 1247, 1171, 1000 (C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.06 (s large, 1H, OH), 3.00 (d, J = 6.8 Hz, 2H, H_β), 3.55-3.64 (m, 1H, H_{β'}), 3.64-3.73 (m, 1H, H_{β'}), 3.93-4.05 (m, 1H, H_α), 4.87 (d, J = 6.1 Hz, 1H, NHBoc), 7.03 (s, 1H, H_i), 7.13 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H_e), 7.21 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H_d), 7.36 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H_f), 7.66 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H_c), 8.23 (s, 1H, H_a); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 27.2 (C_β), 28.6 (C(CH₃)₃), 53.3 (C_α), 65.1 (C_{β'}), 80.0 (C(CH₃)₃), 111.4 (C_c), 112.0 (C_h), 119.1, 119.8 (C_e et C_f), 122.4, 123.0 (C_i et C_d), 127.9 (C_g), 136.5 (C_b), 156.7 (NHCO₂tBu).

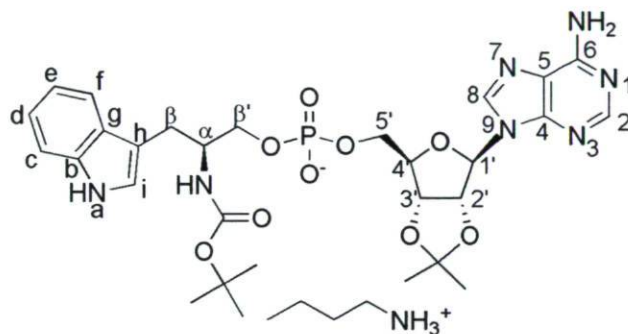
9.5.2. Triester de phosphate 2.6d



L'isopropylidène-adénosine **2.3** (794 mg, 2.58 mmol) est dissous dans 12 mL de CH_2Cl_2 anhydre, auquel on ajoute DIPEA (590 μL , 3.44 mmol) et le méthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (470 μL , 2.58 mmol). Le tout est agité 30 min à la température de la pièce puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans 20 mL de CH_3CN anhydre et le *N*-Boc-tryptophanol **2.2d** (500 mg, 1.72 mmol) ainsi que le triflate d'imidazolium (563 mg, 2.58 mmol) sont additionnés. La réaction est laissée sous agitation pendant 5h à la température de la pièce. Une solution d'iode (874 mg, 3.44 mmol) dans 15 mL de THF / H_2O / pyridine 1:1:1 est par la suite ajoutée jusqu'à ce que la couleur orangée persiste dans le mélange réactionnel. Les solvants sont évaporés puis le résidu est dilué dans 150 mL d'AcOEt, lavé au $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ sat. (30 mL), au HCl 1N (30 mL), au NaHCO_3 sat. (30 mL), au NaCl sat. (30 mL), séché sur MgSO_4 et évaporé. La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice (gradient AcOEt à 10% MeOH / AcOEt). Le triester de phosphate **2.6d** est alors isolé sous la forme d'un solide blanc (594 mg, 51%). $T^{\circ}\text{f}$ 96-98°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -22.9 (c 1.03, MeOH); IR (KBr) 3411 (NH), 2979 (CH aliphatique), 1710 (C=O), 1641 (C=N), 1251 (P=O, C-O), 1168 (C-O), 1029 (P-O-C et C-O) cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 1.33 (s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.55 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.78-2.94 (m, 2H, $\text{H}\beta$), 3.60, 3.62 (2d, $J = 11.2$ Hz, 3H, POCH_3), 3.82-3.92 (m, 1H, $\text{H}\beta'$), 3.92-4.05 (m, 2H, $\text{H}\beta'$ et $\text{H}\alpha$), 4.10-4.25 (m, 2H, $\text{H}5'$), 4.35-4.44 (m, 1H, $\text{H}4'$), 5.06, 5.08 (2dd, $J = 6.2$ Hz et 3.1 Hz, 1H, $\text{H}3'$), 5.39, 5.42 (2dd, $J = 6.3$ Hz et 2.4 Hz, 1H, $\text{H}2'$), 6.16, 6.18 (2d, $J = 2.2$ Hz, 1H, $\text{H}1'$), 6.94 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, He), 7.00-7.06 (m, 2H, Hd et Hi), 7.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Hf), 7.51 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Hc), 8.15, 8.16 (2s, 1H, H2 ou H8), 8.17 (s, 1H, H2 ou H8); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 24.3, 26.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 26.6 ($\text{C}\beta$), 27.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 51.5 (d, $J = 7.1$ Hz, $\text{C}\alpha$), 54.1 (2d, $J = 6.1$ Hz, POCH_3), 67.3 (d,

$J = 5.5$ Hz, $C5'$), 68.9 (d, $J = 5.5$ Hz, $C\beta'$), 79.0 ($C(CH_3)_3$), 81.5 ($C3'$), 84.1 ($C2'$), 85.3 (2d, $J = 7.3$ Hz, $C4'$), 90.6 ($C1'$), 110.3, 111.1 (Cc et Ch), 114.4 ($C(CH_3)_2$), 118.2, 118.5 (Ce et Cf), 119.4 ($C5$), 121.2, 123.1 (Ci et Cd), 127.6 (Cg), 136.8 (Cb), 140.4 ($C8$), 149.0 ($C4$), 152.9 ($C2$), 156.2, 156.6 ($C6$ et $NHCO_2tBu$); RMN ^{31}P (121 MHz, CD_3OD) δ 4.17 et 4.25; SMHR (ESI) calculé pour $C_{30}H_{41}N_7O_9P$ $[M+H]^+$ 674.2698, expérimental 674.2717.

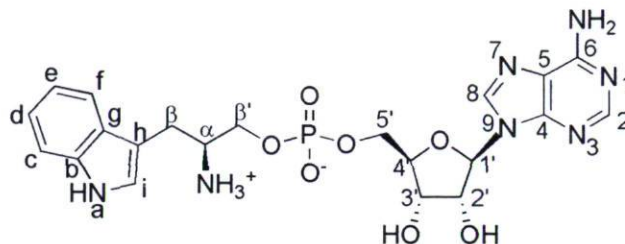
9.5.3. Diester de phosphate 2.7d



Le triester de phosphate **2.6d** (349 mg, 518 μ mol) est dissous dans 10 mL de MeOH et 10 mL de $BuNH_2$. Le mélange est agité à la température de la pièce pendant 48 heures. Le solvant est évaporé et le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (0.5% $BuNH_2$ / 15% MeOH / CH_2Cl_2). Les fractions contenant le composé sont évaporées pour obtenir **2.7d**, un solide blanc (319 mg, 84%). T^o 113-114 oC (déc.); $[\alpha]_D^{21}$ -43.3 (c 1.03, MeOH); IR (KBr) 3408 (NH), 2931 (CH aliphatique), 1694 (C=O), 1642 (C=N), 1216 (P=O, C-O), 1170 (C-O), 1068 (P-O-C, C-O) cm^{-1} ; RMN 1H (400MHz, CD_3OD) δ 0.91 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $H\delta$ $BuNH_3^+$), 1.29-1.40 (m, 14H, $C(CH_3)_3$, $C(CH_3)_2$ et $H\gamma$ $BuNH_3^+$), 1.50-1.59 (m, 5H, $C(CH_3)_2$ et $H\beta$ $BuNH_3^+$), 2.81 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, $H\alpha$ $BuNH_3^+$), 2.85 (dd, $J = 14.4$ Hz et 6.6 Hz, 1H, $H\beta$), 2.93 (dd, $J = 14.4$ Hz et 7.0 Hz, 1H, $H\beta$), 3.75-3.83 (m, 2H, $H\beta'$), 3.89-4.04 (m, 3H, $H\alpha$ et $H5'$), 4.38-4.47 (m, 1H, $H4'$), 4.99-5.07 (m, 1H, $H3'$), 5.27 (dd, $J = 5.6$ Hz et 3.3 Hz, 1H, $H2'$), 6.17 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, $H1'$), 6.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, He), 6.96-7.03 (m, 2H, Hd et Hi), 7.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Hf), 7.55 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, Hc), 8.16 (s, 1H, H2), 8.38 (s, 1H, H8); RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 12.7 ($C\delta$ $BuNH_3^+$), 19.5 ($C\gamma$ $BuNH_3^+$), 24.4, 26.3 ($C(CH_3)_2$), 27.1 ($C\beta$), 27.6 ($C(CH_3)_3$), 30.1 ($C\beta$ $BuNH_3^+$), 39.5 ($C\alpha$ $BuNH_3^+$), 51.9 ($C\alpha$), 65.4, 66.4 ($C5'$), 78.7 ($C(CH_3)_3$), 82.1 ($C3'$), 84.5 ($C2'$), 85.3 (d, $J = 8.0$ Hz, $C4'$), 90.5 ($C1'$), 110.9, 111.0 (Cc et Ch), 114.0 ($C(CH_3)_2$), 118.3,

118.4 (Ce et Cf), 119.0 (C5), 120.9, 123.1 (Ci et Cd), 127.8 (Cg), 136.8 (Cb), 140.0 (C8), 149.3 (C4), 152.8 (C2), 156.1, 156.7 (C6 et NHCO_2tBu); RMN ^{31}P (121 MHz, CD_3OD) δ 4.83; SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_9\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 660.2541, expérimental 660.2541.

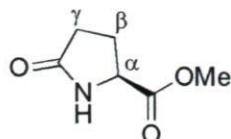
9.5.4. Adénylate de tryptophanol 2.8d



Le composé **2.7d** (212 mg, 289 μmol) est déprotégé dans un mélange de TFA / H_2O 4.0 : 0.6 mL pendant 15 min. Le solvant est par la suite évaporé puis co-évaporé avec Et_2O / MeOH jusqu'à l'obtention d'un résidu solide. Ce produit brut est solubilisé dans 3 mL de MeOH et précipité avec 30 mL d' Et_2O . Le précipité est filtré et lavé avec Et_2O pour donner un solide blanc (152 mg, quantitatif). T^{of} 155-158 $^{\circ}\text{C}$ (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -6.46 (c 0.47, MeOH); IR (KBr) 3114 (NH, OH), 2950 (CH aliphatique), 1690 (C=N), 1204 (P=O, C-O), 1135 (C-O), 1062 (P-O-C, C-O) cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 3.02 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{H}\beta$), 3.62-3.71 (m, 1H, $\text{H}\alpha$), 3.87-3.96 (m, 1H, $\text{H}\beta'$), 4.02-4.11 (m, 2H, $\text{H}5'$ et $\text{H}\beta'$), 4.12-4.22 (m, 2H, $\text{H}5'$ et $\text{H}4'$), 4.31 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, $\text{H}3'$), 4.54 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, $\text{H}2'$), 6.04 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, $\text{H}1'$), 6.94 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_e), 7.02 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_d), 7.12 (s, 1H, H_i), 7.27 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_f), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_c), 8.21 (s, 1H, H_2), 8.53 (s, 1H, H_8); RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 25.1 ($\text{C}\beta$), 52.4 (d, $J = 7.1$ Hz, $\text{C}\alpha$), 64.7, 65.0 (d, $J = 4.9$ Hz et 5.2 Hz, $\text{C}5'$ et $\text{C}\beta'$), 70.5 ($\text{C}3'$), 75.0 ($\text{C}2'$), 84.2 (d, $J = 8.0$ Hz, $\text{C}4'$), 88.5 ($\text{C}1'$), 107.7, 111.3 (C_c et C_h), 117.7, 118.8, 119.0 (C_e , C_f et C_5), 121.5, 123.9 (C_i et C_d), 127.0 (C_g), 137.0 (C_b), 141.7 (C_8), 146.2 (C_2), 148.9, 151.7 (C_4 et C_6); RMN ^{31}P (121 MHz, CD_3OD) δ 4.55; SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 520.1704, expérimental 520.1707.

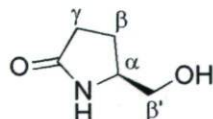
9.6. Synthèse de l'adénylate de pyroglutamol 2.14

9.6.1. Ester méthylique de l'acide L-pyroglutamique 2.10



L'acide L-pyroglutamique **2.9** (2.00 g, 15.5 mmol) est dissous dans 15 mL de MeOH et la solution est refroidie à -25°C . Le chlorure de thionyle (1.36 mL, 18.6 mmol) dilué dans 3 mL de CH_2Cl_2 est ensuite additionné sur une période de 15 min. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 1h30 à la température de la pièce. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est chromatographié sur gel de silice avec un gradient 5-10% MeOH / AcOEt pour donner **2.10** sous la forme d'une huile incolore (2.14 g, 96%). $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ 0.54 (c 1.05, CHCl_3); IR (KBr) 3430 (NH), 2961 (CH aliphatique), 1733, 1660 (C=O), 1441 (CH aliphatique), 1236 ((C=O)-OR) cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1.88-1.97 (m, 1H, H β), 2.03-2.16 (m, 2H, H γ), 2.16-2.27 (m, 1H, H β), 3.51 (s, 3H, OMe), 4.02-4.07 (m, 1H, H α), 7.57 (s, 1H, NH); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 24.1 (C β), 28.7 (C γ), 51.8 (OMe), 55.0 (C α), 172.3 (C=O), 178.2 (CONH).

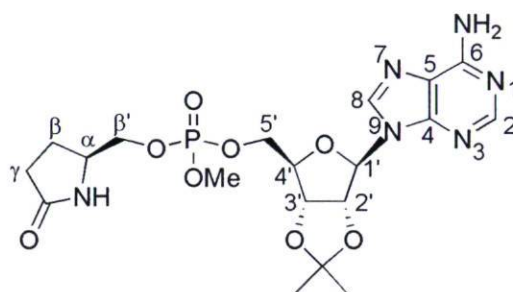
9.6.2. (S)-5-(Hydroxyméthyl)-2-pyrrolidinone 2.11



L'ester méthylique de l'acide L-pyroglutamique **2.10** (1.50 g, 10.5 mmol) est dissous dans 15 mL d'éthanol et le mélange est refroidi à 0°C . NaBH_4 (437 mg, 11.5 mmol) est lentement ajouté et le tout est laissé 2h sous agitation à la température de la pièce. La réaction est arrêtée avec du HCl conc. à 0°C jusqu'à l'obtention d'un pH de 6. Le mélange est par la suite filtré et évaporé sous pression réduite. La purification s'effectue par

chromatographie sur gel de silice avec un gradient 15-20% MeOH / AcOEt pour donner **2.11**, un solide blanc (794 mg, 66%). $T^{\circ}f$ 71°C; $[\alpha]_D^{21}$ 29.9 (c 1.05, EtOH); IR (KBr) 3417 (large, NH, OH), 2961 (CH aliphatique), 1660 (C=O) cm^{-1} ; RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.75-1.84 (m, 1H, H β), 2.11-2.21 (m, 1H, H β), 2.29-2.44 (m, 2H, H γ), 3.45 (dd, J = 11.5 Hz et 6.9 Hz, 1H, H β'), 3.67 (dd, J = 11.5 Hz et 3.2 Hz, 1H, H β'), 3.77-3.84 (m, 1H, H α), 4.64 (large s, 1H, OH), 7.55 (large s, 1H, NH); RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 22.8 (C β), 30.6 (C γ), 57.0 (C α), 65.9 (C β'), 179.8 (CONH).

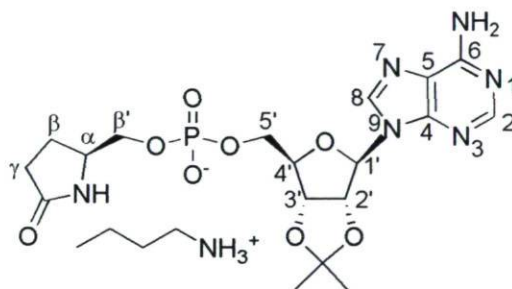
9.6.3. Triester de phosphate 2.12



L'isopropylidène-adénosine **2.3** (1.57 g, 5.11 mmol), la diisopropyléthylamine (1.17 mL, 6.82 mmol) et le méthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (1.04 mL, 5.37 mmol) sont dissous dans 25 mL de CH_2Cl_2 anhydre. Du tamis moléculaire est ajouté et le mélange est agité 30 min à la température de la pièce. Le solvant est évaporé puis le résidu est solubilisé dans 35 mL de CH_3CN anhydre contenant le pyroglutamol **2.11** (392 mg, 3.41 mmol). Le triflate d'imidazolium (1.11 g, 5.11 mmol) est finalement additionné. La réaction est laissée sous agitation pendant 5h à la température de la pièce. Une solution d'iode (1.73 g, 6.82 mmol) dans 30 mL d'un mélange THF / pyridine / H_2O 1:1:1 est par la suite ajoutée jusqu'à la persistance d'une couleur orangée dans le milieu réactionnel. Le produit est par la suite extrait à l'AcOEt, lavé au $Na_2S_2O_3$ sat., au $NaHCO_3$ sat., puis la phase aqueuse est réextraite avec deux petites portions d'AcOEt. Le produit brut est séché sur $MgSO_4$, filtré et le solvant est évaporé sous pression réduite. La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice (20% MeOH / CH_2Cl_2). Le composé **2.12** est isolé sous la forme d'un solide blanc (479 mg, 28%). $T^{\circ}f$ 92-94°C; $[\alpha]_D^{21}$ -10.5 (c 1.64, MeOH); IR (KBr) 3397, 3201 (NH), 2953 (CH aliphatique), 1710 (C=O), 1218 (P=O, C-O), 1033 (P-O-C, C-O) cm^{-1} ; RMN 1H (400 MHz, CD_3OD) δ 1.36 (s, 3H, $C(CH_3)_2$), 1.56 (s, 3H,

C(CH₃)₂, 1.68-1.78 (m, 1H, H_β), 2.09-2.20 (m, 1H, H_β), 2.21-2.35 (m, 2H, H_γ), 3.62 et 3.66 (2d, J = 11.3 Hz, 3H, POCH₃), 3.76-3.85 (m, 2H, H_β'), 3.91-4.00 (m, 1H, H_α), 4.18-4.29 (m, 2H, H₅''), 4.40-4.45 (m, 1H, m, 1H, H₄''), 5.12 (dd, 1H, J = 6.2 Hz et 3.3 Hz, H₃''), 5.47 (dt, 1H, J = 6.2 Hz et 1.8 Hz, H₂''), 6.23 (2d, J = 1.9 Hz, H₁''), 8.20, 8.23 (2s, 2H, H₂ et H₈); RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ 22.2 (C_β), 24.3, 26.2 (C(CH₃)₂), 29.5 (C_γ), 54.1, 54.2, 54.3 (POCH₃ et C_α), 67.5 (d, J = 5.4 Hz, C₅''), 70.1 (2d, J = 5.7 Hz, C_β''), 81.3, 81.4 (C₃''), 84.2 (C₂''), 85.6, 85.7 (2d, J = 7.7 Hz, C₄''), 90.4, 90.5 (C₁''), 114.4 (C(CH₃)₂), 119.3 (C₅), 140.6 (C₈), 149.0, 152.9, 156.2 (C₂, C₄ et C₆), 179.8 (CONH); RMN ³¹P (121 MHz, CD₃OD) δ 4.14, 4.15; SMHR (ESI) calculé pour C₁₉H₂₈N₆O₈P [M+H]⁺ 499.1701, expérimental 499.1703.

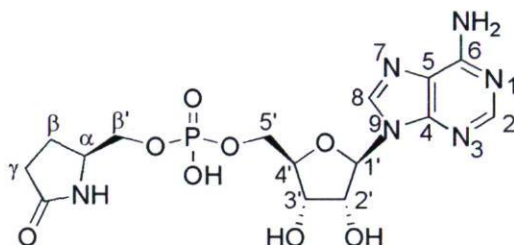
9.6.4. Diester de phosphate 2.13



Le triester de phosphate **2.12** (218 mg, 438 μmol) est dissous dans 10 mL de MeOH auquel on ajoute 10 mL de butylamine. Le mélange est agité à la température de la pièce pendant 48 heures puis le solvant est évaporé sous pression réduite. La purification s'effectue par chromatographie en phase inverse (gradient 0-15% MeOH / H₂O). Les fractions contenant le composé sont évaporées pour obtenir **2.13**, un solide blanc (190 mg, 78%). T^of 110-111°C (déc.); [α]_D²¹ -22.9 (c 1.34, MeOH); IR (KBr) 3335, 3190 (NH), 2958, 2934 (CH aliphatique), 1682 (C=O), 1217 (P=O, C-O), 1152 (C-O), 1063 (P-O-C, C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 0.93 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H_δ BuNH₃⁺), 1.30-1.42 (m, 5H, C(CH₃)₂ et H_γ BuNH₃⁺), 1.50-1.63 (m, 5H, C(CH₃)₂ et H_β BuNH₃⁺), 1.67-1.77 (m, 1H, H_β), 2.02-2.13 (m, 1H, H_β), 2.16-2.35 (m, 2H, H_γ), 2.87 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H_α BuNH₃⁺), 3.57-3.66 (m, 1H, H_α), 3.70-3.78 (m, 2H, H_β''), 3.99 (t, J = 4.6 Hz, 2H, H₅''), 4.42-4.47 (m, 1H, H₄''), 5.09 (dd, J = 6.1 Hz et 2.4 Hz, H₃''), 5.36 (dd, J = 6.1 Hz et 2.9 Hz, 1H, H₂''), 6.20 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H₁''), 8.19 et 8.41 (2s, 2H, H₂ et H₈); RMN ¹³C (100 MHz,

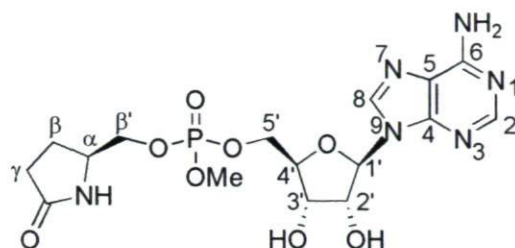
CD₃OD) δ 12.7 (C δ BuNH₃⁺), 19.5 (C γ BuNH₃⁺), 22.5 (C β), 24.3, 26.3 (C(CH₃)₂), 29.4, 29.7 (C γ et C β BuNH₃⁺), 39.3 (C α BuNH₃⁺), 54.9 (d, J = 7.9 Hz, C α), 65.5 (d, J = 5.2 Hz, C5'), 68.1 (d, J = 5.5 Hz, C β '), 81.9 (C3'), 84.4 (C2'), 85.8 (d, J = 8.6 Hz, C4'), 90.5 (C1'), 114.0 (C(CH₃)₂), 119.0 (C5), 140.3 (C8), 149.3, 152.7, 156.1 (C2, C4 et C6), 179.8 (CONH); RMN ³¹P (121 MHz, CD₃OD) δ 4.64; SMHR (ESI) calculé pour C₁₈H₂₆N₆O₈P [M+H]⁺ 485.1544, expérimental 485.1536.

9.6.5. Adénylate de pyroglutamol 2.14



Le diester de phosphate **2.13** (83.0 mg, 149 μ mol) est déprotégé dans un mélange 4 mL TFA / 0.6 mL H₂O à la température de la pièce pendant 15 min. Le tout est par la suite évaporé avec 2 X 15 mL d'un mélange Et₂O / MeOH. Le résidu est solubilisé dans 3 mL de MeOH et le produit est précipité par l'ajout de 10 mL d'Et₂O. Le composé **2.14** est isolé par filtration sous la forme d'un solide blanc (57.6 mg, 87%). T^{of} 156°C (déc.); [α]_D²¹ -13.0 (c 0.24, H₂O / DMF 1:1); IR (KBr) 3600-2500 (NH, OH), 2946 (CH aliphatique), 1700 (C=O), 1657 (C=N), 1223 (P=O, C-O), 1185 (C-O), 1061 (P-O-C, C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1.74-1.84 (m, 1H, H β), 2.12-2.24 (m, 1H, H β), 2.24-2.39 (m, 2H, H γ), 3.67-3.73 (m, 1H, H β '), 3.77-3.83 (m, 1H, H β '), 3.84-3.92 (m, 1H, H α), 4.06-4.18 (m, 2H, H5'), 4.34-4.39 (m, 1H, H4'), 4.51 (t, J = 4.7 Hz, H3'), 4.76 (t, J = 5.1 Hz, 1H, H2'), 6.17 (d, J = 5.1 Hz, 1H, H1'), 8.42, 8.58 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 22.1 (C β), 29.8 (C γ), 54.9 (d, J = 8.2 Hz, C α), 64.7 (d, J = 5.3 Hz, C5'), 68.1 (d, J = 5.5 Hz, C β '), 70.2 (C3'), 74.5 (C2'), 84.1 (d, J = 8.5 Hz, C4'), 88.1 (C1'), 118.8 (C5), 142.4 (C8), 145.1, 148.5, 150.2 (C2, C4 et C6), 181.8 (CONH); RMN ³¹P (121 MHz, D₂O) δ 3.34; SMHR (ESI) calculé pour C₁₅H₂₂N₆O₈P [M+H]⁺ 445.1231, expérimental 445.1226.

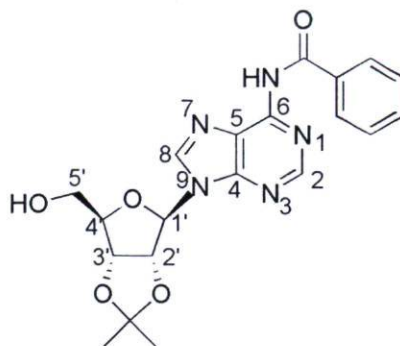
9.6.6. Triester de phosphate 2.15



Le triester de phosphate protégé **2.12** (58.0 mg, 116 μmol) est agité 15 min dans un mélange TFA / H_2O 4 mL : 0.6 mL à la température de la pièce. Le solvant est par la suite évaporé puis co-évaporé avec Et_2O / MeOH. Le résidu est solubilisé dans 5 mL de CH_2Cl_2 et le produit est précipité par l'ajout de 5 mL d' Et_2O . Le composé **2.15** est récolté par filtration sous la forme d'un solide blanc (53 mg, quantitatif). $T^{\circ}\text{f}$ 102°C (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -0.49 (c 0.78, MeOH); IR (KBr) 3322 (large, NH, OH), 2961 (CH aliphatique), 1695 (C=O), 1202 (P=O, C-O), 1134 (C-O), 1030 (P-O-C, C-O) cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 1.78-1.90 (m, 1H, H_β), 2.15-2.38 (m, 3H, H_β et H_γ), 3.75 (d, $J = 11.3$ Hz, 3H, POCH_3), 3.84-3.98 (m, 2H, H_β'), 4.03-4.11 (m, 1H, H_α), 4.23-4.27 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.27-4.35 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 4.35-4.42 (m, 2H, $\text{H}_{5'}$), 4.64 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{2'}$), 6.09 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 8.38, 8.46 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 22.2 (C_β), 29.6 (C_γ), 54.1, 54.2, 54.3 (POCH_3 et C_α), 67.0, 67.2 (d, $J = 5.6$ Hz, $\text{C}_{5'}$), 70.0, 70.1, 70.2 ($\text{C}_{3'}$ et C_β'), 74.4 ($\text{C}_{2'}$), 83.0, 83.1 ($\text{C}_{4'}$), 89.5, 89.6 ($\text{C}_{1'}$), 119.3, 119.4 (C5), 142.4 (C8), 145.0, 148.7, 148.8, 151.2 (C2, C4 et C6), 179.9, 180.0 (CONH); RMN ^{31}P (121 MHz, CD_3OD) δ 4.37; SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_8\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 459.1388, expérimental 499.1403.

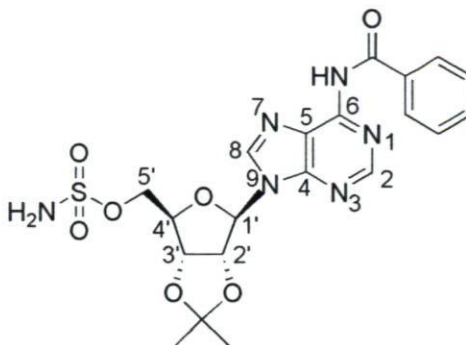
9.7. Synthèse du pyroglutamylsulfamoyl-adénosine 3.7a et du γ -méthyl ester-glutamylsulfamoyl-adénosine 3.7b.

9.7.1. *N*⁶-Benzoyl-2',3'-*O*-isopropylidène adénosine 3.2



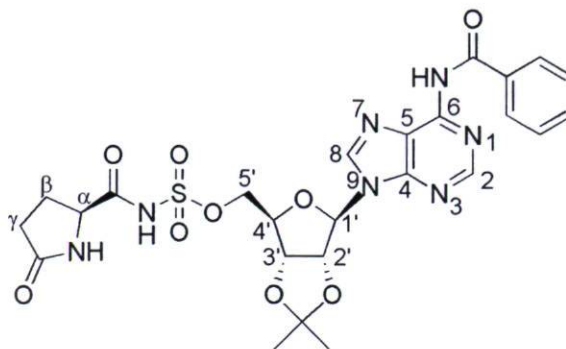
Le 2'-3'-isopropylidène adénosine **3.1** (2.00 g, 6.51 mmol) est dissous dans 45 mL de pyridine anhydre, auquel on ajoute TMSCl (1.24 mL, 9.76 mmol). Cette solution est agitée pendant 30 min à la température de la pièce. Le mélange est par après refroidi à 0°C et le chlorure de benzoyle (2.27 mL, 19.5 mmol) est additionné. La réaction est laissée 15 min à 0°C puis 2 heures à la température de la pièce. Le tout est refroidi de nouveau à 0°C et 10 mL d'eau est ajouté (5 min) puis 20 mL de NH₄OH (20 min). Le solvant est évaporé et le résidu est dilué dans de l'AcOEt. Celui-ci est lavé au NaCl sat., séché sur MgSO₄ et évaporé. La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice (préadsorption au MeOH) avec un gradient 25% à 5% CH₂Cl₂ / AcOEt pour donner un solide blanc (2.22 g, 83%). T[°]f 147°C; [α]_D²¹: -95.4 (c 0.94, CHCl₃); IR (KBr) 3355, 3184 (NH, OH), 3062 (CH aromatique), 2934, 2855 (CH aliphatique), 1709 (C=O), 1608 (C-C aromatique), 1213, 1159, 1060 (C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1.36 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.62 (s, 3H, C(CH₃)₂), 3.78 (dd, J = 12.7 Hz et 1.9 Hz, 1H, H5'), 3.96 (dd, J = 12.7 Hz et 1.9 Hz, 1H, H5'), 4.52 (s, 1H, H4'), 5.07 (d, J = 5.9 Hz, 1H, H3'), 5.20 (t, J = 5.1 Hz, 1H, H2'), 5.98 (d, J = 4.4 Hz, 1H, H1'), 7.48 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H *m*-Ph), 7.58 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H *p*-Ph), 8.00 (d, J = 7.6 Hz, 2H, *o*-Ph), 8.19, 8.72 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 25.2, 27.5 (C(CH₃)₂), 63.1 (C5'), 81.6 (C3'), 83.5 (C2'), 86.6 (C4'), 94.0 (C1'), 114.2 (C(CH₃)₂), 123.8 (C5), 128.0, 128.9 (C *o*-Ph et C *m*-Ph), 133.0, 133.4 (C Ph et C *p*-Ph), 142.6 (C8), 150.1, 150.6 (C4 et C6), 152.4 (C2), 164.9 (C=O).

9.7.2. *N*⁶-Benzoyl-2',3'-*O*-isopropylidène-5'-*O*-sulfamoyladénosine 3.3



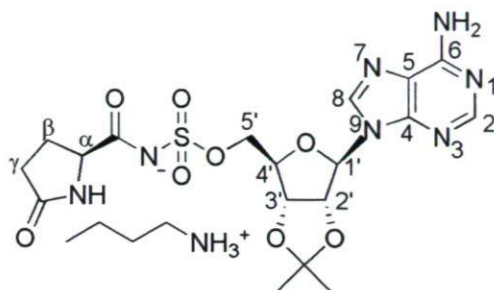
L'isocyanate de chlorosulfonyle (1.35 mL, 15.6 mmol) est dissous dans 10 mL de CH₂Cl₂ anhydre en présence d'acide formique (597 μL, 15.6 mmol). Le tout est agité 3 heures à la température de la pièce, 1 heure à reflux puis 3 heures à la température de la pièce. Cette solution de chlorure de sulfonamide est ensuite additionnée goutte-à-goutte à 0°C au *N*⁶-benzoyl-2',3'-*O*-isopropylidène adénosine **3.2** (800 mg, 1.95mmol) dissous dans 15 mL de DMF anhydre avec du carbonate de calcium (1.95 g, 19.5 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à la température de la pièce. Après dilution dans 120 mL d'AcOEt, le produit est lavé avec NaHCO₃ sat. (2 X 30 mL), H₂O (4 X 15 mL), séché sur MgSO₄ et le solvant est évaporé. La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice (25% CH₂Cl₂ / AcOEt) afin d'isoler le composé **3.3**, un solide blanc (878 mg, 92%). T^{of} 110°C (déc.); [α]_D²¹ -27.9 (c 1.07, CHCl₃); IR (KBr) 3324 (large, NH), 3090 (CH aromatique), 2988, 2936 (CH aliphatique), 1703 (C=O), 1613 (C-C aromatique), 1375 (SO₂NH₂), 1250 (C-O), 1183 (SO₂NH₂, C-O), 1075 (C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.33 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.56 (s, 3H, C(CH₃)₂), 4.26-4.35 (m, 2H, H5'), 4.48-4.53 (m, 1H, H4'), 5.01 (dd, J = 6.2 Hz et 2.3 Hz, 1H, H3'), 5.36 (dd, J = 6.2 Hz et 2.2 Hz, 1H, H2'), 6.18 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H1'), 6.46 (s large, 2H, SO₃NH₂), 7.37 (t, J = 7.7 Hz, 2H, *m*-Ph), 7.49 (t, J = 7.4 Hz, 1H, *p*-Ph), 7.88 (d, J = 7.2 Hz, 2H, *o*-Ph), 8.45, 8.66 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25.4, 27.2 (C(CH₃)₂), 69.5 (C5'), 81.5 (C3'), 84.6 (C2'), 85.1 (C4'), 91.8 (C1'), 114.8 (C(CH₃)₂), 122.3 (C5), 128.3, 128.9 (C *o*-Ph et C *m*-Ph), 132.9 (C *p*-Ph), 133.2 (C Ph), 142.7 (C8), 149.0, 151.5, 152.6 (C2, C4 et C6), 166.0 (NHCOPh).

9.7.3. *N*⁶-Benzoyl-2'-3'-isopropylidène-5'-*O*-(*N*-(*L*-pyroglutamyl)-sulfamoyl) adénosine 3.5a



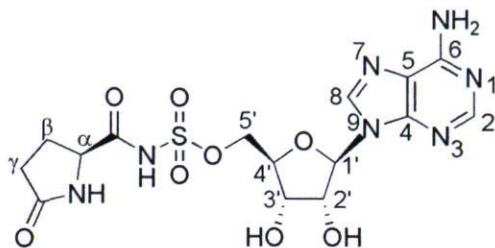
L'acide pyroglutamique **3.4a** (105 mg, 814 μmol), le sulfonamide **3.3** (400 mg, 814 μmol), DMAP (99.0 mg, 814 μmol) et EDC (234 mg, 1.22 mmol) sont dissous dans 25 mL de CH_2Cl_2 anhydre. Le mélange est agité pendant deux heures à la température de la pièce. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est chromatographié sur gel de silice (25% MeOH / AcOEt) pour isoler le composé **3.5a**, un solide blanc (345 mg, 70%). $T^{\circ}\text{f}$ 175°C (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -33.2 (c 0.74, H_2O); IR (KBr) 3409 (NH), 2989, 2940 (CH aliphatique), 1681 (C=O), 1614 (C=O, C-C aromatique), 1262 (OSO₂NHR, C-O), 1153 (C-O) cm^{-1} ; RMN ¹H ($\text{CD}_3\text{OD} / \text{D}_2\text{O}$) δ 1.41 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.62 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.88-1.97 (m, 1H, H β), 2.23-2.30 (m, 2H, H γ), 2.32-2.42 (m, 1H, H β), 4.01-4.06 (m, 1H, H α), 4.21-4.30 (m, 2H, H5'), 4.64-4.67 (m, 1H, H4'), 5.15 (dd, J = 6.0 Hz et 2.2 Hz, 1H, H3'), 5.42 (dd, J = 6.0 Hz et 2.8 Hz, 1H, H2'), 6.32 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H1'), 7.54 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H *m*-Ph), 7.64 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H *p*-Ph), 7.98-8.03 (m, 2H, H *o*-Ph), 8.60 et 8.72 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ¹³C (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} / \text{D}_2\text{O}$) δ 24.5 (C β), 25.7, 26.3 (C(CH₃)₂), 29.7 (C γ), 59.4 (C α), 68.8 (C5'), 81.8 (C3'), 84.5 (C2'), 84.8 (C4'), 91.4 (C1'), 114.9 (C(CH₃)₂), 123.8 (C5), 128.3 (C *o*-Ph), 129.0 (C *m*-Ph), 133.2, 133.4 (C *p*-Ph), 143.5 (C8), 149.5, 151.8, 152.3 (C2, C4 et C6), 168.0 (NH(C=O)Ph) 180.0, 181.2 (CONH et (C=O)NHSO₃R).

9.7.4. 2',3'-O-Isopropylidène-5'-O-(N-(L-pyroglutamyl)-sulfamoyl) adénosine 3.6a



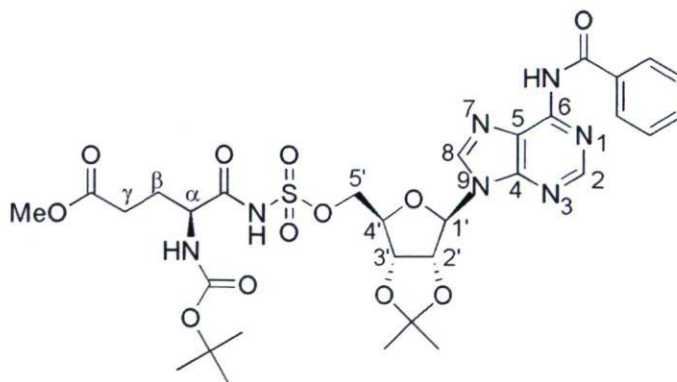
Le composé **3.5a** (178 mg, 296 μmol) est dissous dans 5 mL de MeOH auquel on ajoute 5 mL de BuNH₂. Le mélange est agité à la température de la pièce pendant deux heures puis évaporé sous pression réduite. La purification s'effectue par chromatographie en phase inverse (gradient 0-20% MeOH / H₂O). Le produit **3.6a** est alors obtenu sous la forme d'un solide blanc (120 mg, 71%). T[°]f 128°C (déc.); [α]_D²¹ -16.1 (c 1.48, MeOH); IR (KBr) 3340, 3196 (NH), 2964, 2934, 2873 (CH aliphatique), 1681 (C=O), 1601 (C-C, C-N aromatique), 1296 (OSO₂NHR), 1143, 1077 (C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 0.91 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H δ BuNH₃⁺), 1.27-1.42 (m, 5H, C(CH₃)₂ et H γ BuNH₃⁺), 1.49-1.64 (m, 5H, C(CH₃)₂ et H β BuNH₃⁺), 1.96-2.09 (m, 1H, H β), 2.17-2.42 (m, 3H, H γ et H β), 2.88 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H α BuNH₃⁺), 4.01-4.07 (m, 1H, H α), 4.16-4.26 (m, 2H, H5'), 4.49-4.53 (m, 1H, H4'), 5.08 (dd, J = 5.9 Hz et 2.0 Hz, 1H, H3'), 5.32 (dd, J = 5.9 Hz et 2.6 Hz, 1H, H2'), 6.19 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H1'), 8.17 (s, 1H, H2), 8.36 (s, 1H, H8); RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ 12.7 (C δ BuNH₃⁺), 19.5 (C γ BuNH₃⁺), 24.3 (C β), 25.6, 26.3 (C(CH₃)₂), 29.4, 29.7 (C γ et C β BuNH₃⁺), 39.4 (C α BuNH₃⁺), 59.4 (C α), 68.5 (C5'), 81.9 (C3'), 84.6, 84.8 (C2' et C4'), 90.7 (C1'), 114.1 (C(CH₃)₂), 119.0 (C5), 140.2 (C8), 149.2 (C4), 152.8 (C2), 156.2 (C6), 179.6, 180.2 (CONH et (C=O)NHSO₃R).

9.7.5. 5'-O-(N-(L-Pyroglutamyl)-sulfamoyl) adénosine 3.7a



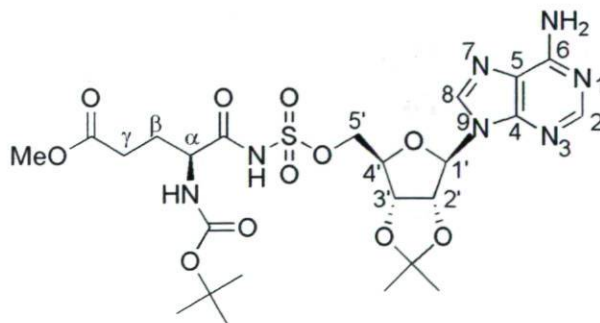
Le composé **3.6a** (74.2 mg, 130 μmol) est déprotégé dans un mélange de TFA / H₂O 4.0 mL : 0.6 mL à la température de la pièce pendant 15 min. Le solvant est par la suite évaporé puis co-évaporé avec Et₂O / MeOH. Le résidu est solubilisé dans 5 mL de MeOH puis 10 mL d'Et₂O est ajouté afin de précipiter le produit. On obtient, après filtration, un solide blanc (45.5 mg, 77%). T_f 126°C (déc.); $[\alpha]_D^{21}$ 6.8 (c 0.82, DMSO); IR (KBr) 3331 (large, NH, OH), 2952, 2854 (CH aliphatique), 1694 (C=O), 1268 (OSO₂NHR), 1202, 1146, 1102 (C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1.94-2.04 (m, 1H, H β), 2.21-2.38 (m, 2H, H γ), 2.42-2.53 (m, 1H, H β), 4.22 (dd, J = 9.0 Hz et 5.6 Hz, H α), 4.39-4.46 (m, 3H, H4'et H5'), 4.52 (t, J = 4.9 Hz, 1H, H3'), 4.76 (t, J = 4.9 Hz, 1H, H2'), 6.14 (d, J = 4.6 Hz, 1H, H1'), 8.41 et 8.50 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 25.3 (C β), 29.4 (C γ), 58.5 (C α), 69.2 (C3'), 69.9 (C5'), 74.1 (C2'), 82.3 (C4'), 88.3 (C1'), 118.8 (C5), 142.5 (C8), 144.9 (C2), 148.4 (C4), 150.2 (C6), 178.0, 181.9 (CONH et (C=O)NHSO₃R).

9.7.6. N⁶-Benzoyl-2',3'-O-isopropylidène-5'-O-[N-(N-Boc- γ -méthylester-glutamyl)-sulfamoyl] adénosine 3.5b



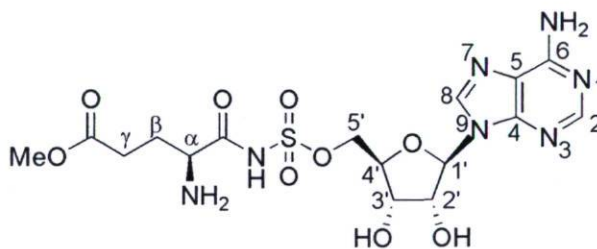
L'acide *N*-Boc- γ -méthylester glutamique **3.4b** (300 mg, 1.15 mmol), le *N*⁶-benzoyl-2',3'-*O*-isopropylidène-5'-*O*-sulfamoyl adénosine **3.3** (563 mg, 1.15 mmol) et le DMAP (210 mg, 1.72 mmol) sont dissous dans 20 mL de CH₂Cl₂ anhydre, auquel on ajoute EDC (330 mg, 1.72 mmol). Le mélange réactionnel est agité 3 heures à la température ambiante puis le produit est extrait avec AcOEt / NH₄Cl. La phase aqueuse est réextraite avec une petite portion d'AcOEt puis la phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient 0-5% MeOH / AcOEt) pour donner le composé **3.5b** sous la forme d'un solide blanc (780 mg, 93%). T_f 161°C (déc.); [α]_D²¹ -30.6 (c 1.52, MeOH); IR (KBr) 3420 (NH), 2982, 2945 (CH aliphatique), 1700 (C=O), 1616, 1583 (C-C, C-N aromatique), 1297 (OSO₂NHR), 1248, 1152, 1076 (C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 1.35 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.39 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.61 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.73-1.84 (m, 1H, H β), 1.98-2.08 (m, 1H, H β), 2.21-2.34 (m, 2H, H γ), 3.57 (s, 3H, OCH₃), 3.93-3.99 (m, 1H, H α), 4.23-4.31 (m, 2H, H5'), 4.57-4.61 (m, 1H, H4'), 5.13 (dd, J = 6.0 Hz et 2.1 Hz, 1H, H3'), 5.42 (dd, J = 6.0 Hz et 2.5 Hz, 1H, H2'), 6.36 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H1'), 7.50 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H *m*-Ph), 7.62 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H *p*-Ph), 8.03-8.07 (m, 2H, *o*-Ph), 8.71 et 8.75 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ 24.4, 26.3 (C(CH₃)₂), 27.5 (C(CH₃)₃), 28.0 (C β), 30.0 (C γ), 50.9 (OCH₃), 56.3 (C α), 68.8 (C5'), 79.2 (C(CH₃)₃), 81.8 (C3'), 84.8 (C2'), 85.3 (C4'), 91.0 (C1'), 114.0 (C(CH₃)₂), 123.3 (C5), 128.4, 128.5 (C *o*-Ph et C *m*-Ph), 132.9 (C *p*-Ph), 133.3 (C-Ph), 143.9 (C8), 149.4, 152.2, 152.3 (C2, C4 et C6), 156.6 (NHCO₂*t*Bu), 167.3 (NHCOPh), 174.0 (CO₂CH₃), 179.6 (CONHSO₃R); SMHR (ESI) calculé pour C₃₁H₄₀N₇O₁₂S [M+H]⁺ 734.2450, expérimental 734.2446.

9.7.7. 2',3'-*O*-Isopropylidène-5'-*O*-[*N*-(*N*-Boc- γ -méthylester-glutamyl)-sulfamoyl] adénosine **3.6b**



Le composé **3.5b** (189 mg, 258 μmol) est dissous dans un mélange 3 mL MeOH / 3 mL butylamine et agité pendant une heure à la température de la pièce. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le produit brut est chromatographié sur gel de silice (15% MeOH / AcOEt), ce qui permet d'isoler le composé **3.6b**, un solide blanc (136 mg, 84%). $T^{\circ}\text{f}$ 148°C (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$: -31.3 (c 0.70, MeOH); IR (KBr) 3357, 3214 (NH), 2982, 2940 (CH aliphatique), 1698 (C=O), 1638 (C=O, C-N aromatique), 1590 (C-C, C-N aromatique), 1292 (OSO₂NHR), 1250, 1212, 1154, 1076 (C-O) cm^{-1} ; RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 1.38 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.60 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.82-1.92 (m, 1H, H β), 2.06-2.15 (m, 1H, H β), 2.32-2.42 (m, 2H, H γ), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 3.96-4.02 (m, 1H, H α), 4.22-4.32 (m, 2H, H5'), 4.49-4.55 (m, 1H, H4'), 5.11 (dd, J = 6.1 Hz et 2.3 Hz, 1H, H3'), 5.37 (dd, J = 6.1 Hz et 3.0 Hz, 1H, H2'), 6.23 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H1'), 8.22, 8.40 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ 24.4, 26.3 (C(CH₃)₂), 27.6 (C(CH₃)₃), 28.2 (C β), 30.0 (C γ), 50.9 (OCH₃), 56.3 (C α), 68.8 (C5'), 79.2 (C(CH₃)₃), 81.9 (C3'), 2 X 84.4 (C2' et C4'), 90.6 (C1'), 114.2 (C(CH₃)₂), 119.0 (C5), 140.3 (C8), 149.2 (C4), 152.8 (C2), 156.1 (C6), 156.6 (NHCO₂tBu), 174.2 (CO₂CH₃), 179.7 (CONHSO₃R); SMHR (ESI) calculé pour C₂₄H₃₆N₇O₁₁S [M+H]⁺ 630.2188, expérimental 630.2199.

9.7.8. 5'-O-[N-(γ -Méthylester-glutamyl)-sulfamoyl] adénosine **3.7b**

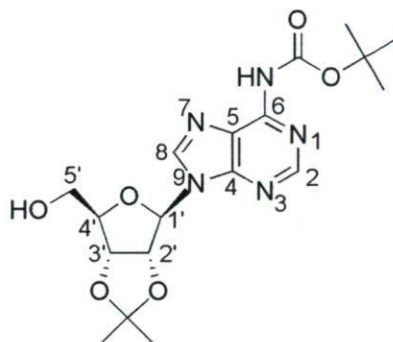


Le composé **3.6b** (70.0 mg, 111 μmol) est agité 15 min dans un mélange TFA / H₂O 4 mL : 0.6 mL, à la température de la pièce. Le solvant est par la suite évaporé puis co-évaporé avec Et₂O / MeOH. Le résidu est solubilisé dans 3 mL de MeOH et précipité par l'ajout de 10 mL d'Et₂O. Le produit déprotégé **3.7b** est récolté par filtration sous la forme d'un solide blanc (52.3 mg, 96%). $T^{\circ}\text{f}$ 148°C (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ 14.8 (c 0.22, MeOH / H₂O 1:1); IR (KBr) 3404, 3152 (NH), 2958 (CH aliphatique), 1692 (C=O), 1636 (C=O, C-N

aromatique), 1301 (OSO₂NHR), 1204, 1146 (C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 2.08-2.24 (m, 2H, Hβ), 2.56 (t, J = 7.4 Hz, 2H, Hγ), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (t, J = 6.3 Hz, 1H, Hα), 4.30-4.34 (m, 1H, H4'), 4.34-4.43 (m, 3H, H3' et H5'), 4.62 (t, J = 5.0 Hz, 1H, H2'), 6.11 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H1'), 8.35 et 8.62 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ 26.4 (Cβ), 29.2 (Cγ), 51.2 (OCH₃), 54.8 (Cα), 68.1 (C3'), 70.6 (C5'), 75.1 (C2'), 83.2 (C4'), 88.8 (C1'), 118.9 (C5), 141.9 (C8), 146.7 (C2), 149.0 (C4), 152.1 (C6), 173.4, 173.7 (CO₂CH₃ et CONHSO₃R); SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₂₄N₇O₉S [M+H]⁺ 490.1350, expérimental 490.1344.

9.8. Synthèse du tryptophanysulfamoyl-adénosine 3.12

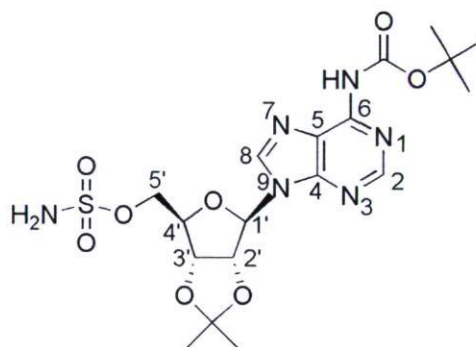
9.8.1. N⁶-Boc-2'-3'-O-isopropylidène adénosine 3.8



L'isopropylidène adénosine **3.1** (800 mg, 2.60 mmol), le DMAP (31.8 mg, 260 μmol) et le Boc₂O (2.27 g, 10.4 mmol) sont dissous dans 40 mL de THF anhydre puis le mélange réactionnel est agité 24 heures à la température de la pièce. Le solvant est évaporé et le produit brut est solubilisé dans un mélange 10 mL MeOH / 10 mL NaHCO₃ saturé. Le tout est agité 48 heures à 60°C. Le produit est extrait avec AcOEt (150 mL) et lavé avec H₂O (50 mL). La phase aqueuse est réextraite avec AcOEt (50 mL) puis la phase organique combinée est séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (20% hexane / AcOEt) pour donner **3.8** sous la forme d'un solide blanc (601 mg, 57%). T_{of} 78°C; [α]_D²¹ -96.0 (c 1.08, CHCl₃); IR (KBr) 3428 (NH, OH), 2983, 2936 (CH aliphatique), 1750 (C=O), 1613, 1588 (C-C et C-N aromatique), 1234, 1111, 1077 (C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.35 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.52 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.61

(s, 3H, C(CH₃)₂), 3.78 (dd, J = 2.2 Hz et 12.8 Hz, 1H, H5'), 3.97 (dd, J = 1.7 Hz et 12.8 Hz, 1H, H5'), 4.52 (s large, 1H, H4'), 5.08 (dd, J = 1.3 Hz et 5.9 Hz, 1H, H3'), 5.18 (dd, J = 4.8 Hz et 5.7 Hz, 1H, H2'), 5.92 (d, J = 4.5 Hz, 1H, H1'), 8.09 et 8.70 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25.4, 27.8 (C(CH₃)₂), 28.3 (C(CH₃)₃), 63.4 (C5'), 81.9 (C3'), 82.8 (C(CH₃)₃), 83.5 (C2'), 86.6 (C4'), 94.4 (C1'), 142.3 (C8), 149.8, 149.9, 150.8, 152.9 (C2, C4, C6 et CO₂tBu).

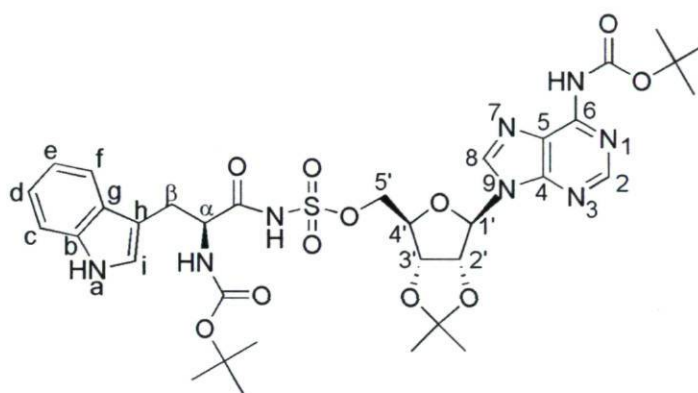
9.8.2. N⁶-Boc-2',3'-O-isopropylidène-5'-O-sulfamoyladénosine 3.9



L'isocyanate de chlorosulfonyle (1.02 mL, 11.8 mmol) est dissous dans 10 mL de CH₂Cl₂ anhydre en présence d'acide formique (453 µL, 11.8 mmol). Le mélange est agité 2 heures à la température de la pièce, 1 heure à reflux puis 3 heures à la température de la pièce. Cette solution de chlorure de sulfonamide est ensuite additionnée goutte-à-goutte à 0°C au N⁶-Boc-2',3'-O-isopropylidène adénosine **3.8** (800 mg, 1.48 mmol) dissous dans 12 mL de DMF anhydre avec du carbonate de calcium (1.48 g, 14.8 mmol). Le mélange réactionnel est agité 30 min à la température de la pièce. Après dilution dans 120 mL d'AcOEt, le produit est lavé avec NaHCO₃ sat. (2 X 30mL), H₂O (40 mL), séché sur MgSO₄ et le solvant est évaporé. La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice (30% CH₂Cl₂/ AcOEt) afin d'isoler le composé **3.9**, un solide blanc (657 mg, 91%). T_f 100-102°C; [α]_D²¹ -21.4 (c 0.99, CHCl₃); IR (KBr) 3367 (large, NH), 2984, 2939 (CH aliphatique), 1749 (C=O), 1613, 1590 (C-C et C-N aromatique), 1372 (SO₂NH₂), 1237 (C-O), 1183 (SO₂NH₂, C-O), 1146, 1107, 1077 (C-O) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.34 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.50 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.58 (s, 3H, C(CH₃)₂), 4.31 (dd, J = 5.0 Hz et 11.0 Hz, 1H, H5'), 4.37 (dd, J = 3.6 Hz et 11.0 Hz, 1H, H5'), 4.54-4.58 (m, 1H, H4'), 5.06

(dd, $J = 2.7$ Hz et 6.2 Hz, 1H, H3'), 5.37 (dd, $J = 2.3$ Hz et 6.2 Hz, 1H, H2'), 6.14-6.24 (m, 3H, H1' et SO₂NH₂), 8.25, 8.71 (2s, 2H, H2 et H8); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25.3, 25.5, 27.1, 27.4 (C(CH₃)₂), 28.2, 28.4 (C(CH₃)₃), 69.5 (C5'), 81.2, 81.6 (C3'), 82.9 (C(CH₃)₃), 84.4, 84.5, 84.9 (C2' et C4'), 91.3, 91.6 (C1'), 115.0 (C(CH₃)₂), 121.8 (C5), 142.0, 142.4 (C8), 149.9, 150.5, 150.7, 152.7, 153.0 (C2, C4, C6 et CO₂tBu).

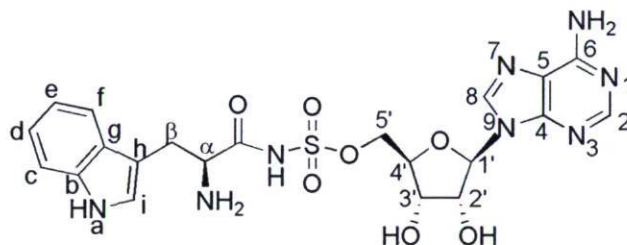
9.8.3. *N*⁶-Boc-2'-3'-isopropylidène-5'-*O*-(*N*-(*N*-Boc-tryptophanyl)-sulfamoyl) adénosine **3.11**



Le *N*-Boc-tryptophane **3.10** (125 mg, 411 μ mol), le *N*⁶-Boc-2',3'-*O*-isopropylidène-5'-*O*-sulfamoyl adénosine (200 mg, 411 μ mol), le DMAP (75.3 mg, 617 μ mol) et EDC (118 mg, 617 μ mol) sont dissous dans 7.0 mL de CH₂Cl₂ anhydre. Le mélange réactionnel est agité 3 heures à température ambiante puis le produit est extrait avec AcOEt (50 mL) et NH₄Cl (25 mL). La phase aqueuse est réextraite avec une petite portion d'AcOEt (25 mL) puis la phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (7% MeOH / CHCl₃) pour donner le composé **3.11** sous la forme d'un solide blanc (205 mg, 64%). T[°]f 165-170 °C (déc.); $[\alpha]_D^{21}$ -25.1 (c 1.32, CH₂Cl₂ / MeOH 1:1); IR (KBr) 3416 (NH), 2981 (CH aliphatique), 1713 (C=O), 1619 (C=O), 1370 (C-H aliphatique), 1251 (OSO₂NHR), 1149 (C-O), 854 (C-H aromatique) cm⁻¹; RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 1.29, 1.30 (2s, 12H, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂), 1.53 (2s, 12H, C(CH₃)₃ et C(CH₃)₂), 3.00 (dd, $J = 14.4$ Hz et 7.0 Hz, 1H, H β), 3.21 (dd, $J = 14.5$ Hz et 5.5 Hz, 1H, H β), 4.00 (dd, $J = 10.7$ Hz et 4.0 Hz, 1H, H5'), 4.08 (dd, $J = 11.1$ Hz et 3.2 Hz, 1H, H5'), 4.27 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, H α), 4.39-4.48 (m, 1H, H4'), 4.91-5.00 (m, 1H, H3'), 5.23-

5.28 (m, 1H, H2'), 6.20 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H1'), 6.88 (t, J = 7.4 Hz, 1H, He), 6.97 (t, J = 7.6 Hz, 1H, Hd), 7.00 (s, 1H, Hi), 7.21 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Hf), 7.48 (d, J = 7.8 Hz, 1H, Hc), 8.44 (s, 1H, H2), 8.55 (s, 1H, H8); RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 24.9, 25.8, 26.5, 27.7 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 28.4 ($\text{C}\beta$), 28.5, 28.6, 28.9 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 56.6, 57.6 ($\text{C}\alpha$), 67.8 ($\text{C}5'$), 78.1, 78.5 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 80.7 ($\text{C}3'$), 82.3($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 84.2, 84.5, 84.9, 86.2 ($\text{C}2'$ et $\text{C}4'$), 90.3, 91.0 ($\text{C}1'$), 110.8, 111.5, 111.7, 112.9 ($\text{C}c$ et $\text{C}h$), 113.8 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2$), 118.6, 118.7, 119.1, 119.4, 121.2, 121.3, 122.3, 124.0, 124.4 ($\text{C}e$, $\text{C}f$, $\text{C}i$, $\text{C}d$ et $\text{C}5$), 128.2, 128.6 ($\text{C}g$), 136.5, 136.6 ($\text{C}b$), 142.9 ($\text{C}8$), 147.7, 150.7, 151.6, 152.0, 152.5 ($\text{C}2$, $\text{C}4$, $\text{C}6$ et CO_2tBu), 155.4, 155.6 (CO_2tBu), 176.6 (CONHSO_3R); SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 775.2949, expérimental 775.2961.

9.8.4. Tryptophanysulfamoyl-adénosine 3.12

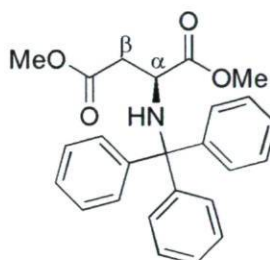


Le composé **3.11** (111 mg, 143 μmol) est agité 15 min dans un mélange de TFA / H_2O 4 mL : 0.6 mL, à la température de la pièce. Le solvant est par la suite évaporé puis co-évaporé avec Et_2O / MeOH. Le résidu est solubilisé dans 5 mL de MeOH et précipité par l'ajout de 25 mL d' Et_2O . Le produit déprotégé **3.12** est récolté par filtration sous la forme d'un solide blanc (50.1 mg, 66%). T^{of} 165-167 $^{\circ}\text{C}$ (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -19.9 (c 0.26, DMSO); IR (KBr) 3407 (NH, OH), 2946 (CH aliphatique), 1640 (C=O), 1479 (CH aliphatique), 1300 (OSO_2NHR), 1146 (C-O) cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ 3.00 (dd, J = 15.0 Hz et 8.7 Hz, 1H, $\text{H}\beta$), 3.29 (dd, J = 15.1 Hz et 3.9 Hz, 1H, $\text{H}\beta$), 3.61-3.70 (m, 1H, $\text{H}\alpha$), 4.02-4.18 (m, 4H, $\text{H}5'$, $\text{H}4'$ et $\text{H}3'$), 4.57 (t, J = 5.2 Hz, 1H, $\text{H}2'$), 5.32 (s large, 1H, OH), 5.52 (s, large, 1H, OH), 5.89 (d, J = 5.7 Hz, 1H, $\text{H}1'$), 6.95 (t, J = 7.3 Hz, 1H, He), 7.03 (t, J = 7.6 Hz, 1H, Hd), 7.17 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Hi), 7.31 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Hf), 7.45 (s large, 2H), 7.53 (d, J = 7.8 Hz, 1H, Hc), 7.71 (s large, 3H, NH_3^+), 8.15 (s, 1H, H2), 8.41 (s, 1H, H8), 10.89 (s, 1H, Ha); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO) δ 28.0 ($\text{C}\beta$), 56.0 ($\text{C}\alpha$), 68.3 ($\text{C}5'$),

71.4, 74.2 (C2'et C3'), 83.1 (C4'), 87.8 (C1'), 108.7, 112.0 (Cc et Ch), 118.9, 119.1, 121.7, 125.2 (Ce, Cf, Ci, Cd et C5), 127.8 (Cg), 136.9 (Cb), 140.3 (C8), 150.1, 152.9 (C2 et C4), 156.3 (C6), 173.0 (CONHSO₃R); SMHR (ESI) calculé pour C₂₁H₂₅N₈O₇S [M+H]⁺ 533.1561, expérimental 533.1578.

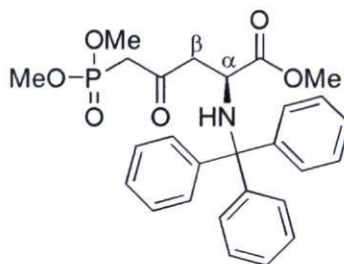
9.9. (S)-2-Amino-4-oxo-5-(phosphonyl) pentanoate de méthyle 5.4

9.9.1. Diméthyl ester du N-(trityl) aspartate 5.2



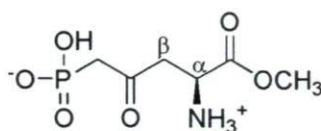
L'hydrochlorure du diméthyl ester de l'acide aspartique **5.1** (2.00 g, 10.1 mmol) et le chlorure de trityle (2.96 g, 10.6 mmol) sont dissous dans 18 mL de CH₃CN anhydre. La triéthylamine (2.80 mL) est par la suite ajoutée goutte-à-goutte sur une période de 2 heures puis le mélange est maintenu sous agitation pendant 4 heures additionnelles. Le produit est extrait avec AcOEt / NaCl sat., séché sur MgSO₄, filtré et évaporé. La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice (gradient 10 à 25% AcOEt / hexane) pour donner **5.2**, un solide blanc (3.85 g, 94%). T[°]f 67-68°C; [α]_D²¹ 13.6 (c 1.04, CHCl₃); IR (KBr) 3326 (NH), 3057, 3025 (C-C aromatique), 1741 (C=O), 1202, 1163 (C-O et C-N) cm⁻¹; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 2.53 (dd, J = 7.2 Hz et 14.7 Hz, 1H, H_β), 2.67 (dd, J = 5.3 Hz et 14.7 Hz, 1H, H_β), 2.99 (s large, 1H, NH), 3.28 (s, 3H, CO₂CH₃α), 3.67-3.77 (m, 4H, H_α et CO₂CH₃β), 7.16-7.33 (m, 9H, H *m*-Ph et H *p*-Ph), 7.52 (d, J = 7.5 Hz, 6H, H *o*-Ph); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 40.3 (C_β), 51.8, 51.9 (OCH₃), 53.7 (C_α), 71.2 (CPh₃), 126.6 (C *p*-Ph), 127.8, 128.8 (C *o*-Ph et C *m*-Ph), 145.7 (C Ph), 171.0, 174.0 (CO₂CH₃).

9.9.2. (S)-2-N-(Trityl) amino-4-oxo-5-(diméthylphosphonyl) pentanoate de méthyle 5.3



Le diméthyl méthylphosphonate (1.21 mL, 11.2 mmol) dans 20 mL de THF anhydre est refroidi à -78°C sous atmosphère d'azote. Une solution de butyllithium 1.6 M dans l'hexane (7.19 mL, 11.2 mmol) est par la suite additionnée goutte-à-goutte et le mélange est agité pendant 30 min. Le diméthyl ester du *N*-(trityl) aspartate **5.2** (1.00 g, 2.48 mmol) dans 3 mL de THF est ajouté et la solution est agité pendant 30 min à -78°C . La réaction est arrêtée avec 10 mL de NH_4Cl saturé. Le produit est dilué avec AcOEt, lavé avec NH_4Cl sat. et la phase aqueuse est réextraite avec deux petites portions d'AcOEt. La phase organique combinée est séchée sur MgSO_4 puis évaporée sous pression réduite. La purification s'effectue par chromatographie sur gel de silice (AcOEt). Le produit **5.3** (solide blanc) est obtenu avec un rendement de 64% (788 mg). $T^{\circ}\text{f}$ $113\text{-}114^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 22.2 (c 1.02, CHCl_3); IR (KBr) 3430 (NH), 3054 (CH aromatique), 2989, 2953, 2927, 2850 (CH aliphatique), 1721 (C=O), 1267 (P=O, C-O), 1226 (C-O), 1038 (P-O-C) cm^{-1} ; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2.82 (dd, $J = 6.8$ Hz et 16.8 Hz, 1H, H_{β}), 2.91 (dd, $J = 4.6$ Hz et 16.8 Hz, 1H, H_{β}), 3.06 (dd, $J = 1.7$ Hz et 22.6 Hz, 2H, CH_2P), 3.30 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.71-3.76 (m, 1H, H_{α}), 3.77 (d, $J = 11.3$ Hz, 6H, POCH_3), 7.16-7.22 (m, 3H, H *p*-Ph), 7.24-7.30 (m, 6H, H *m*-Ph), 7.46-7.50 (m, 6H, H *o*-Ph); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 42.1 (d, $J = 127.8$ Hz, CH_2P), 49.0 (C $_{\beta}$), 52.3 (OCH $_3$), 53.1 (POCH $_3$), 53.3 (C $_{\alpha}$), 71.5 (CPh $_3$), 126.8 (C *p*-Ph), 128.2, 129.0 (C *o*-Ph et C *m*-Ph), 145.9 (C Ph), 174.3 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_3$), 199.5 (d, $J = 6.4$ Hz, C=O); RMN ^{31}P (121 MHz, CDCl_3) δ 22.7.

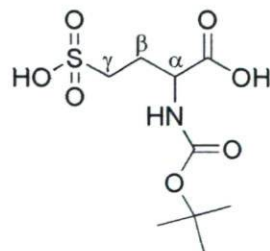
9.9.3. (S)-2-Amino-4-oxo-5-(phosphonyl) pentanoate de méthyle 5.4



Le composé **5.3** (354 mg, 714 μmol) est dissous dans 15 mL de CH_2Cl_2 anhydre. Le TMSI (496 μL , 3.64 mmol) est ajouté et la solution est agitée sous atmosphère d'azote pendant 17 heures. La réaction est arrêtée avec 10 mL d'eau (15 min) puis les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est lavée avec Et_2O (2 X 10 mL), évaporée et le résidu est solubilisé dans 5 mL de MeOH. Le produit est finalement cristallisé par l'addition d'oxyde de propylène (1 mL), filtré puis lavé avec Et_2O pour donner **5.4**, un solide blanc (138 mg, 86%). $T^{\circ}\text{f}$ 165°C (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 1.0 (c 0.24, H_2O); IR (KBr) 3600-2400 (NH, OH), 1737, 1708 (C=O), 1225, 1175 (P=O et C-O), 1048 (P-O-C) cm^{-1} ; RMN ^1H (300 MHz, D_2O) δ 3.12 (dd, $J = 4.1$ Hz et 21.6 Hz, 2H, CH_2P), 3.51 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H, $\text{H}\beta$), 3.84 (s, 3H, CO_2CH_3), 4.44 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha$); RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 42.5 (CH_2P), 48.5, 48.6 ($\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$), 54.0 (CO_2CH_3), 170.2 ($\text{C}\text{O}_2\text{CH}_3$), 204.9 (C=O); RMN ^{31}P (121 MHz, D_2O) δ 14.3.

9.10. Synthèse de l'acide *N*-Boc homocystéique 6.2 et de l'acide (S)-2-[*N*-(Boc)]-5-(diméthoxy-phosphoryl)-4-oxo-pentanoïque 6.6.

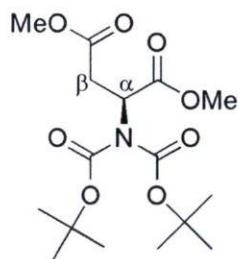
9.10.1. Acide *N*-Boc homocystéique 6.2



Une solution d'acide DL-homocystéique **6.1** (70.0 mg, 382 μmol), de NaHCO_3 (96.3 mg, 1.15 mmol) et de Boc_2O (117 mg, 535 μmol) dans un mélange dioxane / H_2O (0.5 mL : 0.3 mL) est agitée à la température de la pièce. Une quantité additionnelle de

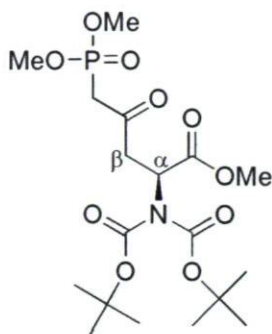
Boc₂O est introduite à 2 heures d'intervalle (2 X 117 mg, 2 X 535 μmol) puis la réaction est laissée 24 heures. Le mélange est par la suite préadsorbé sur silice (MeOH) puis chromatographié (1% HCOOH / 25% MeOH / CH₂Cl₂) pour donner le produit **6.2**, un solide blanc (108 mg, quantitatif). T_f 145-147 °C (déc.); IR (KBr) 3428 (NH, OH), 2981 (CH aliphatique), 1702 (C=O), 1528 (NH), 1369 (CH aliphatique), 1173 (SO₃H), 1050 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 1.32 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.76-1.88 (m, 1H, Hβ), 1.88-1.98 (m, 1H, Hβ), 2.37-2.44 (m, 2H, Hγ), 3.82-3.91 (m, 1H, Hα), 6.90 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 28.1 (Cβ), 28.9 (C(CH₃)₃), 48.7 (Cγ), 53.9 (Cα), 78.5 (C(CH₃)₃), 156.0 (NHCO₂tBu), 174.9 (CO₂H); SMBR (ESI) calculé pour C₉H₁₈NO₇S [M+H]⁺ 284.0, expérimental 284.0.

9.10.2. Diméthyl ester du *N*-(Boc)₂ aspartate **6.4**



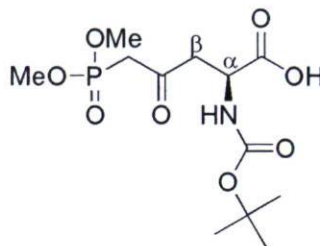
Le diméthyl ester du *N*-Boc aspartate **6.3** (1.20 g, 4.58 mmol) et le DMAP (112 mg, 916 μmol) sont dissous dans 20 mL de CH₃CN anhydre. Boc₂O (1.50 g, 6.87 mmol) est ajouté et le mélange est agité sous N₂ pendant 20h. Le solvant est évaporé puis le résidu est chromatographié sur gel de silice (20% AcOEt / hexane) pour donner **6.4**, un solide blanc (1.56 g, 94%). T_f 55-56°C; [α]_D²¹ -69.4 (c 1.35, CHCl₃); IR (KBr) 2986 (CH aliphatique), 1744, 1728 (C=O), 1370 (CH aliphatique), 1243, 1173, 1145, 1114 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (s, 18H, C(CH₃)₃), 2.71 (dd, J = 16.4 Hz et 6.5 Hz, 1H, Hβ), 3.23 (dd, J = 16.4 Hz et 7.1 Hz, 1H, Hβ), 3.68 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.71 (s, 3H, CO₂CH₃), 5.43 (t, J = 6.8 Hz, 1H, Hα); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 28.2 (C(CH₃)₃), 35.9 (Cβ), 52.2 (OCH₃), 52.7 (OCH₃), 55.1 (Cα), 83.8 (C(CH₃)₃), 151.8 (NHCO₂tBu), 170.5 (CO₂CH₃), 171.3 (CO₂CH₃).

9.10.3. (S)-2-N-(Boc)₂-amino-4-oxo-5-(diméthylphosphonyl) pentanoate de méthyle 6.5



À une solution de diméthyl méthylphosphonate (2.06 mL, 19.0 mmol) dans 30 mL de THF anhydre à -78°C est ajouté goutte-à-goutte (5 min) BuLi (1.6 M / hexane, 11.9 mL, 19.0 mmol). La solution est agitée 15 min supplémentaires puis le diméthyl ester du *N*-(Boc)₂ aspartate **6.4** (1.53 g, 4.22 mmol) dissous dans 5 mL de THF anhydre est ajouté. Après 25 min, la réaction est arrêtée par l'ajout de 25 mL de NH₄Cl saturé. Le produit est extrait avec AcOEt (150 mL) / NH₄Cl sat. (75 mL), séché sur MgSO₄ puis le solvant est évaporé. Le résidu est chromatographié sur gel de silice (AcOEt) pour donner **6.5**, une huile incolore (1.00 g, 51%). $[\alpha]_D^{21}$ -11.0 (c 1.46, CHCl₃); IR (KBr) 2980 (CH aliphatique), 1747, 1721 (C=O), 1369 (CH aliphatique), 1260 (P=O, C-O), 1142, 1114, 1031 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (s, 18H, C(CH₃)₃), 2.90 (dd, J = 17.8 Hz et 5.1 Hz, 1H, H_β), 3.08 (dd, J = 22.3 Hz et 13.9 Hz, 1H, CH₂P), 3.23 (dd, J = 22.7 Hz et 13.9 Hz, 1H, CH₂P), 3.57 (dd, J = 17.8 Hz et 7.6 Hz, 1H, H_β), 3.68 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.76 (2d, J = 11.2 Hz, 6H, POCH₃), 5.47 (dd, J = 7.6 Hz et 5.1 Hz, 1H, H_α); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 28.2 (C(CH₃)₃), 41.9 (d, J = 128.3 Hz, CH₂P), 45.1 (C_β), 52.7, 53.3, 54.4 (C_α, POCH₃ et CO₂CH₃), 83.8 (C(CH₃)₃), 151.8 (NHCO₂tBu), 170.7 (CO₂CH₃), 198.5 (d, J = 6.2 Hz, C=O); ³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃) δ 22.8.

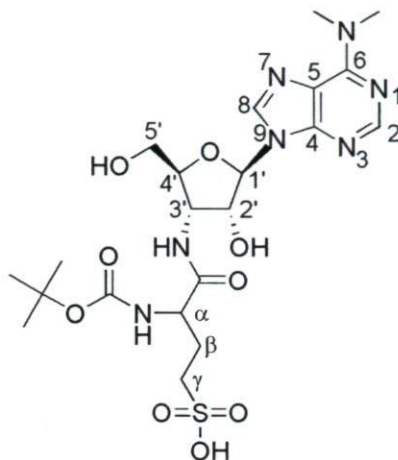
9.10.4. Acide (S)-2-N-(Boc)-amino-4-oxo-5-(diméthylphosphonyl) pentanoïque 6.6



Le phosphonate **6.5** (294 mg, 649 μmol) est dissous dans 10 mL de CH_2Cl_2 auquel on ajoute TFA (110 μL , 1.42 mmol). Le mélange est agité 20 heures à la température de la pièce puis le solvant est évaporé et co-évaporé au MeOH. Le résidu est dissous dans 8 mL de dioxane et 2 mL de NaOH 2 M est ajouté. Après 30 min d'agitation, le solvant est évaporé et co-évaporé au MeOH. Le résidu est préadsorbé sur silice (MeOH) puis chromatographié (1% HCOOH / 5% MeOH / AcOEt) pour donner **6.6** sous la forme d'une huile épaisse (183 mg, 83%). $[\alpha]_D^{25}$ 1.7 (c 0.63, MeOH); IR (KBr) 3342 (NH, OH), 2977, 2929 (CH aliphatique), 1716 (C=O), 1508, 1368 (C-N, CH aliphatique), 1249 (P=O, C-O), 1165, 1031 (C-O) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.01-3.17 (m, 2H, H_β), 3.75 (2d, $J = 11.3$ Hz, 6H, POCH_3), 4.43 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, H_α); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 27.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 45.4 (C_β), 49.4 (C_α), 52.6 (d, $J = 8.2$ Hz, POCH_3), 52.7 (d, $J = 8.2$ Hz, POCH_3), 79.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 156.5 (NHCO_2tBu), 173.6 (CO_2H), 199.6 (C=O); ^{31}P NMR (121 MHz, CD_3OD) δ 28.5; SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NO}_8\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 362.0975, expérimental 362.0984.

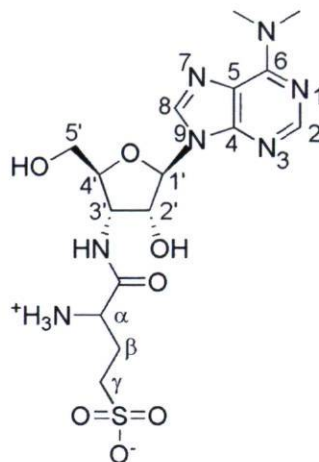
9.11. Synthèse de la 3'-déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(DL-homocystéinyl-amido) adénosine 6.18

9.11.1. 3'-Déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(*N*^α-Boc-DL-homocystéinyl-amido) adénosine 6.11



La 3'-déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-aminoadénosine **6.10** (20.0 mg, 68.0 μmol), l'acide *N*-Boc-homocystéique (21.1 mg, 74.8 μmol), le *N*-hydroxysuccinimide (8.6 mg, 74.8 μmol) et le EDC (27.1 mg, 81.5 μmol) sont agités dans 0.6 mL de DMF anhydre pendant 24h. Le solvant est co-éaporé avec du toluène puis le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (20-25% MeOH / CH₂Cl₂, préadsorption avec MeOH / CH₂Cl₂) pour donner le produit **6.11** sous la forme d'un solide blanc (28.0 mg, 74%). T[°]f 183-185 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -9.8 (c 0.56, MeOH); IR (KBr) 3425 (OH, NH), 2932 (CH aliphatique), 1666 (C=O), 1606 (C-C aromatique), 1427 (CH aliphatique), 1211 (S=O, C-O), 1167, 1046 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.41, 1.42 (2s, 9H, C(CH₃)₃), 2.02-2.13 (m, 1H, H β), 2.14-2.26 (m, 1H, H β), 2.82-2.94 (m, 2H, H γ), 3.45 (br s, 6H, N(CH₃)₂), 3.67-3.75 (m, 1H, H5'), 3.91 (d, J = 12.7 Hz, 1H, H5'), 4.12-4.18 (m, 1H, H4'), 4.24 (dd, J = 8.4 Hz et 5.8 Hz, 1H, H α), 4.53-4.67 (m, 2H, H2' et H3'), 6.00, 6.02 (2d, J = 2.7 Hz et 2.4 Hz, 1H, H1'), 8.15 (s, 1H, H2), 8.31, 8.33 (2s, 1H, H8); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 27.5 (C(CH₃)₃), 27.8 (C β), 37.9 (N(CH₃)₂), 50.7, 53.9 (C α et C3'), 61.1 (C5'), 73.8 (C2'), 79.7 (C(CH₃)₃), 84.0 (C4'), 90.9 (C1'), 120.4 (C5), 138.1 (C8), 149.3, 151.7 (C2 et C4), 154.9 (C6), 156.7 (NHCO₂tBu), 173.9 (CONH); SMHR (ESI) calculé pour C₂₁H₃₄N₇O₉S [M+H]⁺ 560.2139, expérimental 560.2124.

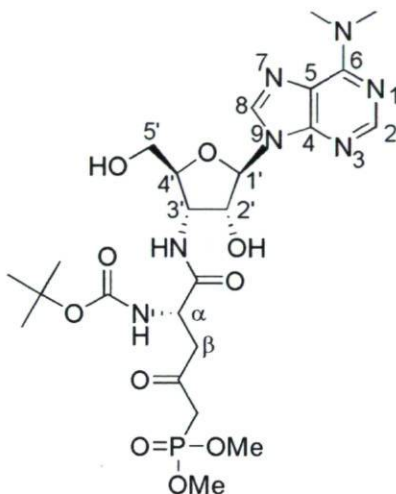
9.11.2. 3'-Déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(DL-homocystéinyl-amido) adénosine 6.18



Le composé **6.11** (27.6 mg, 49.4 μmol) est agité pendant 20 min dans 2 mL de HCl 4 M / dioxane à la température de la pièce. Le solvant est évaporé puis co-évaporé avec du MeOH. Le résidu est solubilisé dans 2 mL de MeOH et le produit est précipité par l'ajout de 15 mL d'acétone. Le composé **6.18** est recueilli par filtration sous la forme d'un solide blanc (19.8 mg, 87%). T[°]f 165°C (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -14.2 (c 0.19, MeOH); IR (KBr) 3434 (OH, NH), 2932 (CH aliphatique), 1660 (C=O), 1604 (C-C aromatique), 1208 (S=O, C-O), 1178, 1098, 1041 (C-O) cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 2.22-2.34 (m, 2H, H β), 2.90-3.04 (m, 2H, H γ), 3.46 (s large, 6H, N(CH₃)₂), 3.68-3.74 (m, 1H, H5'), 3.90 (dd, J = 13.2 Hz et 2.1 Hz, 1H, H5'), 4.19-4.29 (m, 2H, H4' et H α), 4.65-4.73 (m, 2H, H2' et H3'), 6.09, 6.11 (2d, J = 1.6 Hz et 1.3 Hz, 1H, H1'), 8.22 (s, 1H, H2), 8.41 (s, 1H, H8); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 26.7 (C β), 40.5 (N(CH₃)₂), 46.4 (C γ), 50.8, 52.1 (C α et C3'), 60.5 (C5'), 73.6 (C2'), 82.9 (C4'), 90.5 (C1'), 119.7 (C5), 140.4 (C8), 146.6, 147.9 (C2 et C4), 149.9 (C6), 169.4 (CONH); SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₂₆N₇O₇S [M+H]⁺ 460.1614, expérimental 460.1611.

9.12. Synthèse de la 3'-déoxy- N^6,N^6 -diméthyl-3'-[(*S*)-2-amino-4-oxo-5-(méthylphosphonyl) pentanoyl-amido] adénosine 6.19

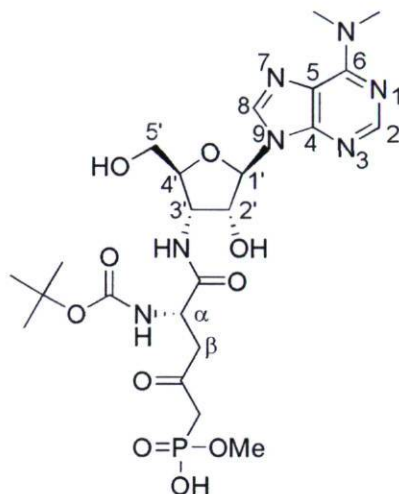
9.12.1. 3'-Déoxy- N^6,N^6 -diméthyl-3'-[(*S*)-2-*N*-(Boc)-amino-4-oxo-5-(diméthylphosphonyl) pentanoyl-amido] adénosine 6.12



La 3'-déoxy- N^6,N^6 -diméthyl-3'-aminoadénosine **6.10** (24.2 mg, 83.5 μmol), l'acide (*S*)-2-*N*-(Boc)-amino-4-oxo-5-(diméthylphosphonyl) pentanoïque **6.6** (31.0 mg, 91.8 μmol), le *N*-hydroxysuccinimide (10.6 mg, 91.8 μmol) et le EDC (22.9 mg, 119 μmol) sont agités dans 0.75 mL de DMF anhydre pendant 24h. Le solvant est co-éaporé avec du toluène puis le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (9% MeOH / CH_2Cl_2) pour donner le produit **6.12** sous la forme d'un solide blanc (28.4 mg, 55%). T $^{\circ}\text{f}$ 84-86 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -39.0 (c 1.08, MeOH); IR (KBr) 3417 (NH, OH), 2927 (CH aliphatique) 1717 (C-O), 1529 (C-C aromatique), 1251 (P=O, C-O), 1164, 1034 (C-O) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.39-1.45 (m, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.93-3.15 (m, 2H, H_β), 3.44 (br s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.68-3.80 (m, 7H, POCH_3 et $\text{H}_{5'}$), 3.89 (dd, $J = 12.6$ Hz et 2.1 Hz, 1H, $\text{H}_{5'}$), 4.12-4.17 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.45-4.52 (m, 1H, H_α), 4.54-4.62 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$ et $\text{H}_{3'}$), 5.99 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 8.14 (s, 1H, H2), 8.31 (s, 1H, H8); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 27.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 37.8 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 44.8 (C_β), 50.5, 50.8, 52.7 ($\text{C}_{3'}$, C_α et POCH_3), 61.2 ($\text{C}_{5'}$), 73.9 ($\text{C}_{2'}$), 79.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 84.0 ($\text{C}_{4'}$), 90.8 ($\text{C}_{1'}$), 120.3 (C5), 138.0 (C8), 149.3, 151.8 (C2 et C4), 154.9 (C6), 156.6 (NHCO_2tBu), 172.9 (CONH), 199.6 (C=O); ^{31}P NMR (121

MHz, CD₃OD) δ 28.6; SMHR (ESI) calculé pour C₂₄H₃₉N₇O₁₀P [M+H]⁺ 616.2491, expérimental 616.2493.

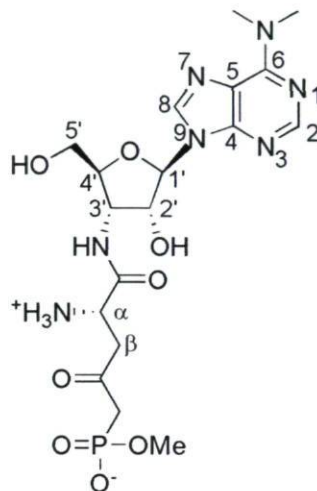
9.12.2. 3'-Déoxy-N⁶,N⁶-diméthyl-3'-[(S)-2-N-(Boc)-amino-4-oxo-5-(méthylphosphonyl) pentanoyl-amido] adénosine 6.13



Le composé **6.12** (28.4 mg, 46.1 μ mol) est dissous dans 1 mL de CH₃CN. LiBr (15.0 mg, 172 μ mol) est ajouté et le mélange est agité à 65°C pendant 8h puis à la température de la pièce pendant 16h. Le solvant est évaporé et le résidu est préadsorbé sur silice avec du MeOH. La chromatographie sur gel de silice (1% HCOOH / 20% MeOH / CH₂Cl₂ à 1% HCOOH / 30% MeOH / CH₂Cl₂) donne un produit légèrement contaminé par SiO₂. Il est donc dissous dans CH₂Cl₂ filtré et évaporé. Le produit pur est obtenu par précipitation à partir de 1 mL MeOH / 20 mL Et₂O (filtration et lavage avec Et₂O) pour donner **6.13**, un solide blanc (21.5 mg, 77%). T_f 145°C (déc.); $[\alpha]_D^{21}$ -21.7 (c 0.95, MeOH); IR (KBr) 3417 (NH, OH), 2978 (CH aliphatique), 1702 (C=O), 1604, 1533 (C-C aromatique), 1368 (CH aliphatique), 1222 (P=O, C-O), 1165, 1052 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.41 (2s, 9H, C(CH₃)₃), 2.98-3.18 (m, 2H, H β), 3.46 (large s, 6H, N(CH₃)₂), 3.56 (d, J = 10.8 Hz, 3H, POCH₃), 3.67-3.75 (m, 1H, H5'), 3.90 (large d, J = 12.4 Hz, 1H, H5'), 4.11-4.17 (m, 1H, H4'), 4.41-4.48 (m, 1H, H α), 4.52-4.57 (m, 1H, H2'), 4.57-4.63 (m, 1H, H3'), 6.01 (s, 1H, H1'), 8.16 (s, 1H, H2), 8.31, 8.33 (2s, 1H, H8); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 27.5 (C(CH₃)₃), 37.8 (N(CH₃)₂), 44.4 (C β), 50.6, 50.7, 51.1 (C3', C α et POCH₃), 60.9 (C5'), 74.0 (C2'), 79.7 (C(CH₃)₃), 83.8 (C4'), 90.9 (C1'), 120.3

(C5), 138.1 (C8), 149.4, 151.8 (C2 et C4), 154.9 (C6), 156.7 (NHCO₂tBu), 173.7 (CONH), 203.4 (C=O); ³¹P NMR (121 MHz, CD₃OD) δ 18.0; SMHR (ESI) calculé pour C₂₃H₃₇N₇O₁₀P [M+H]⁺ 602.2334, expérimental 602.2342.

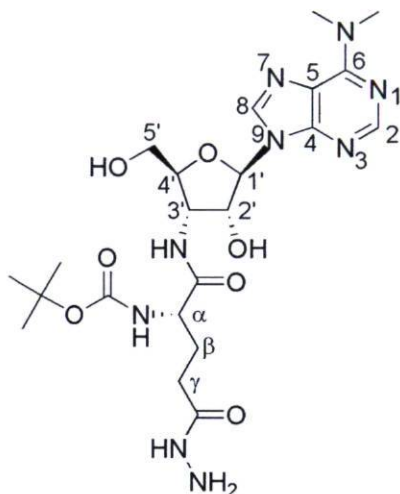
9.12.3. 3'-Déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-[(*S*)-2-amino-4-oxo-5-(méthylphosphonyl)pentanoyl-amido] adénosine **6.19**



Le composé **6.13** (20.6 mg, 34.3 μmol) est agité pendant 30 min dans 2 mL de HCl 4 M / dioxane à la température de la pièce. Le solvant est évaporé puis co-évaporé avec du MeOH. Le résidu est solubilisé dans 2 mL de MeOH et le produit est précipité par l'ajout de 10 mL d'Et₂O. Une précipitation supplémentaire avec 1 mL de MeOH et 10 mL d'acétone (filtration et lavage à l'acétone) donne **6.19**, un solide blanc (15.3 mg, 89%). T_f 183°C (déc.); [α]_D²¹ -20.1 (c 0.33, MeOH); IR (KBr) 3430 (NH, OH), 2926 (CH aliphatique), 1660 (C=O), 1602 (C-C aromatique), 1411 (CH aliphatique), 1214 (P=O, C-O), 1042 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 3.26-3.84 (m, 12H, POCH₃, N(CH₃)₂, Hβ, H5'), 3.87 (2dd, J = 13.0 Hz et 2.3 Hz, 1H, H5'), 4.16-4.25 (m, 1H, H4'), 4.32-4.38 (m, 1H, Hα), 4.64-4.73 (m, 2H, H2' et H3'), 6.13 (2d, J = 1.8 Hz, 1H, H1'), 8.28 (s, 1H, H2), 8.46 (2s, 1H, H8); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 39-44 (N(CH₃)₂), 48.9 (Cβ), 50.7, 50.9, 52.1 (Cα, POCH₃ et C3'), 60.3 (C5'), 73.8 (C2'), 82.7 (C4'), 90.5 (C1'), 119.8 (C5), 140.8 (C8), 145.4, 147.8 (C2 et C4), 149.0 (C6), 169.5 (CONH), 204.1 (C=O); ³¹P NMR (121 MHz, D₂O) δ 18.0; SMHR (ESI) calculé pour C₁₈H₂₉N₇O₈P [M+H]⁺ 502.1810, expérimental 502.1817.

9.13. Synthèse de la 3'-déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(γ -hydrazide-L-glutamyl-amido) adénosine 6.20.

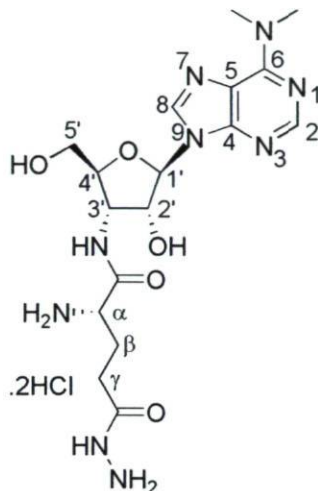
9.13.1. 3'-Déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(*N* ^{α} -Boc- γ -hydrazide-L-glutamyl-amido) adénosine 6.15



Le composé **6.14** (38.9 mg, 72.4 μ mol) est dissous dans 3 mL de MeOH auquel on ajoute $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (200 μ L, 4.12 mmol). Le tout est agité 72h à la température de la pièce puis le mélange est évaporé sous pression réduite. Le résidu est préadsorbé sur silice (MeOH) puis chromatographié sur gel de silice (15% MeOH / CH_2Cl_2). Le produit obtenu est précipité à partir de 2 mL acétone / 10 mL Et_2O , filtré et lavé avec Et_2O pour donner **6.15**, un solide blanc (26.5 mg, 68%). T^of 171-174°C (déc.); $[\alpha]_D^{21}$ -26.0 (c 0.51, MeOH); IR (KBr) 3312 (NH, OH), 2929 (CH aliphatique), 1685, 1654 (C=O), 1602, 1527 (C-C aromatique), 1425 (CH aliphatique), 1248, 1165, 1036 (C-O) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.80-1.92 (m, 1H, H β), 1.97-2.09 (m, 1H, H β), 2.24 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H γ), 3.44 (large s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.70 (dd, J = 12.7 Hz et 2.9 Hz, 1H, H5'), 3.90 (dd, J = 12.7 Hz et 1.7 Hz, 1H, H5'), 4.08 (dd, J = 8.4 Hz et 5.3 Hz, 1H, H α), 4.12-4.17 (m, 1H, H4'), 4.53-4.58 (m, 1H, H2'), 4.58-4.64 (m, 1H, H3'), 6.01 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H1'), 8.15 (s, 1H, H2), 8.33 (s, 1H, H8); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 27.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.9 (C β), 29.9 (C γ), 37.8 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 50.8, 54.4 (C α et C3'), 61.0 (C5'), 74.0 (C2'), 79.7($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 83.6 (C4'), 90.7 (C1'), 120.3 (C5), 137.9 (C8), 149.3, 151.8 (C2 et C4),

154.9 (C6), 156.7 (NHCO₂tBu), 173.0, 173.8 (CONH et CONHNH₂); SMHR calculé pour C₂₂H₃₆N₉O₇ [M+H]⁺ 538.2732, expérimental 538.2725.

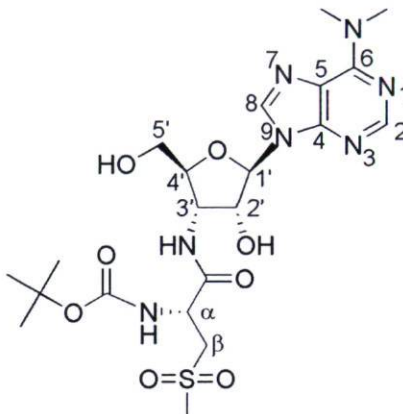
9.13.2. 3'-Déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(γ -hydrazide-L-glutamyl-amido) adénosine 6.20



Le composé **6.15** (25.7 mg, 47.8 μ mol) est agité pendant 30 min dans 2 mL de HCl 4 M / dioxane à la température de la pièce. Le solvant est évaporé puis co-évaporé avec du MeOH. Le résidu est solubilisé dans 1 mL de MeOH et le produit est précipité par l'ajout de 10 mL d'Et₂O. Le composé **6.20** est recueilli après filtration et lavage à l'Et₂O sous la forme d'un solide beige (24.4 mg, quantitatif). T^of 118-120°C (déc.); [α]_D²¹ 6.7 (c 0.77, MeOH); IR (KBr) 3435 (NH, OH), 2928 (CH aliphatique), 1663 (C=O), 1492, 1410 (CH aliphatique), 1219, 1093, 1055 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.14-2.26 (m, 2H, H β), 2.46-2.61 (m, 2H, H γ), 3.41 (large s, 3H, N(CH₃)₂), 3.75 (large d, J = 12.4 Hz, 1H, H5'), 3.86-4.05 (m, 4H, N(CH₃)₂ et H5'), 4.05-4.14 (m, 1H, H α), 4.26 (d large, J = 7.5 Hz, 1H, H4'), 4.57-4.63 (m, 1H, H2'), 4.65-4.72 (m, 1H, H3'), 6.18 (s, 1H, H1'), 8.37 (s, 1H, H2), 8.68 (s, 1H, H8); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 26.3 (C β), 27.5 (C γ), 39.1, 41.0 (N(CH₃)₂) 50.8, 52.6 (C α et C3'), 60.3 (C5'), 74.5 (C2'), 83.2 (C4'), 91.1 (C1'), 120.1 (C5), 140.5 (C8), 144.3, 147.4, 149.1 (C2, C4 et C6), 169.0, 171.2 (CONH et CONHNH₂); SMHR (ESI) calculé pour C₁₇H₂₈N₉O₅ [M+H]⁺ 438.2208, expérimental 438.2205.

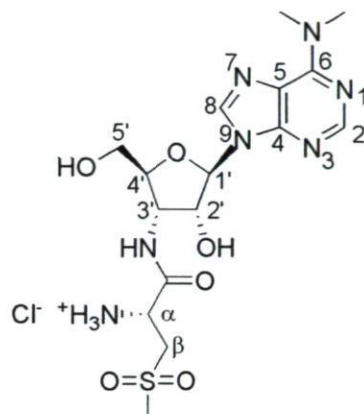
9.14. Synthèse de la 3'-déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(*S*-méthyl-sulfone-*L*-cystéinyl-amido) adénosine **6.21**.

9.14.1. 3'-Déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(*N*^α-Boc-*S*-méthyl-sulfone-*L*-cystéinyl-amido) adénosine **6.16**



La 3'-déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-aminoadénosine **6.10** (24.2 mg, 83.5 μmol), l'acide *S*-méthyl-sulfone-cystéique **6.8** (22.5 mg, 84.2 μmol), le *N*-hydroxysuccinimide (9.7 mg, 84.2 μmol) et le EDC (24.3 mg, 127 μmol) sont agités dans 0.70 mL de DMF anhydre pendant 24h. Le solvant est co-éaporé avec du toluène puis le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (7-8% MeOH / CH₂Cl₂) pour donner le produit **6.16** sous la forme d'un solide blanc (32.5 mg, 78%). T_f 176-178°C (déc.); [α]_D²¹ -35.4 (c 0.30, MeOH / CH₂Cl₂ 1:1); IR (KBr) 3330 (NH, OH), 2931 (CH aliphatique), 1692, 1667 (C=O), 1602, 1525 (C-C aromatique), 1302 (S=O), 1164, 1134, 1039 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD / CDCl₃ 1:1) δ 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.98 (s, 3H, SCH₃), 3.37-3.53 (m, 7H, N(CH₃)₂ et H β), 3.61 (dd, J = 14.7 Hz et 5.1 Hz, 1H, H β), 3.72 (dt, J = 12.8 Hz et 2.0 Hz, 1H, H5'), 3.92 (dd, J = 12.7 Hz et 2.0 Hz, 1H, H5'), 4.13-4.20 (m, 1H, H4'), 4.49-4.55 (m, 2H, H α et H2'), 4.58-4.64 (m, 1H, H3'), 5.92 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H1'), 8.16 (s, 1H, H2), 8.23 (s, 1H, H8); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD / CDCl₃ 1:1) δ 28.0 (C(CH₃)₃), 38.6 (N(CH₃)₂), 41.7 (SCH₃), 50.2, 50.8, 55.3 (C α , C β , C3'), 61.3 (C5'), 74.0 (C2'), 81.0 (C(CH₃)₃), 84.2 (C4'), 91.2 (C1'), 120.8 (C5), 137.8 (C8), 149.0, 151.8 (C2 et C4), 155.0 (C6), 156.1 (NHCO₂tBu), 170.5 (CONH); SMHR calculé pour C₂₁H₃₄N₇O₈S [M+H]⁺ 544.2184, expérimental 544.2188.

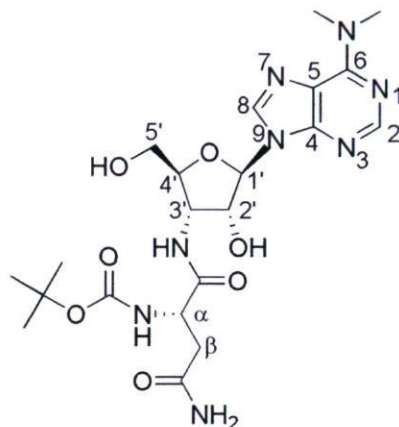
9.14.2. 3'-Déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(*S*-méthyl-sulfone-*L*-cystéinyl-amido) adénosine 6.21



Le composé **6.16** (29.9 mg, 51.5 μmol) est agité pendant 30 min dans 2 mL de HCl 4 M / dioxane à la température de la pièce. Le solvant est évaporé puis co-évaporé avec du MeOH. Le résidu est solubilisé dans 2 mL de MeOH et le produit est précipité par l'ajout de 10 mL d'Et₂O. Le composé **6.21** est recueilli après filtration et lavage à l'Et₂O sous la forme d'un solide blanc (24.7 mg, 94%). T_{of} 151-153°C (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ -12.8 (c 0.19, MeOH); IR (KBr) 3426 (NH, OH), 2924 (CH aliphatique), 1660 (C=O), 1410 (CH aliphatique), 1304 (S=O), 1209, 1139, 1097, 1060 (C-O) cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 3.16 (s, 3H, SCH₃), 3.34-3.50 (large s, 3H, N(CH₃)₂), 3.55-3.66 (m, 2H, H β), 3.73-3.79 (m, 1H, H5'), 3.81-4.05 (m, 4H, N(CH₃)₂, H5'), 4.21-4.28 (m, 1H, H4'), 4.55 (dd, J = 8.3 Hz et 4.4 Hz, 1H, H α), 4.58-4.62 (m, 1H, H2'), 4.67-4.74 (m, 1H, H3'), 6.18 (large s, 1H, H1'), 8.36 (s, 1H, H2), 8.68 (s, 1H, H8); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 40.8 (SCH₃), 51.0, 53.5, 53.8 (C α , C β et C3'), 60.3 (C5'), 74.5 (C2'), 83.4 (C4'), 91.1 (C1'), 120.1 (C5), 140.5 (C8), 144.5, 147.5 (C2 et C4), 149.3 (C6), 166.7 (CONH); SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₂₆N₇O₆S [M+H]⁺ 444.1660, expérimental 444.1664.

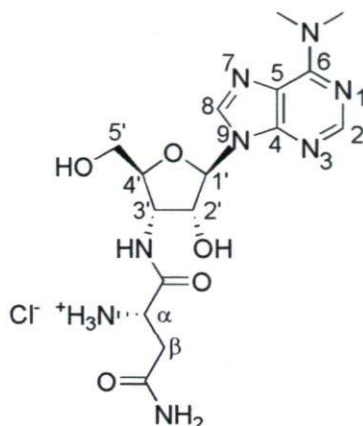
9.15. Synthèse de la 3'-déoxy- N^6,N^6 -diméthyl-3'-(L-asparaginyl-amido) adénosine 6.22.

9.15.1. 3'-Déoxy- N^6,N^6 -diméthyl-3'-(N^{α} -Boc-L-asparaginyl-amido) adénosine 6.17



La 3'-déoxy- N^6,N^6 -diméthyl-3'-aminoadénosine **6.10** (20.0 mg, 68.0 μmol), la N -Boc-asparagine **6.9** (17.4 mg, 74.8 μmol), le N -hydroxysuccinimide (8.6 mg, 74.8 μmol) et le EDC (21.1 mg, 110 μmol) sont agités dans 0.60 mL de DMF anhydre pendant 24h. Le solvant est co-évaporé avec du toluène puis le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (12% MeOH / CH_2Cl_2). Le produit légèrement contaminé est dissous dans 2 mL d'un mélange MeOH / acétone 1:1 et précipité avec 10 mL d' Et_2O (-20°C pendant une heure) pour donner le composé **6.16** après filtration et lavage (Et_2O) sous la forme d'un solide blanc (23.2 mg, 67%). T_f 186-187 $^\circ\text{C}$ (déc.); $[\alpha]_D^{25}$ -27.7 (c 0.46, MeOH / CH_2Cl_2 1:1); IR (KBr) 3402 (NH, OH), 2931 (CH aliphatique), 1688, 1664 (C=O), 1525 (C-C aromatique), 1425 (CH aliphatique), 1165, 1037 (C-O) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.59 (dd, $J = 15.4$ Hz et 6.8 Hz, 1H, H_β), 2.67 (dd, $J = 15.3$ Hz et 6.2 Hz, 1H, H_β), 3.46 (large s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.71 (dd, $J = 12.6$ Hz et 3.1 Hz, 1H, $\text{H}_{5'}$), 3.89 (dd, $J = 12.6$ Hz et 2.2 Hz, 1H, $\text{H}_{5'}$), 4.12-4.18 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 4.45 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, H_α), 4.54-4.62 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$ et $\text{H}_{3'}$), 5.99 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'}$), 8.16 (s, 1H, H2), 8.32 (s, 1H, H8); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 27.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 37.0, 37.8 (C_β et $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 50.9, 51.7 (C_α et $\text{C}_{3'}$), 61.1 ($\text{C}_{5'}$), 73.9 ($\text{C}_{2'}$), 79.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 83.9 ($\text{C}_{4'}$), 90.8 ($\text{C}_{1'}$), 120.4 (C5), 138.0 (C8), 149.4, 151.8 (C2 et C4), 154.9 (C6), 156.5 (NHCO_2tBu), 173.2, 173.8 (CONH et CONH_2); SMHR (ESI) calculé for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_8\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 509.2467, expérimental 509.2476.

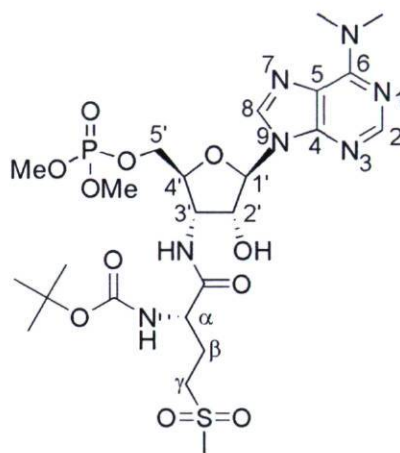
9.15.2. 3'-Déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(*L*-asparaginylo-amido) adénosine 6.22



Le composé **6.17** (23.0 mg, 45.2 μmol) est agité pendant 30 min dans 2 mL de HCl 4 M / dioxane à la température de la pièce. Le solvant est évaporé puis co-évaporé avec du MeOH. Le résidu est solubilisé dans 1 mL de MeOH et le produit est précipité par l'ajout de 10 mL d'Et₂O. Le composé **6.22** est recueilli après filtration et lavage à l'Et₂O sous la forme d'un solide blanc (19.3 mg, 96%). T[°]f 157-158°C (déc.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$ 0.13 (c 0.22, MeOH); IR (KBr) 3416 (NH, OH), 2932 (CH aliphatique), 1664 (C=O), 1411 (CH aliphatique), 1222, 1093, 1064 (C-O) cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.82 (dd, J = 16.9 Hz et 7.8 Hz, 1H, H β), 2.91 (dd, J = 16.9 Hz et 5.0 Hz, 1H, H β), 3.32-3.60 (m, 3H, N(CH₃)₂), 3.70 (dd, J = 12.5 Hz et 2.7 Hz, 1H, H5'), 3.78-4.10 (m, 4H, N(CH₃)₂ et H5'), 4.16-4.21 (m, 1H, H4'), 4.23-4.29 (m, 1H, H α), 4.55-4.59 (m, 1H, H2'), 4.69 (dd, J = 8.3 Hz et 5.3 Hz, 1H, H3'), 6.16 (d, J = 1.0 Hz, H1'), 8.36 (s, 1H, H2), 8.68 (s, 1H, H8); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 35.2 (C β), 50.1, 50.6 (C3' et C α), 60.2 (C5'), 74.4 (C2'), 83.5 (C4'), 91.2 (C1'), 120.0 (C5), 140.5 (C8), 144.5, 147.4 (C2 et C4), 149.3 (C6), 168.9, 172.1 (CONH et CONH₂); SMHR (ESI) calculé for C₁₆H₂₅N₈O₅ [M+H]⁺ 409.1942, expérimental 409.1942.

9.16. Synthèse du 5'-*O*-méthylphosphoryl-3'-déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(*L*-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.26.

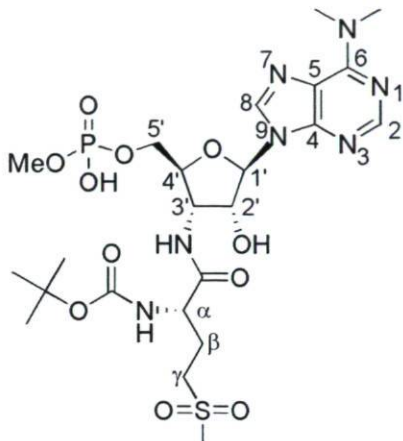
9.16.1. 5'-*O*-Diméthylphosphoryl-3'-déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(*N*^α-Boc-*L*-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.24



À une suspension de 3'-déoxy-*N*⁶,*N*⁶-diméthyl-3'-(*N*^α-Boc-*L*-méthionyl-sulfone-amido) adénosine **6.23** (34.1 mg, 61.2 μmol) dans 2.0 mL de CH₂Cl₂ anhydre est ajouté le *N*-méthylimidazole (9.8 μL, 122 μmol) puis le diméthylchlorophosphate (11.2 μL, 104 μmol). Le mélange est agité durant 3h puis le solvant est évaporé. Le résidu est chromatographié sur gel de silice (gradient 8-10% MeOH / CH₂Cl₂) pour donner le triester de phosphate **6.24**, un solide blanc (32.4 mg, 79%). T[°]f 85-89°C; [α]_D²¹ -14.7 (c 0.65, MeOH); IR (KBr) 3417 (NH, OH), 2931 (CH aliphatique), 1680 (C=O), 1600, 1523 (C-C aromatique), 1297, 1272 (S=O, P=O), 1165, 1129, 1037 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.04-2.15 (m, 1H, H_β), 2.20-2.31 (m, 1H, H_β), 2.97 (s, 3H, SCH₃), 3.12-3.24 (m, 2H, H_γ), 3.45 (br s, 6H, N(CH₃)₂), 3.70 (d, J = 11.2 Hz, 3H, POCH₃), 3.74 (d, J = 11.2 Hz, 3H, POCH₃), 4.20-4.30 (m, 3H, H_{5'} et H_α), 4.33-4.40 (m, 1H, H_{4'}), 4.60 (dd, J = 5.6 Hz et 1.5 Hz, 1H, H_{2'}), 4.78 (dd, J = 8.8 Hz et 5.7 Hz, 1H, H_{3'}), 6.05 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H_{1'}), 8.16 (s, 1H, H₂), 8.18 (s, 1H, H₈); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 24.9 (C_β), 27.5 (C(CH₃)₃), 37.8 (N(CH₃)₂), 39.5 (SCH₃), 50.7, 53.3 (C_α et C_γ), 54.2 (d, J = 6.1 Hz, POCH₃), 54.3 (d, J = 6.1 Hz, POCH₃), 66.6 (d, J = 4.6 Hz, C_{5'}), 73.8 (C_{2'}), 79.9 (C(CH₃)₃), 80.8 (d, J = 8.6 Hz, C_{4'}), 90.7 (C_{1'}), 120.2 (C₅), 137.3 (C₈), 149.7, 152.1 (C₂ et C₄), 154.9 (C₆), 156.7 (NHCO₂tBu), 172.7 (CONH); ³¹P NMR (121 MHz,

CD₃OD) δ 5.52; SMHR (ESI) calculé pour C₂₄H₄₁N₇O₁₁PS [M+H]⁺ 666.2317, expérimental 666.2310.

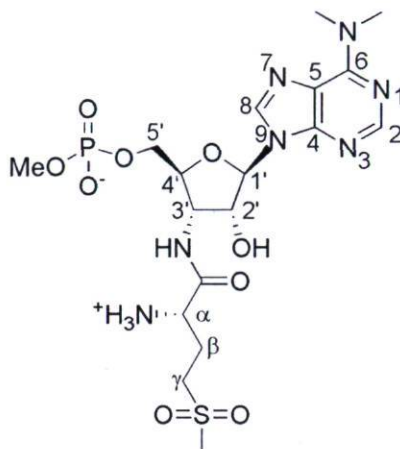
9.16.2. 5'-O-Méthylphosphoryl-3'-déoxy-N⁶,N⁶-diméthyl-3'-(N ^{α} -Boc-L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.25



Une solution du triester de phosphate **6.24** (32.3 mg, 48.6 μ mol) dans CH₃CN (1.0 mL) est agitée en présence de LiBr (15.0 mg, 173 μ mol) à 65°C (4h) puis à T°p (20h). Le mélange est par la suite préadsorbé sur silice (MeOH) et chromatographié sur gel de silice (gradient 1% HCOOH / 20-25% MeOH / CH₂Cl₂). Le produit obtenu est dissous dans 2 mL de MeOH, précipité avec 15 mL d'Et₂O, filtré et lavé avec Et₂O pour donner **6.25** (31.4 mg, 99%) sous la forme d'un solide blanc. T°f 199-200°C (déc.); [α]_D²⁰ 10.9 (c 0.31, CH₂Cl₂ / MeOH 3:1); IR (KBr) 3420 (NH, OH), 2934 (CH aliphatique), 2503 (P-OH), 1694, 1646 (C=O), 1600 (C-C aromatique), 1369 (CH aliphatique), 1292, 1250 (P=O, S=O, C-O), 1120, 1036 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.03-2.15 (m, 1H, H β), 2.19-2.31 (m, 1H, H β), 2.97, (s, 3H, SCH₃), 3.18 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H γ), 3.46 (large s, 6H, N(CH₃)₂), 3.53 (d, J = 10.4 Hz, 3H, POCH₃), 3.98-4.06 (m, 1H, H5'), 4.12-4.19 (m, 1H, H5'), 4.24 (dd, J = 8.3 et 5.3 Hz, 1H, H α), 4.26-4.31 (m, 1H, H4'), 4.54-4.58 (m, 1H, H2'), 4.62-4.69 (m, 1H, H3'), 6.07 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H1'), 8.18 (s, 1H, H2), 8.38 (s, 1H, H8); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 25.0 (C β), 27.5 (C(CH₃)₃), 37.8 (N(CH₃)₂), 39.5 (SCH₃), 50.7, 51.4, 52.1, 53.3 (C γ , C α , C3', POCH₃), 64.5 (C5'), 74.1 (C2'), 79.9 (C(CH₃)₃), 81.6 (C4'), 90.0 (C1'), 120.1 (C5), 137.5 (C8), 149.8, 152.0 (C2 et C4), 154.9

(C6), 156.6 (NHCO₂tBu), 172.8 (CONH); ³¹P NMR (121 MHz, CD₃OD) δ 4.11; SMHR (ESI) calculé pour C₂₃H₃₉N₇O₁₁PS [M+H]⁺ 652.2160, expérimental 652.2169.

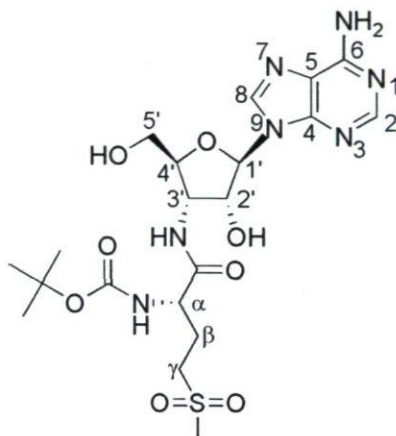
9.16.3. 5'-O-Méthylphosphoryl-3'-déoxy-N⁶,N⁶-diméthyl-3'-(L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.26



Le composé **6.25** (30.0 mg, 46.0 μmol) est déprotégé avec 2.0 mL de 4M HCl / dioxane. Après 40 min d'agitation, le solvant est co-éaporé avec CH₃CN puis MeOH. Le résidu est dissous dans 10 mL de MeOH puis évaporé jusqu'à environ 2 mL. Le produit est précipité avec 10 mL d'Et₂O. Après filtration et lavage à l'Et₂O, on obtient le composé **6.26** (24.9 mg, 98%), un solide blanc. T_{°f} 189-190°C (déc.); [α]_D²⁵ 5.5 (c 0.33, MeOH / H₂O 3:1); IR (KBr) 3428 (NH, OH), 2955 (CH aliphatique), 1662 (C=O), 1411 (CH aliphatique), 1287, 1223 (P=O, S=O, C-O), 1127, 1044 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 2.35-2.48 (m, 2H, H_β), 3.12 (s, 3H, SCH₃), 3.25-3.43 (m, 5H, H_β et N(CH₃)₂), 3.46 (d, J = 10.8 Hz, 3H, POCH₃), 3.80 (s large, 3H, N(CH₃)₂), 3.94-4.02 (m, 1H, H5'), 4.12-4.20 (m, 1H, H5'), 4.26 (t, J = 6.5 Hz, 1H, H_α), 4.40-4.46 (m, 1H, H4'), 4.80 (dd, J = 5.6 Hz et 2.2 Hz, 1H, H2'), 6.21 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H1'), 8.33 (s, 1H, H2), 8.51 (s, 1H, H8); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) 23.7 (C_β), 39.9 (N(CH₃)₂), 40.3 (SCH₃), 49.2, 51.3, 51.9 (C_γ, C_α et C3'), 53.2 (d, J = 5.8 Hz, POCH₃), 64.1 (d, J = 5.0 Hz, C5'), 73.8 (C2'), 81.3 (d, J = 8.7 Hz, C4'), 90.3 (C1'), 119.8 (C5), 140.8 (C8), 145.1, 147.9 (C2 et C4), 148.6 (C6), 169.0 (CONH); ³¹P NMR (121 MHz, D₂O) δ 4.65; SMHR (ESI) calculé pour C₁₈H₃₁N₇O₉PS [M+H]⁺ 552.1636, expérimental 552.1631.

9.17. Synthèse du 3'-déoxy-3'-(L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.30.

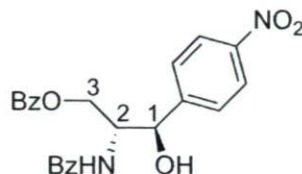
9.17.1. 3'-Déoxy-3'-(N^α-Boc-L-méthionyl-sulfone-amido) adénosine 6.29



La 3'-déoxy-3'-amino-adénosine **6.27** (25.0 mg, 93.9 μmol), la *N*-Boc-méthionine sulfone **6.28** (29.1 mg, 103 μmol), le *N*-hydroxysuccinimide (11.9 mg, 103 μmol) et EDC (21.6 mg, 113 μmol) sont agités dans 0.75 mL de DMF anhydre pendant 24h. Le DMF est co-évacué avec du toluène puis le résidu est chromatographié sur gel de silice (15% MeOH / CH₂Cl₂). Le produit obtenu est précipité à partir de 1 mL d'acétone / 10 mL d'Et₂O pour donner le produit **6.29** sous la forme d'un solide blanc (40.7 mg, 82%). T_f 140-143°C; $[\alpha]_D^{21}$ -18.7 (c 0.65, CH₂Cl₂ / MeOH 1:1); IR (KBr) 3374 (NH, OH), 2930 (CH aliphatique), 1644 (C=O), 1516 (C-C aromatique), 1296 (S=O), 1164, 1127, 1052 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.03-2.14 (m, 1H, H β), 2.19-2.30 (m, 1H, H β), 2.95 (s, 3H, SCH₃), 3.11-3.24 (m, 2H, H γ), 3.71 (dd, J = 12.6 Hz et 3.1 Hz, 1H, H5'), 3.90 (dd, J = 12.6 Hz et 2.3 Hz, 1H, H5'), 4.14-4.19 (m, 1H, H4'), 4.24 (dd, J = 8.4 Hz et 5.3 Hz, 1H, H α), 4.59 (dd, J = 5.6 Hz et 2.4 Hz, 1H, H2'), 4.64 (dd, J = 7.5 Hz et 5.9 Hz, 1H, H3'), 6.02 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H1'), 8.17 (s, 1H, H2), 8.44 (s, 1H, H8); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) 25.0 (C β), 27.4 (C(CH₃)₃), 39.4 (SCH₃), 50.7, 50.9, 53.3 (C γ , C α et C3'), 61.1 (C5'), 74.0 (C2'), 79.9 (C(CH₃)₃), 83.7 (C4'), 90.9 (C1'), 119.4 (C5), 139.9 (C8), 148.7, 152.6 (C2 et C4), 156.2 (C6), 156.7 (NHCO₂tBu), 172.9 (CONH); SMHR (ESI) calculé pour C₂₀H₃₂N₇O₈S [M+H]⁺ 530.2028, expérimental 530.2030.

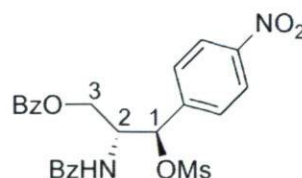
9.18. Synthèse du (1*S*,2*R*)-1-(*p*-Nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol 7.6.

9.18.1. (1*R*,2*R*)-1-(*p*-Nitrophényl)-2-(*N*-benzoyl)-3-benzoyloxypropane 7.1



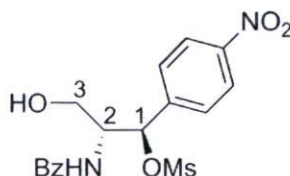
Le (1*R*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol (5.00 g, 23.6 mmol) est dissous dans 200 mL de THF anhydre. La triéthylamine (8.22 mL, 59.0 mmol) est ajoutée puis la solution est refroidie à 0°C. Le chlorure de benzoyle (5.75 mL, 49.6 mmol) est additionné goutte-à-goutte et la réaction est agitée à la température de la pièce pendant 24 h. À 0°C, on ajoute 100 mL de HCl 2 M puis le produit est extrait avec AcOEt (2 X 80 mL), séché sur MgSO₄ et le solvant est évaporé jusqu'à environ 80 mL. Le produit est cristallisé à -20°C, filtré puis lavé avec AcOEt (40 mL) pour donner le (1*R*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-(*N*-benzoyl)-3-benzoyloxypropane **7.1** (6.97 g, 70%) sous la forme d'un solide blanc. T[°]f 169-171°C; [α]_D²¹ -30.1 (c 1.04, CHCl₃); IR (KBr) 3410 (NH, OH), 2887 (CH aliphatique), 1725, 1638 (C=O), 1540 (C-C aromatique, N-O), 1349 (CH aliphatique), 1263 (C-O), 1122 (C-O), 708 (CH aromatique) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.43-4.53 (m, 1H, H₂), 4.70-4.80 (m, 2H, H₃), 5.15 (s large, 1H, H₁), 6.76 (d, J = 7.1 Hz, 1H, NH), 7.41 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Bz), 7.44-7.55 (m, 3H, Bz), 7.57-7.70 (m, 5H, Bz), 8.05 (d, J = 7.8 Hz, 2H, Ph-NO₂), 8.18 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ph-NO₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 55.0 (C₂), 63.4 (C₃), 71.7 (C₁), 123.9, 127.1, 127.2, 128.9, 129.0, 129.2, 130.1, 132.4, 133.5, 134.1, 147.7, 148.1 (Bz et Ph-NO₂), 167.7, 168.3 (C=O); SMHR (ESI) calculé pour C₂₃H₂₁N₂O₆ [M+H]⁺ 421.1394, expérimental 421.1394.

9.18.2. (1*R*,2*R*)-1-(*p*-Nitrophényl)-1-mésyloxy-2-(*N*-benzoyl)-3-benzoyloxypropane 7.2



Le (1*R*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-(*N*-benzoyl)-3-benzoyloxypropane **7.1** (6.40 g, 15.2 mmol) est dissous dans 40 mL de CH₂Cl₂ anhydre et la solution est refroidie à 0°C. La triéthylamine (2.33 mL, 16.7 mmol) est ajoutée puis le chlorure de mésyle (1.30 mL, 16.7 mmol) est additionné goutte-à-goutte (10 min). La réaction est laissée 4 h à la température de la pièce puis diluée avec 100 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec H₂O (3 X 50 mL) et NaCl sat. (50 mL), séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le solide obtenu est trituré avec de l'EtOH (2 X 50 mL) pour donner le (1*R*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-1-mésyloxy-2-(*N*-benzoyl)-3-benzoyloxypropane **7.2** (7.17 g, 94%) sous la forme d'un solide blanc. T_f 105-108°C; [α]_D²¹ -37.9 (c 1.11, CHCl₃); IR (KBr) 3343 (NH), 3023 (CH aromatique), 2937 (CH aliphatique), 1728, 1650 (C=O), 1602, 1538 (C-C aromatique, N-O), 1359 (CH aliphatique), 1278 (C-O, S=O), 1170, 1096 (C-O), 948 (CH aromatique) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.99 (s, 3H, Ms), 4.41 (dd, J = 11.8 et 5.7 Hz, 1H, H3), 4.55 (dd, J = 11.8 et 5.4 Hz, 1H, H3), 5.01-5.09 (m, 1H, H2), 6.04 (d, J = 5.8 Hz, 1H, H1), 6.84 (d, J = 8.7 Hz, 1H, NH), 7.41-7.47 (m, 4H, Bz), 7.53 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Bz), 7.59 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Bz), 7.64 (d, J = 8.6 Hz, 2H, Bz), 7.75 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Bz), 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ph-NO₂), 8.23 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ph-NO₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 39.1 (Ms), 53.2 (C2), 63.1 (C3), 79.8 (C1), 124.5, 127.3, 128.0, 128.9, 129.1, 129.1, 129.9, 132.5, 133.5, 134.0, 142.5, 148.7 (Bz et Ph-NO₂), 166.5, 167.8 (C=O); SMHR (ESI) calculé pour C₂₄H₂₃N₂O₈S [M+H]⁺ 499.1170, expérimental 499.1165.

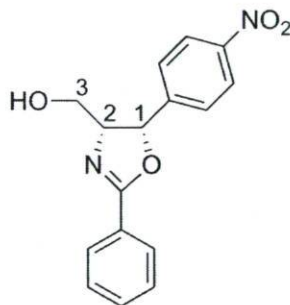
9.18.3. (1*R*,2*R*)-1-(*p*-Nitrophényl)-1-mésyloxy-2-(*N*-benzoyl)-3-propanol **7.3**



Le (1*R*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-1-mésyloxy-2-(*N*-benzoyl)-3-benzoyloxypropane **7.2** (6.99 g, 14.0 mmol) est dissous dans 200 mL de MeOH auquel on ajoute du NaOH 1 M (15.4 mL, 15.4 mmol). La réaction est agitée 2.5 h à la température de la pièce. Le précipité obtenu est filtré puis lavé avec 30 mL de MeOH froid (-20°C) pour donner le (1*R*,2*R*)-1-(*p*-

nitrophényl)-1-mésyloxy-2-(*N*-benzoyl)-3-propanol **7.3** (3.85 g, 70%), un solide blanc. T[°]f 141-142°C; $[\alpha]_D^{21}$ -141.3 (c 1.07, DMSO); IR (KBr) 3419, 3309 (NH, OH), 3027 (CH aromatique), 2926 (CH aliphatique), 1652 (C=O), 1525 (C-C aromatique, N-O), 1347 (CH aliphatique), 1170 (C-O), 950 (CH aromatique) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 3.13 (s, 3H, Ms), 3.38 (dd, J = 11.0 et 6.1 Hz, 1H, H3), 3.54 (dd, J = 11.0 et 6.6 Hz, 1H, H3), 4.44-4.53 (m, 1H, H2), 5.08 (s large, 1H, OH), 5.92 (d, J = 4.8 Hz, 1H, H1), 7.40 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Bz), 7.48 (t, J = 7.3 Hz, 1H, Bz), 7.65 (d, J = 8.6 Hz, 2H, Bz), 7.73 (J = 7.6 Hz, 2H, Ph-NO₂), 8.19 (d, J = 6.9 Hz, 2H, Ph-NO₂), 8.40 (d, J = 9.2 Hz, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 38.7 (Ms), 55.7 (C2), 60.5 (C3), 80.8 (C1), 124.1, 128.1, 128.6, 128.9, 132.0, 134.8, 145.7, 148.0 (Bz et Ph-NO₂), 167.3 (C=O); SMHR (ESI) calculé pour C₁₇H₁₉N₂O₇S [M+H]⁺ 395.0907, expérimental 395.0938.

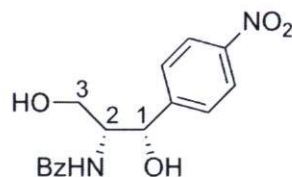
9.18.4. (4*S*,5*R*)-2-Phényl-4-hydroxyméthyl-5-(*p*-nitrophényl)-oxazoline 7.4



Le (1*R*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-1-mésyloxy-2-(*N*-benzoyl)-3-propanol **7.3** (2.00 g, 5.07 mmol) est dissous dans 50 mL d'EtOH puis le KOAc est ajouté (1.02 g, 10.4 mmol). La réaction est agitée 4.5 h à reflux et 15 h à température ambiante. L'EtOH est évaporé puis le produit est extrait entre 100 mL d'Et₂O et 80 mL de NaCl saturé. Après séchage sur MgSO₄, la phase organique est évaporée jusqu'à environ 20 mL puis laissée 1 h à -20°C. Le précipité est filtré et lavé avec 30 mL d'Et₂O froid pour donner la (4*S*,5*R*)-2-phényl-4-hydroxyméthyl-5-(*p*-nitrophényl)-oxazoline **7.4** (475 mg, 31%), un solide blanc. T[°]f 176°C; $[\alpha]_D^{21}$ -24.4 (c 1.01, MeOH); IR (KBr) 3413 (OH), 3089 (CH aromatique), 2851 (CH aliphatique), 1638 (C=N), 1518 (C-C aromatique, N-O), 1351 (CH aliphatique), 1095 (C-O), 693 (CH aromatique) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.29-4.42 (m, 1H, H2),

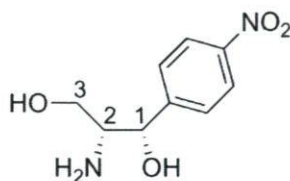
4.50-4.63 (m, 2H, H3), 4.96 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, H1), 7.44 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, Bz), 7.54 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, Bz), 7.71 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Bz), 7.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, Ph-NO₂), 8.24 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ph-NO₂); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 69.9 (C2), 73.5 (C3), 74.8 (C1), 124.5, 128.6, 128.7, 129.5, 129.6, 133.1, 148.9, 151.3 (Bz et Ph-NO₂), 167.6 (C=O); SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₁₅N₂O₄ [M+H]⁺ 299.1026, expérimental 299.1053.

9.18.5. (1*S*,2*R*)-1-(*p*-Nitrophényl)-2-(*N*-benzoyl)-1,3-propadiol 7.5



La (4*S*,5*R*)-2-phényl-4-hydroxyméthyl-5-(*p*-nitrophényl)-oxazoline **7.4** (359 mg, 1.20 mmol) est dissoute dans 3 mL de THF. Le HCl 2 M (87.3 μ L, 1.75 mmol) est ajouté et la réaction est agitée 24 h à température ambiante. La solution est neutralisée avec du NaHCO₃ sat. jusqu'à l'obtention d'un pH de 8-9 puis le mélange est agité pendant 18 h. Le produit est extrait entre 40 mL d'Et₂O et 40 mL de H₂O, séché sur MgSO₄ et évaporé. Une chromatographie sur gel de silice (7 % MeOH / CH₂Cl₂) permet d'isoler le (1*S*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-(*N*-benzoyl)-1,3-propadiol **7.5** (218 mg, 57%), un solide blanc. T^of 215°C; $[\alpha]_D^{21}$ -115.4 (c 0.53, DMSO); IR (KBr) 3276 (NH, OH), 2962 (CH aliphatique), 1634 (C=O), 1524 (C-C aromatique, N-O), 1347 (CH aliphatique), 1077, 1039 (C-O), 706 (CH aromatique) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 3.53-3.61 (m, 1H, H3), 3.68-3.76 (m, 1H, H3), 4.05-4.14 (m, 1H, H2), 4.63 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, OH), 4.81 (dd, $J = 7.5$ et 5.1 Hz, 1H, H1), 5.78 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, OH), 7.36 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Bz), 7.44 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, Bz), 7.63 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, Bz), 7.68 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, Ph-NO₂), 8.10 (d, $J = 8.9$ Hz, 3H, Ph-NO₂ et NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 57.9 (C2), 60.6 (C3), 72.1 (C1), 123.5, 128.5, 128.8, 131.7, 135.3, 147.1, 152.5 (Bz et Ph-NO₂), 166.7 (C=O); SMHR (ESI) calculé pour C₁₆H₁₇N₂O₅ [M+H]⁺ 317.1132, expérimental 317.1153.

9.18.6. (1*S*,2*R*)-1-(*p*-Nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol 7.6



Le (1*S*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-(*N*-benzoyl)-1,3-propadiol **7.5** (97.2 mg, 307 μmol) est dissous dans 3.5 mL de HCl 6 M et la solution est chauffée à reflux pendant une heure. Le solvant est évaporé puis co-évaporé avec du MeOH. Le résidu est préadsorbé sur silice avec du MeOH puis le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (1% NH_4OH / 20% MeOH / CH_2Cl_2). Après évaporation du solvant, l'huile obtenue est cristallisée à -20°C pour donner le (1*S*,2*R*)-1-(*p*-nitrophényl)-2-amino-1,3-propadiol **7.6** sous la forme d'un solide blanc. $T^{\circ}\text{f}$ 106-108 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 3.73 (c 0.50, MeOH); IR (KBr) 3370 (NH, OH), 2912 (CH aliphatique), 1515 (C-C aromatique, N-O), 1347 (CH aliphatique), 1056, 1025 (C-O), 845 (CH aromatique) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 3.04 (q, $J = 5.7$ Hz, 1H, H2), 3.53 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, H3), 4.76 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, H1), 7.61 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, Ph- NO_2), 8.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ph- NO_2); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 57.8 (C2), 62.2 (C3), 73.9 (C1), 123.2, 127.7, 147.6, 150.0 (Ph- NO_2); SMHR (ESI) calculé pour $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 213.0870, expérimental 213.0878.

