

Synthèse des deux énantiomères de l'analogue carbocyclique du nicotinamide ribose et évaluation de leurs propriétés biologiques

Mohamed IKBAL, Claude CERCEAU, François LE GOFFIC et Sames SICSIĆ*

CERCOA–CNRS, 2–8 rue, Henry-Dunant, 94320 Thiais, France

(Reçu le 5 mai 1988, accepté le 30 janvier 1989)

Résumé — La synthèse des deux énantiomères de l'analogue carbocyclique du nicotinamide ribose **14** a été réalisée par une voie comprenant le dédoublement enzymatique du précurseur (\pm)-**3** par l'estérase de foie de porc.

Les propriétés biologiques des deux énantiomères (+)-**14** et (–)-**14** ont été déterminées. Le composé (–)-**14** présente des activités antibactériennes et antifongiques intéressantes.

Des expériences de compétition *in vivo* entre le composé (–)-**14** et les intermédiaires du cycle des nucléotides pyridiniques, ainsi que son pouvoir inhibiteur sur deux enzymes clés du métabolisme du NAD ont été effectuées et montrent que la cible du composé (–)-**14** pourrait être l'une des enzymes intervenant dans le métabolisme du NAD.

Summary — **Synthesis of the two enantiomers of the carbocyclic analog of nicotinamide ribose and analysis of their biological properties.** Synthesis of the enantiomers of the carbocyclic analog of nicotinamide ribose **14**, has been performed in a way including an enzymatic resolution of the precursor (\pm)-**3** using pig liver esterase as a catalyst.

Biological properties of both enantiomers (+)-**14** and (–)-**14** were studied. Compound (–)-**14** showed good and highly specific anti-bacterial and anti-fungal activities.

In vivo competition experiments between compound (–)-**14** and intermediate molecules of the pyridine nucleotide cycle along with its inhibition behavior against two key enzymes of the NAD⁺ metabolism were performed. They suggested that the target of compound (–)-**14** could be one of the enzymes involved in NAD⁺ metabolism.

enantioselective synthesis / anti-bacterial agent / anti-fungal agent / carbocyclic analog / nicotinamide ribose / NAD⁺ metabolism / pyridine nucleotide cycle / microorganism

Introduction

Des progrès importants ont été accomplis dans l'obtention des analogues carbocycliques puriques et pyrimidiques depuis la première synthèse de l'analogue carbocyclique de l'adénosine par Shealy et Clayton [1], et les études biologiques ont montré que certains d'entre eux possèdent des propriétés intéressantes [2].

Deux analogues carbocycliques de l'adénosine d'origine bactérienne, la (–)-aristéromycine [3] et la (–)-néplancine A [4], présentent des activités antivirales et antitumorales remarquables [5, 6]. Leur synthèse énantiosélective [7] a été réalisée par l'introduction d'une étape enzymatique dans le schéma synthétique.

D'autres méthodes de synthèse énantiosélective d'analogues puriques et pyrimidiques ont été également décrites [8, 9].

En revanche, peu d'études ont été consacrées aux analogues carbocycliques pyridiniques. Cependant, dans le cadre d'une étude d'un système de substitution du NAD⁺ dans la réaction d'oxydoréduction catalysée par l'alcool

déshydrogénase de foie de cheval, nous avons décrit la synthèse de l'analogue carbocyclique du nicotinamide ribose (\pm)-**14** et montré qu'il avait l'aptitude de se fixer au site actif de l'enzyme, car il est inhibiteur compétitif du NAD⁺ vis-à-vis de l'enzyme et qu'il pouvait aussi jouer le rôle de cofacteur oxydant pourvu que le milieu soit supplémenté en AMP [10].

Ces intéressantes propriétés enzymologiques de (\pm)-**14**, nous ont incité à examiner si ce composé avait des propriétés biologiques et plus particulièrement des propriétés antibiotiques et nous avons réalisé la synthèse des deux énantiomères de l'analogue carbocyclique **14** afin de déterminer leurs propriétés biologiques respectives.

Chimie

La voie choisie pour la synthèse des deux énantiomères (+)-**14** et (–)-**14**, a consisté à partir de l'énantiomère correspondant de l'(amino-*cis*-4-dihydroxy-*trans*-2,3) cyclopentane méthanol **7**.

*Auteur à qui la correspondance doit être adressée.

En effet la réaction de **7** sur le chlorure de (aminocarboxyl)-3-(dinitro-2,4-phényl)-1-pyridinium **13** conduit suivant le Schéma 2 au composé désiré **14** sans modification de la stéréochimie du carbone porteur de la fonction amine [11].

Pour l'obtention des deux énantiomères (+)-**7** et (-)-**7**, deux voies ont été explorées (Schéma 1). La première consistait à dédoubler un précurseur contenant potentiellement les quatre substituants du cycle cyclopentanique dans la stéréochimie souhaitée, c'est-à-dire celle fixée dès l'oxydation de la lactame bicyclique **1** pour l'obtention du produit **8**. C'est pourquoi des dédoublements enzymatiques ont été tentés sur les intermédiaires **8**, **12** et **11**, car ils étaient susceptibles d'être reconnus et hydrolysés énantiosélectivement par des hydrolases. La papaïne, l' α -chymotrypsine, la subtilisine et l'estérase de foie de porc n'ont donné aucun résultat.

La deuxième voie (Schéma 2) consistait à partir des deux acétamidoesters (+)- et (-)-**5** provenant du dédoublement par hydrolyse énantiosélective enzymatique précédemment décrit de (\pm)-**3** [12], et à réaliser à ce

stade l'oxydation de la double liaison du cycle cyclopentanique. L'oxydation catalysée par le tétraoxyde d'osmium en présence de *N*-méthylmorpholine [13], présentait l'avantage de conduire à de meilleurs rendements que l'oxydation par le permanganate de potassium [14]. Cependant un résultat de la littérature montrait que l'oxydation catalysée par le tétraoxyde d'osmium de l'acétate-*cis*-4-acétamido-*cis*-cyclopentène-2-méthanol conduit à 30% de dihydroxylation en *cis* et à 70% en *trans* [15].

Dans notre cas, l'oxydation de **5** catalysée par le tétraoxyde d'osmium a conduit uniquement à l'introduction des hydroxyles en *trans* par rapport aux groupements acétamide et ester.

Les analyses spectroscopiques par RMN et chromatographiques des composés (+)-**6** et (-)-**6** ont montré qu'il s'agissait du même produit, à la configuration près, que le composé racémique obtenu par oxydation du lactame **1**, qui est totalement *trans* [14].

La voie décrite dans la littérature pour l'obtention de l'acétamidoester (\pm)-**3** [16] a été légèrement modifiée dans le sens d'une simplification: l'ouverture de la lactame

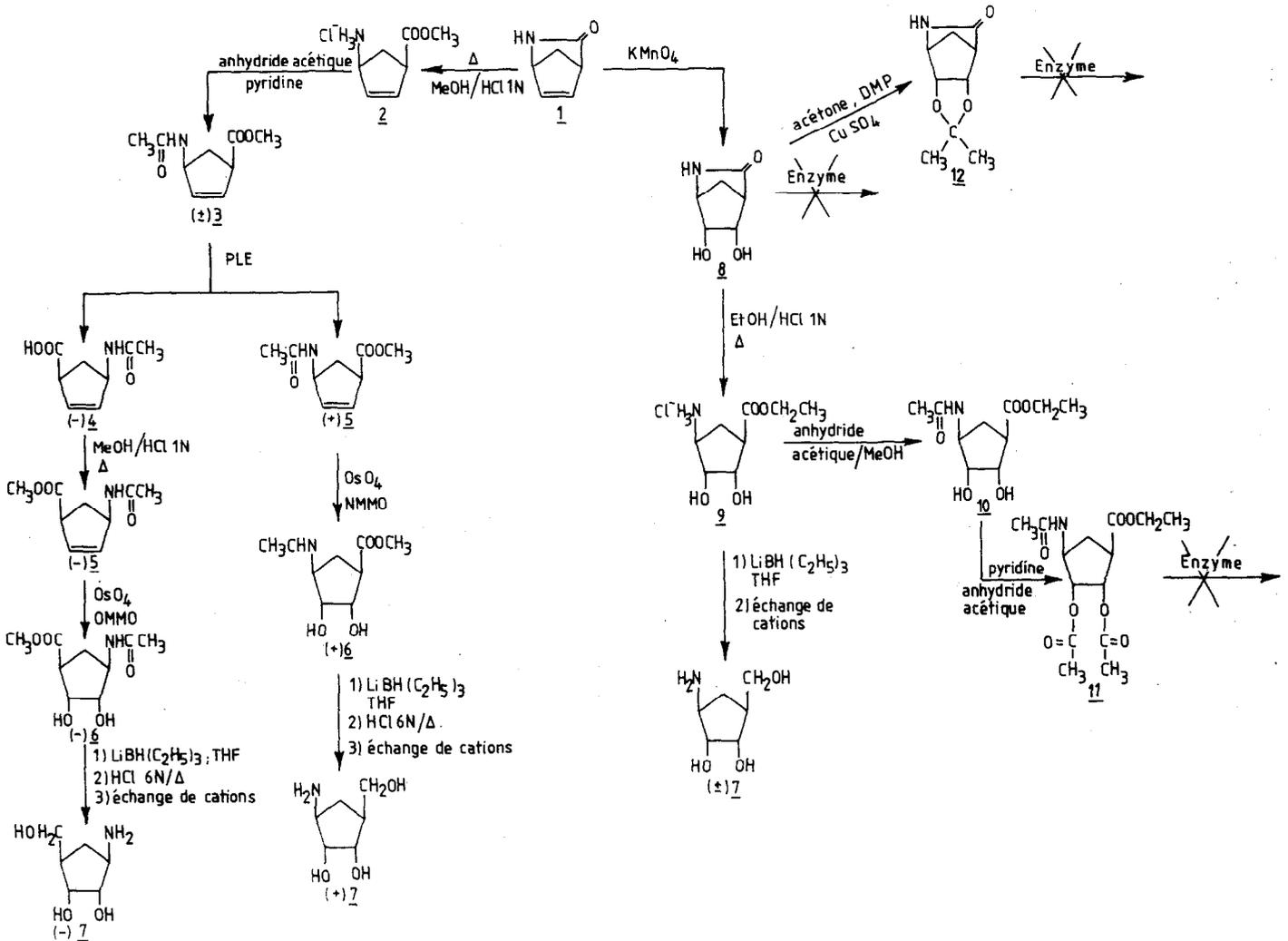


Schéma 1

Schéma 2

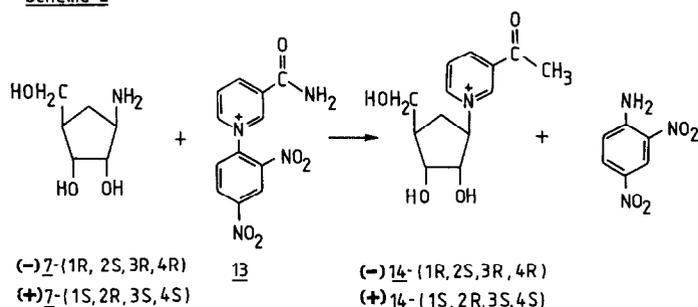


Schéma 2. (-)-7 $[\alpha]_D = -10^\circ$ ($c=1$, H_2O)
 (-)-14 $[\alpha]_D = -9^\circ$ ($c=1$, H_2O)
 (+)-7 $[\alpha]_D = +9^\circ$ ($c=1$, H_2O)
 (+)-14 $[\alpha]_D = +9^\circ$ ($c=1$, H_2O)

1 et l'estérification de l'acide ont été réalisées en une seule étape.

Sans purification ultérieure, le chlorhydrate de l'amino-ester **2** est ensuite acétylé.

Après le dédoublement enzymatique de (\pm)-**3** et les étapes d'oxydation, les composés (+)- et (-)-**7** sont aisément obtenus par réduction des esters (+)- et (-)-**6** par le triéthylborohydrure de lithium suivie de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N de l'acétamide. Le produit brut résultant est ensuite purifié par dépôt sur une résine échangeuse de cations, rinçage abondant de la résine à l'eau pour éliminer les produits non cationiques et élution de **7** par de l'ammoniaque 0,1 N. Après évaporation de l'ammoniaque, on obtient avec un rendement convenable les produits sous forme d'une huile ayant les mêmes caractéristiques spectrales que le produit racémique [14].

Étude des propriétés biologiques des composés (\pm)-**14**, (-)-**14** et (+)-**14**

Les activités antibactériennes et antifongiques des analogues carbocycliques (\pm)-**14**, (+)-**14** et (-)-**14** ont été déterminées selon la technique usuelle de dilutions en milieu gélosé, sur les microorganismes suivants: *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* et *H. parainfluenzae*, *Salmonella typhimurium* LT2, *Staphylococcus aureus* 209P, *Candida albicans* et *C. tropicalis* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Les résultats exposés dans les Tableaux I et II montrent que les propriétés biologiques du mélange racémique (\pm)-**14** proviennent, exclusivement de l'énantiomère (-)-**14** qui présente des activités antibiotiques et antifongiques intéressantes. L'énantiomère (+)-**14**, en revanche, est dépourvu de toute activité sur les microorganismes testés.

Le fait que le composé (-)-**14** soit un analogue carbocyclique du nicotinamide ribose, dont nous avons montré qu'il pouvait être reconnu par une enzyme telle que

Tableau I. Activités antibactériennes^(a) (CMI mg/l).

Souches	(\pm)- 14		(-)- 14		(+)- 14	
	MM	MR	MM	MR	MM	MR
<i>E. coli</i> K12	<<	0,1	<<	0,1	>	>128
<i>E. coli</i> MRE600	<	0,1	<	0,1	>	>128
<i>E. coli</i> UB1005	<	0,1	<	0,1	>	>128
<i>E. coli</i> 9637	<	0,1	<	0,1	>	>128
<i>S. typhimurium</i> LT2	ND				0,125	>128
<i>S. typhimurium</i> try4	ND				0,125	>128
<i>H. influenzae</i>	ND			0,3	>	>128
<i>H. parainfluenzae</i>	ND			0,015	>	>128
<i>S. aureus</i> 209P*	>128		>128		>	>128

^(a): Toutes les souches sont cultivées sur milieu minimum excepté *Haemophilus* qui nécessite du NAD^+ comme facteur de croissance.

**S. aureus* est cultivée sur milieu riche Mueller-Hinton.

ND: non déterminé.

l'alcool déshydrogénase de foie de cheval, tant par ses propriétés inhibitrices que par son activité de cofacteur, indiquait qu'une des cibles possibles de (-)-**14** pouvait être l'une des enzymes intervenant dans le métabolisme du NAD^+ , c'est-à-dire dans le cycle des nucléotides pyridiniques.

Tableau II. Activités antifongiques (CMI mg/l).

Souches	(\pm)- 14		(-)- 14		(+)- 14	
	MM	MR	MM	MR	MM	MR
<i>C. albicans</i> ATCC 26278	8	>128	8	> 64	>128	>128
<i>C. tropicalis</i> 204	4	32	4	4-8	>128	>128
<i>S. cerevisiae</i> 9898	16	>128	16	>128	>128	>128

MM: milieu minimum levure; MR: milieu riche au casitone.

Ces milieux sont utilisés pour la détermination de la sensibilité des champignons levuriformes, filamenteux et sporites aux antifongiques.

Nous avons donc poursuivi l'étude dans deux directions, l'une microbiologique et l'autre enzymatique.

Pour l'étude microbiologique, deux souches bactériennes ont été choisies: *Salmonella typhimurium* LT2, dont le cycle des nucléotides pyridiniques est le plus étudié [17], et *Haemophilus influenzae*. Cette dernière est intéressante car elle est incapable de synthétiser les nucléotides pyridiniques et exige du NAD^+ exogène dans le milieu de culture pour sa croissance. Le NAD^+ n'est pas utilisé intact par la cellule. Il est dégradé d'abord en nicotinamide mononucléotide (NMN^+) avant de pénétrer dans la cellule [18].

Des expériences de compétition *in vivo* ont été réalisées entre le composé (-)-**14** et les intermédiaires du cycle des nucléotides pyridiniques: l'acide nicotinique, le nicotinamide et le nicotinamide ribose mononucléotide.

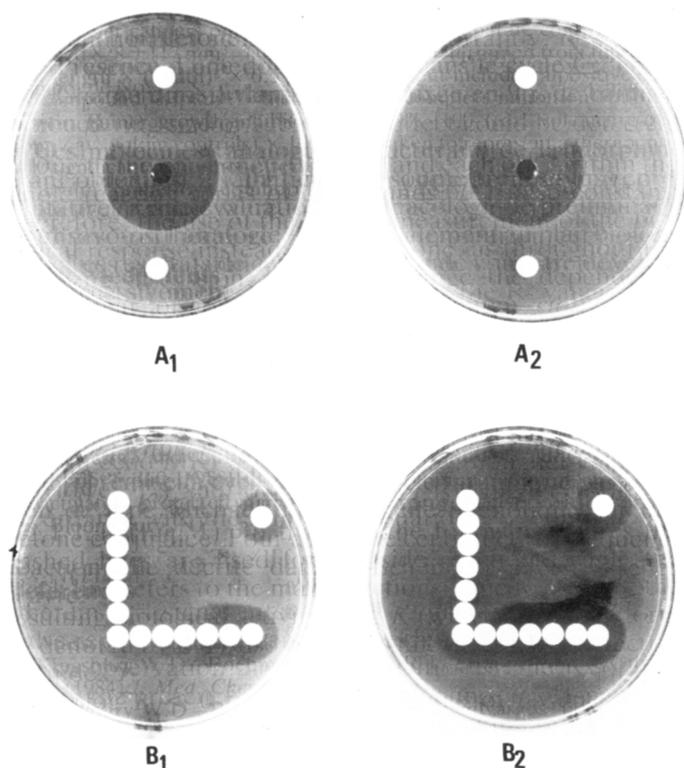


Fig. 1. Les cellules de *S. typhimurium* LT2 sont cultivées jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance et diluées à 5×10^5 cellules/ml. 1 ml de la suspension est étalé sur milieu gélosé en boîte de Petri, puis placé à 30°C pendant 1 h. Des disques de 7 mm de diamètre (Institut Pasteur Production) imprégnés du composé (-)-14 et des éventuels compétiteurs sont déposés à la surface de l'agar. Les boîtes sont incubées 24 h à 37°C . **A.** Les disques sont chargés, au centre, de $3 \mu\text{g}$ de (-)-14 en bas, de $1,25 \mu\text{g}$ de NMN⁺; en haut, A₁, de $1,25 \mu\text{g}$ de Nam; en haut, A₂, de $1,25 \mu\text{g}$ de NA. **B.** Les disques sont chargés horizontalement, de $3 \mu\text{g}$ de (-)-14 verticalement, B₁, de $1,25 \mu\text{g}$ de NMN⁺; B₂, de $3,25 \mu\text{g}$ de NMN⁺. Abréviations: Nam: nicotinamide; NA: acide nicotinique; NMN⁺: nicotinamide ribose mononucléotide.

Avec *S. typhimurium*, les résultats de ces expériences sont illustrés sur la Figure 1.

Dans un milieu minimum ensemencé de *S. typhimurium* LT2, un disque chargé de $1,25 \mu\text{g}$ de l'acide nicotinique ou du nicotinamide lève l'inhibition de croissance de $3 \mu\text{g}$ du composé (-)-14.

Par contre, le nicotinamide ribose mononucléotide à la même quantité ne supprime pas cet effet. La levée d'inhibition n'est observée qu'avec une charge de $3,25 \mu\text{g}$ en NMN⁺.

De même, une compétition entre (-)-14 ($3 \mu\text{g}$) et le NMN⁺ ($3,25 \mu\text{g}$) est observée également chez *H. influenzae*.

Au plan enzymatique, il a été montré que, chez les microorganismes [17], le NAD⁺ exogène est d'abord scindé en NMN⁺ + AMP par une enzyme périplasmique, la NAD pyrophosphatase. Le NMN⁺ est ensuite dégradé

en nicotinamide + ribose phosphate par une enzyme membranaire, la NMN glycohydrolase, avant de pénétrer dans la cellule. Cette enzyme a donc retenu notre attention dans le cadre du présent travail.

Nous avons donc essayé de purifier cette enzyme chez *S. typhimurium* LT2 en préparant les sphéroplastes selon la méthode de Kaback [19]. Cependant, son instabilité et la faible activité spécifique obtenue ($0,24 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) ne nous ont pas permis de réaliser des cinétiques d'inhibition *in vitro*.

Par contre, nous avons étudié le composé (-)-14 en tant qu'inhibiteur de deux autres enzymes du métabolisme du NAD⁺: la NAD glycohydrolase de *Neurospora crassa* qui effectue, comme la NMN glycohydrolase, la rupture de la liaison N-glycosidique du NAD⁺, et la NAD pyrophosphatase de *Crotalus atrox* qui scinde le NAD⁺ en NMN⁺ + AMP.

Les résultats de ces tests, résumés sur les Figs. 2 et 3 montrent que le composé (-)-14 est un inhibiteur compétitif du NAD⁺ vis-à-vis des deux enzymes, avec cependant une meilleure affinité pour la NAD⁺ glycohydrolase.

Cette inhibition est caractérisée par un $K_i = 0,74 \text{ mM}$ vis-à-vis de la NAD glycohydrolase, le K_m du NAD⁺ étant $0,5 \text{ mM}$ (Fig. 2).

Le K_i de la NAD pyrophosphatase a été évalué à $2 \times 10^{-2} \text{ M}$, le K_m du NAD⁺ vis-à-vis de l'enzyme est $0,5 \text{ mM}$ (Fig. 3).

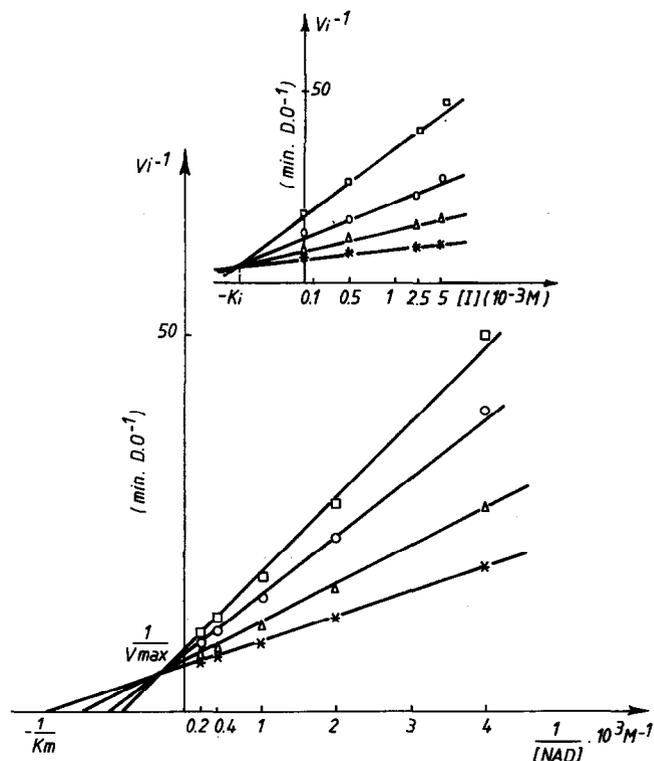


Fig. 2. Inhibition de la NAD glycohydrolase par le composé (-)-14 utilisant le NAD⁺ comme substrat. Concentrations en (-)-14: *: 0; Δ : $0,5 \text{ mM}$; \circ : $2,5 \text{ mM}$; \square : 5 mM . En médaillon, l'estimation de K_i selon la représentation de Dixon $1/v_i = f(I)$.

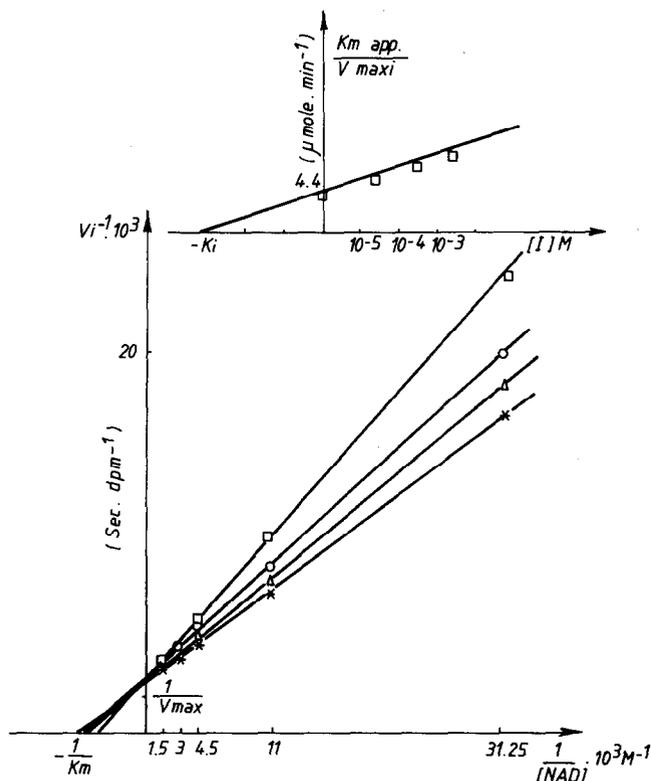


Fig. 3. Inhibition de la NAD pyrophosphatase par le composé (-)-14 en présence de NAD^+ . Concentrations en (-)-14: *: 0; Δ : $2,34 \cdot 10^{-5}$ M; \circ : $2,34 \cdot 10^{-4}$ M; \square : 2,34 mM. En médaillon, la détermination de K_i selon la méthode graphique de Dixon $K_m \text{ app}/V_{\text{max}} = f(I)$.

Ces résultats, considérés séparément, ne permettent pas d'expliquer les fortes activités antimicrobiennes de (-)-14 observées sur les différents microorganismes étudiés.

Ces fortes activités microbiennes pourraient peut être résulter d'un effet de synergie correspondant à des actions simultanées sur deux enzymes appartenant à la même voie métabolique.

Protocoles expérimentaux

Chimie

La pureté des produits synthétisés a été caractérisée par spectroscopie de masse, la chromatographie sur couche mince (gel silice 60 F₂₅₄, Merck), la spectroscopie de RMN H¹ (Varian à 60 et 90 MHz). Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Perkin-Elmer 241.

Synthèse de l'ester méthylique de l'acide (acétamido-cis-4)-cyclopentène-2-carboxylique (±)-3

Une solution de méthanol chlorhydrique 1 N (100 ml), contenant 7 g du lactame **1** (6,4 mmol) obtenu suivant [16], est portée à reflux pendant 2 h. Après évaporation du méthanol, le résidu est repris par de l'acétone, et la solution obtenue évaporée. Le résidu est dissous dans 50 ml de pyridine et 20 ml d'anhydride acétique sont ajoutés goutte à goutte à 0°C. La solution est laissée 1 h à température ambiante, puis évaporée sous

vide. Le résidu est repris dans du dichlorométhane (50 ml), et la solution est lavée 3 fois avec 20 ml de bicarbonate de sodium, 3 fois avec 10 ml de chlorure de sodium, séché (sulfate de magnésium), et évaporée. Après recristallisation (toluène-hexane) on obtient l'ester (±)-3 (6,5 g, 71%), F = 65°C, litt: 66°C [16].

Dédoublement de l'ester méthylique (±)-3

Le dédoublement de (±)-3 a été réalisé suivant [12]. Il conduit à l'ester (+)-5, $[\alpha]_D = +43^\circ$ (c=1, MeOH), et à l'acide (-)-4, $[\alpha]_D = -39^\circ$ (c=1, MeOH). 450 mg de cet acide sont dissous dans 10 ml de méthanol chlorhydrique 1 N, la solution est portée au reflux pendant 2 h puis évaporée. Le résidu est repris dans 50 ml de dichlorométhane et la solution est traitée comme précédemment. On obtient 430 mg (88%) de l'ester (-)-5, $[\alpha]_D = -46^\circ$ (c=1, MeOH).

Synthèse de l'ester méthylique de l'acide (acétamido-cis-4-dihydroxy-trans-2,3)cyclopentane carboxylique (-)-6

1 g de l'ester (-)-5 (5,46 mmol) sont ajoutés à une solution contenant: 1,3 g d'oxyde de N-méthylmorpholine (9,6 mmol); 2,8 ml d'eau distillée; 1,16 ml de t-butanol; 4,3 mg de tétraoxyde d'osmium (0,016 mmol) dans 330 μ l de t-butanol.

La solution est agitée toute la nuit à température ambiante et sous atmosphère d'azote. 50 mg d'hydrosulfite de sodium sont ensuite ajoutés à la solution tout en agitant. On rajoute ensuite 4 ml d'eau et 1 g de célite. La célite est filtrée sur fritté et le gâteau de célite est lavé avec de l'eau. Le filtrat est concentré sous vide. Le résidu huileux obtenu est repris dans du méthanol et imprégné sur silice. Après évaporation du méthanol, la silice est déposée sur une colonne de silice chromagel 60 Å CC (200-400 mesh) préalablement équilibrée par du chloroforme. La colonne est rincée avec 500 ml de chloroforme, puis le produit est élué sous moyenne pression (0,4 bar) avec un mélange chloroforme-méthanol 9/1. R_f: 0,7. Les différentes fractions contenant le diol (-)-6 sont rassemblées.

Après évaporation des solvants sous vide, 700 mg (59%) du diol (-)-6 sont obtenus sous forme visqueuse. RMN H¹ (90 MHz) CDCl₃ δ : 3,2 ppm (m, 1H, H1); 4,3 ppm (dd, 1H, H2); 4,09 ppm (dd, 1H, H3); 3,9 ppm (m, 1H, H4); 1,6 ppm (m, 1H, H5); 2,3 ppm (m, 1H, H5'); 2 ppm (s, 3H, CO-CH₃); 3,4 ppm (s, 3H, OCH₃).

Synthèse de l'(amino-cis-4-dihydroxy-trans-2,3 hydroxyméthyl)-1 cyclopentane (-)-7

3,2 ml d'une solution tétrahydrofurannique 1 N de triéthylborohydrure de lithium (3,2 mmol) sont ajoutés goutte à goutte et sous atmosphère d'argon à une suspension contenant 700 mg de l'ester méthylique (-)-6 (3,22 mmol) [11] dans 40 ml de tétrahydrofuranne anhydre. L'addition est effectuée à 0°C, avec agitation magnétique. La réaction est laissée à 0°C pendant 30 min supplémentaires après addition. Le tétrahydrofuranne est évaporé sous vide.

Le résidu obtenu est repris dans le méthanol, et l'excès de triéthylborohydrure de lithium est détruit à 0°C par HCl 0,1 N.

L'eau est ensuite évaporée sous vide et coévaporée avec du méthanol. Le résidu visqueux obtenu est repris dans 40 ml d'HCl 6 N et mis à reflux pendant 4 h. Après retour à température ambiante, la solution est concentrée. Le produit est déposé sur une colonne de résine échangeuse de cations type BioRad AG 50 WX 8 (H⁺). La colonne est rincée avec 200 ml d'eau, puis l'aminoalcool (-)-7 est élué avec 300 ml d'ammoniaque 0,1 N. Après évaporation du solvant sous vide, 300 mg (63%) de l'aminoalcool (-)-7, sont obtenus sous forme d'huile visqueuse. R_f: 0,4; $[\alpha]_D = -10^\circ$ (c=1, CH₃OH) (litt. -10° , 3 [7]); RMN H¹ (90 MHz) D₂O δ : 2,2 ppm (m, 2H, H1, H5); 3,9 ppm (m, 1H, H2); 3,7 ppm $>\delta>$ 3,5 ppm (m, 3H, H3, H6, H'6); 3,21 ppm (m, 1H, H4); 1,04 ppm (m, 1H H5').

L'énantiomère (+)-7 est obtenu de manière analogue à (-)-7, $[\alpha]_D = +9^\circ$ (c=1, CH₃OH).

Synthèse du chlorhydrate de (-)-aminocarbonyl-3-(hydroxyméthyl)-cis-4-dihydroxy-trans-2,3-cyclopentyl 1-pyridinium (-)-14

730 mg de **13** [11] (2,26 mmol) sont ajoutés à 10 ml d'une solution méthanolique contenant 500 mg (3,4 mmol) de (-)-7. Le mélange est agité 48 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, le résidu obtenu est repris dans 10 ml d'eau. La dinitroaniline précipitée est éliminée par extraction de la phase aqueuse 10 fois par 10 ml d'éther éthylique. La phase aqueuse est ensuite concentrée, traitée au charbon actif, puis déposée sur une colonne de résine échangeuse de cations type BioRad AG 50 WX 8 (H⁺). Après rinçage de la colonne, l'analogue carbo-

cyclique (-)-**14** est élué avec un gradient linéaire d'HCl 0 à 0,8 M. Après évaporation de l'eau sous vide, 120 mg (33%) de (-)-**14** sont obtenus. $R_f = 0,7$; UV $\lambda_{\max} = 266$ nm; $\epsilon = 5450$ cm⁻¹ M⁻¹; RMN H¹ (D₂O) δ : 1,9 ppm (m, 1H, H'5); 2,09 ppm (m, 1H, H'4); 2,75 ppm (m, 1H, H'5); 3,78 ppm (d, 2H, $J_{4,5} = 5$ Hz, H'6); 3,83 ppm (dd, 1H, $J_{2,3} = 5,3$ Hz; $J_{3,4} = 1,84$ Hz, H'3); 4,22 ppm (dd, 1H, $J_{1,2} = 9,6$ Hz; $J_{2,3} = 5,4$ Hz, H'2); 5 ppm (m, 1H, H'1); 8,25 ppm (dd, 1H, H5); 8,96 ppm (d, 1H, $J_{4,5} = 8$ Hz, H4); 9,25 ppm (d, 1H, $J_{5,6} = 6$ Hz, H6); 9,48 ppm (s, 1H, H2). [10], $[\alpha]_D = -9^\circ$ (c=1, H₂O).

L'énantiomère (+)-**14** est obtenu de manière analogue à partir de (+)-**7**, $[\alpha]_D = +9^\circ$ (c=1, H₂O).

L'ester éthylique de l'acide[acétamido-4-(diacétoxy-trans-2,3]cyclopentane carboxylique (\pm)-**11**

A 700 mg (3,1 mmol) de **9** synthétisé selon [15], dans 7 ml de pyridine sont ajoutés goutte à goutte, à 0°C, 4 ml d'anhydride acétique. La solution est agitée 15 h à température ambiante. La pyridine est ensuite évaporée. Le résidu obtenu est repris dans 20 ml d'eau et extrait 3 fois par 20 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée 3 fois avec 10 ml d'une solution saturée en bicarbonate de sodium, puis 3 fois avec 10 ml d'une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium. Après évaporation du solvant, le produit obtenu est cristallisé dans l'acétate d'éthyle. F: 116°C Masse: $m/e = 316$ (M⁺, 100), 287 (M⁺-(C₂H₅), 2) 272 (M-(CH₃CO), ϵ), 256 (M-(OCOCH₃), ϵ), 215 (M⁺-(CH₃CO+NHCOCH₃), 11), 198 (M-(NHCOCH₃+OCOCH₃), 80). RMN H¹ (CDCl₃, TMS): δ ppm: 1,24 (t, 3H, CH₂-CH₃); 1,7 (m, 1H, H5); 1,9 (s, 3H, CH₃CO); 2,04 (s, 6H, COCH₃); 2,3 (m, 1H, H'5); 2,7 (m, 1H, H1); 4,1 (q, 2H, CH₂-CH₃); 4,5 (m, 1H, H4); 5,17 (m, 2H, H2-H3); 6,7 (m, 1H, NH).

Aza-bicyclo[2.2.1]([diméthylméthylène)dioxy-trans-5,6]-one-3-heptane (\pm)-**12**

A une solution contenant (307 mg; 2,15 mmol) de **8** [15], dans 3 ml d'acéto- anhydre, sont ajoutés (238 mg; 1,5 mmol) de sulfate de cuivre. La solution est portée à reflux pendant 40 h sous atmosphère d'azote. On laisse revenir à 25°C puis la solution est filtrée sur célite. Après évaporation du solvant, le résidu obtenu est repris dans 10 ml d'eau et extrait 3 fois avec 10 ml de chloroforme. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium. Après évaporation du chloroforme 210 mg (55%) de l'acétamide sont obtenus: F: 149°C. Masse: $m/e = 201$ (M+(NH₄), 100), 184 (M⁺, 34), 168 (M-(CH₃), ϵ), 125 (M-(CO(CH₃)₂), ϵ).

RMN H¹ (CDCl₃) δ ppm: 1,3 (s, 3H, CH₃); 1,5 (s, 3H, CH₃); 2,1 (m, 2H, H5-H'5); 2,7 (m, 1H, H1); 3,8 (m, 1H, H4); 4,4 (d, 1H, H2); 4,6 (d, 1H, H3).

Biochimie

Les différents microorganismes utilisés pour les tests biologiques proviennent de l'Institut Pasteur excepté *Haemophilus influenzae* (Hôpital Henri-Mondor).

Le milieu minimum contient par litre: 7 g de K₂HPO₄; 3 g de KH₂PO₄; 0,5 g de sodium citrate-3 H₂O; 0,1 g de MgSO₄·7 H₂O; 1 g de (NH₄)₂SO₄; 2 g de glucose. (pH final: 7).

Les enzymes NAD glycohydrolase [EC 3.2.2.5] et NAD pyrophosphatase [EC 3.6.1.9] sont des produits Sigma; le NAD[C¹⁴] est un produit Amersham (50 μ Ci/ml), AS = 44 mCi/mol). Le NMN[C¹⁴] a été préparé par hydrolyse enzymatique du NAD[C¹⁴] grâce à la phosphodiesterase I [20].

Inhibition de la NAD pyrophosphatase

La NAD pyrophosphatase est essayée pendant 3 min à 37°C dans un mélange réactionnel contenant 10 μ mol de tampon phosphate de potassium, pH 7,5; 320 nmol de NAD⁺ contenant 0,2 μ Ci de NAD[C¹⁴] et 25 μ l de l'enzyme (0,1 U) dans un volume total de 100 μ l.

Les vitesses initiales sont mesurées en suivant l'apparition du NMN[C¹⁴] pendant les 30 premières secondes. Les mesures ont été répétées 3 fois pour 5 concentrations différentes en substrat.

Pour chaque test, une aliquote de 10 μ l du mélange réactionnel est prélevée et mélangée à 10 μ l d'une solution d'acide formique 6 N pour arrêter la réaction, 10 μ l sont alors cochromatographiés sur papier filtre

Whatman N°1 en présence de NAD⁺ et NMN⁺ non radioactifs, dans un système de solvant: acétate d'ammonium 1 M:éthanol absolu (3:7) ajusté à pH 5,5 avec HCl concentré. La tâche correspondant au NMN⁺, révélée à l'UV_{254 nm} est découpée en segments et la radioactivité est mesurée dans 5 ml de liquide de scintillation. Le composé (1R, 2S, 3R, 4R)-**14** testé comme inhibiteur est préincubé avec l'enzyme à 37°C pendant 10 min avant l'addition du substrat. Trois concentrations en inhibiteur ont été utilisées.

La valeur K_i a été évaluée selon la représentation de Dixon K_m^{app}/V_{max} en fonction de [I]. Le type d'inhibition est estimé par 1/Vⁱ en fonction de 1/S en présence de concentrations croissantes en inhibiteur (Fig. 2).

Inhibition de la NAD glycohydrolase

L'activité NADase est déterminée par spectroscopie UV à 325 nm par réaction du NAD⁺ n'ayant pas réagi, avec KCN [21].

Les cinétiques sont suivies pendant 3 min. Les mesures sont répétées 3 fois pour 5 concentrations différentes en substrat. Le mélange réactionnel contenant 10 μ mol de tampon phosphate de potassium, pH 7,5; 10 μ l de l'enzyme (0,03 U) est laissé 3 min à 37°C avant l'addition du NAD⁺.

Pour chaque test, une aliquote de 100 μ l est prélevée du mélange réactionnel et mélangée avec 900 μ l d'une solution KCN 1 M. L'absorbance du mélange à 325 nm est comparée à celle du tube contrôle contenant le NAD⁺ sans l'enzyme. La différence de D.O. entre l'essai et le blanc détermine la quantité de NAD⁺ hydrolysée.

Trois concentrations en inhibiteur (-)-**14** ont été utilisées pour évaluer la constante d'inhibition K_i (Fig. 3).

Références

- 1 Shealy Y.F. & Clayton J.D. (1966) *J. Am. Chem. Soc.* 88, 3885-3887
- 2 Montgomery J.A. (1982) *Med. Res. Rev.* 2, 271-308
- 3 Kusaka T., Yamamoto H., Shibata M., Kishi T. & Mizuno K. (1968) *J. Antibiol. (Tokyo)* 21, 255-263
- 4 Yaginuma S., Muto N., Tsujino M., Sudate Y., Hayashi M. & Ohani M. (1981) *J. Antibiol. (Tokyo)* 34, 359-366
- 5 Glazer I.R. & Knod M.C. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 12964-12969
- 6 Bennett L.L.J., Allan P.W. & Hill D.L. (1968) *Mol. Pharmacol.* 4, 208-217
- 7 Arita M., Adachi K., Ito Y., Sawal H. & Ohno M. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105, 4049-4055
- 8 Arai Y., Hayashi Y., Yamamoto M. & Koizumi T. (1987) *Chem. Lett.* 185-186
- 9 Madhavan G.V.B. & Martin J.C. (1986) *J. Org. Chem.* 51, 1287-1293
- 10 Sicsic S., Durant P., Langrené S. & Le Goffic F. (1986) *Eur. J. Biochem.* 155, 403-407
- 11 Lettré H., Haede W. & Rhubaum E. (1953) *Liebigs Ann. Chem.* 529, 123-132
- 12 Sicsic S., Ikbai M. & Le Goffic F. (1987) *Tetrahedron Lett.* 28, 1887-1888
- 13 VanRheenen V., Kelly R.C. & Cha D.Y. (1976) *Tetrahedron Lett.* 23, 1973-1976
- 14 Kam B.L. & Oppenheimer N.J. (1981) *J. Org. Chem.* 46, 3268-3272
- 15 Vince R. & Daluge S. (1980) *J. Org. Chem.* 45, 531-533
- 16 Daluge S. & Vince R. (1978) *J. Org. Chem.* 43, 2311-2320
- 17 Foster J. & Moat A.G. (1980) *Microbiol. Rev.* 44, 83-105
- 18 Kahn D.W. & Anderson B.M. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 155-161
- 19 Kaback H.R. (1971) *Methods Enzymol.* 99-120
- 20 Kinney D.M., Foster J.W. & Moat A.G. (1979) *J. Bacteriol.* 140, 607-611
- 21 Colowick S.P., Kaplan N.O. & Ciotti M.M. (1951) *J. Biol. Chem.* 191, 473-483