



UNIVERSITÉ DE NANTES  
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE • 3MPL

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Mesure des effets isotopiques cinétiques  
lors de la dégradation d'alcaloïdes tropaniques  
par les souches de bactéries  
*Pseudomonas* AT3 et MS2

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline :

Spécialité : Chimie analytique

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Katarzyna KOSIERADZKA**

*Le 12 octobre 2010, devant le jury ci-dessous :*

Rapporteurs	M. Marcel DELAFORGE, Directeur de Recherche au CNRS • Institut de Biologie et de Technologies de Saclay
	M. François MESNARD, Professeur • Université de Picardie Jules Verne
Examineurs	M. Michel THÉRISOD, Professeur • Université de Paris Sud 11
	M. Jacques LEBRETON, Professeur • Université de Nantes
Directeur de thèse	M. Richard ROBINS, Directeur de Recherche au CNRS • Université de Nantes
Co-Encadrant de thèse	M. Emmanuel GENTIL, Maître de Conférences • Université de Nantes

*Mojemu Kochanemu Piotrkowi*

## Remerciements

Cette thèse a été réalisée au laboratoire CEISAM (Chimie et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation) au sein de l'équipe EBSI (Elucidation de Biosynthèse et Spectrométries Isotopiques). Je tiens à remercier son directeur, M. Bruno BUJOLI, de m'y avoir accueilli.

Premièrement, je remercie M. Richard ROBINS, qui a accepté ma candidature et qui a dirigé mon travail, pour son soutien et pour tout l'aide pendant mon séjour à Nantes.

Je remercie également M. Emmanuel GENTIL, qui a accepté de co-encadrer cette thèse, pour sa disponibilité, son grand engagement, son aide précieuse et pour sa bonne humeur.

Je remercie M. Marcel DELAFORGE et M. François MESNARD de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs, ainsi que M. Jacques LEBRETON et M. Michel THÉRISOD pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Je remercie M. Jacques LEBRETON et Mlle. Anaïs FOURNIAL de m'avoir fourni les composés deutérés, ainsi que pour leurs avis scientifiques.

Je remercie Mme. Illa TEA qui m'a appris la technique d'irm-MS, pour sa bonne humeur et pour son soutien pendant la thèse.

Je remercie également Isabelle LOUVET, Nadia GUIGNARD et Ingrid ANTHEAUME pour leur aide avec les analyses irm-MS.

Je remercie M. Gilbert NOURRISSON et Mme. Julie HEMEZ pour les analyses en GC-MS.

Merci à Virginie SILVESTRE pour les analyses en RMN et la bonne atmosphère qu'elle a apportée au laboratoire.

Merci à Denis LOQUET pour l'aide avec le service GC et pour la bonne ambiance qu'il a amenée au laboratoire.

Un énorme merci à Alexis GILBERT pour être ma petite famille française. Je te remercie de m'avoir aidé à apprendre le français, pour m'avoir fait découvrir la culture française, pour les soirées et les vacances passées ensemble. Merci Alexis !!!!

Je remercie également Renata KWIEIĆ et Benoît CHARRIER pour m'avoir aidée et soutenue pendant ma thèse. Merci à Renata pour les petits potins polonais :)

Je remercie Alexis, Patrick, Estelle, Nadia pour les corrections de français.

Des remerciements chaleureux sont adressés à tous qui m'ont aidée et soutenue pendant ma thèse : Julie, Nadia, Ingrid, Estelle, Pauline, Patrick, Eliot, Vincent et aussi à tous ceux que j'oublie...

Je remercie mes amis nantais : Julie, Emilie, Francis, Jim, Cat, Arek, Kamil, Kalid, Ali pour leur soutien et pour tous les moments agréables passés ensemble.

Je remercie mes parents pour leur soutien, leur aide et pour m'avoir permis d'étudier à l'étranger. Dziękuję BARDZO !!!

Un grand merci à ma petite sœur et ma meilleure amie Dominika (Moniczka) pour son soutien et pour toutes les vacances passées ensemble à Nantes.

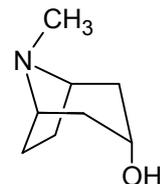
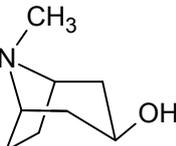
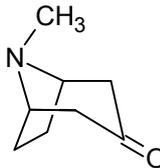
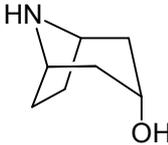
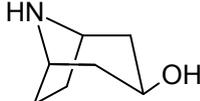
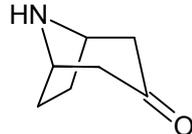
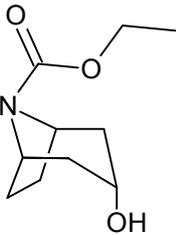
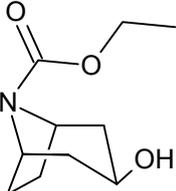
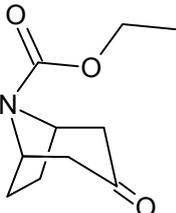
A la fin je tiens à remercier spécialement mon compagnon Piotrek qui a accepté mes ambitions et mon départ en France. Merci beaucoup pour ton soutien, pour tous les moments passés ensemble et car je peux toujours compter sur toi. Sans toi tout ça n'aurait pas été possible !!! Kocham Cię !!!

## Abréviations – Notations utilisées

<b>4NMP</b>	<i>N</i> -Méthyl-4-piperidinol
<b>A</b>	Abondance isotopique
<b>Ac</b>	Groupement acétyle
<b>anh.</b>	Anhydre
<b>BHT</b>	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-méthylphénol
<b>But</b>	Groupement butyryle
<b>Bnz</b>	Groupement benzoyle
<b>C8</b>	Chaîne carbonée de 8 atomes de carbone
<b>C18</b>	Chaîne carbonée de 18 atomes de carbone
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>CoA</b>	Coenzyme A
<b>CYP450</b>	Cytochrome P450
$\delta$	Déviation isotopique (exprimée en ‰)
$\delta$	Déplacement chimique en RNM
$\delta^{15}\text{N}$	Déviation isotopique de l'azote-15 (exprimée en ‰)
$\delta_g$	Déviation isotopique globale d'une molécule (exprimée en ‰)
$\delta_i$	Déviation isotopique pour le site <i>i</i> (exprimée en ‰)
<b>D</b>	Deutérium
<b>DO<sub>550</sub></b>	Dispersion optique à $\lambda=550$ nm
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EA-irm-MS</b>	Spectromètre de masse de rapport isotopique couplé avec analyseur élémentaire
<b>EC</b>	Groupement éthylcarbamate
<b>EIC</b>	Effet isotopique cinétique
<b>EIE</b>	Effet isotopique d'équilibre
<b>ELL</b>	Extraction par partition liquide-liquide
<b>EPS</b>	Extraction en phase solide
<b>F</b>	Facteur d'avancement d'une réaction
<b>FID</b>	Détecteur à Ionisation de Flamme
<b>GC</b>	Chromatographie en phase gazeuse
<b>GC-irm-MS</b>	Spectrométrie de masse de rapport isotopique couplé avec chromatographie en phase gazeuse
<b>GC-MS</b>	Chromatographie en phase gazeuse couplée avec spectrométrie de masse
<b>GC-MS (EI)</b>	Chromatographie en phase gazeuse couplée avec spectrométrie de masse, avec ionisation par Impact Electronique
<b>H6H</b>	Hyoscyamine 6- $\beta$ -hydroxylase

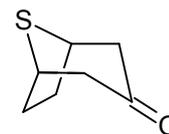
<b>HP-5</b>	Colonne capillaire GC (5% diphenyl et 95% dimethyl polysiloxane)
<b>IAEA</b>	Agence Internationale de l'Energie Atomique
<b>irm-MS</b>	Spectromètre de masse de rapport isotopique
<b>k<sub>I</sub></b>	Constante de vitesse d'un isotopomère léger
<b>k<sub>L</sub></b>	Constante de vitesse d'un isotopomère lourd
<b>K<sub>I</sub></b>	Constante d'équilibre d'un isotopomère léger
<b>K<sub>L</sub></b>	Constante d'équilibre d'un isotopomère lourd
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis
<b>MP</b>	Milieu de croissance pauvre
<b>MP-Mg/2</b>	Milieu de croissance pauvre avec quantité de magnésium réduite par deux
<b>MS</b>	Spectrométrie de masse
<b>m/z</b>	Rapport masse sur charge
<b>NPSTRI</b>	Norpseudotropine
<b>NTRI</b>	Nortropine
<b>NTRO</b>	Nortropinone
<b>P</b>	Porphyrine
<b>PTA-5</b>	Colonne capillaire GC désactivée (5% diphenyl et 95% dimethyl polysiloxane)
<b>R</b>	Rapport isotopique
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>TAH</b>	Transfert d'un atome d'hydrogène
<b>TCD</b>	Détecteur à conductivité thermique
<b>TDLAS</b>	Spectroscopie d'absorption à diode laser infrarouge
<b>TR I</b>	Enzyme tropinone réductase I (EC 1.1.1.206)
<b>TR II</b>	Enzyme tropinone réductase II (EC 1.1.1.236)
<b>TSE</b>	Transfert d'un seul électron
<b>V<sub>max</sub></b>	Vitesse maximale d'une réaction enzymatique
<b>ZB-WAX</b>	Colonne capillaire GC désactivée (polyéthylène glycol (PEG))
<b>ZPVE</b>	Energie vibrationnelle de point zéro

## Abréviations – Produits utilisés au cours de la thèse

<b>TRI</b>	8-Méthyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3- <i>endo</i> -ol (3 $\alpha$ -Tropanol) (Tropine)	
<b>PS TRI</b>	8-Méthyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3- <i>exo</i> -ol (3 $\beta$ -Tropanol) (Pseudotropine)	
<b>TRO</b>	8-Méthyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (Tropinone)	
<b>N TRI</b>	8-Azabicyclo[3.2.1]octan-3- <i>endo</i> -ol (Nortropine)	
<b>NP TRI</b>	8-Azabicyclo[3.2.1]octan-3- <i>exo</i> -ol (Norpseudotropine)	
<b>NTRO</b>	8-Azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (Nortropinone)	
<b>N TRI-EC</b>	Ethyle 3- $\alpha$ -hydroxy-8-azabicyclo[3.2.1]octane-8-carboxylate (Nortropine éthylcarbamate)	
<b>NP TRI-EC</b>	Ethyle 3- $\beta$ -hydroxy-8-azabicyclo[3.2.1]octane-8-carboxylate (Norpseudotropine éthylcarbamate)	
<b>NTRO-EC</b>	Ethyle 3-oxo-8-azabicyclo[3.2.1]octane-8-carboxylate (Nortropinone éthylcarbamate)	

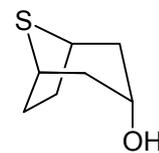
**TBON**

8-Thiabicyclo[3.2.1]octan-1-one



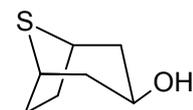
**$\alpha$ -TBOL**

8-Thiabicyclo[3.2.1]octan-1-*endo*-ol



**$\beta$ -TBOL**

8-Thiabicyclo[3.2.1]octan-1-*exo*-ol



# Sommaire :

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : CONTEXTE ET ETAT DE L'ART .....</b>	<b>3</b>
1.1 LES ALCALOÏDES TROPANIQUES .....	3
1.1.1 Usage pharmaceutique de l'atropine et de la scopolamine.....	4
1.1.2 Biosynthèse.....	5
1.1.2.1 La réduction de la tropinone : une étape clé du métabolisme .....	8
1.1.3 Catabolisme.....	10
1.1.3.1 Chez les plantes .....	10
1.1.3.2 Chez les mammifères.....	10
1.1.3.3 Chez les bactéries .....	12
1.2 METABOLISME SPECIFIQUE DES ALCALOÏDES TROPANIQUES PAR <i>PSEUDOMONAS</i> .....	13
1.2.1 Habitat.....	13
1.2.2 Métabolisme des alcaloïdes tropaniques.....	13
1.3 ISOTOPES ET EFFETS ISOTOPIQUES .....	18
1.3.1 Généralités sur les isotopes.....	18
1.3.2 Effet isotopique d'équilibre et cinétique.....	20
1.3.3 Nature des effets isotopiques cinétiques et interprétation .....	21
1.3.3.1 Effet isotopique cinétique primaire : EIC (I) .....	22
1.3.3.2 Effet isotopique cinétique secondaire : EIC (II) .....	23
1.3.4 Effet isotopique cinétique primaire pour les enzymes .....	24
1.3.4.1 Effet de la substitution isotopique sur la cinétique d'une réaction enzymatique.....	24
1.3.4.2 Mesure des effets isotopiques cinétiques enzymatiques .....	27
1.3.5 Modélisation moléculaire et détermination des effets isotopiques .....	28
1.4 LES ISOTOPES ET LES METHODES DE MESURE DE LA TENEUR ISOTOPIQUE .....	29
1.4.1 Notions et unités .....	29
1.4.2 Méthodes d'analyse isotopique.....	29
1.4.2.1 Mesure de Rapport Isotopique par Spectrométrie de Masse (irm-MS) : principes .....	30
1.4.2.2 Interfaçage avec un analyseur élémentaire (EA-irm-MS).....	31
1.4.2.3 Interfaçage avec un chromatographe en phase gazeuse (GC-irm-MS) .....	32
1.4.2.4 EA-irm-MS versus GC-irm-MS .....	32
1.4.3 Précision, justesse et sources d'erreurs .....	33
1.5 OBJECTIFS DU TRAVAIL .....	34
<b>CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE MESURE DES EFFETS ISOTOPIQUES CINETIQUES .....</b>	<b>37</b>
2.1 INTRODUCTION.....	37
2.2 DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'EXTRACTION DIRECTE DES ALCALOÏDES A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE .....	38
2.2.1 Extraction liquide/liquide (ELL).....	38

2.2.2	<i>Extraction en phase solide (EPS)</i> .....	39
2.3	DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'EXTRACTION APRES DERIVATION DES ALCALOÏDES A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE .....	41
2.3.1	<i>Dérivation sous forme de carbamate</i> .....	41
2.3.2	<i>Dérivation sous forme de carbamate suivie d'une acylation</i> .....	42
2.3.3	<i>Dérivation par acétylation directe</i> .....	43
2.3.4	<i>Choix de la méthode</i> .....	43
2.3.5	<i>Optimisation du rendement de dérivation en carbamate</i> .....	43
2.4	VALIDATION DU PROTOCOLE D'ANALYSE QUANTITATIVE PAR GC-FID.....	44
2.4.1	<i>Choix de l'étalon interne</i> .....	44
2.4.2	<i>Vérification de la linéarité</i> .....	45
2.4.3	<i>Validation de la méthode de quantification dans les milieux de croissance bactériens</i> .....	46
2.4.3.1	Validation dans la gamme de concentrations biologiques .....	46
2.4.3.2	Vérification des interactions entre composés.....	46
2.4.3.3	Vérification des effets de matrice .....	47
2.5	VALIDATION DE LA METHODE POUR LA MESURE DE DEVIATION ISOTOPIQUE EN $\delta^{15}\text{N}$ (‰) PAR GC-IRM-MS .....	52
2.5.1	<i>Transfert de la méthode chromatographique du GC-FID vers le GC-irm-MS</i> .....	52
2.5.2	<i>Choix de l'étalon azoté</i> .....	53
2.5.3	<i>Domaine de linéarité : déviation isotopique / amplitude du signal</i> .....	53
2.5.4	<i>Validation de la prise d'essai</i> .....	54
2.5.5	<i>Validation de la méthode dérivation/extraction : étude du fractionnement</i> .....	57
2.5.5.1	Validation dans la gamme de concentrations biologiques .....	57
2.5.5.2	Vérification des interactions entre composés.....	57
2.5.5.3	Vérification des effets de matrice .....	58
2.5.5.4	Validation de la mesure de déviation isotopique sur la gamme d'abondance naturelle.....	58
2.6	CONCLUSION .....	59
 <b>CHAPITRE 3 : METABOLISME DE LA NORTROPINE ET DE LA NORPSEUDOTROPINE PAR LES BACTERIES PSEUDOMONAS AT3.....</b>		<b>60</b>
3.1	CONDITIONS DE CROISSANCE : LES MILIEUX DE CULTURE .....	60
3.2	CROISSANCE BACTERIENNE ET PROFILS METABOLIQUES .....	61
3.2.1	<i>Métabolisme de la nortropine par Pseudomonas AT3</i> .....	61
3.2.2	<i>Métabolisme de la norpseudotropine par Pseudomonas AT3</i> .....	63
3.2.3	<i>Métabolisme de la nortropinone par Pseudomonas AT3</i> .....	65
3.2.4	<i>Métabolisme du mélange nortropine + norpseudotropine par Pseudomonas AT3</i> .....	66
3.3	ETUDE METABOLIQUE DES VOIES DE DEGRADATION DE LA NORTROPINE ET DE LA NORPSEUDOTROPINE ....	69
3.3.1	<i>Inhibition de la tropinone réductase (TR I)</i> .....	69
3.3.2	<i>Etude in vitro de l'activité enzymatique des tropinone réductases</i> .....	76
3.3.3	<i>Etude des échanges nortropine <math>\rightleftharpoons</math> norpseudotropine en utilisant des substrats marqués</i> .....	79
3.3.3.1	Substrat marqué en position 3 [ $3\text{-}^2\text{H}$ ] .....	79
3.3.3.2	Mélange de substrats avec des teneurs isotopiques en $^{15}\text{N}$ significativement différentes .....	82

3.3.3.3 Proposition de modèle pour l'interprétation des résultats de culture en présence de co-substrats nortropine + norpseudotropine.....	86
3.4 CONCLUSIONS .....	92
<b>CHAPITRE 4 : ANALYSE DES EFFETS ISOTOPIQUES CINETIQUES LIES A L'OUVERTURE DU CYCLE DE LA NORTROPINE.....</b>	<b>96</b>
4.1 INTRODUCTION.....	96
4.2 EXPLOITATION DES EFFETS ISOTOPIQUES EN <sup>15</sup> N POUR IDENTIFIER LE MECANISME CATALYTIQUE.....	96
4.2.1 Effets isotopiques primaires en <sup>15</sup> N lors de la rupture de liaison C–N.....	96
4.2.2 Effets isotopiques secondaires en <sup>15</sup> N lors de la rupture de liaison C–N.....	101
4.2.3 Effets isotopiques primaires et secondaires en <sup>15</sup> N au cours de la création de la liaison C–N.....	103
4.2.4 Etudes précédentes des effets isotopiques en <sup>15</sup> N au cours de la dégradation des alcaloïdes.....	104
4.3 ANALYSE DES EFFETS ISOTOPIQUES CINETIQUES AU COURS DE LA REACTION D'OUVERTURE DU CYCLE DE LA NORTROPINE ET DE LA NORPSEUDOTROPINE.....	105
4.3.1 Mesure des déviations isotopiques δ <sup>15</sup> N (‰) au cours du métabolisme des alcaloïdes tropaniques	106
4.3.2 Calcul des effets isotopiques en azote-15 au cours de la dégradation des alcaloïdes nortropaniques .....	110
4.3.2.1 EIC- <sup>15</sup> N pendant la dégradation de la norpseudotropine.....	111
4.3.2.2 EIC- <sup>15</sup> N pendant la dégradation de la nortropine.....	111
4.3.2.3 Premières conclusions sur les EIC- <sup>15</sup> N pendant la dégradation de la nor(pseudo)tropine .....	112
4.3.3 Mesure des effets isotopiques en deutérium au cours de la dégradation de la [1- <sup>2</sup> H]nor(pseudo)tropine et de la [1,5- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]nor(pseudo)tropine.....	113
4.4 PROPOSITION D'UN MECANISME POUR LA REACTION DE L'OUVERTURE DU CYCLE.....	115
4.4.1 Choix du modèle de base .....	115
4.4.2 Modèle de l'oxydation en 5' de la nicotine.....	116
4.4.3 Proposition d'un modèle pour la coupure oxydative de la nor(pseudo)tropine.....	117
4.4.3.1 Effets isotopiques théoriques et expérimentaux en rapport avec le modèle proposé .....	120
4.4.3.2 Les effets isotopiques résultent-ils de l'ablation de l'hydrogène en position 1?.....	121
4.4.3.3 Les effets isotopiques résultent-ils de la protonation de l'atome d'azote ?.....	121
<b>CHAPITRE 5 : MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>124</b>
5.1 METHODES D'EXTRACTION DIRECTE .....	124
5.1.1 Extraction en phase solide.....	124
5.1.2 Extraction liquide-liquide des alcaloïdes .....	124
5.1.3 Extraction liquide-liquide de la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione .....	125
5.2 METHODES D'EXTRACTION APRES DERIVATION DES ALCALOÏDES.....	125
5.2.1 Dérivation des alcaloïdes nortropaniques par le chloroformiate d'éthyle dans l'eau en présence de pyridine.....	125
5.2.2 Acylation du groupement hydroxyle des dérivés carbamates.....	126
5.2.2.1 Dérivation par l'anhydride acétique.....	127
5.2.2.2 Dérivation par l'anhydride benzoïque.....	128
5.2.2.3 Dérivation par l'anhydride butyrique.....	128

5.2.3	<i>Dérivation des alcaloïdes nortropaniques par l'anhydride acétique</i>	129
5.2.4	<i>Dérivation des alcaloïdes nortropaniques par le chloroformiate d'éthyle en système bi-phasique</i>	130
5.2.5	<i>Dérivation des alcaloïdes nortropaniques par le chloroformiate d'éthyle en système bi-phasique (validation de la méthode)</i>	132
5.2.6	<i>Extraction des alcaloïdes tropaniques du milieu bactérien par dérivation directe dans le milieu bactérien</i>	133
5.2.7	<i>Préparation de la nortropine et de la norpseudotropine avec valeurs de <math>\delta^{15}N</math> (‰) écartées</i>	133
5.2.7.2.	<i>Validation de la mesure de déviation isotopique dans la gamme d'abondance naturelle</i>	134
5.3	<b>METHODES DE QUANTIFICATION PAR GC-FID</b>	134
5.3.1	<i>Quantification des composés après l'EPS</i>	135
5.3.2	<i>Quantification des composés dérivés par le chloroformiate d'éthyle</i>	136
5.3.3	<i>Quantification de la TBON et du TBOL</i>	137
5.4	<b>ANALYSE PAR GC-FID</b>	138
5.4.1	<i>Analyse de la tropinone, de la tropine et de la pseudotropine</i>	138
5.4.2	<i>Analyse de la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione</i>	139
5.4.3	<i>Analyse des alcaloïdes dérivés</i>	140
5.5	<b>METHODES POUR LA CULTURE DE CELLULES BACTERIENNES</b>	141
5.5.1	<i>Préparation de milieu de culture</i>	141
5.5.2	<i>Préparation de la solution de substrat ou d'inhibiteur pour les bactéries</i>	142
5.5.3	<i>Préparation des cultures bactériennes</i>	142
5.5.4	<i>Culture de Pseudomonas MS2</i>	144
5.5.5	<i>Préparation du stock des bactéries (-80°C)</i>	144
5.5.6	<i>Sélection des bactéries Pseudomonas</i>	144
5.5.7	<i>Culture Pseudomonas AT3 sur le mélange nortropine + norpseudotropine</i>	145
5.5.8	<i>Cultures de Pseudomonas AT3 sur des alcaloïdes en présence d'inhibiteur (TBON, <math>\beta</math>-TBOL)</i>	145
5.5.9	<i>Etude des échanges entre nortropine et norpseudotropine en utilisant des substrats marqués</i>	147
5.5.10	<i>Culture sur le mélange de substrats avec des teneurs isotopiques en <math>^{15}N</math> significativement différentes</i>	147
5.6	<b>METHODE DE MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES</b>	148
5.6.1	<i>Préparation des extraits cellulaires</i>	148
5.6.2	<i>Mesure de l'activité enzymatique des enzymes TR I et TR II</i>	148
5.6.2.1	<i>Protocole de mesure de l'activité envers les cétones</i>	149
5.6.2.2	<i>Protocole de mesure de l'activité envers les alcools</i>	149
5.6.3	<i>Mesures de la concentration des protéines</i>	149
5.6.4	<i>Incubation des cétones avec les extraits cellulaires</i>	149
5.7	<b>METHODE DE MESURE DES DEVIATIONS ISOTOPIQUES</b>	150
5.7.1	<i>Méthode de mesure des déviations isotopiques par CG-irm-MS</i>	150
5.7.2	<i>Méthode de mesure des déviations isotopiques par AE-irm-MS</i>	153
5.8	<b>METHODE DE MESURE DES EFFETS ISOTOPIQUES</b>	154
5.8.1	<i>Mesure de <math>\delta^{15}N</math> (‰) au cours du métabolisme des alcaloïdes tropaniques</i>	154

5.8.2 Calcul des effets isotopiques cinétiques en azote-15 au cours de la dégradation des alcaloïdes nortropaniques .....	154
5.8.3 Mesures des effets isotopiques en deutérium au cours de la dégradation des alcaloïdes nortropaniques .....	155
5.9. METHODE DE SYNTHÈSE DES COMPOSÉS NON-MARQUÉS .....	155
5.9.1 Synthèse de la norpseudotropine .....	155
5.9.2 Synthèse de la pseudotropine .....	156
5.9.3 Synthèse de la TBON .....	157
5.9.4. Réduction du TBON, synthèse de $\alpha$ -TBOL et $\beta$ -TBOL .....	158
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>160</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES : .....</b>	<b>168</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>175</b>
ANNEXE 1 : SYNTHÈSE DES COMPOSÉS MARQUÉS .....	175
A.1.1 Synthèse de la [3- <sup>2</sup> H]nortropine hydrochloride et la [3- <sup>2</sup> H]norpseudotropine hydrochloride .....	175
A.1.2 Synthèse de la [3- <sup>2</sup> H]tropine et la [3- <sup>2</sup> H]pseudotropine .....	178
A.1.3 Synthèse de la [1- <sup>2</sup> H]nor(pseudo)tropine hydrochloride et de la [1,5- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]nor(pseudo)tropine hydrochloride .....	179
ANNEXE 2 : CALCULS POUR MODÈLE DE MÉTABOLISMES DU MÉLANGE DES SUBSTRATS (NORTROPINE + NORPSEUDOTROPINE) .....	185
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>190</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>193</b>
<b>LISTE DE TRAVAUX RÉALISÉS PENDANT LA THÈSE .....</b>	<b>195</b>

# Introduction générale

La nortropine est un métabolite provenant de la dégradation de l'atropine qui est un alcaloïde tropanique bien connu pour son influence complexe sur le système humain. Il est donc important de comprendre à la fois les interactions de la nortropine dans le corps humain ainsi que les voies métaboliques de la dégradation de l'atropine et d'autres alcaloïdes de la famille des tropanes. De façon générale, la connaissance des étapes de dégradation des agents thérapeutiques est très importante pour comprendre leur toxicité, pour découvrir des structures d'inhibiteurs d'enzymes responsables de leur dégradation, et pour proposer des structures de nouveaux médicaments potentiels.

Le rôle important des enzymes de type cytochrome P450 monooxygénase est bien connu dans la dégradation de produits bioactifs. Les *Pseudomonas* constituent un genre de bactérie très réputé pour sa capacité à s'adapter à la dégradation d'un grand nombre de composés grâce à son système inductible de cytochrome P450 monooxygénase. La souche *Pseudomonas* AT3 a été isolée, par sélection, pour sa capacité à métaboliser des alcaloïdes tropaniques. Elle a donc été choisie comme modèle d'étude du métabolisme de la tropine et de la nortropine afin d'élucider les mécanismes des premières réactions de dégradation. La *N*-déméthylation de la tropine par les *Pseudomonas* AT3, étape donnant la nortropine comme produit, était le sujet d'étude d'une thèse antérieure effectuée dans le laboratoire [1]. Ce travail est la continuité de ces travaux et porte sur le catabolisme de la nortropine.

L'objectif des travaux développés dans ce travail de thèse est l'élucidation du mécanisme d'une réaction de rupture de liaison C–N lors de la dégradation de la nortropine et de la norpseudotropine par les bactéries *Pseudomonas* AT3. Ces bactéries pourront se servir d'alcaloïde tropanique comme seul substrat de croissance. L'approche adoptée est de suivre le fractionnement isotopique de ces composés au cours de leur dégradation *in vivo*, afin de mesurer les effets isotopiques cinétiques (EICs) de la réaction. Grâce aux EICs, il est possible de proposer un mécanisme réactionnel, dont la validité pourra être testée par comparaison avec les valeurs des EICs obtenus par calcul théorique.

La détermination des EICs dans les systèmes biologiques est une démarche très complexe et difficile. La mesure des déviations isotopiques au niveau de l'abondance naturelle, se confronte à la limite de précision des méthodes disponibles. De plus, le contrôle précis du métabolisme du système étudié, la récupération des composés cibles, leur quantification, et la mesure du fractionnement isotopique, exigent une grande rigueur de travail.

Cette étude nécessite :

- [Des connaissances préalables variées \(Chapitre 1\)](#)

Afin d'atteindre les objectifs de cette thèse, qui touche à de nombreux domaines, une large gamme de connaissances est requise concernant : les alcaloïdes tropaniques (usage pharmaceutique, biosynthèse et catabolisme, propriétés physico-chimiques); le métabolisme bactérien de l'atropine; les principes concernant les effets isotopiques cinétiques et les techniques de mesure des déviations isotopiques en abondance naturelle.

- [Une méthodologie adaptée \(Chapitre 2\)](#)

La clé du succès pour mener à bien ces études est une méthodologie bien adaptée aux exigences des mesures à effectuer. Ainsi, l'optimisation d'une méthode d'extraction quantitative du milieu bactérien et un protocole de quantification des métabolites de la nortropine par GC-FID doivent être rigoureusement validés. De plus, ce protocole d'extraction ne doit pas ajouter de fractionnement isotopique et doit pouvoir être adapté à une large gamme de concentrations, car il est souhaitable que la réaction soit suffisamment avancée pour calculer les EICs. De plus, les mesures de déviations isotopiques  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) en abondance naturelle ( $A\%^{15}\text{N}=0.366$ ) seront réalisées par spectrométrie de masse de rapport isotopique (irm-MS) couplée avec le GC, technique dont la mise au point demande rigueur et précision.

- [Un métabolisme bactérien correctement défini et maîtrisé \(Chapitre 3\)](#)

Les études précédemment menées au laboratoire sur le métabolisme de la nortropine ont montré l'accumulation de norpseudotropine (épimère de la nortropine) dans le milieu bactérien [2, 3]. Afin de définir l'impact de la voie de formation de la norpseudotropine sur le métabolisme de la nortropine, plusieurs approches sont utilisées (inhibiteurs des enzymes, composés marqués...). Il faut, en effet, que les voies métaboliques soient correctement définies pour pouvoir commencer les études mécanistiques.

- [La mesure des déviations isotopiques, le calcul des effets isotopiques et la proposition du mécanisme réactionnel \(Chapitre 4\)](#)

Une fois les déviations isotopiques  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) mesurées par GC-irm-MS, il est possible de calculer les EICs. Les valeurs des EICs étant faibles et proches pour les deux composés, il a été possible d'avancer l'hypothèse que la rupture de la liaison C–N de la nortropine et de la norpseudotropine implique la même enzyme de type cytochrome P450 monooxygénase et que la rupture n'est pas l'étape limitante de la voie réactionnelle.

# Chapitre 1 : Contexte et état de l'art

## 1.1 Les alcaloïdes tropaniques

Les alcaloïdes tropaniques sont des métabolites secondaires biosynthétisés chez les plantes de la famille des Solanaceae (genres *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Scopolia*, *Duboisia*). On les rencontre aussi chez les familles Erythroxylaceae (*Erythroxylum coca*), Convolvulaceae, Proteaceae et Rhizophoraceae [4]. Parmi les tropanes, les substances les plus connues sont la (S)-(-)-hyoscyamine, l'atropine (correspondant au mélange racémique de (S)-(-)- et (R)-(+)-hyoscyamine), la scopolamine et la cocaïne (Figure 1). La vraie connaissance scientifique des alcaloïdes tropaniques a commencé au XIXème siècle lorsque la plante *Atropa belladonna* a été analysée du point de vue phytochimique par Vauquelin [5]. Ces travaux ont permis, en 1809, d'isoler pour la première fois un alcaloïde tropanique, l'atropine (Figure 1). Ultérieurement l'atropine a été identifiée chez *Datura stramonium* et en 1833 Geiger a isolé l'hyoscyamine (Figure 1) à partir de la graine d'*Hyoscyamus niger*. A l'heure actuelle, plus de 200 structures d'alcaloïdes tropaniques ont été identifiées [4].

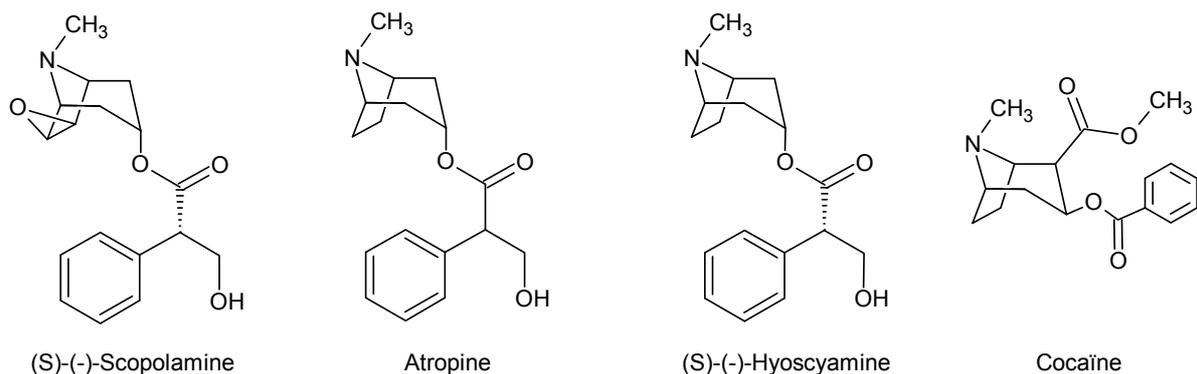


Figure 1. Les principaux alcaloïdes tropaniques exploités par l'homme

Les alcaloïdes tropaniques sont caractérisés par la présence d'une structure tropanique bicyclique N-méthyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane (Figure 2).

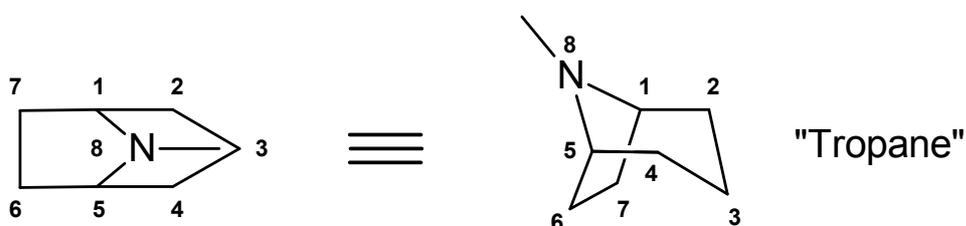


Figure 2. Structure cyclique des alcaloïdes tropaniques

Dans la civilisation humaine, l'utilisation des alcaloïdes a débuté il y a plus de 4000 ans. Ils étaient utilisés comme médicaments ou poisons dans les flèches pour la chasse ou la guerre. Certains de ces poisons sont encore utilisés en Afrique et en Amérique du Sud [6]. Quelques plantes, comme le *Datura* et le *Brugmansia*, étaient également exploitées par les chamans pour leurs effets hallucinogènes induits par les feuilles [5]. Aujourd'hui les alcaloïdes et leurs formes semi-synthétiques sont largement utilisés en pharmacothérapie.

### 1.1.1 Usage pharmaceutique de l'atropine et de la scopolamine

L'utilisation pharmaceutique d'alcaloïdes tropaniques remonte à 1860. Ils diminuent ou inhibent les sécrétions au niveau du système digestif, dans les poumons et les glandes salivaires et sudoripares. La contraction de la vessie [7], la mobilité gastrique et intestinale sont aussi diminuées. Ces composés ont une large influence sur le rythme cardiaque qui peut être perturbé. Ainsi, une faible dose peut causer la diminution du rythme cardiaque alors qu'une dose plus élevée provoque, à l'inverse, la tachycardie. Ils sont aussi des dilatateurs des bronches et de la pupille, ainsi l'atropine est utilisée régulièrement en ophtalmologie. De plus ces médicaments causent le relâchement de la tension des muscles du pharynx. L'atropine et la scopolamine peuvent pénétrer facilement la barrière entre le sang et le liquide cérébro-spinal et leurs effets secondaires sont : excitation, hallucinations, énervement et amnésie induite par le blocage des récepteurs muscariniques du système nerveux central (SNC). La scopolamine cause une perte de la mémoire dont la durée est dépendante de la dose.

Ces alcaloïdes sont des médicaments anticholinergiques : ils agissent en compétition antagoniste dans les récepteurs muscariniques. L'interaction avec les récepteurs est fortement spécifique. Les récepteurs muscariniques régulent beaucoup d'activités physiologiques et biochimiques dans le système nerveux central et autonome. La régulation de ces activités est effectuée par l'activation des protéines G. Les protéines G sont responsables de la modulation du système de transmission intracellulaire et de la stimulation des flux d'ions ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{K}^+$ ) via les membranes cellulaires. La génération du signal de transduction dans les récepteurs muscariniques est constituée de trois étapes : la reconnaissance de l'antagoniste, l'activation des récepteurs couplés avec les protéines G, la stimulation ou l'inhibition du mécanisme intracellulaire. L'atropine et la scopolamine sont des antagonistes compétitifs, non spécifiques de l'acétylcholine [8]. Les agents anticholinergiques se composent de deux groupes de composés : les parasymphatholytiques naturels (atropine, scopolamine) et les semi-synthétiques. La présence dans la structure des agents semi-synthétiques d'un groupement amine

quaternaire permet de minimiser leurs effets sur le SNC car la structure polaire diminue la solubilité dans les lipides. Le transport dans le sang via le compartiment cérébro-spinal est donc perturbé et les effets secondaires sur le SNC sont diminués.

Les agents anticholinergiques sont utilisés en prémédication avant anesthésie pour diminuer les sécrétions, notamment pour les interventions sur les voies respiratoires, mais aussi avant les opérations en pédiatrie ou pour le traitement des bradyarythmies. La scopolamine peut être utilisée comme anti-nauséeux après une intervention chirurgicale [9] et, sous forme de comprimé ou de patchs transdermiques (« Scopoderm ») disponibles commercialement, pour prévenir la cinétose (mal du transport). L'atropine est utilisée comme facteur de régulation de l'acétylcholine dans les cas d'empoisonnement par des insecticides phosphorés ou par certains gaz de combat. Plus récemment, une activité potentielle pour le traitement de la maladie d'Alzheimer a été mise en évidence pour l'atropine [10].

### 1.1.2 Biosynthèse

Dans la nature, on observe la biosynthèse d'alcaloïdes tropaniques dans de nombreuses plantes appartenant principalement aux familles Solanaceae, Erythroxylaceae, Convolvulaceae, Proteaceae et Rhizophoraceae. Cette biosynthèse est effectuée très majoritairement, voire exclusivement, dans les racines. Le stockage, par contre, peut se faire au niveau des racines mais aussi des feuilles, des semences, et même des tubercules comme pour la pomme de terre.

Notre étude métabolique étant limitée à deux étapes très spécifiques du métabolisme des certains alcaloïdes : la réduction de la (nor)tropinone en (nor)tropine ou (nor)pseudotropine et la dégradation de la (nor)tropine et (nor)pseudotropine, nous ne décrivons que succinctement des autres aspects de la voie de biosynthèse.

De façon générale, les alcaloïdes tropaniques sont biosynthétisés à partir de deux acides aminés, l'arginine **(1)** (Figure 3) et la phénylalanine **(14)** (Figure 4). L'intermédiaire principal de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques, la tropinone **(7)** (Figure 4), est produit à partir de la putrescine qui, suite à une *N*-méthylation, donne naissance à l'ion *N*-méthyl- $\Delta'$ -pyrrolinium **(5)** (Figure 3). Après condensation de ce composé avec une molécule d'acétoacétyl-CoA **(6)** on forme, en plusieurs étapes, la tropinone **(7)**. Cet alcaloïde est ensuite réduit stéréospécifiquement soit par la tropinone réductase I (TR I) pour donner la tropine (tropan-3 $\alpha$ -ol) **(8)** soit par la tropinone réductase II (TR II) pour former la pseudotropine (tropan-3 $\beta$ -ol) **(9)**.

Ces deux composés peuvent ensuite être impliqués dans diverses réactions d'estérifications [4], la réaction majeure étant l'estérification du (*R*)-3-phényllactoyl-CoA pour former la littorine (**10**). Dans la suite de la biosynthèse, le réarrangement du groupe phényllactoyl conduit à la *S*-(-)-hyoscyamine (**11**), elle-même substrat de la hyoscyamine 6- $\beta$ -hydroxylase (H6H), responsable de la formation de la *S*-(-)-scopolamine (hyoscine) (**12**).

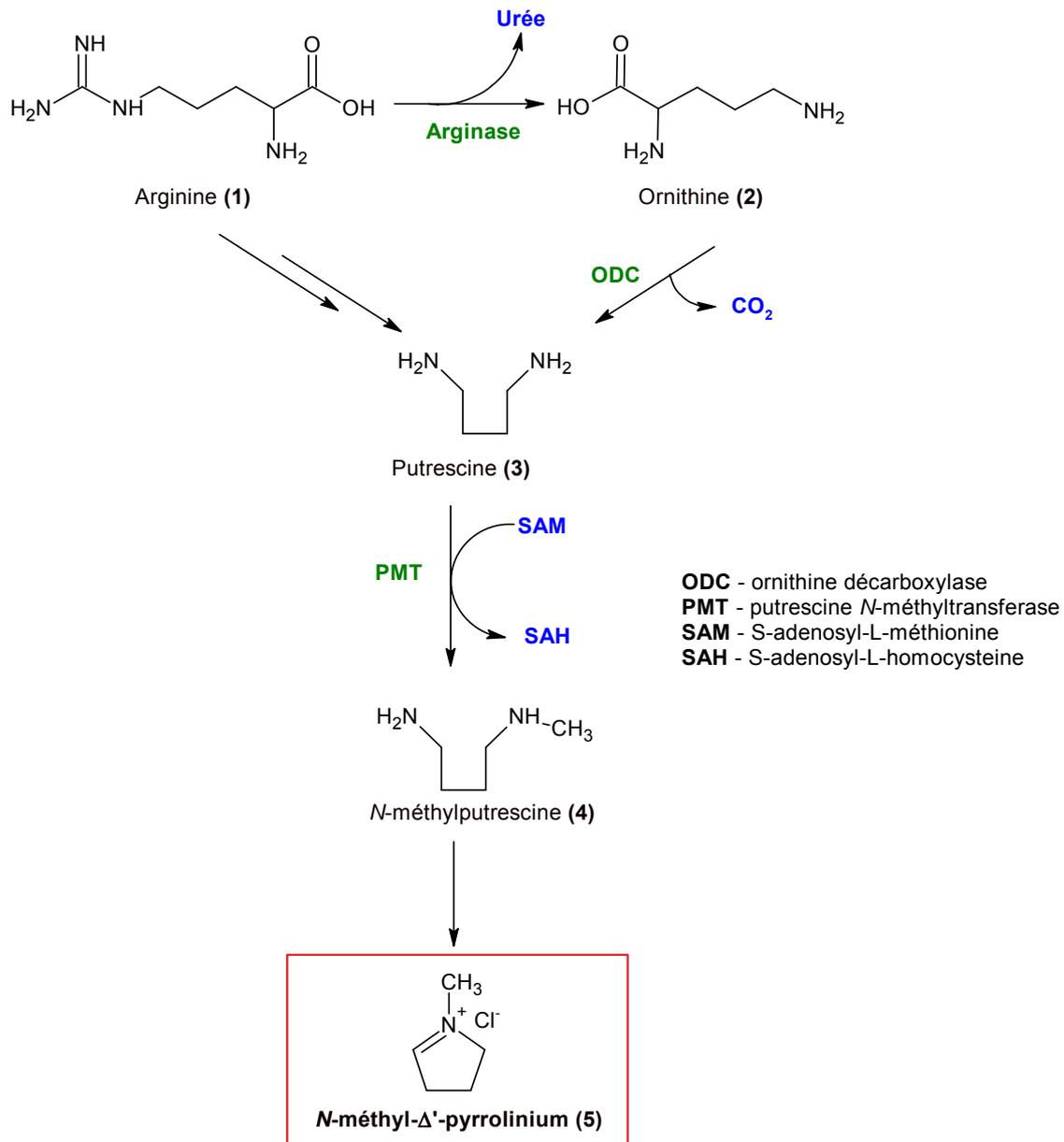
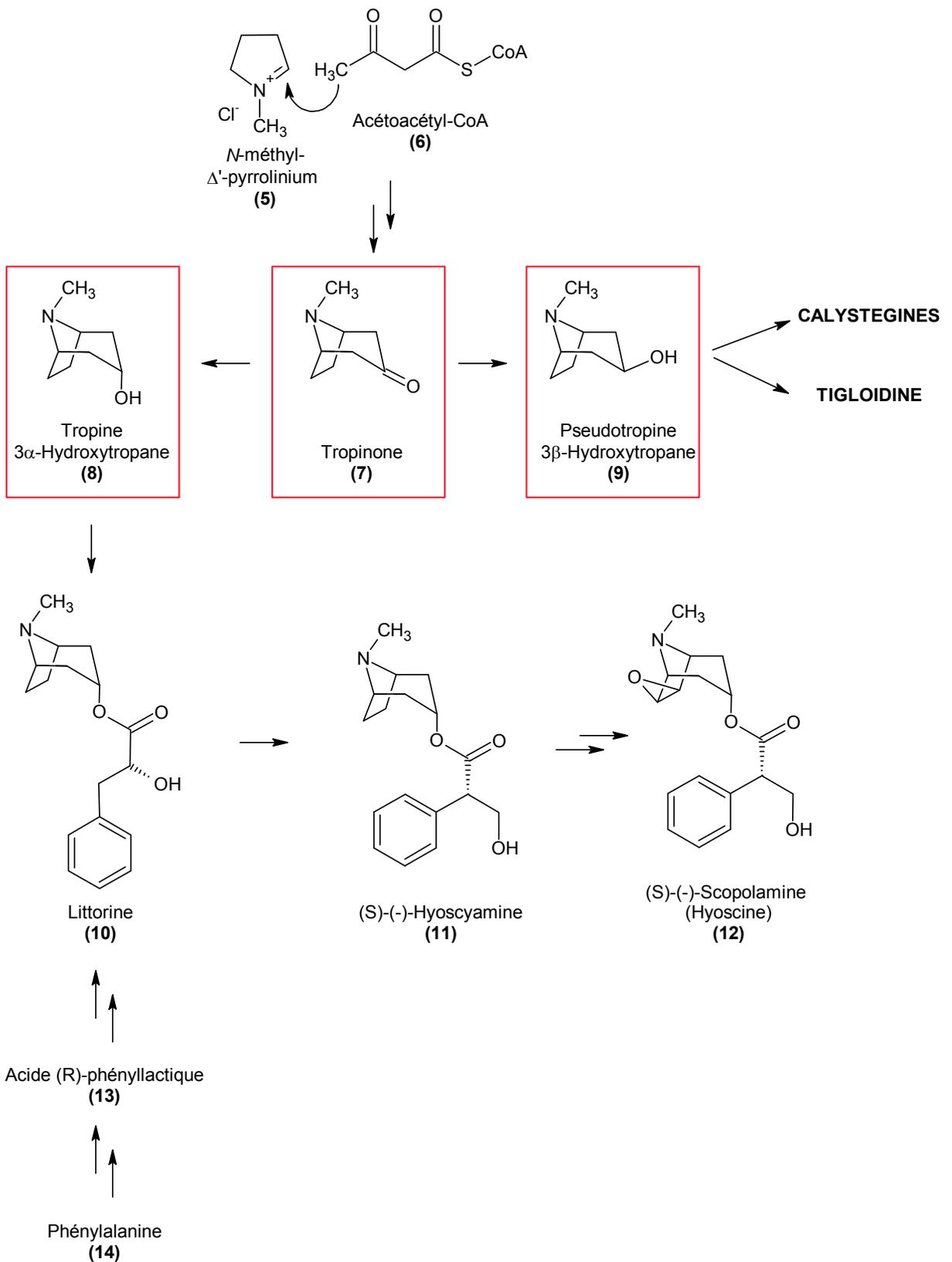


Figure 3. Voies de biosynthèse du *N*-méthyl- $\Delta'$ -pyrrolinium



**Figure 4. Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques**

### 1.1.2.1 La réduction de la tropinone : une étape clé du métabolisme

La réduction de la tropinone en tropine (3 $\alpha$ ) (**8**) ou en pseudotropine (3 $\beta$ ) (**9**) est une étape clé conduisant à la formation de deux séries de produits comme, par exemple, l'hyoscyamine et la scopolamine à partir de la tropine et les calystegines à partir de la pseudotropine (Figure 5). Pour cette étape de réduction de la tropinone, deux oxydoréductases stéréospécifiques ont été identifiées : la tropinone réductase I (TR I, EC 1.1.1.206) qui catalyse la réduction de la tropinone en tropine et la tropinone réductase II (TR II, EC 1.1.1.236) qui catalyse la réaction de réduction de la tropinone en pseudotropine. Ces deux enzymes régulent le flux de biosynthèse des esters et le ratio  $\alpha/\beta$ . Ce ratio chez *Datura stramonium* varie entre 30/1 et 80/1 [11], par contre, dans d'autres espèces les produits de configuration  $\beta$  sont plus présents, comme par exemple pour *Atropa belladonna*, ou même majoritaires, comme pour *Calystegia sepium* [12].

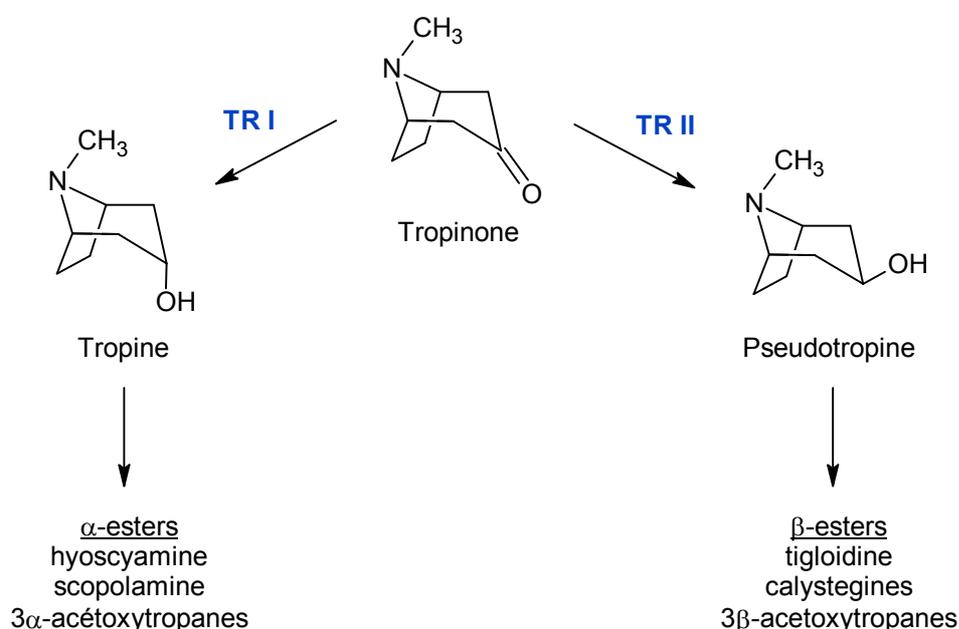


Figure 5. Etape de régulation par les tropinones réductases I et II

Dräger et Portsteffen à Münster (Allemagne) ont étudié au début des années 1990 les tropinone réductases dans les racines transformées de *Datura stramonium* cultivées en milieu stérile [11, 13]. Ils ont montré pour la TR I que, dans le sens de la réduction, la zone de pH d'activité est étroite et centrée autour de 6.4 avec une perte d'activité très importante hors de cet optimum. Par contre, la TR II a une zone de pH d'activité large, l'enzyme gardant 90% de son activité maximale entre 5.2 et 8.2 [14]. Ainsi, à pH 7.2, TR II a une activité environ 2 fois plus forte que TR I [11]. Par contre, dans le sens de l'oxydation, TR I montre une zone de pH d'activité large entre 7.0 et 10.5, avec une valeur maximale à pH 10.0 alors qu'aucune activité n'a été détectée pour TR II.

De plus, les mêmes auteurs ont trouvé que, dans la gamme de pH biologique, entre 7.0 et 7.5, les deux enzymes ont des affinités équivalentes pour la tropinone : TR I  $K_m=0.13$  mM et TR II  $K_m=0.10$  mM à pH 7.0. Mais, ils ont également montré que les valeurs de  $K_m$  pour les deux enzymes dépendent fortement du pH : la valeur de  $K_m$  pour TR II varie de 0.33 mM à pH 6.0 jusqu'à 0.06 mM en conditions basiques (pH 7.9) et pour TR I entre 4.50 mM et 0.04 mM pour les mêmes valeurs de pH [13]. L'interprétation qui peut être faite de ces observations est que le substrat préférentiel de la réaction est la tropinone sous forme neutre ( $pK_a$  8.9), et donc que la valeur de  $K_m$  calculée sur la concentration totale du substrat n'est que « apparente » lorsque le pH n'est pas significativement supérieur au  $pK_a$ .

Les protéines de TR I et TR II montrent une forte homologie dans leurs séquences d'acides aminés (64%), ce qui peut indiquer qu'elles ont évolué à partir du même gène [15]. Il existe quand même des différences significatives entre les deux protéines au niveau des interactions avec la tropinone dans le site actif. Des études réalisées sur les formes cristallines et l'analyse de la structure par modélisation moléculaire des deux enzymes ont permis d'expliquer ces différences observées lors de fixation de la cétone [16] [17]. Un résidu d'acide glutamique (Glu156) chargé négativement dans le site actif de TR II oriente la tropinone, chargée positivement au niveau de l'azote dans le site actif, grâce à des interactions ioniques entre le glutamate et le groupement ammonium quaternaire. Par contre, pour TR I, l'orientation du substrat dans le site actif se fait par un mécanisme inhabituel basé sur la répulsion du groupement ammonium quaternaire par un résidu d'histidine (His112) chargé positivement qui oblige le substrat à se positionner dans une orientation opposée à celle observée pour TR II.

Les tropinone réductases peuvent aussi catalyser la réduction d'analogues de la tropine. Ainsi, l'enzyme TR I extraite de *Hyoscyamus niger* ou de *Datura stramonium* réduit la 8-thiabiciclo[3.2.1]octane-3-one (TBON) et la 3-quinuclidinone, alors que TR II ne catalyse pas la réduction de ces composés. Les pipéridones sont des substrats acceptés par TR II et non par TR I.

L'effet inhibiteur de la TBON et de ses produits de réduction, 8-thiabicyclo[3.2.1]octan-3 $\alpha$ -ol ( $\alpha$ -TBOL) et 8-thiabicyclo[3.2.1]octan-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -TBOL) sur les tropinone réductases TR I et TR II extraites de *Datura stramonium* a été étudié [13]. Il a été établi que la TBON est un inhibiteur compétitif de TR I. Par contre, l'activité de l'enzyme TR II n'est pas diminuée en présence de TBON. Lors de l'incubation de TR I avec de la tropinone et du NADPH en présence de TBON (à 30% de la concentration en tropinone), la réduction de la tropinone diminue jusqu'à 35% de l'activité initiale [11]. L'affinité de la TBON pour l'enzyme ( $K_m=0.04$  mM) est environ 35 fois plus grande que celle de la tropinone ( $K_m=1.33$  mM) à ce pH mais du même ordre que la valeur minimale (0.04 mM) obtenue à pH

7.9. La réduction de la TBON par TR I conduit à mélange des deux produits : l' $\alpha$ -TBOL (80 %) et le  $\beta$ -TBOL (20%).

Il a également été montré que l' $\alpha$ -TBOL et le  $\beta$ -TBOL sont des inhibiteurs de TR I aussi bien pour la réduction de la tropinone que pour l'oxydation de la tropine. Lors de la réduction de la tropinone par TR I en présence d' $\alpha$ -TBOL (à 30% de la concentration en tropinone) la vitesse de catalyse est diminuée jusqu'à 25% de l'activité initiale. L'effet du  $\beta$ -TBOL est plus fort, avec 90% de perte de l'activité initiale [11]. Par contre, l'activité de l'enzyme TR II est inchangée en présence d' $\alpha$ -TBOL ou de  $\beta$ -TBOL. Lorsque l' $\alpha$ -TBOL et le  $\beta$ -TBOL ont été testés comme substrats pour l'enzyme TR I seul l' $\alpha$ -TBOL a été oxydé, avec une vitesse de réaction inférieure de moitié à celle de la tropine. Ceci permet de conclure que l' $\alpha$ -TBOL et la TBON sont des inhibiteurs compétitifs de TR I alors que le  $\beta$ -TBOL est un inhibiteur non-compétitif [13].

Une activité de type tropinone réductase a été aussi observée dans les bactéries *Pseudomonas* AT3 [18]. Aucune activité de type TR II n'a été observée dans l'extrait brut par ces auteurs. L'enzyme TR I a été purifiée et ses propriétés ont été étudiées. Il a été montré que la même enzyme réagit avec la tropine et la nortropine, le rapport des vitesses de la réaction d'oxydation de ces substrats restant égal à 1.5 tout au long des étapes de purification. Les valeurs des constantes de Michaelis-Menten ont été mesurées : pour la tropine  $V_{max}=0.0220\pm 0.0005$   $\mu\text{mol}/\text{min}$  et  $K_m=6.06\pm 0.46$   $\mu\text{M}$  et pour la nortropine  $V_{max}=0.0341\pm 0.0005$   $\mu\text{mol}/\text{min}$  et  $K_m=73.40\pm 3.90$   $\mu\text{M}$ . On constate que le rapport  $V_{max}/K_m$  est 7.8 fois plus grand pour la tropine que pour la nortropine et donc que la tropine est le substrat préférentiel de cette enzyme. Ces éléments montrent qu'il existe des différences significatives entre les enzymes tropinone réductases des bactéries et celles des plantes.

### **1.1.3 Catabolisme**

#### **1.1.3.1 Chez les plantes**

La voie de dégradation des alcaloïdes tropaniques chez les plantes n'est que très partiellement connue. La seule activité enzymatique identifiée est celle de l'atropine estérase, qui coupe la liaison ester de l'atropine pour donner la tropine et l'acide tropique [19].

#### **1.1.3.2 Chez les mammifères**

En raison de leur usage en médecine, le métabolisme de dégradation des alcaloïdes tels que l'hyoscyamine, la scopolamine et la cocaïne a été bien étudié. Chez les mammifères

ces composés sont métabolisés rapidement par les enzymes du type cytochrome P450 monooxygénase. Les mécanismes du métabolisme primaire (i.e. *N*-déméthylation) sont actuellement à l'étude [20, 21]. La compréhension de ces mécanismes réactionnels peut permettre de proposer des structures pour des analogues et des inhibiteurs potentiels.

Généralement, la dégradation des alcaloïdes tropaniques est effectuée de la même façon chez tous les mammifères étudiés (la souris, le rat, le porc de guinée, la chèvre, le chien, le singe et l'humain) sauf chez le lapin [22]. Chez le rat, où le métabolisme de l'atropine et de la scopolamine a été particulièrement bien étudié [23] [24] [25], quatre types de réactions ont été identifiées : l'hydrolyse de la liaison ester entre l'acide tropique et la tropine; la réaction de déméthylation de l'azote; la création de sulfo-conjugués ou de glucurono-conjugués; l'hydroxylation ou méthoxylation au niveau du cycle benzénique. Du fait de ces réactions, différents métabolites sont produits, dont les métabolites primaires (nortropine, tropine, *N*-déméthylatropine, *p*-hydroxyatropine et *p*-hydroxyatropine *N*-oxide) et secondaires (glucurono-conjugués et sulfo-conjugués des *N*-déméthylatropine, atropine et *p*-hydroxyatropine). Il existe le même type de métabolites pour la scopolamine (scopine, L-(-)-acide tropique, 6- $\beta$ -hydroxyhyoscyamine, 4'-hydroxy-(-)-scopolamine, 3'-méthoxy-(-)-scopolamine, 4'-hydroxy-3'-méthoxy-(-)-scopolamine, L-(-)-aposcopolamine, L-(-)-aponscopolamine, L-(-)-norscopolamine et sulfo- et glucurono-conjugués). Dans l'urine, le plasma et les fèces de rat vingt quatre produits du métabolisme de l'atropine ont été trouvés [23]. Chez l'homme 57% de l'atropine elle-même est expulsée avec l'urine et la tropine constitue le catabolite le plus important (29% de la dose initial) [8]. Les études de la composition d'urine humaine après consommation de scopolamine ont indiqué que les glucurono-conjugués et sulfo-conjugués sont les métabolites prépondérants.

Bien que le métabolisme d'alcaloïdes tels que l'atropine et la scopolamine soit comparable chez la majorité des mammifères, une différence quantitative existe au niveau du profil des métabolites excrétés, qui dépend du genre du mammifère et de la quantité de l'alcaloïde initialement présent.

Exceptionnellement, chez le lapin il ne semble exister qu'une voie de dégradation par action de l'atropine estérase, comme chez les plantes. L'activité est présente dans le sérum et le foie, et est plus forte pour la (*S*)-(-)-hyoscyamine que pour la (*R*)-(+)-hyoscyamine.

### 1.1.3.3 Chez les bactéries

L'atropine contient à la fois du carbone et de l'azote organique, deux nutriments essentiels pour la croissance de bactéries. Les alcaloïdes tropaniques peuvent donc servir de source de croissance pour certains microorganismes.

Le métabolisme de l'atropine chez les bactéries a été étudié pour la première fois en 1959 par Niemer *et al.* pour *Corynebacterium belladonnae* [26, 27]. Ces microorganismes ont été isolés du sol ayant servi à la culture d'*Atropa belladonna*. Lorsque ces microorganismes ont été mis en culture avec l'atropine comme seule source d'azote, les auteurs ont observé la présence de méthylamine et d'acide tropinique dans le milieu bactérien. Ils ont proposé pour le métabolisme de l'atropine une voie passant par l'oxydation en tropinone puis en acide tropinique pour former ensuite de l'acide 2,6-dioxopimelique et de la méthylamine. Pour la réaction d'oxydation de la fonction hydroxyle de la tropine, les auteurs ont proposé une réaction de type enzymatique catalysée par des déshydrogénases.

Le métabolisme de l'atropine par d'autres microorganismes isolés du sol (*Arthrobacter* et *Pseudomonas*) a été étudié dans les années 1960-70 [28] [29] [30]. Ces études ont montré que la première étape du métabolisme de l'atropine est l'hydrolyse de la liaison ester et que l'enzyme atropine estérase est induite pendant la croissance des bactéries sur l'atropine. Pour les étapes suivantes, il a fallu attendre le travail du groupe de Hopper et Trudgill à Aberystwyth (Pays de Galles) dans les années 1990 [31] [31] [32, 33]. Grâce aux études menées par ce groupe, la voie catabolique a été bien définie et plusieurs activités enzymatiques identifiées et certaines enzymes isolées.

Le métabolisme général des alcaloïdes tropaniques par *Pseudomonas* ayant l'air être assez bien défini, il nous a semblé que ces bactéries constituaient le modèle le plus intéressant pour l'étude des mécanismes réactionnels enzymatiques conduisant à la rupture des liaisons C-N pour ces composés et à la libération d'azote sous une forme assimilable par les bactéries.

## 1.2 Métabolisme spécifique des alcaloïdes tropaniques par *Pseudomonas*

### 1.2.1 Habitat

Les bactéries *Pseudomonas* qui métabolisent les alcaloïdes tropaniques ont été découvertes dans le sol à proximité des racines des plantes synthétisant de tels alcaloïdes. La souche de bactéries *Pseudomonas* AT3 a été isolée par culture sélective sur atropine [30]. Une souche nommée MS2, bloquée dans son métabolisme a été obtenue par mutation de *Pseudomonas* AT3 par la *N*-méthyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine et sélection des colonies capables de pousser sur atropine mais incapables de pousser sur tropine seule [18].

Ces microorganismes peuvent se développer dans un milieu pauvre en micro-éléments et ne contenant comme source d'azote et de carbone qu'un alcaloïde tropanique. Ils peuvent utiliser l'atropine ainsi que des composés provenant de la voie métabolique de dégradation de l'atropine, notamment l'acide tropique (avec une source d'azote minérale), la tropine ou la nortropine. Selon le substrat, les cellules induisent les enzymes nécessaires à cette partie du métabolisme et initient le métabolisme [32].

### 1.2.2 Métabolisme des alcaloïdes tropaniques

Les produits de dégradation de l'atropine par les bactéries *Pseudomonas* AT3 ont été identifiés au début des années '90. Les études ont confirmé que la première étape du métabolisme est l'hydrolyse de la liaison ester par l'enzyme atropine estérase. La croissance des bactéries est réalisée en deux étapes. Premièrement les bactéries utilisent rapidement l'acide tropique, puis après une période de ralentissement de croissance, elles métabolisent la tropine.

La dégradation de l'acide tropique (**25**) pour former l'acide phénylacétique (**28**) a été étudiée en 1997 par Long *et al.* [33] qui ont proposé la voie métabolique présentée sur la Figure 6. L'acide tropique (**25**) est oxydé par une NAD<sup>+</sup>-déshydrogénase via un semi-aldéhyde, phénylmalonique (**26**), donnant le phénylacétaldéhyde (**27**) par décarboxylation qui est probablement spontanée. La formation de l'aldéhyde phénylmalonique (**26**) n'a jamais été confirmée et ce n'est donc qu'une structure intermédiaire proposée. Le phénylacétaldéhyde (**27**) est ensuite oxydé par une deuxième NAD<sup>+</sup>-déshydrogénase induite pendant le métabolisme pour former l'acide phénylacétique (**28**).

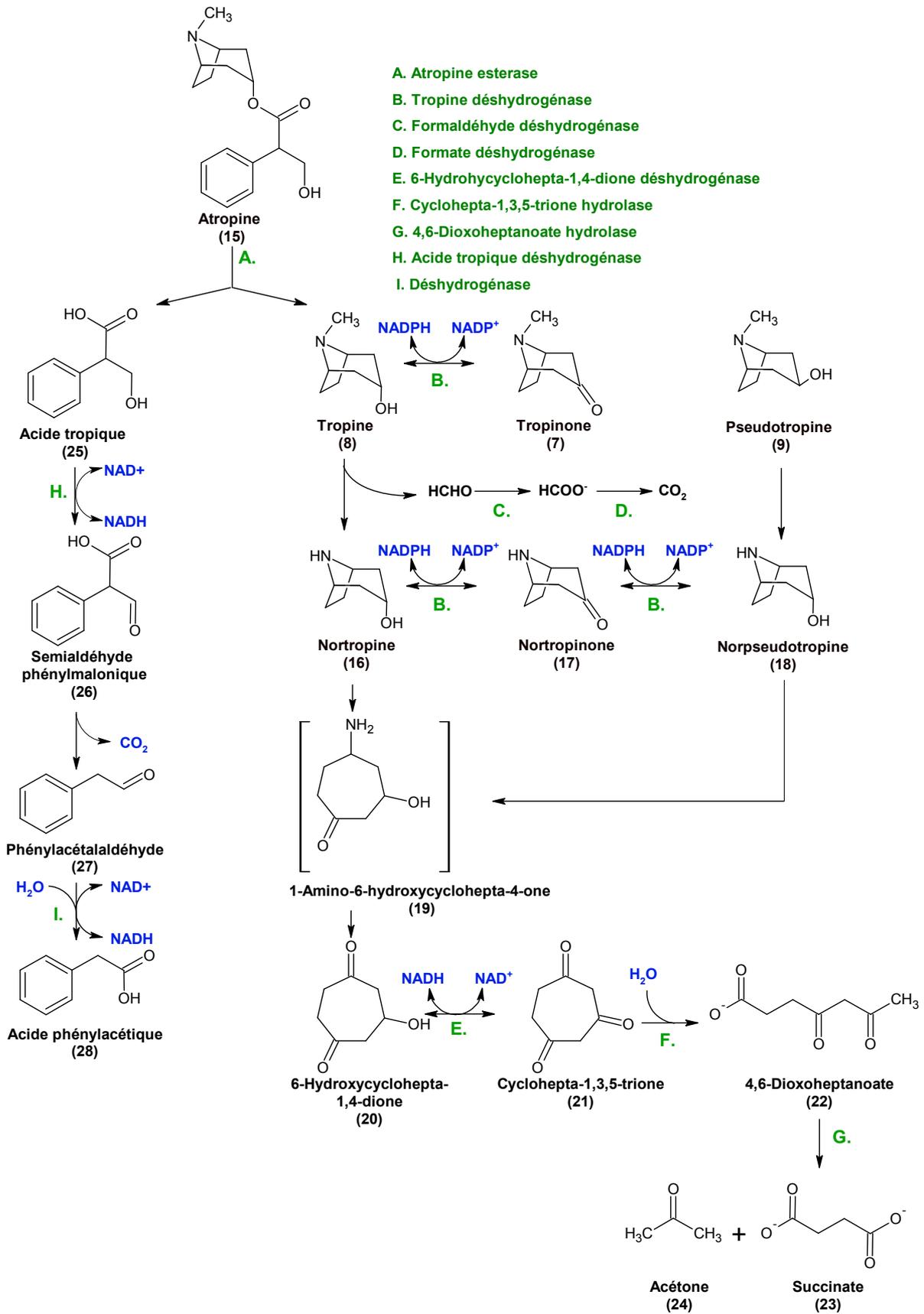
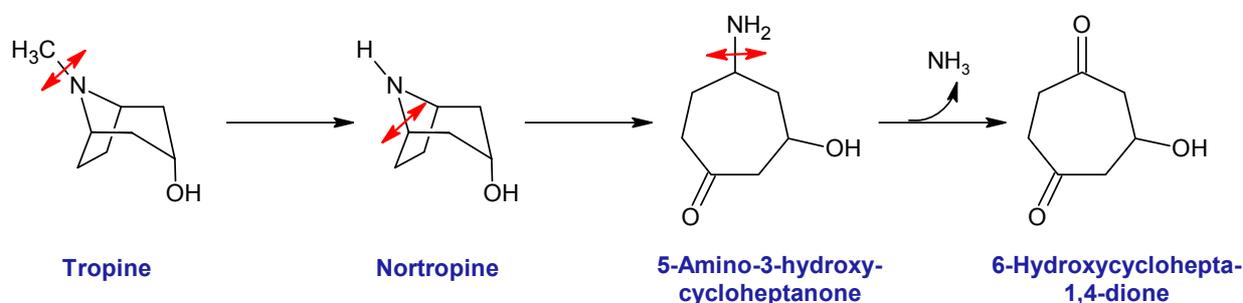


Figure 6. Le métabolisme de l'atropine chez bactéries *Pseudomonas AT3*

Pour libérer l'azote sous une forme assimilable la bactérie utilise trois réactions successives conduisant *in fine* à la formation d'ammoniaque (Figure 7). La première est une réaction de *N*-déméthylation de la tropine en nortropine. La deuxième est l'ouverture du pont azoté du système bicyclo pour conduire à la 5-amino-3-hydroxycycloheptanone (**19**) puis, en troisième, une dernière coupure de liaison C-N conduit à la libération d'ammoniaque.



**Figure 7. Séquence de ruptures des liaisons C–N pendant le métabolisme bactérien**

Bien que l'existence de la 5-amino-3-hydroxycycloheptanone (**19**) n'ait jamais été prouvée, cet intermédiaire est très probable et une preuve indirecte est que son produit, la 6-hydroxycycloheptane-1,4-dione, a pu être isolé du milieu de culture de la souche MS2 [34]. Il a été montré que la souche MS2 est dépourvue de l'enzyme 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione déshydrogénase et donc que le métabolisme s'arrête au niveau de la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione qui s'accumule dans le milieu [34] [18].

Ni la nature, ni le mécanisme d'aucune de ces enzymes n'ont été identifiés. L'hypothèse est que l'enzyme responsable pour la *N*-déméthylation de la tropine et celle pour l'ouverture oxydative de la nortropine sont de type cytochrome P450 monooxygénase [35] [36], et que l'enzyme responsable pour la libération de l'ammoniaque est une aminase oxydative [37] [38] [39].

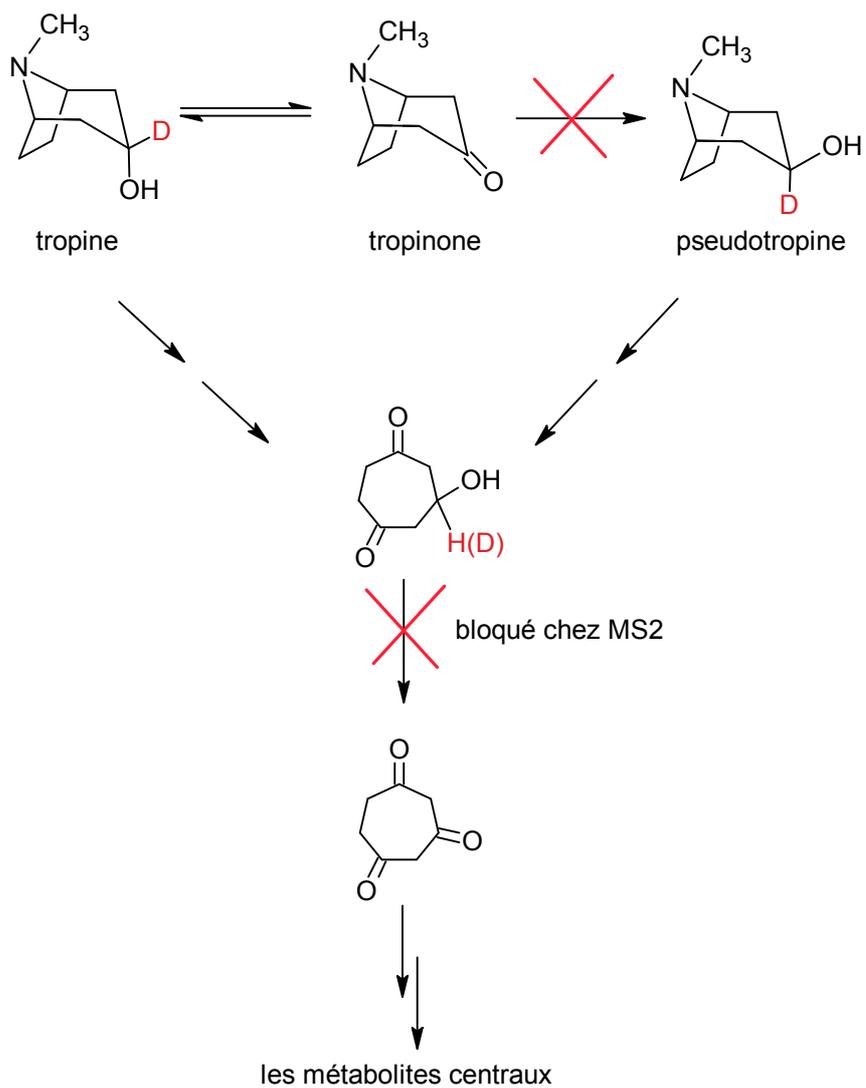
Pour la souche AT3, la 6-hydroxycycloheptane-1,4-dione (**20**) est oxydée par une NAD<sup>+</sup>-déshydrogénase en cyclohepta-1,3,5-trione (**21**) qui est ensuite hydrolysée par la cyclohepta-1,3,5-trione hydrolase pour former le 4,6-dioxoheptanoate (**22**). L'hydrolyse de ce composé par l'enzyme 4,6-dioxoheptanoate hydrolase conduit au succinate (**23**) et à l'acétone (**24**), composés exploitables par la bactérie comme source d'énergie.

Il a été montré que la tropine peut également jouer directement le rôle de substrat de croissance. La dégradation de la tropine chez les bactéries *Pseudomonas* a été étudiée en détail. Une étude par Bartholomew *et al.* [18] utilisant des composés marqués au deutérium en position C-3 (Figure 8) et la souche *Pseudomonas* MS2 a mis en évidence deux informations essentielles :

- premièrement il a été confirmé que 30% environ de la tropine est convertie sous forme de cétone, la tropinone (la perte de 29% de deutérium a été mesurée en analysant la composition du produit final la 6-hydroxy-1,4-cycloheptadione).
- deuxièmement il a été démontré que la pseudotropine, qui par ailleurs n'a jamais été observée dans le milieu bactérien lorsque la tropine est le substrat, peut également servir comme de substrat de croissance. Dans ce cas, la rétention, de 91% de deutérium dans le produit final a confirmé que la pseudotropine est métabolisée directement, sans épimérisation en tropine.

Dans le même cadre [18], une autre étude a été réalisée sur l'enzymologie de l'épimérisation et a montré que l'enzyme purifiée n'est active que sur les composés de configuration  $\alpha$ , la tropine et la nortropine, et pas sur leurs épimères de configuration  $\beta$ , la pseudotropine et la norpseudotropine, il s'agit donc de TR I. De plus, lorsque l'activité enzymatique globale est évaluée dans le sens de la réduction avec la tropinone Bartholomew *et al.* observent uniquement la formation de tropine et jamais celle de pseudotropine. L'ensemble de ces résultats ont amené ces auteurs à conclure à l'absence d'activité de TR II chez *Pseudomonas AT3*. Toutes ces observations sont cohérentes avec l'hypothèse d'un métabolisme direct des composés de configuration  $\beta$ .

Par contre, au cours des études sur la dégradation de la nortropine faites au laboratoire [2] [3] l'accumulation de norpseudotropine dans le milieu bactérien a été constatée. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Bartholomew *et al.* pour la tropine et suggèrent qu'il puisse y avoir une différence au niveau métabolique avec les composés nortropaniques. Il était donc essentiel, pour nos études métaboliques, de mieux connaître et comprendre le fonctionnement des tropinone réductases et la régulation de ce niveau métabolique.



**Figure 8. Dégradation de la tropine et de la pseudotropine par les bactéries *Pseudomonas* MS2 [18]**

## 1.3 Isotopes et effets isotopiques

### 1.3.1 Généralités sur les isotopes

La plupart des éléments chimiques possèdent des isotopes, c'est à dire des atomes ayant le même numéro atomique  $Z$  mais un nombre de masse  $A$  différent. Ils ont donc le même nombre des protons et la même structure électronique mais différent par leur nombre de neutrons. Cette différence de masse atomique entre deux isotopes change leurs propriétés réactionnelles et est à l'origine du phénomène appelé fractionnement isotopique.

Il existe deux types d'isotopes : stables et radioactifs. Les isotopes stables ne se désintègrent pas alors que les isotopes radioactifs se désintègrent en émettant des rayonnements i.e.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Les principaux éléments trouvés dans les composés d'origine naturelle ont des isotopes stables (Tableau 1).

Tableau 1. Distribution naturelle des isotopes		
Elément	Isotopes stables	Abondance naturelle
		moyenne A (%) <sup>a</sup>
Hydrogène	<sup>1</sup> H	99.9844
	<sup>2</sup> H (D)	0.0156
Carbone	<sup>12</sup> C	98.892
	<sup>13</sup> C	1.108
Azote	<sup>14</sup> N	99.634
	<sup>15</sup> N	0.366
Oxygène	<sup>16</sup> O	99.763
	<sup>17</sup> O	0.037
	<sup>18</sup> O	0.200

<sup>a</sup> [40] [41]

En abondance naturelle, les molécules organiques sont principalement constituées d'isotopes légers. Deux molécules qui diffèrent uniquement par leur composition isotopique sont appelées **isotopologues** (par exemple CH<sub>3</sub>OH, CH<sub>3</sub>OD). Les composés isomères qui possèdent le même nombre de chaque isotope mais à des positions qui diffèrent s'appellent des **isotopomères** (par exemple CH<sub>3</sub>OD, CH<sub>2</sub>DOH).

Les isotopes d'un élément n'ont pas exactement les mêmes propriétés physicochimiques et la substitution d'un atome par un de ses isotopes produit des effets perceptibles thermodynamiquement et cinétiquement.

Ce phénomène est à l'origine des **effets isotopiques**, qui résultent de la sélectivité entre isotopes légers ou lourds. Ces effets isotopiques, qui peuvent apparaître lors de changements d'état physique ou de réactions chimiques, se traduisent par un enrichissement ou un appauvrissement en isotopes lourds appelé **fractionnement isotopique** correspondant à la modification de la teneur isotopique d'un composé. On peut distinguer deux types d'effets isotopiques, les effets isotopiques cinétiques (EIC) et les effets isotopiques d'équilibre (EIE) et donc deux types de fractionnement isotopique liés à la masse : le fractionnement thermodynamique (dans un système en équilibre physique ou chimique) et le fractionnement cinétique (pendant une réaction (bio)chimique irréversible) [42].

La théorie de l'influence de la substitution isotopique a été développée par Bigeleisen et Meyer en 1947 [43]. La substitution isotopique ne perturbe pas les termes énergétiques de nature électronique mais seulement les termes énergétiques liés à la masse des atomes (c'est-à-dire les niveaux vibrationnels et rotationnels) ce qui se traduit par une modification des énergies associées constituant une partie de l'énergie interne. Deux isotopologues possèdent ainsi une énergie fondamentale de vibration différente qui représente la contribution la plus importante à l'effet isotopique. Dans un système classique la fréquence de vibration est quantifiée :

$$E_{vib} = h\nu\left(V + \frac{1}{2}\right)$$

Avec :

$h$	constante de Planck
$\nu$	fréquence de vibration
$V$	nombre quantique de vibration

Le niveau d'énergie vibrationnelle de point zéro (ZPVE) n'est pas égal à zéro mais à :

$$E_{vib(0)} = \left(\frac{1}{2}\right)h\nu$$

De plus, selon la loi de Hook la fréquence de vibration est dépendante de la constante de force et de la masse réduite du système :

$$\nu = \left(\frac{1}{2\pi}\right)\sqrt{\frac{K}{\mu}}$$

Avec :

$K$	constante de force de liaison
$\mu$	masse réduite du système

Le remplacement d'un atome par un de ses isotopes produit un changement des niveaux d'énergie vibrationnelle dans l'état fondamental et éventuellement dans l'état de transition (Figure 9). Les effets isotopiques massiques observés en cinétique chimique, sont essentiellement dus à  $\Delta(\text{ZPVE})$ .

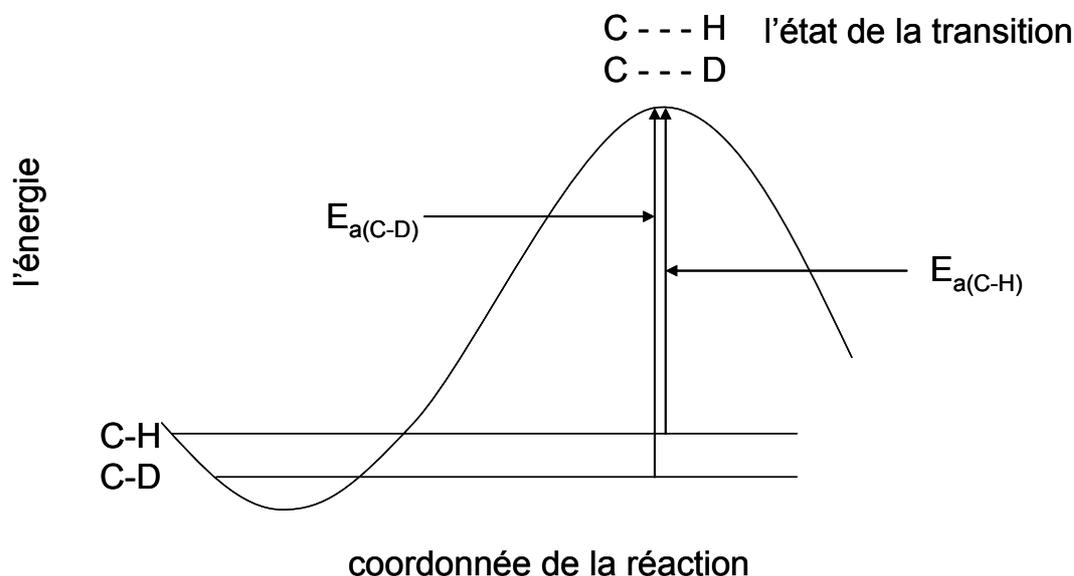
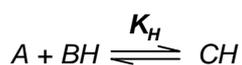


Figure 9. Influence de la différence d'énergie de point zéro sur la réactivité des liaisons C-<sup>1</sup>H et C-<sup>2</sup>H (D)

### 1.3.2 Effet isotopique d'équilibre et cinétique

L'effet isotopique d'équilibre (EIE) est un effet isotopique sur la constante d'équilibre. Cet effet peut être exprimé comme le rapport de la constante d'équilibre de l'isotope léger ( $K_l$ ) sur la constante d'équilibre de l'isotope lourd ( $K_L$ ).

Effet isotopique d'équilibre

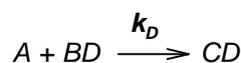
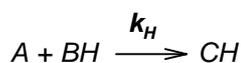


$$EIE = \frac{K_H}{K_D}$$

$$EIE = \frac{K_l}{K_L}$$

L'effet isotopique cinétique (EIC) est un effet isotopique sur la constante de vitesse. Il est exprimé comme le rapport de la constante de vitesse de l'isotope léger ( $k_l$ ) sur la constante de vitesse de l'isotope lourd ( $k_L$ ).

## Effet isotopique cinétique

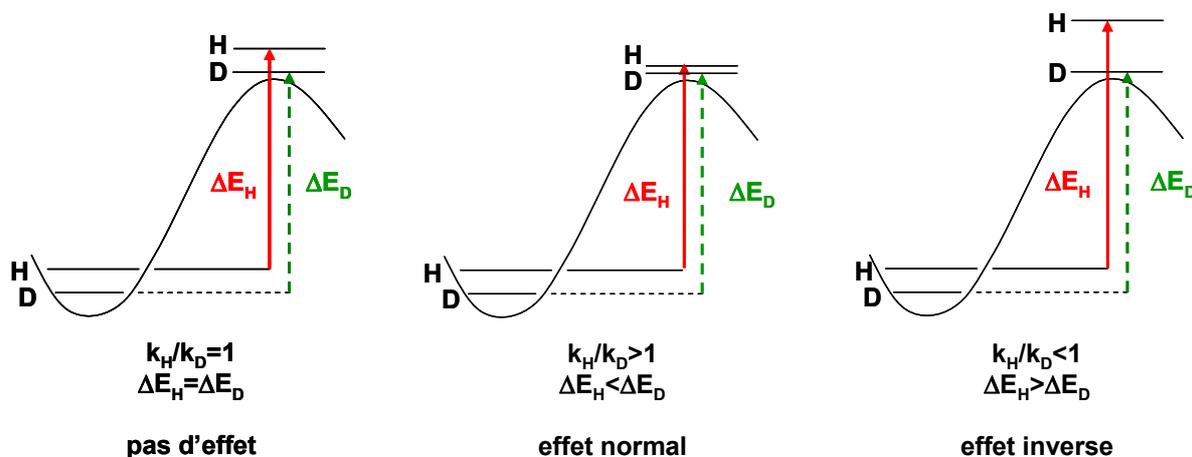


$$EIC = k_H/k_D$$

$$EIC = k_l/k_L$$

### 1.3.3 Nature des effets isotopiques cinétiques et interprétation

La valeur de l'effet isotopique dépend de la différence d'énergie d'activation entre les deux isotopologues (Figure 10) [44]. S'il n'y a pas de différence entre les énergies, on n'observe aucun effet isotopique. Quand la barrière énergétique pour le composé contenant l'isotope léger est plus petit que celle pour l'isotope lourd on observe un appauvrissement en isotope lourd sur les produits, c'est un effet dit **normal**. Dans le cas où la barrière énergétique est plus grande pour l'isotope léger on observe un enrichissement en isotope lourd sur les produits, c'est un effet **inverse**.



**Figure 10. Valeur de l'effet isotopique et son interprétation**

L'ordre de la liaison chimique a une influence sur les niveaux d'énergie de point zéro. Dans le cas où les deux atomes sont liés de façon rigide (liaison double ou triple), la différence entre les deux niveaux d'énergie de point zéro pour l'isotope léger et lourd est significative. Les niveaux énergétiques se trouvent alors, dans un puits de potentiel étroit. Avec la diminution de l'ordre de la liaison la différence entre deux niveaux énergétiques est moindre. Les atomes liés par une liaison simple sont liés moins fortement donc la différence entre les énergies de point zéro pour l'isotope léger et lourd est moins importante. Dans ce cas on considère le puits large. Ce phénomène influe sur la valeur de l'effet isotopique.



Pour les isotopes avec une masse atomique plus grande comme le carbone ou l'azote l'effet isotopique cinétique maximal à 25°C est respectivement [46] :

$$\frac{k_{C^{12}}}{k_{C^{13}}} = 1.05 \text{ et } \frac{k_{N^{14}}}{k_{N^{15}}} = 1.04.$$

De plus si l'état de transition n'est pas linéaire la valeur de l'EIC est inférieure à la valeur maximale.

On peut noter qu'il a été observé des EIC (I) pour  $^2\text{H}$  nettement supérieur à 6.5. Ils peuvent être expliqués par un effet « tunnel » qui ne concerne en pratique que le deutérium et donc ne sera pas développé ici.

### 1.3.3.2 Effet isotopique cinétique secondaire : EIC (II)

Les effets isotopiques cinétiques ne sont pas uniquement observés dans le cas où une des liaisons de l'isotope concerné est rompue. Dans le cas des effets secondaires il n'y a pas coupure de liaison pour l'isotope concerné mais perturbation de celle-ci du fait d'un changement d'hybridation ou de la variation d'une hyperconjugaison au cours de l'étape cinétiquement déterminante de la réaction [45]. En fonction de l'éloignement de cet atome par rapport au centre réactionnel on parlera d'effet isotopique  $\alpha$  ou  $\beta$  on peut relier l'effet au changement d'hybridation. Pour le carbone, par exemple, si on passe d'une hybridation  $sp^3$  à  $sp^2$  on observera un effet normal, à l'inverse un changement  $sp^2$  versus  $sp^3$  donnera un effet inverse. En effet si, par exemple, un C  $sp^3$  est converti en  $sp^2$  la force de la liaison C-H faiblit, notamment sa résistance au « bending » (vibration de déformation). Cette variation est plus grande que pour C-D, car C-H est plus longue et son amplitude de vibration est plus grande.

Il est aussi possible de détecter des effets isotopiques cinétiques sur des atomes plus éloignés que  $\beta$ . Par exemple, un EIC (II) en  $^{15}\text{N}$  est associé à la résonance phényle  $\leftrightarrow$  quinone (Figure 12), due au changement d'état de l'atome d'azote [47]. Au cours de la déacylation du *p*-nitrophénylacétate des effets cinétiques isotopiques sur l'azote-15 ont été mesurés car tous les atomes interviennent dans le mécanisme de résonance. L'amplitude de l'effet isotopique change en fonction de la contribution de deux formes de résonance.

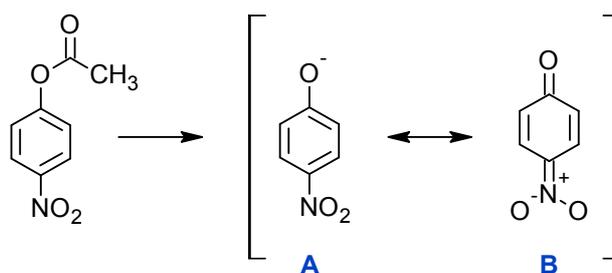


Figure 12. Résonance phényle  $\leftrightarrow$  quinone avec changement d'ordre de liaison de l'azote

### 1.3.4 Effet isotopique cinétique primaire pour les enzymes

Les effets isotopiques constituent un outil très efficace pour étudier les mécanismes enzymatiques réactionnels. L'étude des effets de la substitution de l'hydrogène par le deutérium ou le tritium sont les plus développés, grâce à la grande différence de masse qui facilite la mesure d'un écart important entre les vitesses de réaction  $k_L$  et  $k_I$ . Pour les autres éléments, à cause des différences de masse moindres entre  $m_L$  et  $m_I$ , la mesure des rapports isotopiques de ces éléments pour les réactions enzymatiques a été longtemps un paramètre limitant jusqu'à l'introduction de la spectrométrie de masse de rapport isotopique. Aujourd'hui les mécanismes réactionnels enzymatiques sont étudiés en utilisant des isotopes variés ( $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ ) et ce même au niveau de l'abondance naturelle grâce à des instruments de mesure bien adaptés (voir § 1.4.2).

#### 1.3.4.1 Effet de la substitution isotopique sur la cinétique d'une réaction enzymatique

Les enzymes, comme tous les catalyseurs classiques, abaissent l'énergie d'activation d'une réaction. Par contre, dans le cas d'une réaction enzymatique, le mécanisme de la catalyse diffère beaucoup de celui de la catalyse chimique classique, notamment, dans le cas de la catalyse classique, il n'existe généralement qu'un seul état de transition, comme pour les réactions non catalysées (Figure 13). Si l'application des effets isotopiques à l'étude mécanistique n'est pas plus compliquée que pour les réactions non catalysées, par contre, les réactions enzymatiques sont souvent caractérisées par un ou plusieurs maxima énergétiques, ainsi que plusieurs étapes potentiellement limitantes, ce qui peut diminuer ou masquer totalement la valeur de l'effet isotopique réel.

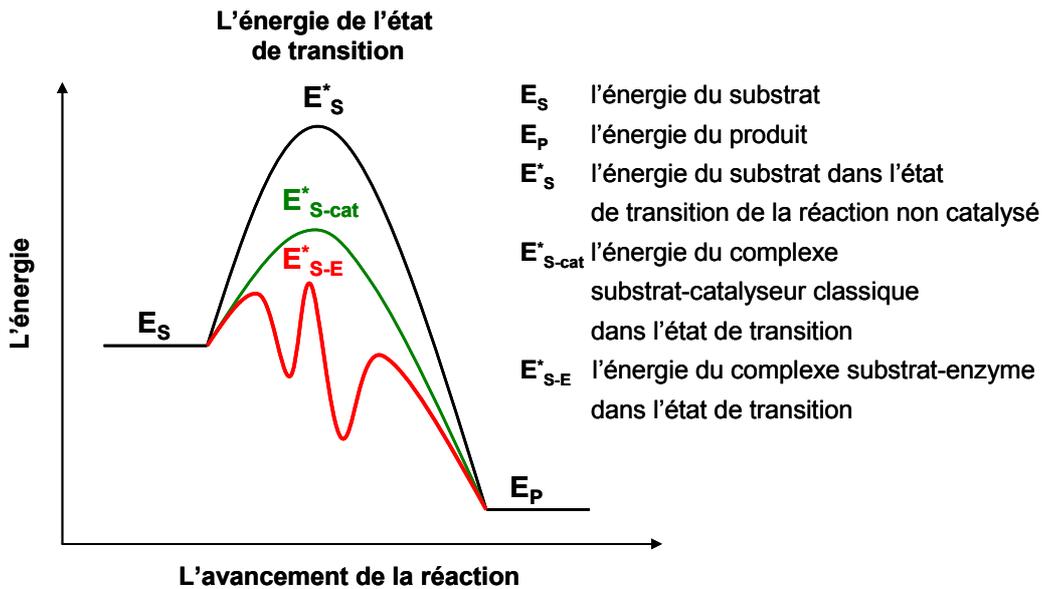
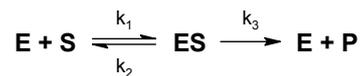


Figure 13. Différence d'états de transition pour une réaction non catalysée, par catalyse classique et par catalyse enzymatique



Pour le modèle simple de catalyse enzymatique : la vitesse de la réaction dépend de la concentration du substrat (à condition que  $[E] \ll [S]$ ), comme le montre la Figure 14.

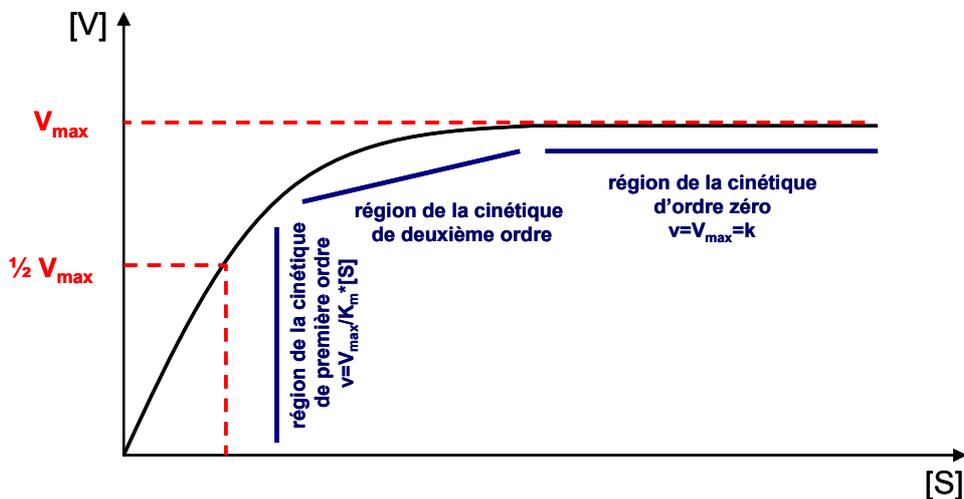


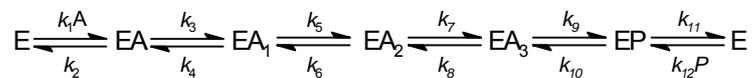
Figure 14. Vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat

Cette courbe classique pourra être analysée en appliquant l'équation de Michaelis-Menten :  $v = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m}$ . Les deux paramètres cinétiques indépendants de l'équation de Michaelis-Menten sont : la vitesse maximale  $V_{max}$  de la catalyse et le rapport  $V_{max}/K_m$  de la

vitesse maximale sur la constante de Michaelis-Menten. Trois zones sont à distinguer. Pour les faibles concentrations en substrat ( $[S] \ll K_m$ ), la vitesse de la réaction enzymatique est pseudo-proportionnelle à la concentration en substrat [48]. Dans cette zone, la réaction est effectuée selon une cinétique de pseudo premier ordre et la vitesse de la catalyse est décrite par l'équation :  $v = \frac{V_{\max}}{K_m} [S]$  car  $k_2 \approx 0$ . Pour les fortes concentrations en substrats, il y a excès de substrat par rapport de l'enzyme ( $[S] \gg K_m$ ) et tous les sites actifs sont saturés par le substrat. Dans ce cas, la vitesse de la réaction enzymatique est constante et égale à la vitesse maximale,  $v = V_{\max}$  ( $k_1 = k_2 > k_3$ ). Dans la zone intermédiaire la saturation du site actif devient de plus en plus significative.

Lorsqu'il y a substitution isotopique au niveau du substrat la cinétique de la réaction enzymatique peut être modifiée et les valeurs des paramètres cinétiques de Michaelis-Menten différeront. Donc, l'étude des effets isotopiques des réactions enzymatiques consiste en la mesure de ces paramètres avec des substrats marqués et non marqués isotopiquement, ceci pouvant être réalisé de façon compétitive ou non compétitive ( $k_L$  et  $k_I$  déterminées indépendamment).

Par contre, la réaction enzymatique est composée de plusieurs étapes :



Dans la majorité des cas, le changement de la vitesse maximale mesuré n'est pas causé uniquement par une seule étape et ce n'est pas nécessairement l'étape sensible à la présence de l'isotope qui limite la vitesse. De plus, la présence d'un isotope lourd ou léger sur le substrat peut modifier les interactions avec l'enzyme et influencer sur la constante  $K_m$ . Pour une réaction simple, catalysant la transformation d'un substrat, l'effet d'une substitution isotopique sur les paramètres du modèle de Michaelis-Menten est illustré à l'aide du graphique de Lineweaver-Burk (Figure 15) [46], forme de représentation linéaire de la cinétique de Michaelis-Menten (Figure 14) qui permet de déterminer plus facilement les paramètres cinétiques  $V_{\max}$  et  $K_m/V_{\max}$ . Dans cet exemple, des changements de  $V_{\max}$  et  $K_m/V_{\max}$  sont apparents (Figure 15).

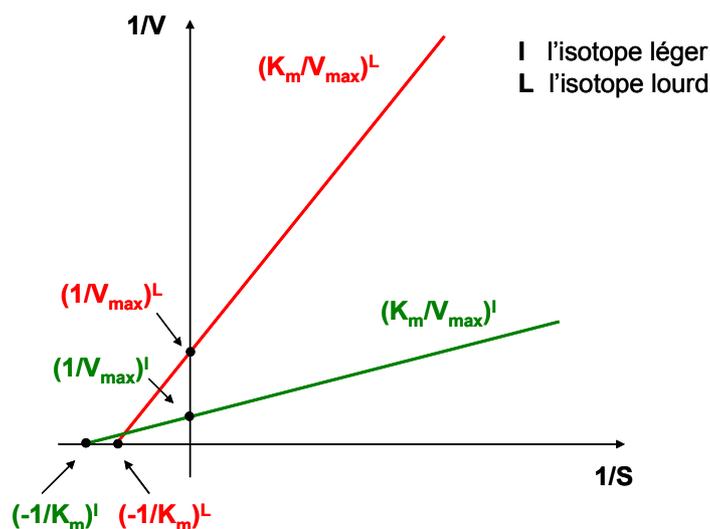


Figure 15. Représentation de Lineweaver-Burk du changement des paramètres cinétiques d'une réaction enzymatique dû à la substitution isotopique

### 1.3.4.2 Mesure des effets isotopiques cinétiques enzymatiques

En pratique, la méthode dite de compétition permet de mesurer des effets isotopiques de valeur absolue  $\geq 0.0002$  à partir du rapport  $V/K$  et est donc adaptée à la mesure des effets très faibles. La réaction se déroule en présence d'un mélange en substrat marqué et non marqué isotopiquement. La méthode s'applique à tous les isotopes stables de composés naturels ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ ) quel que soit le niveau d'enrichissement. Le rapport isotopique est déterminé soit pour le substrat soit pour le produit, soit pour les deux. Pour le substrat, le rapport isotopique est déterminé au temps initial de la réaction et pour un degré d'avancement suffisant pour permettre tout à la fois, avec la justesse et la précision nécessaire, le dosage du composé et la mesure du rapport isotopique. Idéalement, pour une meilleure précision, les mesures seront faites pour un degré d'avancement de la réaction compris entre 0.6 et 0.8. Pour les analyses faites sur le produit, les mêmes contraintes de justesse et précision s'appliquent.

Pour le substrat l'effet isotopique est calculé à partir de l'équation de Biegeleisen :

Avec :

$$EIC = (V/K) = \frac{\ln(1-F)}{\ln\left[(1-F)\left(\frac{R_t}{R_0}\right)\right]}$$

$F$  facteur d'avancement de la réaction

$R_0$  rapport isotopique du substrat au temps zéro

$R_t$  rapport isotopique du substrat au temps  $t$

$$\text{où } F = \frac{S_0 - S_t}{S_0}$$

$S_0$      quantité de substrat au temps zéro  
 $S_t$      quantité de substrat au temps t

$$\text{où } \frac{R_t}{R_0} = \frac{\frac{\delta_t}{1000} + 1}{\frac{\delta_0}{1000} + 1}$$

$\delta_0$       $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de substrat au temps zéro  
 $\delta_t$       $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de substrat au temps t

On voit donc l'importance de la justesse et de la précision dans la détermination de  $S_0$ ,  $S_t$ ,  $\delta_0$  et  $\delta_t$ .

### 1.3.5 Modélisation moléculaire et détermination des effets isotopiques

Pour une réaction donnée on peut éventuellement proposer un ou plusieurs mécanismes réactionnels avec plusieurs états de transition. En déterminant, par calcul théorique, les énergies des réactifs et des états de transition, on peut ainsi calculer les effets isotopiques cinétiques théoriques du modèle réactionnel. La comparaison de ces valeurs théoriques avec les valeurs expérimentales permet souvent de proposer un mécanisme avec un grand degré de confiance. Grâce à la modélisation moléculaire il est non seulement possible de calculer les paramètres énergétiques des modèles proposés mais aussi de les étudier du point de vue dynamique.

Pour illustrer cette approche par un exemple proche de nos études : le mécanisme de déméthylation de la (S)-nicotine ((S)-3-(1-méthyl-2-pyrrolidinyl)pyridine) catalysée par une cytochrome P450 monooxygénase dans la plante *Nicotiana glauca* a été déterminé [21]. Les calculs théoriques par modélisation ont permis d'obtenir des résultats qui, comparés aux résultats expérimentaux en  $^{15}\text{N}$  et  $^2\text{H}$ , ont permis de choisir entre deux mécanismes possibles. Dans cet exemple, la valeur de l'effet cinétique en  $^{15}\text{N}$  a été un élément décisif pour la détermination du mécanisme réactionnel. L'effet isotopique cinétique de la déméthylation de la nicotine mesuré expérimentalement sur l'azote (EIC- $^{15}\text{N}$  égal à 1.0028) indique que l'effet est un EIC (II). En effet, pour un effet primaire d'EIC (I) correspondant à la rupture d'une liaison C-N, les valeurs seraient plus fortes, pouvant atteindre 1.04. Ceci implique que la rupture de la liaison C-N n'est pas l'étape limitante. Par contre, les valeurs mesurées sont en accord avec celles calculées pour une réaction de type « oxygène rebound ».

## 1.4 Les isotopes et les méthodes de mesure de la teneur isotopique

Dans le contexte de ce travail, les mesures isotopiques nécessaires concernent la mesure en abondance naturelle des teneurs en  $^{15}\text{N}$  d'alcaloïdes tropaniques et la mesure de la teneur isotopique en  $^2\text{H}$  de quelques composés fortement enrichis. Par conséquent, dans cette partie, ne sera pas présenté de façon exhaustive l'ensemble des notions et techniques liées à la mesure des teneurs isotopiques mais seulement les notions et méthodologies pertinentes.

### 1.4.1 Notions et unités

Dans une molécule le **rapport isotopique**  $R$  traduit la proportion du nombre de moles de l'élément lourd  $^{15}\text{N}$  sur le nombre de moles de l'élément léger  $^{14}\text{N}$  :

$$R(^{15}\text{N}) = \frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N}}$$

L'**abondance isotopique** est définie comme la proportion de l'isotope donné dans l'élément chimique considéré:

$$A(^{15}\text{N}) = \frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{15}\text{N} + {}^{14}\text{N}}$$

Au niveau de l'abondance naturelle, les changements de teneurs en isotopes sont très faibles. La notion qui permet d'étudier ces variations par rapport à une référence internationale est la **déviaton isotopique**  $\delta$ , exprimé en pour mille (‰). L'analyse de la déviation en  $^{15}\text{N}$  est étudiée par rapport à l'azote atmosphérique.

$$\delta(^{15}\text{N}) = \frac{R_{\text{éch}} - R_{\text{std}}}{R_{\text{std}}} \cdot 1000$$

### 1.4.2 Méthodes d'analyse isotopique

Le rapport isotopique en abondance naturelle d'un même élément peut être déterminé directement par spectrométrie de masse de rapport isotopique (irm-MS), par RMN quantitative, ou par spectrométrie de laser infrarouge. Chaque technologie à ses avantages et ses inconvénients.

La méthode par irm-MS est la mieux adaptée à la mesure de différents éléments (H, C, N, O, S) mais ne donne qu'une valeur globale (désignée  $\delta_g\%$ ) pour le produit introduit dans le spectromètre.

La RMN quantitative a l'avantage très important de pouvoir effectuer une mesure spécifique sur chaque site du composé (désignée  $\delta_i\%$ ), mais est actuellement limitée aux éléments H et C. Cette technique, n'ayant pas été utilisée au cours de ce travail, ne sera pas développée. Pour des exemples de son application, consultez [49, 50].

La spectroscopie d'absorption à diode laser infrarouge (TDLAS) est une technique en développement en isotopie qui permet d'effectuer des mesures de teneurs isotopiques pour les éléments N, C et O à partir de traces de gaz ( $N_2O$ , CO et  $CO_2$  respectivement) mais avec une précision encore peu satisfaisante [51] [52].

#### **1.4.2.1 Mesure de Rapport Isotopique par Spectrométrie de Masse (irm-MS) : principes**

La technique la plus souvent utilisée pour déterminer les rapports isotopiques d'un composé donné est la spectrométrie de masse de rapport isotopique. Le principe général de cette méthode est la transformation d'un échantillon organique  $C_xH_yO_zN_t$  en molécules simples à l'état gazeux (par exemple  $N_2$  pour l'analyse  $^{15}N$ ). Ensuite le gaz est ionisé par impact électronique dans une chambre d'ionisation sous vide. Puis les ions formés sont accélérés grâce à un potentiel créé par un système de lentilles. Dès que les ions entrent dans l'analyseur dispersif, le champ magnétique sépare les ions en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). À chaque isotopomère correspondent une trajectoire et un détecteur de type cage de Faraday dédié à une masse spécifique. En conditions d'usage normal, le signal électrique est proportionnel à la quantité d'ions détectés. Ce courant ionique est ensuite amplifié. Par exemple, pour l'analyse de  $N_2$  on obtient les amplitudes (V) de trois  $m/z$  28, 29 et 30 qui correspondent respectivement aux masses 28 ( $^{14}N^{14}N$ ), 29 ( $^{14}N^{15}N$ ), 30 ( $^{15}N^{15}N$ ).

Les grandeurs mesurées par l'appareil sont exprimées sous la forme d'une déviation isotopique ( $\delta\%$ ). Les déviations isotopiques sont calculées par rapport à une référence de travail ( $R_{std}$  dans la formule § 1.4.1) qui est calibrée par rapport à une référence internationale. Il faut que la référence de travail soit une substance pure, stable chimiquement et thermiquement. Les références internationales ont été établies par l'Agence International d'Energie atomique (IAEA). La référence utilisée pour l'azote est le  $N_2$  atmosphérique  $A(^{15}N)=0.3663\%$  [40].

L'interfaçage de l'irm-MS avec soit un analyseur élémentaire (EA-irm-MS) ou une chromatographe en phase gazeuse (GC-irm-MS) permet l'introduction de l'échantillon en flux continu.

#### 1.4.2.2 Interfaçage avec un analyseur élémentaire (EA-irm-MS)

Le spectromètre de masse de rapport isotopique peut être couplé avec un analyseur élémentaire (Figure 16). Pour une analyse par EA-irm-MS, on peut introduire un composé pur ou un mélange de composé afin d'obtenir une valeur globale ( $\delta_g\%$ ) de l'échantillon. Dans cette technique la capsule contenant l'échantillon (qui peut être solide ou liquide) est introduite dans le four de combustion en quartz (chauffé à 1100°C) qui est constitué d'oxyde de chrome, de cuivre réduit, de cobalt argenté et d'oxyde de cobalt. L'échantillon est quantitativement transformé en  $N_2$ ,  $CO_2$  et  $H_2O$ .

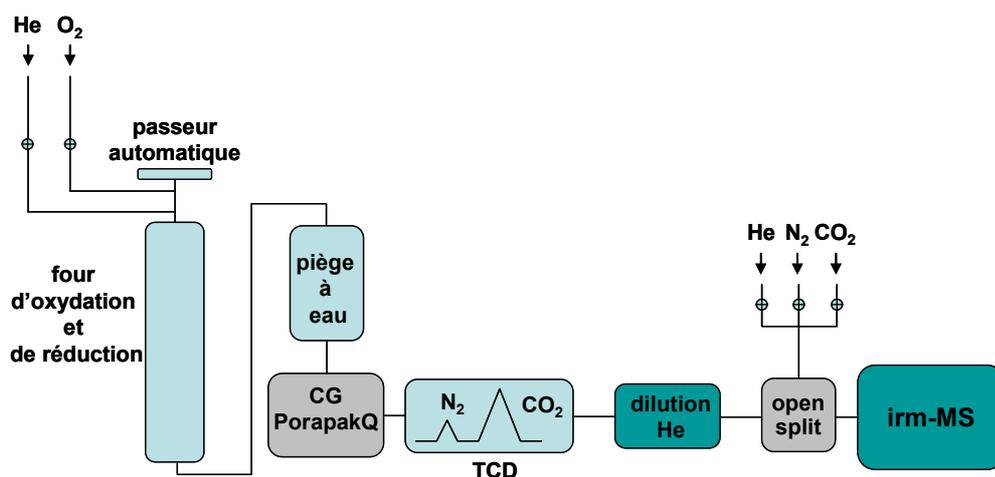
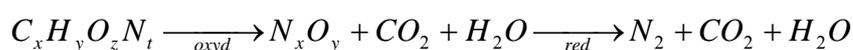


Figure 16. Schéma du spectromètre de masse de rapport isotopique couplé avec l'analyseur élémentaire

Ces gaz traversent ensuite un piège à eau (perchlorate de magnésium) puis le mélange des gaz  $N_2$  et  $CO_2$  est séparé sur une colonne chromatographique de type PORAPAK Q avec détection par un TCD (détecteur à conductivité thermique). Le détecteur donne un signal proportionnel à la quantité de chaque gaz présent et, si nécessaire, le gaz est dilué avec de l'hélium pour éviter la saturation de la source. Les deux gaz  $N_2$  et ensuite  $CO_2$  entrent dans le spectromètre et sont analysés. Certains appareils d'irm-MS permettent la mesure sur le même échantillon des rapports  $^{13}C/^{12}C$  et  $^{15}N/^{14}N$  au cours d'une seule analyse. Entre la détection du  $N_2$  et l'introduction du  $CO_2$  dans la source, le réglage du

champ magnétique est changé pour passer des masses 28, 29 et 30 aux masses 44, 45 et 46.

### 1.4.2.3 Interfaçage avec un chromatographe en phase gazeuse (GC-irm-MS)

Le couplage d'un spectromètre de masse de rapport isotopique avec un chromatographe en phase gazeuse via un système de combustion (Figure 17) est utilisé pour l'analyse des mélanges d'analytes volatils.

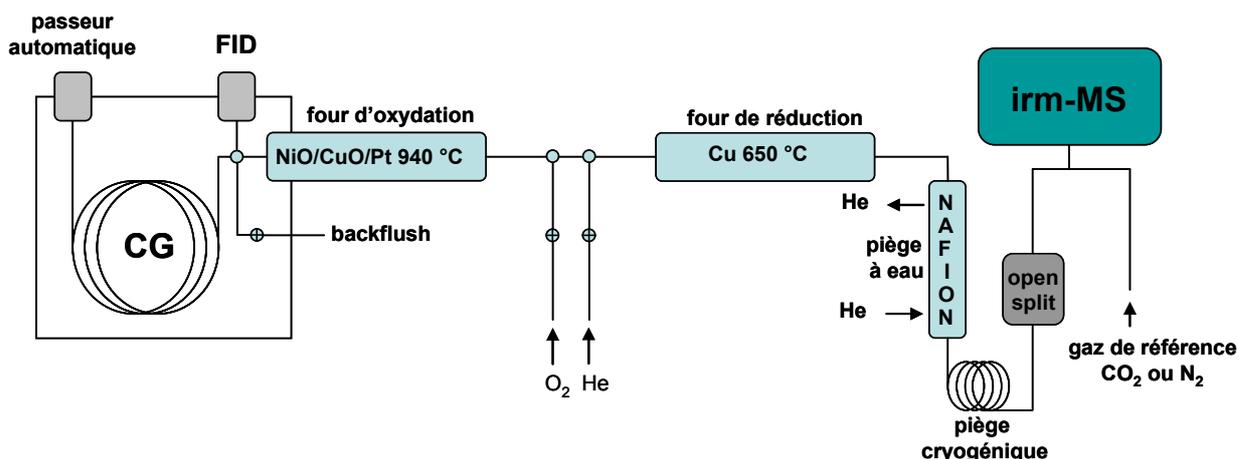


Figure 17. Schéma du spectromètre de masse de rapport isotopique couplé avec la chromatographie gazeuse et l'interface de combustion

Tout d'abord l'échantillon liquide est injecté dans le GC. Grâce à un système de retro balayage par l'hélium, le solvant et les composés qui ne sont pas intéressants peuvent être évacués du système à la sortie de la colonne chromatographique. À la fermeture de la vanne de retro balayage, les composés élués de la colonne sont transportés avec le gaz vecteur (He) vers le four d'oxydation (tube d'alumine non poreux chauffé à 940°C, qui contient des fils de nickel, cuivre et platine). L'échantillon est oxydé en gaz (N<sub>x</sub>O<sub>y</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O), puis les oxydes d'azote sont réduits dans un four de réduction chauffé à 650°C et constitué de cuivre. L'eau formée est éliminée au moyen d'une membrane Nafion (copolymère de tétrafluoroéthylène et d'acide perfluoro-3,6-dioxa-4-méthyl-7-octène-sulfonique), séchée par un courant d'hélium. Dans le cas de l'analyse en <sup>15</sup>N, avant que le gaz N<sub>2</sub> soit dirigé dans le spectromètre de masse, il traverse un piège à CO<sub>2</sub> cryogénique. Il est impératif d'éliminer le CO<sub>2</sub> pour éviter toute interférence dans la source entre le CO<sup>+</sup> ( $m/z = 28$ ) et le N<sub>2</sub><sup>+</sup> ( $m/z = 28$ ) venant de l'échantillon. Au cours d'une analyse on ne peut donc déterminer le rapport isotopique que d'un seul élément à la fois.

### 1.4.2.4 EA-irm-MS versus GC-irm-MS

La comparaison de deux techniques est présentée dans le Tableau 2.

Tableau 2. Comparaison entre l'EA-irm-MS et la GC-irm-MS		
paramètre	EA-irm-MS	GC-irm-MS
échantillon	Composé pur ou mélange de plusieurs composés : solide ou liquide	Composé pur ou mélange de plusieurs composés volatils : solide ou liquide
analyse	Détermination simultanée des valeurs de $\delta_g(^{13}\text{C})$ et $\delta_g(^{15}\text{N})$ du contenu de la capsule	Détermination de la valeur soit de $\delta_g(^{15}\text{N})$ soit de $\delta_g(^{13}\text{C})$ de plusieurs composés
quantité de composé	De l'ordre du mg.	De l'ordre du $\mu\text{g}$ (mais il s'agit de l'injection de quelques $\mu\text{L}$ d'une solution d'analyte avec une concentration de l'ordre du mg/ml)

### 1.4.3 Précision, justesse et sources d'erreurs

La **précision** est représentée par l'étroitesse de l'accord (le degré de dispersion) d'une série de mesures obtenues à partir de prélèvements multiples d'un échantillon homogène avec les conditions d'analyse prescrites. La précision est aussi appelée **fidélité** pour éviter une confusion éventuelle avec la notion de **justesse**, qui elle-même est la certitude (ou non) que la valeur déterminée est la valeur absolue [53].

Statistiquement parlant, la fidélité (la dispersion) d'une méthode s'exprimera par la variance (ou l'écart-type) d'une série de mesure d'un même échantillon. Cette précision est essentielle pour pouvoir détecter des fractionnements isotopiques au niveau de l'abondance naturelle. En fonction de l'interface couplée avec le spectromètre, la précision de mesure change faiblement. Ainsi, l'analyse isotopique des rapports  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  par EA-irm-MS est réalisée avec une précision de 0.2‰ pour ces deux éléments [54]. Par contre, à cause du fractionnement isotopique pendant l'analyse par GC-irm-MS par rapport à l'EA-irm-MS, la précision de la mesure est moins bonne pour l'azote que pour le carbone :  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  (0.4‰),  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (0.2‰).

Toutes les mesures faites par irm-MS sont des analyses comparatives car il n'est pas possible par cette méthode de mesurer une valeur de  $\delta(\text{‰})$  absolue. D'une part il est nécessaire de calibrer l'appareil avec une référence. Or, s'il existe des références internationales distribuées par l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA), celles-ci ont une disponibilité limitée et des prix élevés. Pour cette raison, il est d'usage de travailler

avec des références internes propres au laboratoire. De plus, la qualité de la mesure obtenue par irm-MS dépend de plusieurs facteurs : la bonne calibration de l'appareillage, le type d'interfaçage (pour l'analyse par GC-irm-MS on peut avoir un fractionnement au niveau de l'injecteur, de la colonne et des capillaires qui conduisent au four d'oxydation), la pureté de l'échantillon et le procédé préalable de préparation de l'échantillon.

## 1.5 Objectifs du travail

L'objectif de ce travail est la détermination des effets isotopiques cinétiques liés à la rupture de la liaison C–N associée au catabolisme de la nortropine au cours de la dégradation de la tropine par les bactéries *Pseudomonas*. Pour cela un certain nombre de problèmes devront être préalablement résolus :

- [Méthodologie pour la mesure des EI](#)

L'élucidation des mécanismes réactionnels enzymatiques par l'étude des effets isotopiques cinétiques est une démarche complexe. Il est essentiel de bien définir l'objet de l'étude et les techniques analytiques disponibles. L'optimisation du protocole et la validation de la méthode analytique sont déterminantes. L'étape suivante de mesure des effets isotopiques est aussi complexe et nécessite un savoir-faire pour la mesure aussi bien que pour l'interprétation. Ceci nécessite, donc, un développement méthodologique adapté à l'exigence de la problématique :

Développer et valider une méthode pour quantifier avec la justesse et la précision nécessaires les analytes présents en faible concentration dans la matrice aqueuse du milieu de culture?

Développer et valider une méthode pour mesurer les déviations isotopiques en  $^{15}\text{N}$  de ces analytes avec une justesse et une précision suffisantes pour permettre le calcul des effets isotopiques?

Ces aspects méthodologiques sont décrits dans le **Chapitre 2**

- [Etude du comportement métabolique](#)

Pour l'élucidation des mécanismes réactionnels de la dégradation des alcaloïdes tropaniques, les bactéries *Pseudomonas* AT3 et MS2 ont été choisies comme modèles d'étude. En effet, pour des raisons évidentes de stabilité il est beaucoup plus facile de manipuler des organismes cellulaires que des enzymes isolées. De plus la croissance des bactéries est relativement rapide (quelques heures) et répétable et les quantités de substrats nécessaires à mettre en jeu sont acceptables. La dégradation de l'atropine par *Pseudomonas* AT3 et MS2 a été étudiée en détails dans les années 90 (voir § 1.2.2) [32] et la nortropine a été identifiée comme produit de déméthylation de la tropine. Par contre une des complexités du système d'étude est liée à l'existence d'équilibres entre tropine et tropinone d'une part et nortropine et nortropinone d'autre part. L'utilisation de composés marqués au deutérium : la [3-<sup>2</sup>H]tropine et la [3-<sup>2</sup>H]pseudotropine a permis de prouver que la pseudotropine est utilisée comme substrat par les bactéries *Pseudomonas* AT3 et MS2 et que ce composé est dégradé directement sans épimérisation préalable en tropine [18]. En conséquence, une étude du comportement métabolique de *Pseudomonas* AT3 et MS2 a été nécessaire pour tenter de répondre aux questions telles que :

Existe-il une réaction d'épimérisation entre (nor)pseudotropine et (nor)tropine?

Est-il possible d'inhiber cette épimérisation?

Les flux sont-ils mono- ou bidirectionnels (réaction réversible)?

Ce travail est rapporté dans le **Chapitre 3**

- [Mesure du fractionnement isotopique et calcul des effets isotopiques](#)

Les études, entreprises précédemment au laboratoire, des mécanismes réactionnels de la dégradation de la tropine [1] et de la nortropine [3] [2] par les bactéries *Pseudomonas* AT3 et MS2 ont été poursuivies. Dans ce contexte l'EIC-<sup>15</sup>N de la déméthylation de la tropine a été mesuré et une valeur de 0.9969 (écart-type 0.0009) obtenue. Le mécanisme postulé, encore actuellement à l'étude par le biais de calculs théoriques, consiste en une oxydation du groupe méthyle par l'intervention de l'enzyme cytochrome P450 monooxygénase CYP101 [1]. D'autre part, des mesures préliminaires de l'EIC-<sup>15</sup>N de la dégradation de la nortropine ont été entreprises et une valeur de 0.9946 (écart-type 0.0006) a été obtenue [2]. Pourtant, lors des cultures sur nortropine, l'accumulation de quantité importante de norpseudotropine a été constatée, liée à la réaction métabolique d'isomérisation. Ceci peut potentiellement fausser les résultats obtenus pour l'EIC. Il était donc essentiel de comprendre l'impact de cet

échange entre nortropine et norpseudotropine et de tenter de déterminer les EIC sur les deux composés indépendamment. En conséquence, une étude de l'influence de l'isomérisation sur la mesure d'EIC a été conduite pour répondre aux questions telles que :

Les valeurs de l'EIC en  $^{15}\text{N}$  et  $^2\text{H}$  pour la fission de la liaison C–N pour la nortropine et pour la norpseudotropine sont-elles fiables ?

Les valeurs de l'EIC en  $^{15}\text{N}$  et  $^2\text{H}$  pour la fission de la liaison C–N pour la nortropine et pour la norpseudotropine sont-elles identiques ?

Un mécanisme peut-il être proposé pour la réaction de coupure de liaison C-N ?

Ce travail fait l'objet du **Chapitre 4**

# Chapitre 2 : Développement d'une méthode de mesure des effets isotopiques cinétiques

## 2.1 Introduction

Pour les études des EICs, une fois le modèle biologique défini, il est nécessaire de choisir un protocole analytique qui permette la quantification des métabolites et le suivi de l'évolution des déviations isotopiques pendant la dégradation des composés étudiés. Le développement d'une telle méthode requiert la mesure précise du degré d'avancement de la réaction et donc la nécessité de pouvoir quantifier précisément et avec justesse les concentrations en substrats. Pour cela la quantification par GC semble la mieux adaptée.

L'analyse par GC nécessite une extraction préalable des alcaloïdes du milieu de culture, l'injection directe n'étant pas adaptée (milieux aqueux, charge minérale importante, concentration des analytes faible, effets de matrice...). Il existe beaucoup de méthodes différentes permettant l'extraction des alcaloïdes tropaniques [55]. Généralement les alcaloïdes tropaniques sont solubles dans l'eau, donc la méthode classique d'extraction liquide/liquide (ELL) des alcaloïdes d'une solution aqueuse basique par un solvant organique est très utilisée. Parfois l'extraction est favorisée par un changement de la force ionique de la solution par saturation de la phase aqueuse par du chlorure de sodium. Il est également possible d'utiliser des méthodes par extraction en phase solide (EPS). La nortropine possède un cycle composé de sept atomes de carbone; elle peut donc générer des interactions hydrophobes avec une phase hydrophobe. La nortropine peut également permettre des interactions polaires via son groupement hydroxyle ou amino, voire ioniques selon le pH, avec le groupement amino. L'extraction des alcaloïdes tropaniques par des phases inverses apolaires (par exemple silice greffée par une chaîne hydrocarbonée C8 ou C18) est donc possible ainsi que par des phases échangeuses d'ions.

Pour obtenir un protocole d'extraction de la nortropine à partir du milieu bactérien qui soit le plus efficace, plusieurs méthodes d'extraction ont été (ré)évaluées (voir § 2.2 ci-dessous) [2, 3] et en particulier les méthodes d'extraction liquide/liquide et en phase échangeuse d'ions. Pour les études sur la tropine menées au laboratoire, la quantification a été effectuée soit par GC après extraction des alcaloïdes du milieu de culture bactérien, soit directement sur le milieu bactérien par RMN <sup>1</sup>H. Pour les extractions, c'est l'extraction en phase solide qui a été retenue.

L'extraction des alcaloïdes nortropaniques sur une phase échangeuse d'ions (cartouche Discovery® DSC-SCX Supelco) a permis de récupérer la nortropine•HCl avec un taux de recouvrement supérieur à 90%, mais assez variable [2]. L'analyse par GC a été effectuée sur une colonne Supelco PTA-5 (5% diphényl / 95% diméthyl polysiloxane), spécialement dédiée aux composés polaires contenant de l'azote. La mesure par RMN <sup>1</sup>H de la concentration en nortropine n'a pas pu être effectuée correctement à cause de l'apparition de massifs parasites dus à des composés de dégradation de la nortropine ayant des déplacements chimiques très proches de ceux de la nortropine [2].

D'autre part, il faut rappeler que cette méthode d'extraction doit également permettre de mesurer la teneur isotopique en <sup>15</sup>N des composés à chaque degré d'avancement de la réaction. Pour cela :

- le rendement d'extraction doit être supérieur à 90%, voire quantitatif,
- la résolution en GC doit être  $\geq 14$ ,
- les molécules introduites dans l'IRM-MS doivent être compatibles avec tout le système de l'appareil.

Après un bref résumé des diverses méthodologies testées, la méthode retenue et sa validation sont présentées dans la partie suivante.

## **2.2 Développement d'une méthode d'extraction directe des alcaloïdes à partir du milieu de culture**

### **2.2.1 Extraction liquide/liquide (ELL)**

Quatre solutions aqueuses de nortropine, nortropinone, tropine et tropinone de concentrations connues et avec un pH > 12 (voir pK<sub>a</sub> Tableau 4) ont été préparées et le recouvrement par différents solvants a été testé (dichlorométhane, acétate d'éthyle, diéthyle éther). Une solution de nortropine a été extraite trois fois (v/v) par chacun de solvants d'extraction, la phase organique a été séchée au sulfate de magnésium, puis évaporée. Le taux de recouvrement a été calculé après pesée des composés extraits (Tableau 3).

Il a été constaté que c'est le dichlorométhane qui donne les meilleurs taux d'extraction malgré des rendements peu satisfaisants.

**Tableau 3. Taux de recouvrement des alcaloïdes tropaniques : influence de la nature du solvant d'extraction**

Composé	Solvant	Concentration	Recouvrement (%)
		Initiale (mM)	
nortropine	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	41.5	47
nortropine	AcOEt	41.5	17
nortropine	Et <sub>2</sub> O	41.5	14

Ensuite, chaque solution a été extraite trois fois (v/v) par du dichlorométhane puis les phases organiques ont été séchées au sulfate de magnésium (Tableau 4). Si le taux de recouvrement des composés cétoniques peut être considéré comme acceptable (> 90%), pour les alcools (tropine et nortropine) cette technique n'est pas bien adaptée car les taux de recouvrement obtenus sont faibles.

**Tableau 4. Taux de recouvrement des alcaloïdes tropaniques : influence de la nature du composé**

Composé	Concentration		Recouvrement	
	Initiale (mM)	pK <sub>a</sub> <sup>a)</sup>	sans NaCl (%)	avec NaCl (%)
tropine	53.2	10.8	48	
tropinone	42.3	8.9	94	
nortropine	41.5	10.9	24	21
norpseudotropine	40.7	10.9		10
nortropinone	41.6	9.2	93	75

<sup>a)</sup> [55]

L'augmentation de la charge minérale (saturation en NaCl) n'a pas amélioré les taux de recouvrement mais, au contraire, a diminué ceux-ci pour la nortropine, la norpseudotropine et la nortropinone.

Cette série d'essais montre que l'extraction en mode ELL n'est pas bien adaptée à notre cas, les taux de recouvrement sont trop peu élevés et très variables d'un composé à l'autre. Ces conditions ne sont donc pas adaptées pour la quantification par GC en particulier pour les faibles concentrations attendues en fin de culture.

## 2.2.2 Extraction en phase solide (EPS)

Pour cette méthode nous avons choisi une phase stationnaire de type échangeur fort de cation SCX (groupement sulfonate) (voir protocole 5.1.1). En raison du contenu en

microéléments dans le milieu bactérien, les études ont été menées à la fois sur des solutions aqueuses et sur le milieu de culture afin de vérifier les effets de matrices. Préalablement, la composition du milieu de culture a été optimisée pour éviter la saturation de la phase stationnaire par les ions minéraux présents dans le milieu (voir protocole 5.5.1 et § 3.1). Dans chaque cas, le pH a été ajusté à 7.2 (protonation des groupements amino). Le taux de recouvrement a été évalué après quantification par GC selon la méthode développée au laboratoire [3].

Dans un premier temps les taux de recouvrement à partir des solutions aqueuses ont été mesurés et sont présentés dans le Tableau 5.

<b>Tableau 5. Taux de recouvrement des alcaloïdes tropaniques à partir des solutions aqueuses</b>			
<b>Composé</b>	<b>Quantité de composé déposé sur la colonne (mg)</b>	<b>Quantité de composé récupéré (mg)</b>	<b>Recouvrement (%)</b>
nortropine	5	4.07	81
		4.87	97
norpseudoatropine	5	4.61	92
		5.03	99

Ensuite les taux de recouvrement ont été mesurés pour les mêmes composés, seuls ou en mélange, à partir des milieux de cultures (Tableaux 6 et 7).

<b>Tableau 6. Taux de recouvrement des alcaloïdes tropaniques à partir des milieux cultures</b>			
<b>Composé</b>	<b>Quantité de composé déposé sur la colonne (mg)</b>	<b>Quantité de composé récupéré (mg)</b>	<b>Recouvrement (%)</b>
nortropine	10	8.75	88
		8.42	84
		8.17	82
norpseudoatropine	10	8.96	90
		7.80	78
		8.24	82

Les résultats montrent que les taux de recouvrement ne sont pas satisfaisants pour une quantification par GC en particulier pour les faibles concentrations attendues en fin de culture.

**Tableau 7. Taux de recouvrement des alcaloïdes tropaniques en mélange à partir des milieux de cultures**

Expérience	Alcaloïde	Quantité de composé déposé sur la colonne (mg)	Quantité de composé récupéré (mg)	Recouvrement (%)
1	nortropine	3.3	2.72	82
	norpseudotropine		3.07	93
2	nortropine	3.3	2.79	85
	norpseudotropine		3.01	91

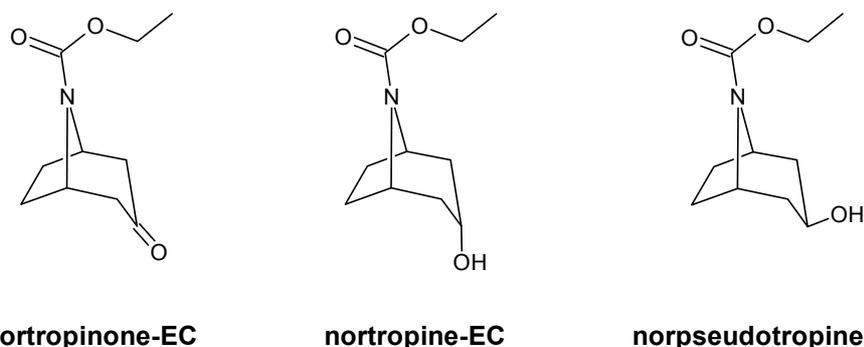
### 2.3 Développement d'une méthode d'extraction après dérivation des alcaloïdes à partir du milieu de culture

Les essais d'extraction par ELL et EPS n'ayant pas été satisfaisants en termes de taux de recouvrement, il a été nécessaire de développer une nouvelle méthode faisant appel à une dérivation préalable *in situ* des composés. Cette dérivation doit également permettre l'amélioration des conditions d'analyse par GC. En effet, pour les alcaloïdes étudiés nous avons constaté des effets d'adsorption importants engendrant des pics dissymétriques et ce malgré la phase stationnaire spécialement désactivée ainsi que des pertes variables par adsorption au niveau de l'injecteur (perte de sensibilité, diminution de la précision). Les groupements hydroxyle et amino présents dans la molécule sont à l'origine de ces interactions indésirables, les groupements amino, en particulier, sont connus pour engendrer ce type de problème. Ces mêmes groupements sont impliqués dans la solubilité excessive dans la phase aqueuse pour les extractions liquide/liquide et constituent donc notre cible. La stratégie a donc été de bloquer le ou les groupes fonctionnels (amino, hydroxyle) et de trouver des conditions de séparation des dérivés satisfaisantes pour un transfert vers la GC-irm-MS (résolution  $R \geq 14$ ). Pour les méthodes de dérivation testées, toutes les structures des dérivés ont été confirmées par spectrométrie de masse et les rendements estimés par GC.

#### 2.3.1 Dérivation sous forme de carbamate

Cette méthode de dérivation (chloroformiate d'éthyle/pyridine) (protocole 5.2.1) peut être effectuée directement dans le milieu de culture et affecte sélectivement le groupement amino [56, 57]. Le protocole a été appliqué au mélange de nor(pseudo)tropine et nortropinone. L'analyse des produits de la réaction par GC-MS a confirmé la formation de

dérivés éthylcarbamates (composés EC) pour les trois composés avec toutefois des rendements après extraction peu satisfaisants : nortropine-EC 42%, norpseudotropine-EC 47% et la nortropinone 45% (Figure 18). De plus, la résolution des pics pour les dérivés de la nortropine et de la norpseudotropine n'est pas suffisante ( $R=1.9$ ) pour envisager une exploitation de la méthode en GC-irm-MS.



**Figure 18. Structures des dérivés carbamates obtenus après réaction avec le chloroformiate d'éthyle**

### 2.3.2 Dérivation sous forme de carbamate suivie d'une acylation

Dans le but d'améliorer la séparation, les dérivés carbamates ont été acylés de façon à dériver également la fonction hydroxyle. Plusieurs dérivés ont été testés.

Acétylation (anhydride acétique/pyridine) (voir protocole 5.2.2) : Après analyse, on constate que la nortropinone-EC n'a pas réagi avec l'anhydride acétique comme prévu. La norpseudotropine-EC a été acétylée quantitativement au niveau du groupement hydroxyle, mais, pour la nortropine-EC, un mélange de produit non réagi et de composé di-substitué (fonctions hydroxyle et amino) en rapport 3/7 a été obtenu. D'autre part, le gain de résolution en GC entre nortropine-EC-Ac et norpseudotropine-EC-Ac est insuffisant ( $R=2.4$ ) pour justifier une optimisation des conditions réactionnelles.

Benzoylation (anhydride benzoïque/pyridine) (voir protocole 5.2.2) : Dans le cas de l'anhydride benzoïque les trois alcaloïdes-EC ont pu être dérivés spécifiquement et quantitativement mais les deux produits (nortropine-EC-Bnz et norpseudotropine-EC-Bnz) sont très mal séparés ( $R=0.7$ ) en GC.

Butyrylation (anhydride butyrique /pyridine) (voir protocole 5.2.2) : De nouveau la nortropine-EC n'a pas réagi quantitativement. Le ratio entre la forme nortropine-EC et la nortropine-EC-But est de 1/2.5. La résolution des pics entre nortropine-EC-But et norpseudotropine-EC-But est de  $R=3.2$ , valeur trop peu satisfaisante.

### 2.3.3 Dérivation par acétylation directe

Pour la tropinone, la réaction est quantitative (protocole 5.2.3). Pour la norpseudotropine les deux groupements ont été dérivés quantitativement. Pour la nortropine on obtient un mélange de mono et di-dérivés. La résolution, en chromatographie pour les di-dérivés est jugée insuffisante ( $R=2.4$ ) pour justifier une optimisation des conditions réactionnelles.

### 2.3.4 Choix de la méthode

La méthode de dérivation qui s'est avérée la plus intéressante est la dérivation par le chloroformiate d'éthyle car il ne conduit qu'à la formation d'un seul produit (Figure 18), malgré une résolution insuffisante en GC pour envisager un transfert vers la GC-irm-MS. La stratégie adoptée a donc été de chercher à améliorer la résolution en GC. Une fois le groupement amino dérivé sous forme de carbamate, limitant ainsi les phénomènes d'adsorption, il est apparu opportun d'exploiter la différence entre les groupements hydroxyles *endo* et *exo* en utilisant une phase stationnaire polaire type polyéthylène glycol (PEG) désactivée (Phenomenex ZB-WAX). Le programme développé en GC (voir protocole 5.3.2) permet d'obtenir sur cette colonne une résolution de  $R=13.6$  entre nortropine-EC et norpseudotropine-EC avec une symétrie des pics satisfaisante ( $As=1.45$ ), et une très bonne résolution ( $R=45.2$ ) entre nortropine-EC et nortropinone-EC. Les résolutions obtenues étant maintenant suffisantes, le protocole de dérivation a été optimisé.

### 2.3.5 Optimisation du rendement de dérivation en carbamate

Parmi les paramètres testés pour l'optimisation ont été vérifiés l'effet du pH initial, le nombre d'équivalents de réactifs nécessaires, la concentration des composés (substrat et réactifs), le solvant d'extraction. Seule la concentration croissante des composés a eu un effet positif sur le rendement (probablement du à de meilleurs taux de recouvrements). Toutefois, pour une concentration de 5 mg/mL (39.4 mM) en nortropine, le rendement global ne dépasse pas 83%.

Pour une optimisation plus poussée, il a été décidé d'élaborer un nouveau protocole à partir des deux méthodes décrites dans la littérature [56, 57] (protocole 5.2.4). Les deux modifications principales par rapport à l'ancienne méthode sont : (i) l'élimination de la pyridine comme catalyseur et (ii) l'introduction du chloroformiate d'éthyle en solution dans du

dichlorométhane, un système bi-phasique permettant d'éviter la dégradation du réactif. Les extractions sont réalisées à l'acétate d'éthyle. Le nouveau protocole a permis d'obtenir des rendements de 90 à 95% (Tableau 8).

<b>Tableau 8. Rendements de dérivation des alcaloïdes nortropaniques par le chloroformiate d'éthyle</b>	
<b>Alcaloïde</b>	<b>Recouvrement (%)</b>
nortropinone-EC	91
nortropine-EC	93
norpseudotropine-EC	95

## 2.4 Validation du protocole d'analyse quantitative par GC-FID

Du point de vue de la mesure quantitative, nécessaire au calcul des effets isotopiques (degré d'avancement de la réaction), il est essentiel d'avoir une méthode la plus juste et la plus précise possible. Pour cela une méthode de dosage en chromatographie gazeuse avec étalonnage interne a été développée sur la base des conditions expérimentales précédemment établies.

### 2.4.1 Choix de l'étalon interne

Dans un premier temps, il a été décidé d'évaluer la pertinence de composés azotés comme étalon interne, cet étalon pouvant servir tout à la fois d'étalon interne pour la quantification et d'étalon interne azoté pour la mesure isotopique. Les alcaloïdes testés (tropine et pseudotropine) n'ont pas été retenus en raison d'une trop forte adsorption sur la colonne ZB-WAX. Un autre composé testé, la *N*-méthyl-4-piperidinol (4NMP) n'a également pas été retenu en raison de la formation de sous-produits avec le réactif de dérivation. D'autres composés azotés ont été testés (quinoline, 3-diméthylamino-1-propylamine, 4,4'-bipyridyl, diméthylamine pyridine, 2,3-diméthyle indole, indole, caféine, 3-quinclidinol, nicotine et 4-aminoacétophénone) sans qu'aucun ne donne satisfaction. Il a donc été décidé d'utiliser deux étalons différents pour la quantification et la mesure isotopique. Pour la quantification c'est le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylphenol (BHT) qui a été retenu.

Dans les conditions chromatographiques détaillées en protocole 5.3.2, les temps de rétention sont : BHT, 10.93 min; nortropinone-EC, 14.02 min; nortropine-EC, 15.75 min; norpseudotropine-EC, 16.20 min.

## 2.4.2 Vérification de la linéarité

La linéarité de la réponse a été étudiée sur une gamme de concentration allant de 0.5 à 3.0 mg/mL ce qui correspond à des concentrations dans le milieu d'approximativement 2.5 à 15 mM (Figure 19). Les coefficients de détermination mesurés sont satisfaisants. Concernant les coefficients de réponse relatifs, les écarts-types sur la gamme 0.5 à 3.0 mg/mL sont inférieurs à 0.1 et les coefficients de variation inférieurs à 5.5 % (Tableau 9).

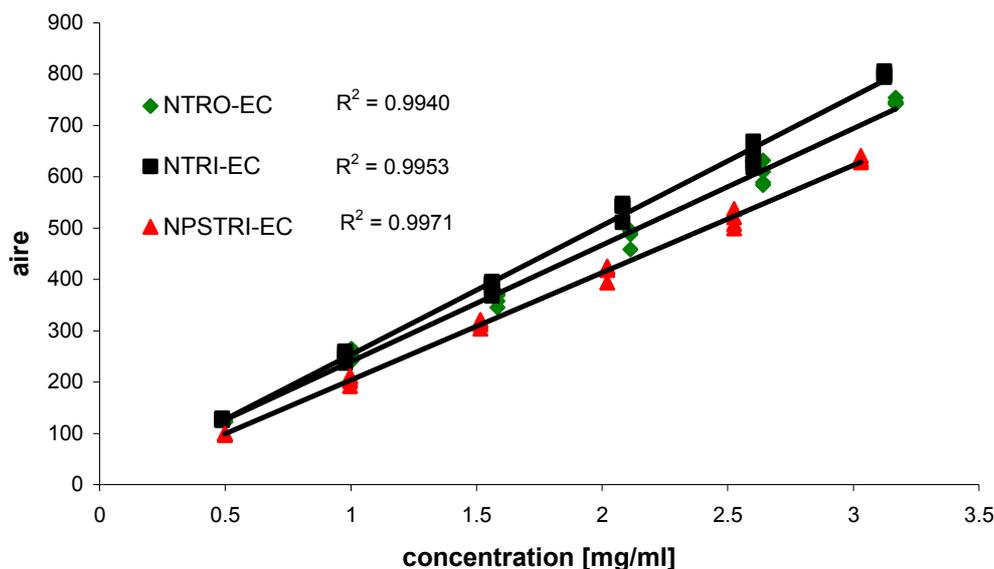


Figure 19. Etude de la linéarité pour la quantification par GC des dérivés EC des alcaloïdes avec le BHT comme étalon interne

Tableau 9. Coefficients de réponse relatifs dérivés EC des alcaloïdes (0.5 à 3.0 mg/mL) / BHT (1 mg/mL)			
composé	Nortropinone-EC	Nortropine-EC	Norpseudotropine-EC
	$K_{\text{NTRO-EC}}/K_{\text{BHT}}$	$K_{\text{NTRI-EC}}/K_{\text{BHT}}$	$K_{\text{NPSTRI-EC}}/K_{\text{BHT}}$
Moyenne	1.82	1.71	2.11
Écart-type	0.09	0.05	0.03
CV (%)	5.4	2.8	1.3

Il est intéressant de noter que pour les composés les plus importants (nortropine et norpseudotropine) les écarts-types sont inférieurs à 0.1 et les coefficients de variation inférieurs à 2.8%.

## 2.4.3 Validation de la méthode de quantification dans les milieux de croissance bactériens

### 2.4.3.1 Validation dans la gamme de concentrations biologiques

Le protocole a été validé pour une gamme de concentrations allant de 1.7 à 8.0 mM. La limite basse de 1.7 mM est la concentration minimale permettant le recouvrement d'une quantité suffisante d'échantillon pour effectuer une mesure de déviation isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  par GC-irm-MS. La limite haute de 8 mM est la concentration correspondant au seuil de toxicité pour les bactéries.

Le protocole a été vérifié pour chacun des trois alcaloïdes aux niveaux des seuils bas et hauts (protocole 5.2.5). Chaque mesure a été répétée trois fois (3 x 17  $\mu\text{mol}$  et 3 x 80  $\mu\text{mol}$  dans 10 mL de l'eau). Les résultats montrent qu'on obtient aux deux niveaux de concentration des taux de recouvrement en dérivés carbamates quasi quantitatifs : nortropinone-EC (96%, écart-type 3%), nortropine-EC (98%, écart-type 1%) et norpseudotropine-EC (96%, écart-type 3%) (Tableau 10, Figure 20).

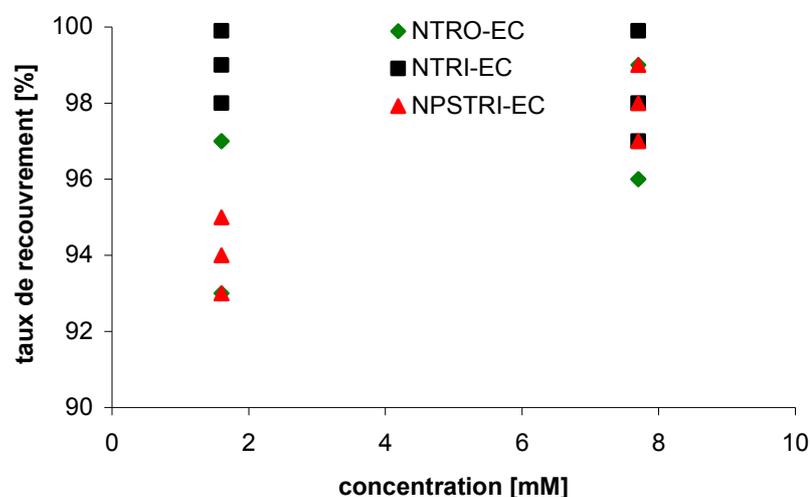
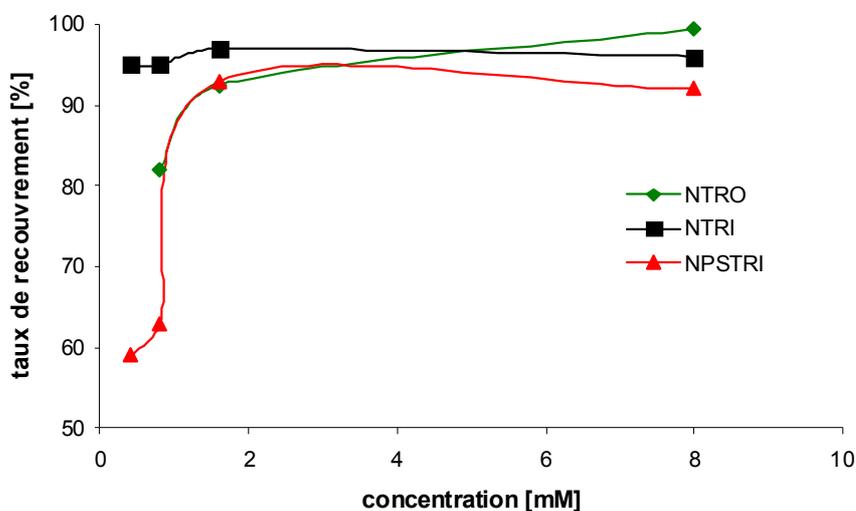


Figure 20. Taux de recouvrement des alcaloïdes en fonction de la concentration initiale

### 2.4.3.2 Vérification des interactions entre composés

Il s'agit de vérifier s'il existe d'éventuelles interactions entre les composés au cours du protocole. Les vérifications ont été faites sur une gamme de concentration allant de 0.4 mM à 8 mM dans l'eau (protocole 5.2.5). Les taux de recouvrement montrent une bonne répétabilité des résultats pour une gamme allant de 1.6 à 8.0 mM avec des valeurs très

satisfaisantes : nortropinone-EC (95%, écart-type 4%), nortropine-EC (95%, écart-type 2%) et norpseudotropine-EC (94%, écart type 2%). Pour les concentrations inférieures à 1.6 mM les taux de recouvrements sont variables (57 à 95%), (Tableau 11, Figure 21).



**Figure 21. Taux de recouvrement des alcaloïdes en fonction de la concentration initiale : vérification des interactions entre composés**

#### 2.4.3.3 Vérification des effets de matrice

Les mesures seront effectuées en milieu biologique, il faut donc s'assurer d'éventuels effets de matrice en appliquant en parallèle le protocole sur des solutions dans l'eau et dans le milieu de culture (protocole 5.2.5). Les mesures ont été réalisées à la concentration limite basse pour chacun des composés sans observer de différences significatives (Tableau 12).

**Tableau 10. Validation dans la gamme de concentrations biologiques : taux de recouvrement (%) et déviation isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) des dérivés carbamates**

Composé	Echantillon	Taux de recouvrement			Déviation isotopique			
		Composé initial ( $\mu\text{mol}$ )	Composé dérivé ( $\mu\text{mol}$ )	Recouvrement <sup>a)</sup> (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) <sup>b)</sup>	Ecart-type <sup>b)</sup>	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Ecart-type
nortropinone	NTRO <sup>c)</sup>						-6.8	0.2
	NTRO-EC <sup>c)</sup>						-6.1	0.1
	1	16.9	16.5	97	-6.5	0.2		
	2	17.3	15.9	93	-6.7	0.3	-6.7	0.3
	3	15.9	15.5	97	-6.9	0.1		
	4	76.5	76.1	99	-6.5	0.2		
	5	78.6	75.4	96	-6.2	0.1	-6.3	0.2
6	72.0	69.1	96	-6.3	0.1			
nortropine	NTRI <sup>c)</sup>						-9.0	0.1
	NTRI-EC <sup>c)</sup>						-9.0	0.1
	1	16.3	16.0	98	-7.6	0.1		
	2	15.5	15.5	99.9	-8.1	0.5	-7.8	0.3
	3	15.5	15.3	99	-7.9	0.1		
	4	81.0	78.4	97	-6.9	0.4		
	5	81.0	80.9	99.9	-7.1	0.2	-6.9	0.3
6	80.1	78.6	98	-6.7	0.1			
norpseudotropine	NPSTRI <sup>c)</sup>						-8.6	0.1
	NPSTRI-EC <sup>c)</sup>						-7.7	0.1
	1	18.9	18	95	-6.6	0.3		
	2	18.9	17.9	93	-7.1	0.1	-7.1	0.6
	3	14.4	13.5	94	-7.5	0.9		
	4	81	79	98	-7.2	0.2		
	5	78.7	76.4	97	-7.0	0.1	-7.0	0.2
6	79.6	78.9	99	-6.8	0.1			

<sup>a)</sup> Chaque échantillon a été analysé trois fois par GC-FID.

<sup>b)</sup> Chaque échantillon a été analysé trois fois par GC-irm-MS.

<sup>c)</sup> Chaque composé a été analysé quatre fois par EA-irm-MS.

**Tableau 11. Vérification des interactions entre composés : taux de recouvrement (%) et déviation isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) des dérivés carbamates**

Mélange			Taux de recouvrement			Déviation isotopique			
Concentration (mM)	Composé	mesure	Composé initial ( $\mu\text{mol}$ )	Composé dérivé ( $\mu\text{mol}$ )	Recouvrement <sup>a)</sup> (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) <sup>b)</sup>	Ecart-type <sup>b)</sup>	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Ecart-type
~0.4	NTRO	1	3.8	3.0	79	-7.8	0.1	-7.6	0.3
		2		3.4	89	-7.5	0.3		
	NTRI	1	3.9	3.7	95	-8.5	0.2	-8.3	0.3
		2		3.7	95	-8.0	0.2		
	NPSTRI	1	4.1	2.4	59	-7.3	0.1	-6.8	0.5
		2		2.4	59	-6.3	0.2		
~0.8	NTRO	1	7.7	5.9	77	-7.3	0.3	-7.0	0.4
		2		6.3	82	-6.8	0.4		
	NTRI	1	7.8	7.4	95	-8.0	0.3	-7.9	0.3
		2		7.4	95	-7.8	0.2		
	NPSTRI	1	8.2	4.7	57	-5.9	0.6	-5.7	0.5
		2		5.2	63	-5.5	0.4		
~1.6	NTRO	1	16.3	15.3	94	-6.4	0.5	-6.6	0.4
		2		14.7	91	-6.7	0.1		
	NTRI	1	15.9	14.9	94	-7.5	0.4	-7.7	0.3
		2		15.5	97	-7.9	0.1		
	NPSTRI	1	15.5	14.3	92	-4.5	0.2	-4.6	0.2
		2		14.4	93	-4.7	0.3		
~8.0	NTRO	1	76.8	76.8	99.9	-6.4	0.1	-6.4	0.1
		2		76.0	99	-6.4	0.2		
	NTRI	1	78.2	75.8	97	-7.4	0.1	-7.4	0.1
		2		74.9	96	-7.4	0.1		
	NPSTRI	1	78.5	74.3	95	-4.9	0.2	-4.9	0.2
		2		72.3	92	-4.9	0.1		

<sup>a)</sup> Chaque échantillon a été analysé trois fois par GC-FID.

<sup>b)</sup> Chaque échantillon a été analysé trois fois par GC-irm-MS.

**Tableau 12. Vérification des effets de matrice : taux de recouvrement (%) et déviation isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) des dérivés carbamates**

Composé	Matrice <sup>a)</sup>		Taux de recouvrement			Déviation isotopique			
			Composé initial ( $\mu\text{mol}$ )	Composé dérivé ( $\mu\text{mol}$ )	Recouvrement <sup>b)</sup> (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) <sup>c)</sup>	Ecart-type <sup>c)</sup>	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Ecart-type
nortropinone	H <sub>2</sub> O	1	17.9	17.5	98	-7.0	0.2	-7.0	0.2
	MP	2	17.0	16.2	95	-7.0	0.2		
	MP	3	16.0	15.4	96	-6.6	0.1	-6.8	0.3
nortropine	H <sub>2</sub> O	4	16.7	15.9	91	-8.1	0.1	-8.1	0.1
	MP	5	19.1	17.5	92	-7.8	0.2	-7.8	0.2
norpsudotropine	H <sub>2</sub> O	6	17.7	16.9	95	-7.8	0.2	-7.8	0.2
	MP	7	15.7	15.4	98	-7.3	0.3		
	MP	8	15.9	14.9	94	-7.7	0.2	-7.5	0.3

<sup>a)</sup> H<sub>2</sub>O l'échantillon dans l'eau; MP l'échantillon dans le milieu bactérien.

<sup>b)</sup> Chaque échantillon a été analysé trois fois par GC-FID.

<sup>c)</sup> Chaque échantillon analysé par trois fois GC-irm-MS.

**Tableau 13. Validation dans la gamme de déviations isotopiques en  $^{15}\text{N}$  en abondance naturelle : taux de recouvrement (%) et déviation isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) des dérivés carbamates**

Alcaloïde	L'échantillon <sup>a)</sup>	Taux de recouvrement			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)			
		Alcaloïde non-dérivé (μmol)	Alcaloïde dérivé (mol)	Recouvrement <sup>a)</sup> (%)	Moyenne <sup>b)</sup>	Ecart-type <sup>b)</sup>	Moyenne	Ecart-type
nortropine	Référence <sup>c)</sup>						-81.9	0.4
fraction 1	1	15.7	15.5	99	-68.7	0.3	-71.7	2.2
	2	17.0	15.2	89	-71.8	1.1		
	3	15.7	15.0	96	-73.6	1.1		
nortropine	Référence <sup>c)</sup>						49.3	1.0
fraction 3	4	20.0	15.0	75	49.2	0.7	50.0	0.6
	5	16.2	14.5	90	50.3	0.1		
	6	15.9	13.5	85	50.2	0.2		
norpseudotropine	Référence <sup>c)</sup>						-60.8	0.2
fraction 1	1	15.6	14.9	96	-54.8	2.1	-54.6	2.1
	2	15.6	14.6	94	-53.8	1.2		
	3	16.7	14.9	89	-55.2	0.9		
norpseudotropine	Référence <sup>c)</sup>						42.5	0.4
fraction 3	4	17.1	15.5	91	37.8	0.2	37.9	0.5
	5	17.3	14.6	84	37.9	0.7		
	6	19.0	16.7	88	38.1	0.1		

<sup>a)</sup> Chaque échantillon a été analysé trois fois par GC-FID.

<sup>b)</sup> Chaque échantillon a été analysé trois fois par GC-irm-MS.

<sup>c)</sup> Référence, les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) ont été mesurées par EA-irm-MS : chaque échantillon a été encapsulé et analysé deux fois.

## **2.5 Validation de la méthode pour la mesure de déviation isotopique en $\delta^{15}\text{N}$ (‰) par GC-irm-MS**

### **2.5.1 Transfert de la méthode chromatographique du GC-FID vers le GC-irm-MS**

La méthode développée en GC-FID ne peut pas être transférée directement en GC-irm-MS. En effet, le mode d'injection avec division (split) utilisé en GC-FID, où seulement une faible partie de l'échantillon (quelques %) est transférée vers la colonne, n'est pas adapté pour les mesures de déviations isotopiques pour lesquelles il est essentiel d'éviter tout fractionnement isotopique non répétable. Le mode d'injection préférentiel en GC-irm-MS est le mode sans division (splitless) où la totalité de l'échantillon est transférée vers la colonne. Ce mode nécessite une adaptation de la programmation de température du four afin de permettre une recondensation en tête de colonne suivie d'une étape de reconcentration de l'échantillon par évaporation contrôlée du solvant d'injection afin de limiter l'élargissement et l'augmentation de l'asymétrie des pics.

Un autre aspect favorisant l'élargissement des pics est le passage par les fours d'oxydation et de réduction où les phénomènes de diffusion sont plus importants que dans les colonnes capillaires. Pour nos composés, un facteur d'élargissement de 50 fois est observé, ainsi la résolution obtenue initialement de 13.6 n'est pas suffisante. Or il faut savoir qu'un fractionnement isotopique se produit durant les changements de phase ayant lieu en chromatographie et que, par conséquent, la teneur isotopique varie tout le long du pic. Pour une mesure exacte, il est donc indispensable que la totalité du pic soit pris en compte et qu'aucun recouvrement entre pics n'existe.

La nouvelle programmation de température optimisée pour le GC-irm-MS est la suivante : 35°C, 3 min; 15°C/min jusqu'à 160°C; 2°C/min jusqu'à 260°C; 260°C, 3 min (protocole 5.7.1). Grâce à cette programmation de température la résolution entre nortropine-EC et norpseudotropine-EC est suffisante pour permettre une séparation totale des pics (Figure 22).

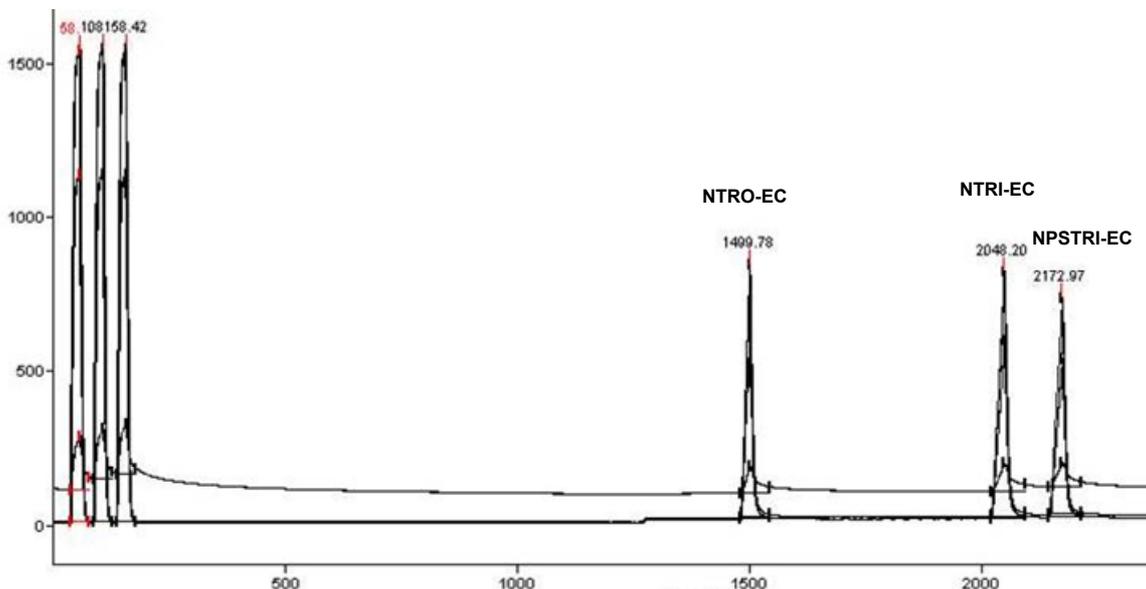


Figure 22. Séparation en GC-irm-MS des pics de nortropinone-EC, nortropine-EC et la norpseudotropine-EC

## 2.5.2 Choix de l'étalon azoté

Pour valider les mesures de déviation isotopique (protocole 5.7.1), il est préférable d'introduire un étalon azoté de teneur isotopique connue au sein de l'échantillon de façon à corriger les éventuelles dérives de l'appareil au sein d'une série ou entre séries. Deux composés ont été testés : tropine et tropinone. Les résultats obtenus avec la tropine sont peu satisfaisants avec des pics larges et des écarts-types sur les valeurs de déviation isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) supérieurs à 0.5 ‰ (10 mesures). Pour la tropinone les résultats sont meilleurs avec un écart maximum de 0.3 ‰ (10 mesures). C'est donc la tropinone qui a été retenue comme étalon.

## 2.5.3 Domaine de linéarité : déviation isotopique / amplitude du signal

Afin vérifier la gamme de linéarité de la réponse pour les dérivés, une série de solutions en concentrations croissantes (0.2; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 et 2.5 mg/mL) a été analysée par GC-irm-MS (injection de 1  $\mu\text{L}$ ) (protocole 5.7.1). Lorsque l'amplitude (en mV) de la réponse en ions de  $m/z$  28 (représentatif de la quantité de produit introduite) et la déviation

isotopique sont comparés, les valeurs de déviations isotopiques sont constantes sur la gamme de 200 à 1000 mV (de 0.5 à 2.5 mg/mL) (Figures 23 et 24).

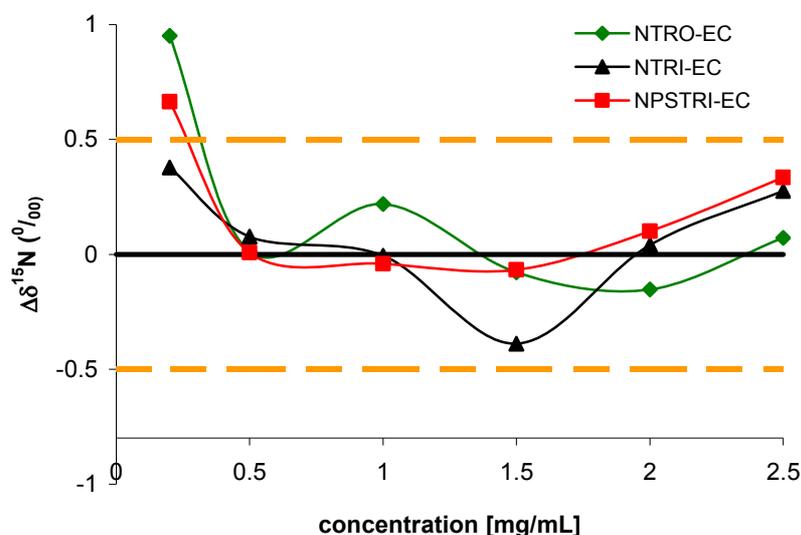


Figure 23. Variation en teneur isotopique en fonction de la quantité d'alcaloïde injecté

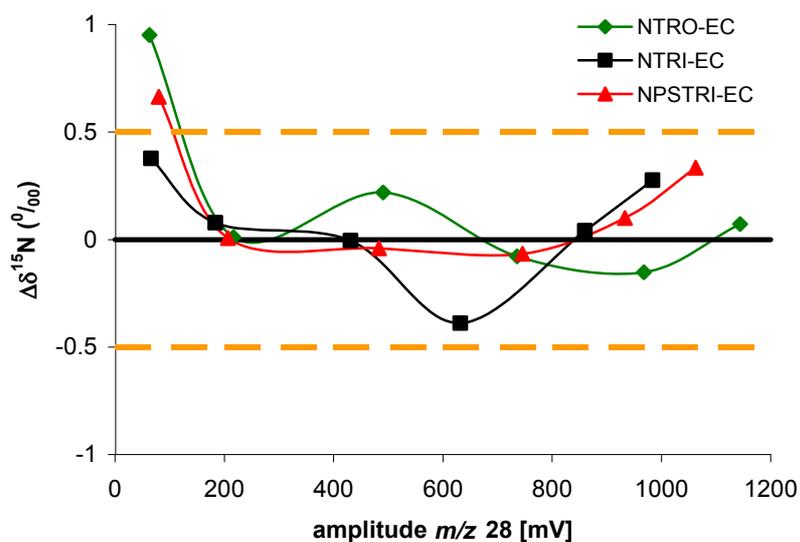


Figure 24. Variation en teneur isotopique en fonction d'amplitude du signal

#### 2.5.4 Validation de la prise d'essai

Avec le GC-irm-MS, en mode d'injection sans division, le volume injecté peut avoir une influence sur les pics (largeur, symétrie, résolution). Quatre volumes d'injection ont été testés : 0.5; 1.0; 1.5 et 2.0  $\mu$ L avec des solutions de concentration 1 mg/mL et 2 mg/mL de chaque dérivé (Figures 25-28) (protocole 5.7.1). Les résultats obtenus montrent une

influence du volume d'injection sur la mesure de déviation isotopique. Un volume d'injection d'1.0 µL a été choisi comme optimal. Lorsque le volume d'injection est de 2.0 µL, les pics sont mal séparés quelle que soit la concentration. Lorsque le volume d'injection est de 0.5 µL on observe un biais dans la mesure de déviation isotopique (enrichissement en <sup>15</sup>N).

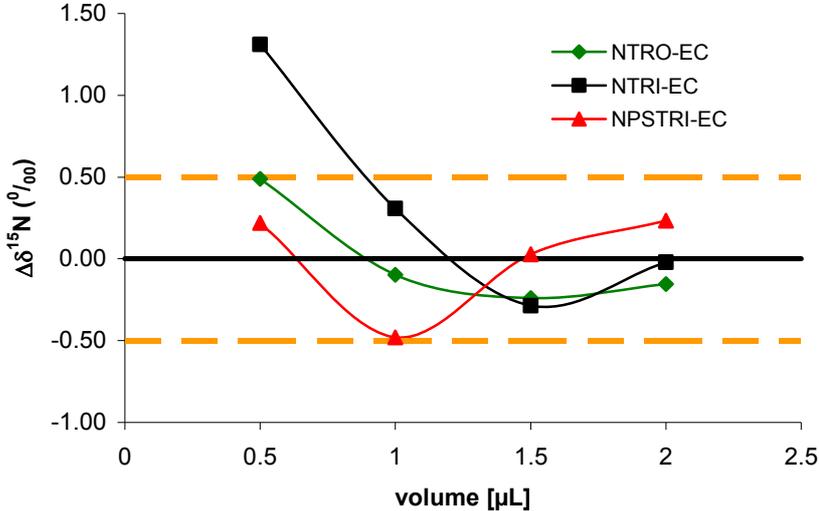


Figure 25. Variation en teneur isotopique en fonction du volume injecté (échantillon 1 mg/mL)

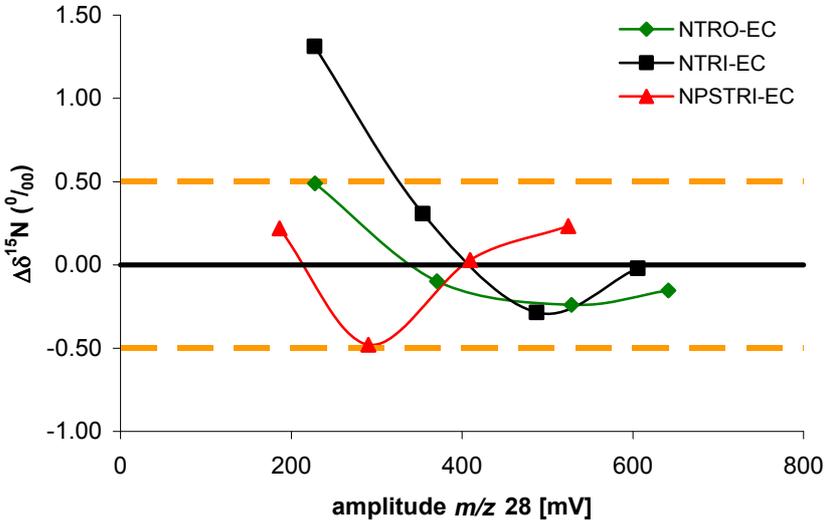
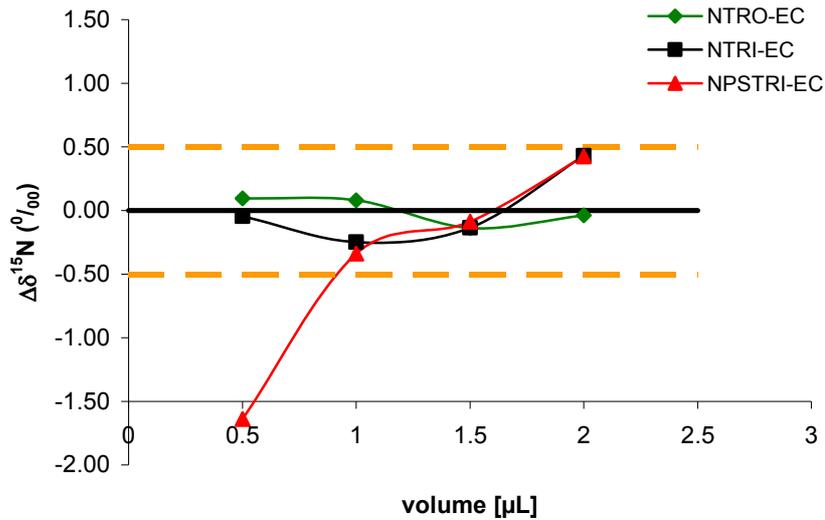
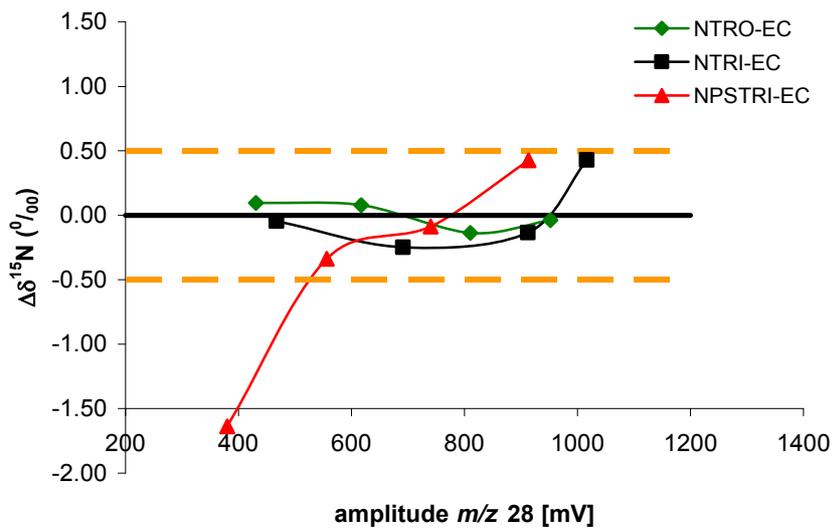


Figure 26. Variation en teneur isotopique en fonction de l'amplitude du signal : test du volume injecté (échantillon 1 mg/mL)



**Figure 27. Variation en teneur isotopique en fonction du volume injecté (échantillon 2 mg/mL)**



**Figure 28. Variation en teneur isotopique en fonction de l'amplitude du signal : test du volume injecté (échantillon 2 mg/mL)**

La quantité totale d'échantillon introduite dans le système joue un rôle dans ce constat et les écarts-types sont plus faibles pour les mesures de déviation isotopique avec la solution à 1 mg/mL (0.7‰) qu'avec la solution à 2 mg/mL (0.9‰). Les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) sont répétables (écart-type inférieur à 0.5‰) dans la gamme d'amplitude 400 à 1000 mV (qui correspond avec la concentration des alcaloïdes dérivés entre 0.5 et 2.0 mg/mL), comme observé précédemment.

## 2.5.5 Validation de la méthode dérivation/extraction : étude du fractionnement

### 2.5.5.1 Validation dans la gamme de concentrations biologiques

Le protocole a été vérifié pour chacun des trois alcaloïdes aux niveaux seuils bas et haut. Chaque mesure a été répétée trois fois (3 x 17  $\mu\text{mol}$  et 3 x 80  $\mu\text{mol}$  dans 10 mL de l'eau) (pour protocole de dérivation voir § 5.2.5 et pour protocole de mesurer  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) voir § 5.7.1). Les résultats montrent qu'on obtient aux deux niveaux de concentration des valeurs de déviation isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  répétables (Tableau 10, Figure 29). Si pour la nortropine on peut constater un écart significatif dans la déviation isotopique mesurée entre les deux niveaux de concentration, cette différence n'a pas été retrouvée lors des mesures faites pour des concentrations allant de 0.4 à 8 mM sur le mélange des alcaloïdes. Il s'agit donc probablement d'une différence due à un biais potentiel. Toutefois on peut noter que ce  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  (‰) est inférieur aux  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  (‰) que l'on peut observer au niveau métabolique.

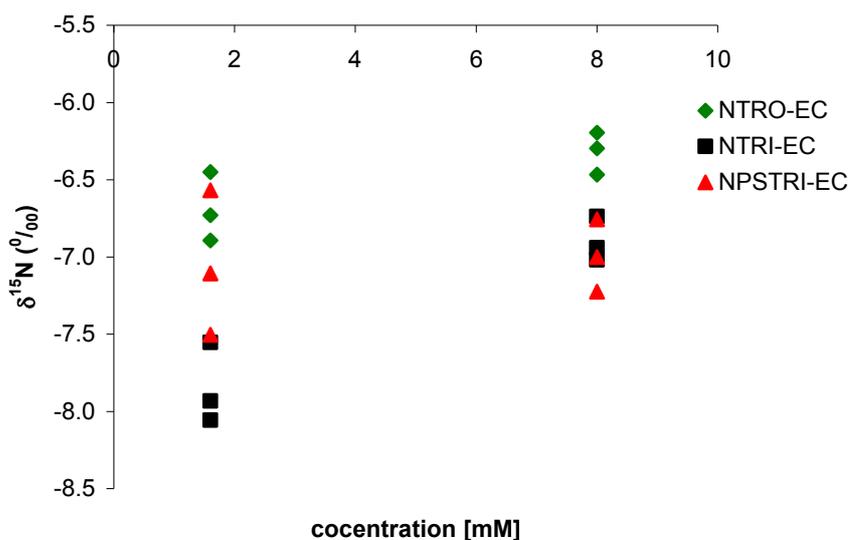
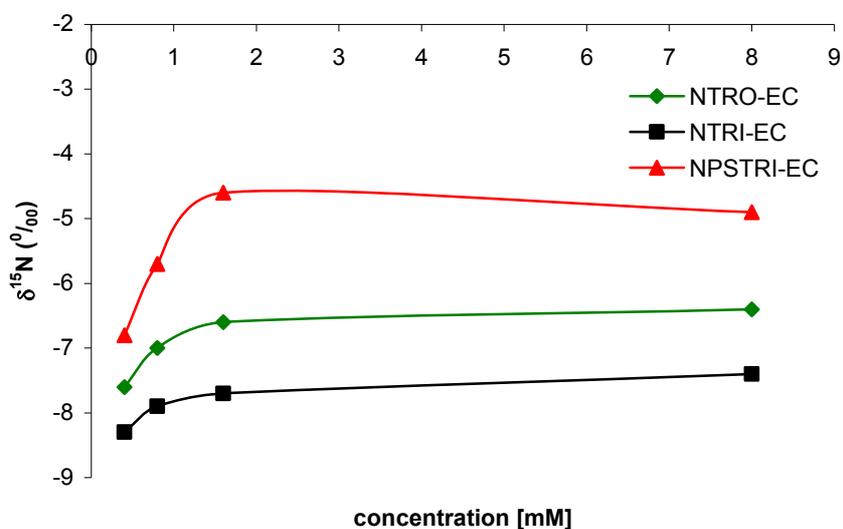


Figure 29. Vérification des interactions entre composés : variations de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) des alcaloïdes dérivés en fonction de la concentration

### 2.5.5.2 Vérification des interactions entre composés

Il s'agit de vérifier s'il existe d'éventuelles interactions entre les composés au cours du protocole (pour protocole de dérivation voir § 5.2.5 et pour protocole de mesurer  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) voir § 5.7.1). Les vérifications ont été faites comme précédemment sur une gamme de concentration large allant de 0.4 mM à 8 mM dans l'eau. Pour les concentrations inférieures à 1.6 mM un appauvrissement des teneurs isotopiques est apparente, probablement corrélé à un taux de recouvrement inférieur à ces concentrations et à des amplitudes du signal

proches ou inférieures à la limite de quantification pour le GC-irm-MS (Tableau 11, Figure 30).



**Figure 30. Vérification des interactions entre composés : variation de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) des alcaloïdes dérivés en fonction de la concentration**

### 2.5.5.3 Vérification des effets de matrice

Les mesures seront effectuées en milieu biologique, il faut donc s'assurer d'éventuels effets de matrice en appliquant en parallèle le protocole sur des solutions dans l'eau et dans le milieu de culture. Les mesures ont été réalisées à la concentration limite basse pour chacun des composés sans observer de différences significatives (Tableau 12) (pour protocole de dérivation voir § 5.2.5 et pour protocole de mesurer  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) voir § 5.7.1).

### 2.5.5.4 Validation de la mesure de déviation isotopique sur la gamme d'abondance naturelle

La justesse de la mesure de déviation isotopique doit être vérifiée pour chaque composé sur toute la gamme de déviation isotopique en abondance naturelle. Pour cela les composés (nortropine et norpseudotropine) dont nous disposons ne conviennent pas car le nombre restreint de fournisseurs et le mode d'obtention de ces composés ne permet pas de disposer de standards avec une variabilité en  $\delta^{15}\text{N}$  suffisante. Donc, des standards appropriés couvrant la gamme isotopique souhaitée ont été préparés en exploitant le fractionnement isotopique associé à la chromatographie sur colonne de silice (voir protocole 5.2.7). Les fractions en tête et en queue de pics ont été isolées et les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) obtenues (Tableau 13) ont été mesurées par EA-irm-MS (protocole analytique 5.7.2). Ceci a

permis d'obtenir des standards avec des valeurs couvrant très largement la gamme en abondance naturelle : nortropine (-80‰; +50‰) et norpseudotropine (-60‰; +40‰).

Les résultats obtenus par GC-irm-MS après dérivation (Tableau 13) montrent que les mesures de déviation isotopique sont répétables avec, des valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) avant et après dérivation relativement proches. Les écarts-types sur les mesures varient de 0.5 à 2.2‰.

## 2.6 Conclusion

Pour la mesure des effets isotopiques cinétiques de la réaction enzymatique conduisant à la rupture de la liaison C–N du cycle azoté de la nortropine et de la norpseudotropine, il est nécessaire de déterminer avec justesse et précision le degré d'avancement de la réaction et la teneur isotopique du substrat à ce même degré d'avancement. Pour cela nous avons mis au point et validé une méthode qui nécessite la dérivation préalable des substrats sous forme de carbamates. La quantification est réalisée par GC-FID et les mesures de déviation isotopique par GC-irm-MS.

La nouvelle méthode de dérivation par le chloroformiate d'éthyle peut être appliquée à la quantification des alcaloïdes nortropaniques dans le milieu bactérien. De plus cette méthode n'introduit pas de fractionnement isotopique significatif. La stabilité des composés dérivés a été aussi confirmée. Les deux types de mesures ont été validés sur une gamme de concentration en substrat allant de 1.6 à 8.0 mM.

Les mesures de déviation isotopiques ont également été validées sur une gamme couvrant largement la gamme d'abondance naturelle de nortropine (-80‰ à +50‰) et de norpseudotropine (-60‰ à +40‰).

La validation du protocole a donné lieu à publication [58].

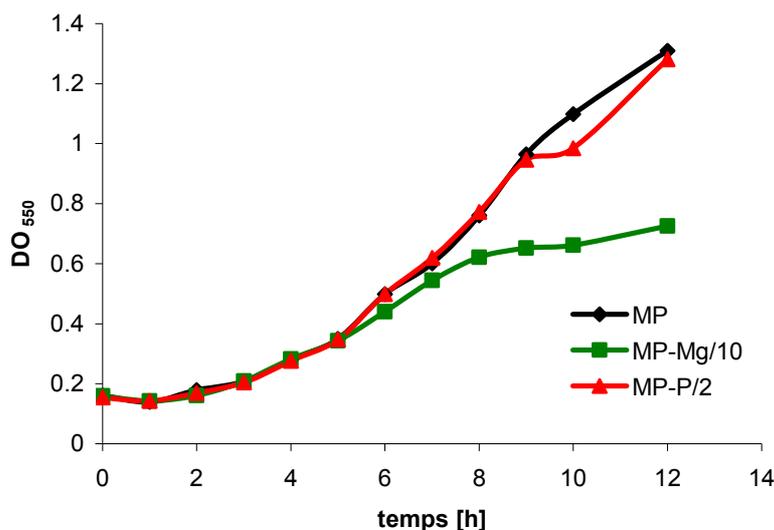
## Chapitre 3 : Métabolisme de la nortropine et de la norpseudotropine par les bactéries *Pseudomonas* AT3

Afin de pouvoir interpréter, en termes mécanistiques, les valeurs des effets isotopiques cinétiques (EIC) mesurés, il est essentiel de bien définir les voies métaboliques empruntées au niveau de la nortropine. En effet, lorsque la nortropine est utilisée comme substrat de croissance pour *Pseudomonas* AT3, on a constaté la formation de norpseudotropine par isomérisation via un intermédiaire cétonique, la nortropinone [2, 3]. Ceci est susceptible de perturber l'interprétation mécanistique car l'EIC mesuré peut n'être qu'une valeur apparente due à l'influence de l'équilibre sur la valeur isotopique de la nortropine (EIE) et/ou au métabolisme direct de la norpseudotropine avec une valeur propre d'EIC. Afin de s'assurer de ces éléments, une étude plus approfondie du métabolisme a été menée.

Pour cela, la croissance des bactéries *Pseudomonas* a été étudiée avec différents alcaloïdes nortropaniques comme substrats (nortropine, norpseudotropine et nortropinone). Le profil métabolique tout le long de la croissance a également été établi pour ces composés.

### 3.1 Conditions de croissance : les milieux de culture

Afin d'optimiser les conditions d'extraction et de dosage des alcaloïdes à partir des milieux de culture, il a été choisi de développer les cultures sur un milieu minimum en sels minéraux. A partir d'un milieu de croissance pauvre de référence (MP) :  $K_2HPO_4$  (0.8 g/L);  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (0.7 g/L);  $MgSO_4 \cdot H_2O$  (12.31 mg/L);  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.56 mg/L);  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0.40 mg/L);  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (0.35 mg/L), il a été testé des milieux plus appauvris en sulfate de magnésium et en phosphate. Une diminution de concentration a été testée et les résultats de croissance sont présentés en Figure 31. Pour les phosphates, une diminution d'un facteur deux n'affecte pas la croissance. Pour le sulfate de magnésium, si une réduction par un facteur 2 est sans effet, pour une diminution au 1/10 la croissance des bactéries n'arrive pas à terme quelle que soit la durée de culture, signifiant l'épuisement du sulfate de magnésium avant l'épuisement du substrat.



**Figure 31. Influence du milieu de culture sur les courbes de croissance des bactéries *Pseudomonas AT3***

Le milieu retenu sera donc le milieu (MP-Mg/2) :  $K_2HPO_4$  (0.8 g/L);  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (0.7 g/L);  $MgSO_4 \cdot H_2O$  (6.16 mg/L);  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.56 mg/L);  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0.40 mg/L);  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (0.35 mg/L). Les conditions de cultures détaillées et de suivi de croissance sont décrites dans la partie « méthodes » (voir § 5.5.1).

## 3.2 Croissance bactérienne et profils métaboliques

### 3.2.1 Métabolisme de la nortropine par *Pseudomonas AT3*

Lors des études préliminaires sur le métabolisme de la nortropine par les bactéries *Pseudomonas AT3*, la formation de norpseudotropine dans le milieu a été constatée [2, 3].

Afin de mieux comprendre le lien métabolique entre la nortropine et la norpseudotropine, les courbes de croissance ont été répétées afin de vérifier ces données préalables et le profil métabolique en alcaloïdes établi tout au long de la croissance bactérienne.

Les cultures ont été réalisées suivant le protocole 5.5.3 et les données concernant les courbes de croissance sont rassemblées dans le Tableau 14 et présentées en Figures 32 et 33.

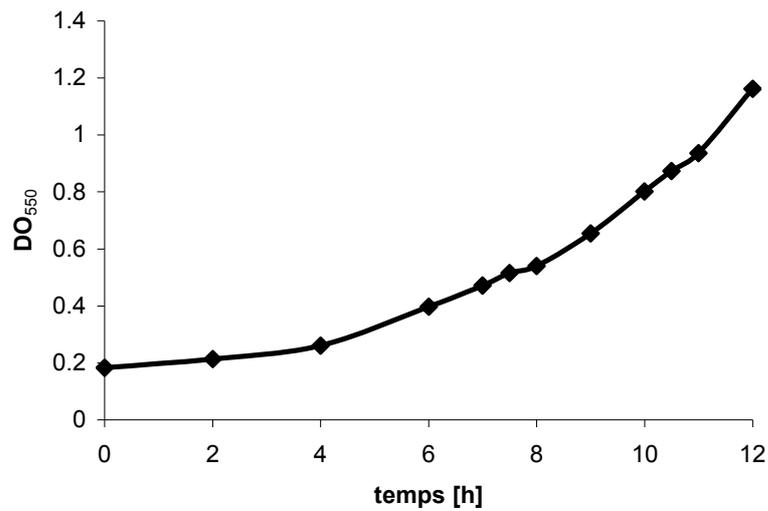


Figure 32. Courbe de croissance des bactéries *Pseudomonas AT3* / substrat : nortropine

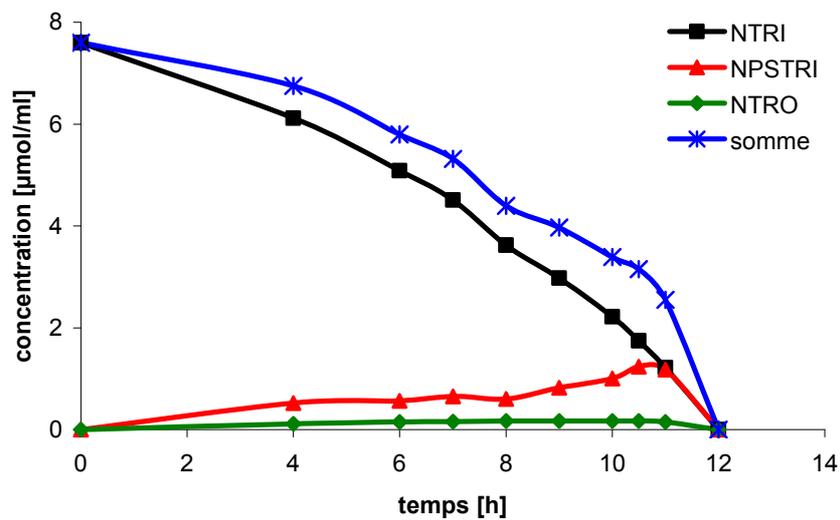


Figure 33. Profil métabolique au cours de la croissance des bactéries *Pseudomonas AT3* / substrat : nortropine

Ces résultats confirment la formation de norpseudotropine au cours de la croissance. La présence de petites quantités de nortropinone (jusqu'à 0.16 mM) a également été observée. En fin de croissance tous les produits sont consommés indiquant clairement que ces produits sont également des substrats potentiels pour les bactéries.

**Tableau 14. DO<sub>550</sub> et concentration des alcaloïdes dans le milieu bactérien / substrat :  
nortropine**

<b>Temps (h)</b>	0	4	6	7	8	9	10	10.5	11	12
<b>DO<sub>550</sub></b>	0.18	0.26	0.40	0.47	0.54	0.66	0.80	0.87	0.94	1.16
<b>Nortropine (mM)</b>	7.60	6.12	5.09	4.51	3.62	2.97	2.22	1.74	1.22	0
<b>Norpseudotropine (mM)</b>	0	0.52	0.56	0.66	0.60	0.82	1.00	1.24	1.18	0
<b>Nortropinone (mM)</b>	0	0.12	0.15	0.16	0.17	0.17	0.17	0.17	0.15	0
<b>Somme (mM)</b>	7.60	6.76	5.8	5.33	4.39	3.96	3.39	3.15	2.63	0

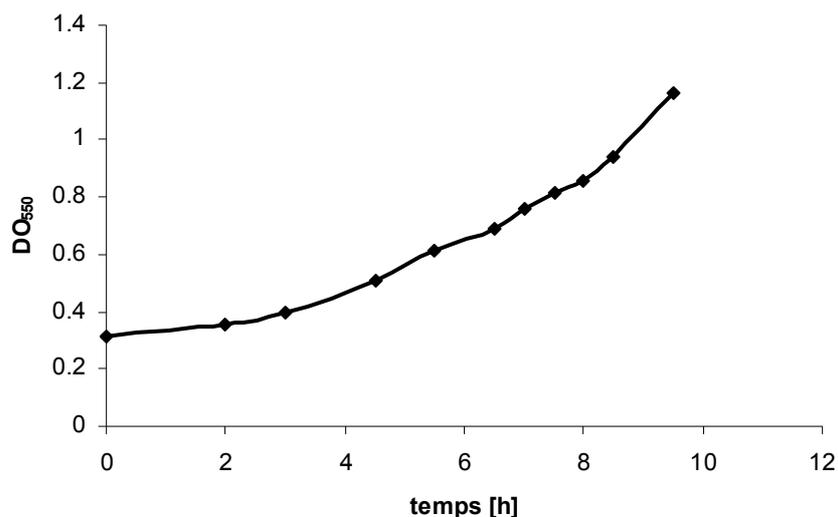
Ces résultats montrent clairement qu'il existe une voie active de transformation de la nortropine en norpseudotropine via la nortropinone.



Par contre, il est impossible de distinguer si la norpseudotropine est métabolisée directement ou indirectement après retour sous forme de nortropine. Toutefois des études réalisées précédemment [18] sur *Pseudomonas* AT3, avec des substrats marqués au deutérium, ont montré indirectement que la voie directe existait et semblait être prépondérante lorsque le substrat est la pseudotropine.

### 3.2.2 Métabolisme de la norpseudotropine par *Pseudomonas* AT3

Les cultures ont été réalisées suivant le protocole 5.5.3 et les données concernant les courbes de croissance sont rassemblées dans le Tableau 15 et présentées en Figure 34. Les résultats sont comparables en tout point à ceux obtenus avec la nortropine (vitesse, DO<sub>max</sub>).



**Figure 34. Courbe de croissance des bactéries *Pseudomonas* AT3 / substrat : norpseudotropine**

**Tableau 15. DO<sub>550</sub> et concentration des alcaloïdes dans le milieu bactérien / substrat : norpseudotropine**

Temps (h)	0	2 <sup>a)</sup>	3	4.5	5	6.5	7	7.5	8	8.5	9.5
DO <sub>550</sub>	0.29	0.35	0.41	0.51	0.61	0.68	0.76	0.81	0.86	0.94	1.17
Nortropinone (mM)						trace					
Nortropine (mM)						trace					
Norpseudo-tropine (mM)	7.81		7.01	6.82	6.65	6.02	5.63	5.12	4.83	4.27	0

<sup>a)</sup> Les échantillons pour quantification des alcaloïdes n'ont pas été prélevés.

Un premier élément de preuve du métabolisme inverse norpseudotropine  $\rightarrow$  nortropine pourrait être apporté par la formation de nortropine lorsque le substrat utilisé est la norpseudotropine. Toutefois, l'observation du profil métabolique (Figure 32) montre que seules des traces de nortropine et de nortropinone ont été observées et ces résultats ne permettent pas de proposer une hypothèse. En effet, dans ce contexte, on peut envisager que la norpseudotropine est métabolisée directement de façon majoritaire et que seule une faible part est transformée en nortropine, mais on peut également envisager que la vitesse

de métabolisation de la nortropine est supérieure à celle de l'équilibration et que la nortropine est consommée au fur et à mesure de sa formation.

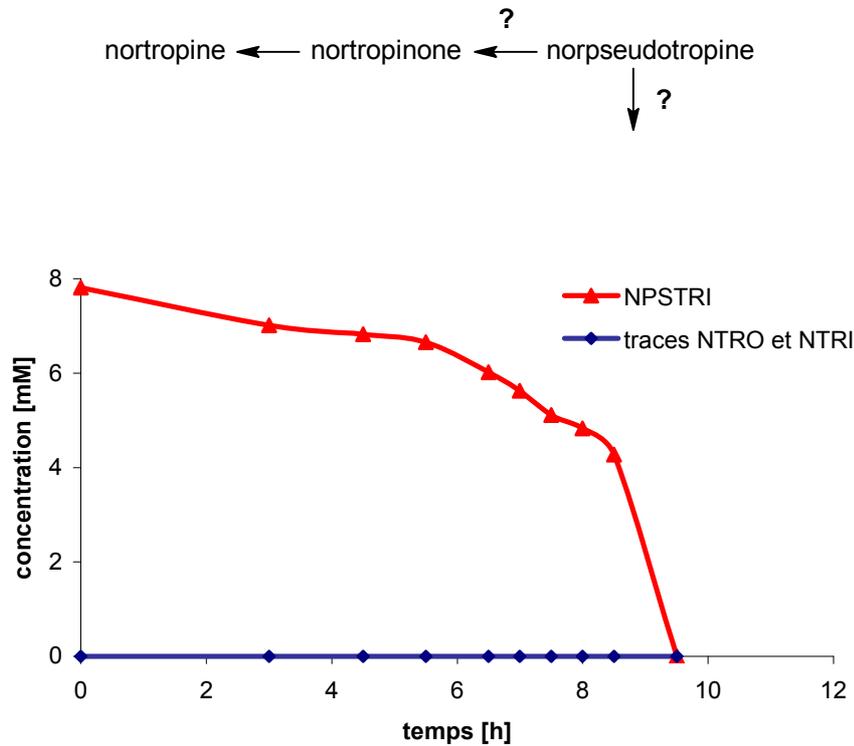


Figure 35. Profil métabolique au cours de la croissance des bactéries *Pseudomonas AT3* / substrat : norpseudotropine

### 3.2.3 Métabolisme de la nortropinone par *Pseudomonas AT3*

Pour mieux comprendre le lien métabolique existant entre nortropine et norpseudotropine avec la nortropinone comme intermédiaire, la croissance de *Pseudomonas AT3* avec la nortropinone comme unique substrat a été suivie.

Les cultures ont été réalisées selon le protocole 5.5.3 et les données sont rassemblées et présentées dans le Tableau 16.

Avec ce substrat, la croissance est plus lente (Tableau 16) et nécessite plus de 22 heures. L'étude du profil métabolique montre qu'il y a formation de nortropine et de norpseudotropine, les deux composés étant détectés dans le milieu. Cela permet de confirmer que les enzymes TR I et TR II sont actives et que le métabolisme peut se faire dans les deux sens au niveau de la nortropinone.



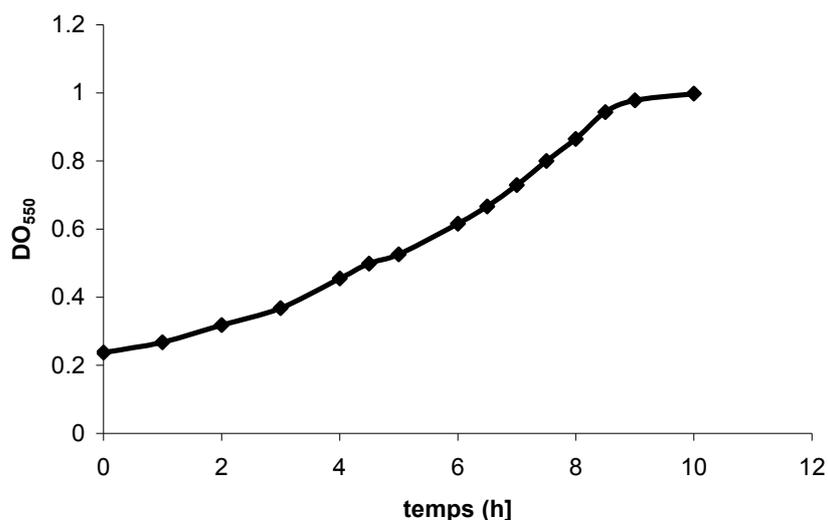
**Tableau 16. DO<sub>550</sub> et concentration des alcaloïdes dans le milieu bactérien / substrat : nortropinone**

Temps (h)	0	13	16	19	22
DO <sub>550</sub>	0.14	0.36	0.53	0.94	0.99
Nortropinone (mM)	7.84	3.2	2.8	0.35	0
Nortropine (mM)	0	0.59	0.52	0.52	0
Norpseudotropine (mM)	0	0.15	0.17	0.21	0

### 3.2.4 Métabolisme du mélange nortropine + norpseudotropine par *Pseudomonas* AT3

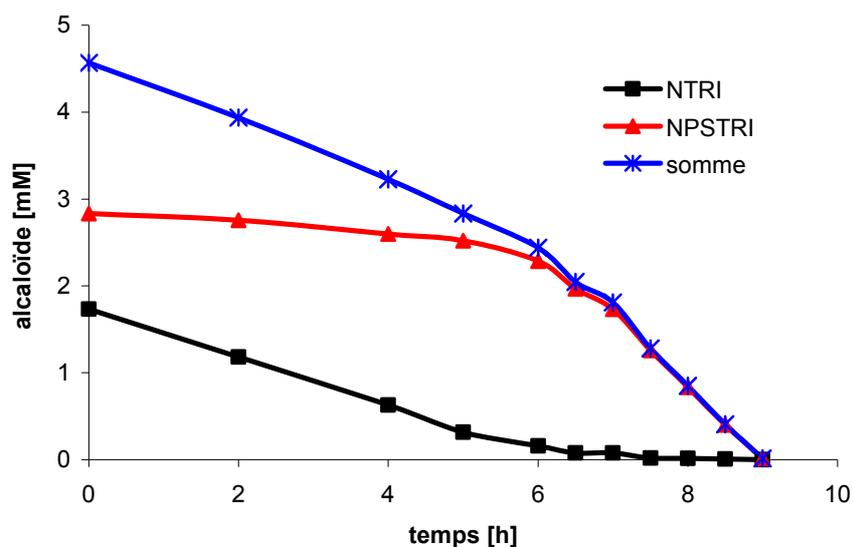
Afin de s'assurer du fait qu'il existe ou non un métabolisme direct de la norpseudotropine, un mélange de nortropine (1.73 mM) et de norpseudotropine (2.83 mM) a été utilisé comme co-substrats.

Les cultures ont été réalisées selon le protocole 5.5.7 et les données concernant les courbes de croissance sont rassemblées dans le Tableau 17 et présentées en Figures 36 et 37. La cinétique de croissance est comparable à celles observées sur l'un ou l'autre des substrats seul.



**Figure 36. Courbe de croissance des bactéries *Pseudomonas* AT3 / co-substrats : nortropine + norpseudotropine**

Du point de vue du profil métabolique, on constate (Figure 37) durant les premières heures que si la concentration de la nortropine diminue constamment, mais que celle de la norpseudotropine reste quasi constante. Ce n'est qu'après épuisement de la nortropine qu'une diminution de la concentration en norpseudotropine est observé jusqu'à épuisement, correspondant à la fin de la croissance.



**Figure 37. Profil métabolique au cours de la croissance / co-substrats : nortropine + norpseudotropine**

Deux hypothèses pour expliquer ces observations peuvent être posées :

- soit la nortropine est le substrat préférentiel et est consommée en priorité, la norpseudotropine n'étant métabolisée qu'après épuisement de la nortropine.
- soit les deux substrats sont métabolisés mais la norpseudotropine consommée est compensée par celle générée à partir de la tropine après isomérisation.

A partir des expériences précédentes on peut constater :

- que les cinétiques de consommation des deux substrats sont identiques ce qui ne montre pas de différence notable d'affinité en faveur de la nortropine.
- qu'avec la nortropine comme substrat on observe l'accumulation significative de norpseudotropine mais que celle-ci est aussi métabolisée.
- qu'avec la norpseudotropine comme substrat on n'observe pas l'accumulation significative de nortropine.

**Tableau 17. Croissance et concentration des alcaloïdes dans le milieu bactérien / co-substrats : nortropine + norpseudotropine**

<b>Temps (h)</b>	<b>0</b>	<b>1 <sup>a)</sup></b>	<b>2</b>	<b>3 <sup>a)</sup></b>	<b>4</b>	<b>4.5 <sup>a)</sup></b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>6.5</b>	<b>7</b>	<b>7.5</b>	<b>8</b>	<b>8.5</b>	<b>9</b>	<b>10 <sup>a)</sup></b>
<b>Croissance (DO<sub>550</sub>)</b>	0.24	0.27	0.32	0.37	0.46	0.50	0.53	0.62	0.67	0.73	0.80	0.86	0.94	0.98	0.99
<b>Nortropine (mM)</b>	1.73		1.18		0.63		0.31	0.16	0.08	0.08	0.02	0.02	0.01	0.00	
<b>Norpseudotropine (mM)</b>	2.83		2.76		2.60		2.52	2.28	1.97	1.73	1.26	0.83	0.40	0.02	
<b>Somme (mM)</b>	4.57		3.94		3.23		2.83	2.44	2.05	1.81	1.28	0.85	0.41	0.02	

<sup>a)</sup> Les échantillons pour quantification des alcaloïdes n'ont pas été prélevés.

Ces éléments font pencher en faveur de la seconde hypothèse. Pour vérifier ceci, plusieurs expériences peuvent être envisagées :

- utiliser des inhibiteurs connus des réductases afin d'essayer de bloquer spécifiquement l'isomérisation
- étudier *in vitro* les activités enzymatiques des réductases TR I et TR II.
- utiliser des substrats marqués au deutérium sur le carbone portant le groupement hydroxyle afin d'évaluer la part due au métabolisme direct ou indirect des substrats en mesurant le taux de transfert vers les produits suivants du métabolisme.
- utiliser en compétition des substrats avec des taux d'enrichissements en <sup>15</sup>N significativement différents dans la gamme des abondances isotopiques naturelles pour évaluer le transfert d'un substrat à l'autre en mesurant la variation de déviation isotopique pour chacun d'eux tout au long de la croissance bactérienne.

### **3.3 Etude métabolique des voies de dégradation de la nortropine et de la norpseudotropine**

#### **3.3.1 Inhibition de la tropinone réductase (TR I)**

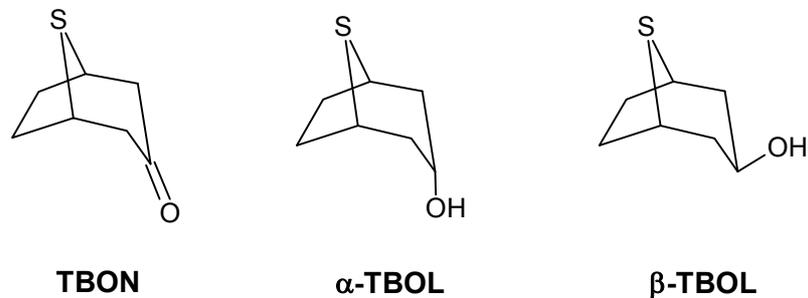
Ce type d'enzyme a déjà été décrit et étudié chez *Pseudomonas* AT3 dans le cadre du métabolisme de la tropine (Chapitre 1, § 1.1.2.1). Toutefois, à ce jour, rien, n'a été décrit concernant leur activité sur la nortropine, norpseudotropine et nortropinone.

Il existe des inhibiteurs connus de ce type d'enzyme qui ont été étudiés chez les plantes [11, 13]. Pour la tropinone réductase I les inhibiteurs tels que le 8-thiabicyclo[3.2.1]octane-3-one (TBON) et le 8-thiabicyclo[3.2.1]octane-3-ol ( $\alpha$ - et  $\beta$ -TBOL) bloquent l'échange entre la tropine et la tropinone (Figures 38 et 39). Pour le TBOL, le composé  $\beta$ - est décrit comme ayant un effet inhibiteur plus fort que le composé  $\alpha$ - [14].

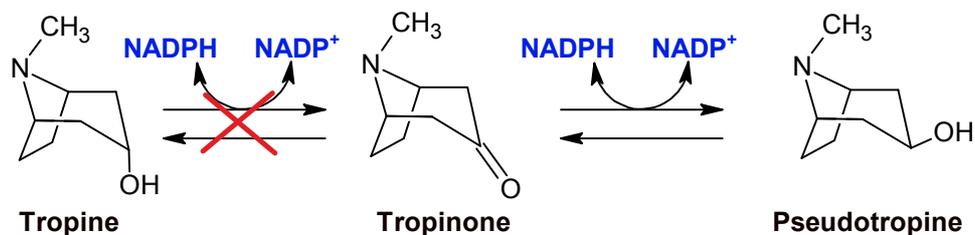
Il a paru judicieux d'étudier l'effet de ces composés sur la nortropine. En effet si ces inhibiteurs peuvent bloquer ou inhiber fortement la voie nortropinone → nortropine, on pourra vérifier :

- si la norpseudotropine s'accumule dans les cultures avec comme substrat la nortropine.

- si la réaction de métabolisme direct de la norpseudotropine existe (croissance en présence d'inhibiteur).
- comment se partage le métabolisme entre les voies directe et indirecte, par comparaison des vitesses de croissance avec et sans inhibiteur.



**Figure 38. Structures des inhibiteurs de la tropinone réductase I**



**Figure 39. Inhibition de TR I par la TBON, le  $\alpha$ -TBOL et le  $\beta$ -TBOL chez *Datura stramonium***

Pour ces études la TBON a été synthétisée au laboratoire à partir de la tropinone (protocole 5.9.3) et le  $\beta$ -TBOL a été synthétisé par réduction du TBON par le borohydrure de sodium (protocole 5.9.4).

Pour, dans un premier temps, mesurer la limite de toxicité de la TBON envers *Pseudomonas* AT3, une série de cultures avec la nortropine comme substrat a été réalisée en présence de concentrations croissantes en TBON.

Pour rationaliser la mesure de l'effet inhibiteur ou toxique de la TBON on peut exprimer celui-ci comme étant le rapport du temps nécessaire pour obtenir un degré de croissance de 50% sans inhibiteur ( $C_i$ ) sur le temps nécessaire pour obtenir un degré de croissance de 50% avec inhibiteur ( $I_i$ ). Les résultats sont présentés dans les Figures 40 et 41.

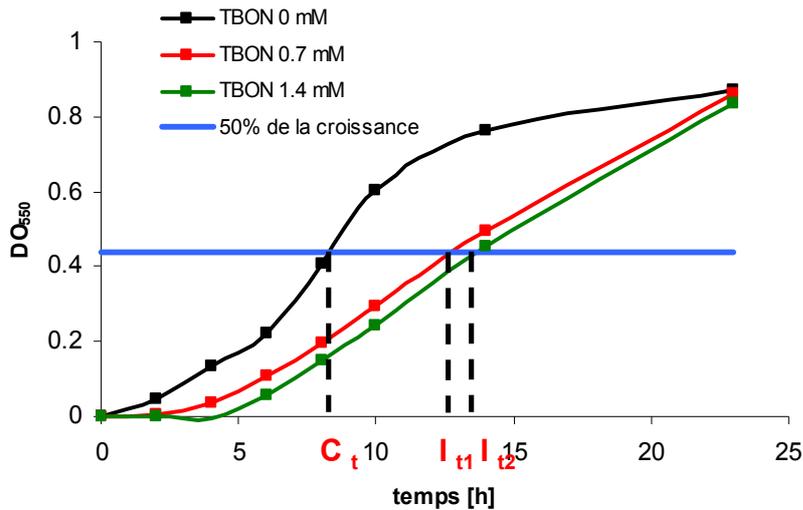


Figure 40. Croissance des cultures de *Pseudomonas AT3* sur nortropine en présence de TBON

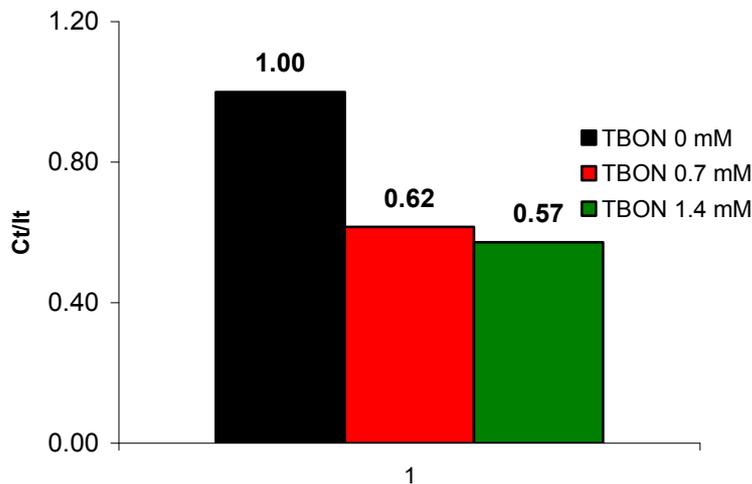
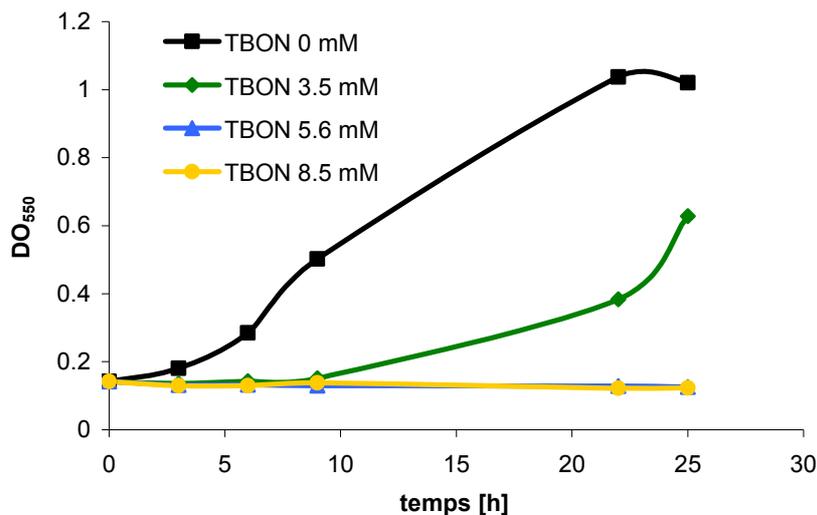


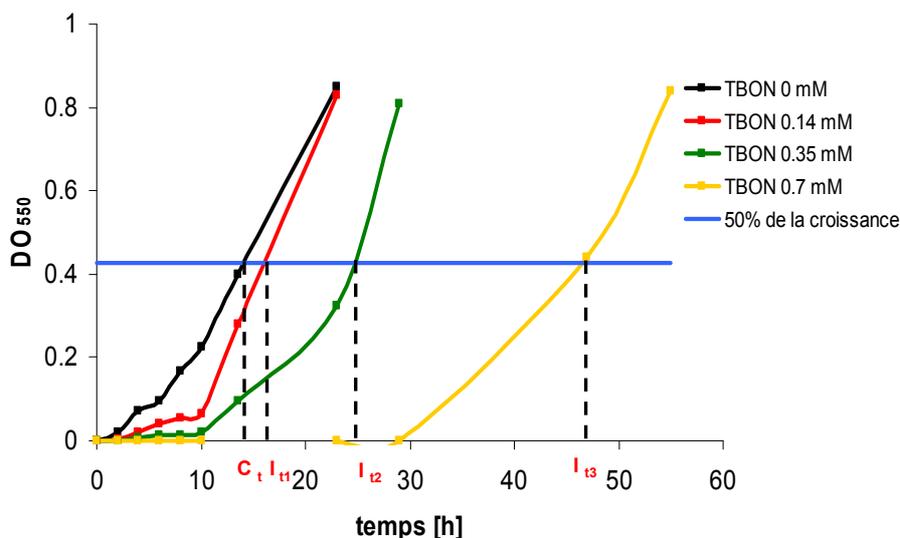
Figure 41. Mesure de l'effet toxique de la TBON sur les cultures de *Pseudomonas AT3* sur nortropine

Lorsque l'on augmente les concentrations en TBON au delà de 1.4 mM l'effet toxique s'accroît fortement avec une croissance très ralentie à 3.5 mM et nulle pour des concentrations supérieures à 5.6 mM (Figure 42). Toutefois il est intéressant de noter que même aux fortes concentrations on finit par observer pour des durées de cultures longues (>100h) une croissance bactérienne après un temps de latence qui dépend de la concentration initiale en TBON.

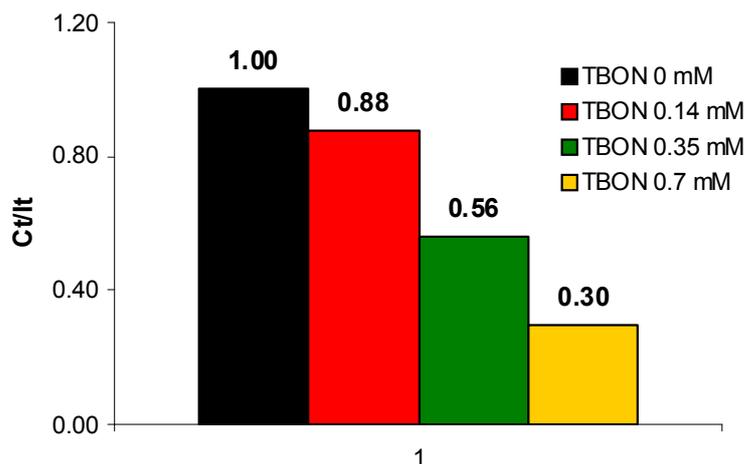


**Figure 42. Limites de toxicité de la TBON sur les bactéries *Pseudomonas* AT3**

Les valeurs de référence de taux de croissance (exprimées par le rapport  $C_t/I_t$ ) obtenues pour les cultures sur nortropine serviront d'élément de comparaison pour évaluer, par différence, l'effet inhibiteur sur les cultures réalisées avec la norpseudotropine comme unique substrat. Une série de cultures avec la norpseudotropine comme substrat a été réalisée en présence de concentrations croissantes en TBON (0.14; 0.35; 0.7 mM). Pour les concentrations supérieures à 1.4 mM, une croissance nulle a été observée. Les taux de croissance ont été mesurés comme précédemment et les résultats sont présentés dans les Figures 43 et 44.



**Figure 43. Croissance des cultures de *Pseudomonas* AT3 sur norpseudotropine en présence de TBON**



**Figure 44. Mesure de l'effet toxique + inhibiteur de la TBON sur les cultures de *Pseudomonas* AT3 sur norpseudotropine**

Dans ces deux cas il semble que l'effet observé soit plutôt un effet de toxicité qu'un effet d'inhibiteur spécifique pour l'enzyme TR I. Malgré cela, dans le cas de la norpseudotropine l'impact sur la croissance mesurée est nettement supérieur à celui observé pour la nortropine. Cette différence pourra être la résultante de l'effet potentiel inhibiteur car dans les études métaboliques effectuées sans inhibiteur on a observé que les taux de croissance sont comparables pour les deux substrats. On peut donc utiliser comme référence de l'effet toxique l'effet mesuré avec la nortropine et par différence évaluer l'effet inhibiteur.

Si l'on compare les résultats obtenus pour une concentration en TBON de 0.7 mM on note pour les cultures sur nortropine un taux de croissance relatif de 0.62 alors que pour la norpseudotropine il est de 0.30. A partir de ces données on pourrait conclure que la norpseudotropine n'est pas métabolisée uniquement par voie directe sinon le taux de croissance n'aurait pas différencié notablement de celui observé avec la nortropine. Il n'est, par contre, pas possible de trancher en faveur d'un métabolisme utilisant uniquement la voie indirecte ou un mélange entre voie directe et indirecte. En effet, si on a un effet inhibiteur total, on peut considérer que la diminution du taux de croissance correspond à la disparition de la part due au métabolisme indirect et que la croissance observée est celle résultant de la voie directe (métabolisme mixte) et que, dans le cas d'un métabolisme uniquement indirecte on devrait avoir une croissance nulle. Mais on ignore si l'effet inhibiteur sur l'enzyme TR I est total ou non aux concentrations utilisées. Il est donc impossible de trancher entre ces deux possibilités.

Le  $\beta$ -TBOL est un autre inhibiteur potentiel des enzymes TR I dont l'activité a été décrite chez les plantes comme étant supérieure à celle de la TBON. Ainsi pour la réduction de la tropinone, l'effet inhibiteur maximal pour la TBON est obtenu à partir de 1.5 mM (diminution de l'activité initiale de 70%) alors qu'avec le  $\beta$ -TBOL l'activité enzymatique nulle à partir de 1 mM [14]. Les taux de croissance ont été mesurés comme précédemment et les résultats sont présentés dans les Figures 45 et 46.

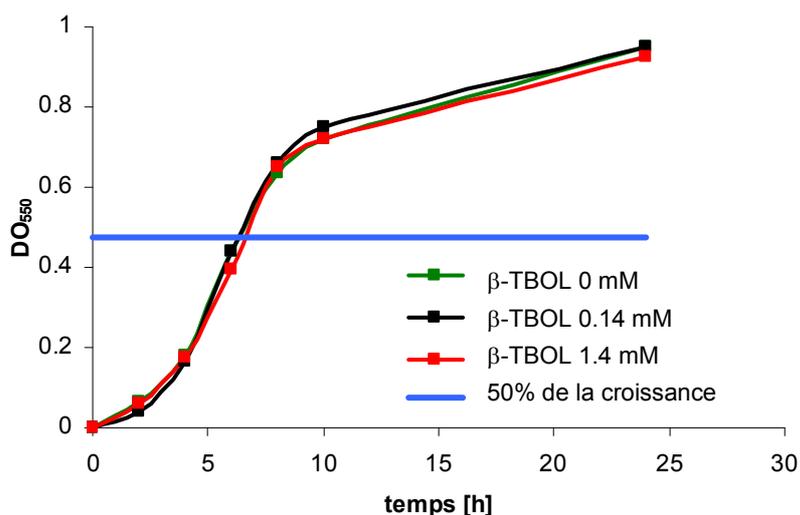


Figure 45. Courbe de croissance de *Pseudomonas AT3* en présence de  $\beta$ -TBOL / substrat : nortropine

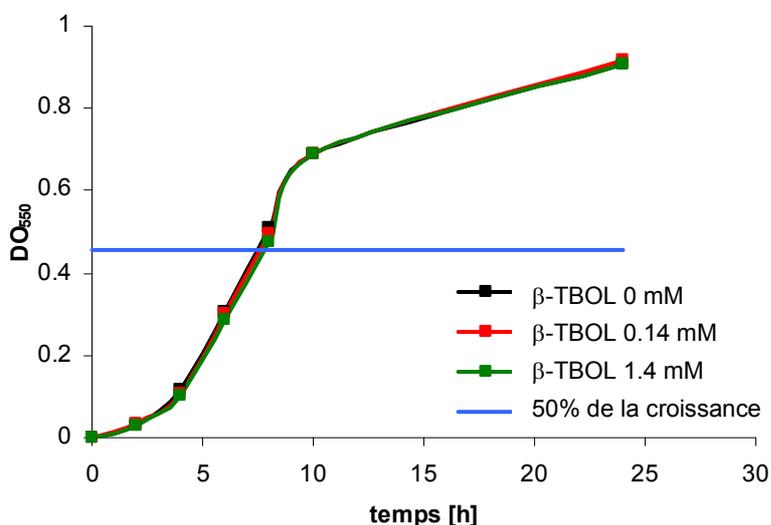


Figure 46. Courbe de croissance de *Pseudomonas AT3* en présence de  $\beta$ -TBOL / norpseudotropine

Les résultats montrent clairement qu'il n'existe pas *in vivo* d'effet toxique à ces concentrations pour le  $\beta$ -TBOL pour les bactéries *Pseudomonas AT3* et que ni le métabolisme de la nortropine, ni celui de la norpseudotropine ne sont inhibés. Ces résultats

montrent une différence majeure par rapport aux observations décrites dans la littérature pour le métabolisme de la tropine chez les plantes et mettent en question l'action de ces composés sur le métabolisme bactérien.

Les études sur la tropinone réductase I extraite de *Datura stramonium* ont montré que la TBON est un inhibiteur compétitif qui est au cours de la réaction réduit par TR I en  $\beta$ -TBOL (80%) et  $\alpha$ -TBOL (20%) [13]. Chez les bactéries *Pseudomonas* AT3 une métabolisation de ces composés en compétition avec celle des alcaloïdes pourrait éventuellement expliquer l'effet toxique. En effet, si TBON et TBOL servent comme substrat pour les enzymes TR I et / ou TR II, ils pourront diminuer fortement la capacité de croissance sur les substrats azotés.

Afin de vérifier le rôle de la TBON dans le métabolisme de la nortropine nous avons suivi au cours de la croissance cellulaire la concentration en TBON,  $\alpha$ -TBOL et  $\beta$ -TBOL. La culture a été réalisée avec la nortropine comme substrat et une concentration initiale en TBON de 1.4 mM. Des prélèvements et dosages dans le milieu de culture ont été réalisés après 6h et 108h (Tableau 18). Les résultats montrent que, même à 108h, le TBON est très peu dégradé et que de faibles quantités de TBOL sont formées ( $\alpha$ -TBOL 3.0% et  $\beta$ -TBOL 1.4%). Le dosage a été également effectué au niveau du contenu cellulaire (protocole 5.5.8) et les résultats (Tableau 18) sont cohérents avec les observations faites dans le milieu.

<b>Tableau 18. Evolution du contenu intra et extra cellulaire en TBON et TBOL au cours de la croissance sur la nortropine</b>				
<b>Temps (h)</b>	<b>Composé</b>	<b>Quantité initiale dans le milieu (mM)</b>	<b>Quantité dans le milieu extracellulaire (mM)</b>	<b>Quantité dans le milieu intracellulaire (mM)</b>
6	TBON	1.38	1.34	0.03
	$\alpha$ -TBOL	-	-	-
	$\beta$ -TBOL	-	-	-
118	TBON	1.36	1.21	0.09
	$\alpha$ -TBOL	-	0.04	-
	$\beta$ -TBOL	-	0.02	-

Cette différence de comportement de la TBON et du TBOL entre les plantes et les bactéries est inattendue. Il est évident que la TBON a une ou plusieurs interaction(s) avec la

physiologie des bactéries, mais de nature différente. Quelques hypothèses peuvent être avancées :

- Il s'agit d'une inhibition du transport des substrats à travers la membrane bactérienne. Cette hypothèse pourrait expliquer la diminution des taux de croissance suite simplement à l'inhibition du transport du substrat vers l'intérieur des cellules.
- La TBON interagit avec le(s) cytochrome P450 monooxygénase(s) responsable(s) de la dégradation de la nor(pseudo)tropine. Cette hypothèse pourrait expliquer la diminution des taux de croissance par simple action comme inhibiteur compétitif ou non-compétitif avec la monooxygénase, la TBON elle-même n'étant pas substrat. La longue période de latence concentration-dépendante observée avant un retour de croissance, est cohérente avec soit l'induction d'une quantité plus importante de la même enzyme, soit l'induction d'une autre enzyme capable d'effectuer la dégradation du substrat mais insensible à l'action de la TBON.

Ces interprétations pourraient être cohérentes avec le fait que la croissance se produit malgré tout quelle que soit la concentration initiale en inhibiteur potentiel et ce sans que celui-ci soit métabolisé. Malheureusement, ni l'une ni l'autre de ces hypothèses n'a été rigoureusement testée.

### 3.3.2 Etude *in vitro* de l'activité enzymatique des tropinone réductases

Une étude *in vitro*, sur les extraits enzymatiques de *Pseudomonas* AT3, de façon à définir leurs affinités pour les substrats, ainsi que leurs interactions avec le TBON et le TBOL pourrait amener des éléments de réponse concernant l'éventuel échange



On trouve dans la littérature que l'activité des enzymes TR I et TR II extraites des bactéries *Pseudomonas* AT3 a déjà été mesurée pour la tropine et la nortropine et décrite succinctement pour la pseudotropine et la norpseudo tropine. Il a été montré qu'il existe une activité catalytique de TR I envers la tropine et la nortropine (1.5 fois plus grande pour la nortropine que pour la tropine). Par contre, aucune activité catalytique envers la pseudotropine et la norpseudo tropine n'a été montrée [18]. De plus, lors de l'incubation de la tropinone en présence d'extrait enzymatique, seule la tropine a été obtenue. Il semble donc qu'au niveau de la tropine il n'existe aucune activité de type TR II, donc pas d'échange possible entre la tropine et la pseudotropine.

Pour nos expériences, les extraits enzymatiques ont été réalisés suivant le protocole 5.6.1, et la spectrophotométrie UV a été utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (protocole 5.6.2) et la concentration des protéines (protocole 5.6.3). Afin de comparer les résultats obtenus sur la nor(pseudo)tropine avec ceux de la littérature [18], les mesurées d'activité sur la (pseudo)tropine et la tropinone ont été aussi réalisées. Les activités mesurées sont présentées dans Tableau 19. L'activité inhibitrice potentielle de la TBON (7 mM) et du TBOL (6.9 mM) a également été évaluée ainsi que leur capacité à agir en tant que substrat. L'activité *in vitro* des enzymes bactériens envers la pseudotropine et la norpseudotropine n'a jamais été rapportée dans la littérature.

**Tableau 19. Activité spécifique des extraits enzymatiques de *Pseudomonas* AT3**

substrat	Activité <sup>a)</sup> (μkat/mg de protéine)		
	Inhibiteur		
	-	TBON	β-TBOL
tropine	0.166	0.149	0.188
pseudotropine	0.004	0.005	0.004
tropinone	0.643	0.630	0.556
nortropine	0.263	0.209	0.240
norpseudotropine	0.119	0.101	0.094
nortropinone	1.293	1.157	1.118
TBON	0	-	-
β-TBOL	0	-	-

<sup>a)</sup> Chaque activité a été mesurée cinq fois.

Pour les composés cétoniques le taux de transformation en (nor)tropine et (nor)pseudotropine a été également mesuré (Tableau 20) (protocole 5.6.4).

**Tableau 20. Composition du mélange obtenu après incubation d'extrait enzymatique avec la (nor)tropinone**

substrat	Produits (%)		
	tropinone	tropine	pseudotropine
tropinone	-	100	-
nortropinone	nortropine	nortropine	norpseudotropine
	-	75	25

En résumé, on constate que :

- l'activité est 42 fois plus grande pour la tropine que pour la pseudotropine
- l'activité n'est que 2.2 fois plus grande pour la nortropine que pour la norpseudotropine
- l'activité est 2.0 fois plus grande pour la nortropinone que pour la tropinone
- l'activité est 3.9 fois et 4.9 fois plus grande pour les composés dans le sens de l'oxydation pour les composés méthyle- et nor- respectivement

Ces observations faites *in vitro* sont largement cohérentes avec les résultats de Bartholomew *et al.* [18]. Une activité très faible est mesurée pour la pseudotropine; pour la tropinone l'activité n'est que du type TR I (100% de transformation en tropine); et l'activité de TR I est d'environ 1.5 fois plus grande envers la nortropine qu'envers la tropine.

Contrairement aux activités mesurées pour les composés tropaniques, des différences significatives de comportement pour les composés nortropaniques sont observées. Une activité de TR II quarante fois plus élevée envers norpseudotropine est mesurée; pour la nortropinone des activités de TR I et de TR II sont observées (75% nortropine et 25% norpseudotropine); l'activité de TR I / II est plus grande envers la nor(pseudo)tropine qu'envers la (pseudo)tropine.

Ces observations pourraient être comparées avec les caractéristiques enzymatiques des TR I et TR II des plantes. Portsteffen *et al.* ont travaillé sur les enzymes extraites et purifiées de *D. stramonium*. Ils ont montré que TR II réduit la tropinone en pseudotropine et que la réaction catalysée par TR I est 6 fois plus rapide que celle catalysée par TR II [14]. De plus, ils ont constaté que pour TR I l'activité réductrice (tropinone→tropine) est plus forte que l'activité oxydative (tropine→tropinone) et que la TR ne présente aucune activité oxydative envers la pseudotropine [13], résultat également trouvé pour d'autres espèces *A. belladonna* et *H. niger* (très faible activité détectée) [59]. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans le cadre de notre étude sur *Pseudomonas* AT3.

Les études *in vitro* de l'effet du TBON et  $\beta$ -TBOL sur TR I extrait de *D. stramonium* ont clairement montré un effet inhibiteur de ces composés sur l'enzyme [11]. Il a été montré que la TBON agissait comme un inhibiteur compétitif de TR I avec une diminution d'activité de 65% en présence du TBON (1.5-2.0 mM). Le  $\beta$ -TBOL est un inhibiteur plus fort considéré comme étant un inhibiteur non-compétitif avec une activité enzymatique nulle obtenue pour une concentration de  $\beta$ -TBOL de 1.0 mM. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans le cadre de notre étude sur *Pseudomonas* AT3 où aucun effet inhibiteur de la TBON et du  $\beta$ -TBOL ni sur TR I ni sur TR II n'a été observé.

En résumé si on compare les observations faites *in vitro* et *in vivo* on peut constater que :

- lorsque le substrat est la tropine on n'observe jamais *in vivo* la formation de pseudotropine. Ceci est cohérent avec les résultats des études réalisées *in vitro* sur les extraits enzymatiques. Cette situation est identique chez les plantes et les bactéries.
- lorsque le substrat est la nortropine, l'accumulation de norpseudotropine dans le milieu bactérien confirme l'existence d'une isomérisation *in vivo*. Les études *in vitro* ont confirmé qu'il existe une activité réductrice de TR II envers la nortropinone.
- l'activité enzymatique est plus forte dans le sens de la réduction ce qui est cohérent avec les observations faites *in vivo* où on n'observe jamais plus que des traces des composés cétoniques.
- pour les bactéries et à la différence des plantes, aucun effet inhibiteur de la TBON et du  $\beta$ -TBOL n'a été observé ni *in vitro* ni *in vivo*.

On peut donc conclure que les TR de *Pseudomonas* ont des caractéristiques équivalentes des TRs des plantes de la famille des Solanaceae en ce qui concerne leurs affinités pour les alcaloïdes tropaniques mais que des différences significatives existent au niveau de l'interaction avec des analogues soufrés. Une étude plus poussée des enzymes de la bactérie nécessiterait une étude de la structure des protéines afin de les comparer avec les structures des enzymes TR I et TR II des plantes [15] [16] [17].

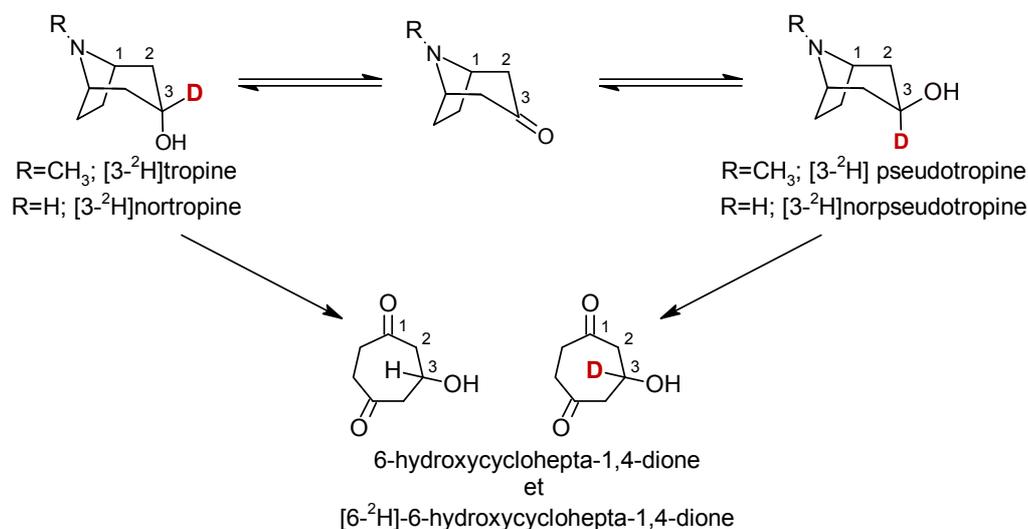
### **3.3.3. Etude des échanges nortropine $\rightleftharpoons$ norpseudotropine en utilisant des substrats marqués**

Selon les résultats antérieurement présentés, il semble qu'une épimérisation au niveau de la nortropine  $\rightleftharpoons$  norpseudotropine existe de façon plus importante qu'au niveau de la tropine  $\rightleftharpoons$  pseudotropine. Afin de mieux quantifier la part d'échange au cours du métabolisme, on a réalisé des expériences en marquage isotopique afin d'évaluer la part due au métabolisme direct ou indirect des substrats en mesurant le taux de transfert vers les produits suivants du métabolisme.

#### **3.3.3.1 Substrat marqués en position 3 [3-<sup>2</sup>H]**

Pour cette étude, il s'agit d'utiliser des substrats marqués au deutérium sur le carbone portant le groupement. Pour cela, des alcaloïdes marqués en position 3 : la [3-<sup>2</sup>H]tropine, la [3-<sup>2</sup>H]pseudotropine, la [3-<sup>2</sup>H]nortropine, la [3-<sup>2</sup>H]norpseudotropine ont été

synthétisés (pour la synthèse voir Annexe 1, protocoles A.1.1 et A.1.2) par Anaïs Fournial dans le cadre du projet ANR-2008-ISOMODTS (Figure 47).



**Figure 47. Métabolisme des alcaloïdes marqués en position 3 [3-<sup>2</sup>H] par *Pseudomonas* MS2** (NB la numérotation des structures des diones fait référence à la numérotation des substrats tropaniques)

Pour ces expériences la bactérie *Pseudomonas* MS2 a été choisie. Cette souche, qui est un mutant de la souche *Pseudomonas* AT3, est bloquée dans la voie de dégradation au niveau de la réduction de la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione (Figure 8, section 1.2.2). L'intérêt est que ce composé s'accumule dans le milieu permettant ainsi d'évaluer l'incorporation réelle de <sup>2</sup>H dans ce produit. Cette information permet de déterminer quelle(s) voie(s) métabolique suit la dégradation des deux alcaloïdes. En effet, si l'alcaloïde de départ est métabolisé indirectement, après isomérisation via la (nor)tropinone, le <sup>2</sup>H sera perdu. Si, au contraire, l'alcaloïde est métabolisé directement, le <sup>2</sup>H sera retenu à 100% sur le carbone-6 (=carbone 3 de la nortropine) de la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione (Figure 47). Et si les deux voies coexistent, on obtiendra une situation mixte.

Les expériences ont été réalisées avec un taux d'enrichissement de 100% pour les substrats et le taux de transfert vers le produit final la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione a été mesuré par spectrométrie de masse classique après extraction du milieu (voir procédure 5.1.3).

Dans un premier temps, afin de valider le protocole, les expériences décrites dans la littérature [18] pour *Pseudomonas* MS2 avec comme substrat la [3-<sup>2</sup>H]tropine ou la [3-<sup>2</sup>H]pseudotropine ont été répétées. Les cultures ont été réalisées avec un mélange d'acide tropanique (3.0 mM) et de composé marqué (3.5 mM) (voir procédure 5.5.4). En fin de croissance, le taux d'incorporation a été calculé en utilisant le rapport d'intensité entre le pic correspondant avec la [6-<sup>2</sup>H]-6-hydroxycyclohepta-1,4-dione ( $m/z=143$ ) et le pic

correspondant avec la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione ( $m/z=142$ ). Pour la  $[3-^2\text{H}]$ tropine on observe un taux d'incorporation du deutérium de 68% dans le produit final soit 68% de métabolisme direct. Pour la  $[3-^2\text{H}]$ pseudotropine, le taux d'incorporation calculé est de 91%. Ces données sont cohérentes avec celles de la littérature où des taux d'incorporation de 71% pour la  $[3-^2\text{H}]$ tropine et de 93% pour la  $[3-^2\text{H}]$ pseudotropine ont été observés [18].

Lorsque l'on applique cette méthode pour le métabolisme des alcaloïdes nortropaniques on obtient avec la  $[3-^2\text{H}]$ nortropine un taux d'incorporation de 83% et pour la  $[3-^2\text{H}]$ norpseudotropine de 91%.

Pour vérifier encore une fois le potentiel inhibiteur de la TBON, ces expériences ont été répétées en présence de concentrations variables (0 à 3.5 mM) de cette molécule, les résultats sont présentés dans le Tableau 21. Une fois de plus la TBON n'a montré aucune influence sur l'équilibre métabolique.

**Tableau 21. Taux d'incorporation du  $^2\text{H}$  dans la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione par *Pseudomonas* MS2**

Substrat	Rétention du deutérium (%)	
	-	Inhibiteur
		<b>TBON</b>
$[3-^2\text{H}]$ tropine	68	68
$[3-^2\text{H}]$ pseudotropine	91	92
$[3-^2\text{H}]$ nortropine	83	83
$[3-^2\text{H}]$ norpseudotropine	91	91

Néanmoins, lorsque la perte du marquage est constatée, les expériences précédentes ne peuvent pas montrer s'il y a un échange réel entre les deux voies via l'intermédiaire de la (nor)tropinone. En effet, cette perte du marquage peut s'expliquer également par un retour au produit initial après l'oxydation en cétone. Du point de vue métabolique, ces deux possibilités ont des implications très différentes et ont un impact direct sur l'interprétation qui peut être faite de la valeur des EIC mesurés. Afin de vérifier le flux métabolique réel entre voie directe et indirecte pour la nortropine et la norpseudotropine, on peut réaliser une expérience utilisant comme substrat un mélange de nortropine et de norpseudotropine avec des  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) très différents tout en restant au niveau de l'abondance naturelle. En suivant l'évolution des déviations isotopiques  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) pour chacun des substrats, on pourra évaluer la part de chacune des voies potentielles.

### 3.3.3.2 Mélange de substrats avec des teneurs isotopiques en $^{15}\text{N}$ significativement différentes

Les expériences ont été réalisées avec un mélange de nortropine (1.73 mM,  $\delta^{15}\text{N}$  (‰)=25.6) et de norpseudotropine (2.83 mM,  $\delta^{15}\text{N}$  (‰)=0.8) (protocole 6.5.7) et les variations de teneur isotopique en  $^{15}\text{N}$  suivies au cours de la croissance pour chacun des substrats (Figures 48 et 49, Tableau 22).

Pour les cultures réalisées précédemment (Chapitre 3, § 3.2.4) dans les mêmes conditions de concentrations de substrats, on a observé durant les premières heures que si la concentration de la nortropine diminue constamment, celle de la norpseudotropine reste quasi constante et que ce n'est qu'après épuisement de la nortropine que l'on observe la diminution de la concentration en norpseudotropine jusqu'à épuisement correspondant à la fin de la croissance.

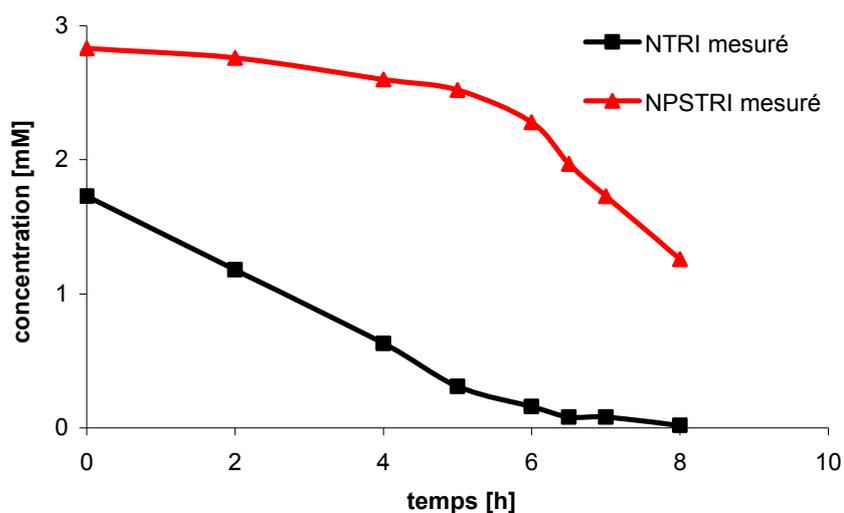
Comme montre la Figure 48, un profil métabolique similaire (*cf.* Figure 37) a été observé pour cette expérience avec une diminution constante de la concentration de la nortropine associée à une légère diminution de la norpseudotropine.

**Tableau 22. Suivi métabolique et isotopique de la nortropine et la norpseudotropine au cours de la croissance**

				<b>Temps</b>										
				<b>(h)</b>										
				<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>6.5</b>	<b>7</b>	<b>7.5</b>	<b>8</b>	<b>8.5</b>	
<b>Nortropine</b>	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	<b>Mesuré</b>	<b>Concentration</b> <sup>a)</sup>	1.73	1.18	0.63	0.31	0.16	0.08	0.08	0.02	0.02	0.01	
			<b>(mM)</b>											
			<b>Moyenne</b> <sup>b)</sup>	25.6	22.8	16.3	12.1							
			<b>Ecart-type</b> <sup>b)</sup>	0.5	0.1	0.5	0.2							
<b>Norpseudotropine</b>	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	<b>Mesuré</b>	<b>Concentration</b> <sup>a)</sup>	2.83	2.76	2.60	2.52	2.28	1.97	1.73	1.26	0.83	0.40	
			<b>(mM)</b>											
			<b>Moyenne</b> <sup>b)</sup>	0.8	1.5	2.0	1.6	0.5	-0.8	-3.0	-5.5	-9.7	-15.8	
			<b>Ecart-type</b> <sup>b)</sup>	0.2	0.1	0.3	0.3	0.2	0.1	0.3	0.3	0.2	0.5	

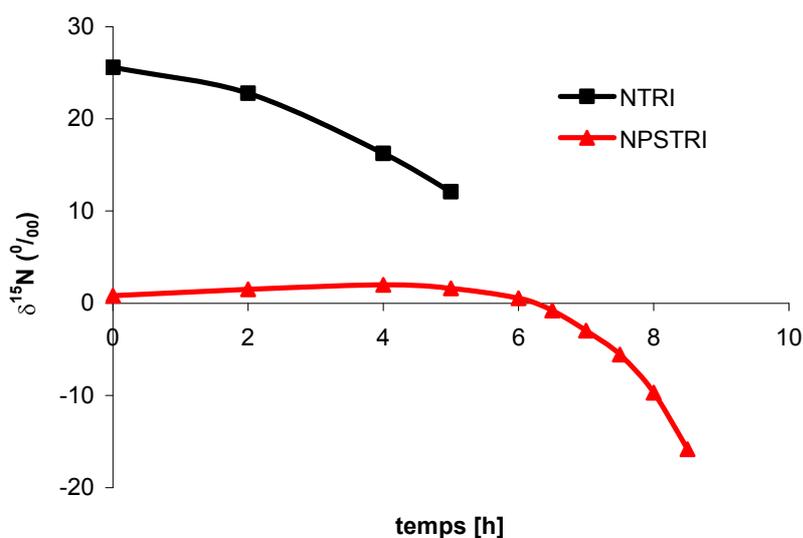
<sup>a)</sup> Chaque échantillon a été analysé trois fois par GC-FID.

<sup>b)</sup> Chaque échantillon a été analysé trois fois par GC-irm-MS.



**Figure 48. Profil métabolique au cours de la croissance / co-substrats : nortropine ( $\delta^{15}\text{N}$  (‰)=25.6) + norpseudotropine ( $\delta^{15}\text{N}$  (‰)=0.8)**

L'étude faite en suivant les profils isotopiques des substrats au cours du métabolisme donne des résultats totalement cohérents avec le profil métabolique établi précédemment (Figure 49). On observe un appauvrissement quasi constant de la nortropine tout au long de sa consommation. Par contre, pour la norpseudotropine la teneur isotopique est quasi constante, avec même une légère tendance à l'enrichissement durant les premières heures de cultures. Puis, après 4 à 6h c'est un changement de tendance avec un appauvrissement qui devient rapidement important après 6h de culture, ce qui correspond à la phase de consommation de la norpseudotropine.



**Figure 49. Profil isotopique en  $^{15}\text{N}$  de la nortropine et la norpseudotropine au cours de la croissance / co-substrats : nortropine + norpseudotropine**

Ces résultats nous permettent toujours dans un premier temps d'envisager deux hypothèses :

- soit la nortropine est le substrat préférentiel et est consommée en priorité; la norpseudotropine n'étant métabolisée qu'après épuisement de la nortropine.
- soit les deux substrats sont métabolisés en parallèle mais la norpseudotropine consommée est compensée par celle générée à partir de la tropine après isomérisation et la norpseudotropine générée à partir de la nortropine ( $\delta^{15}\text{N}$  (‰)=25.6) vient enrichir la norpseudotropine initialement présente ( $\delta^{15}\text{N}$  (‰)=0.8).

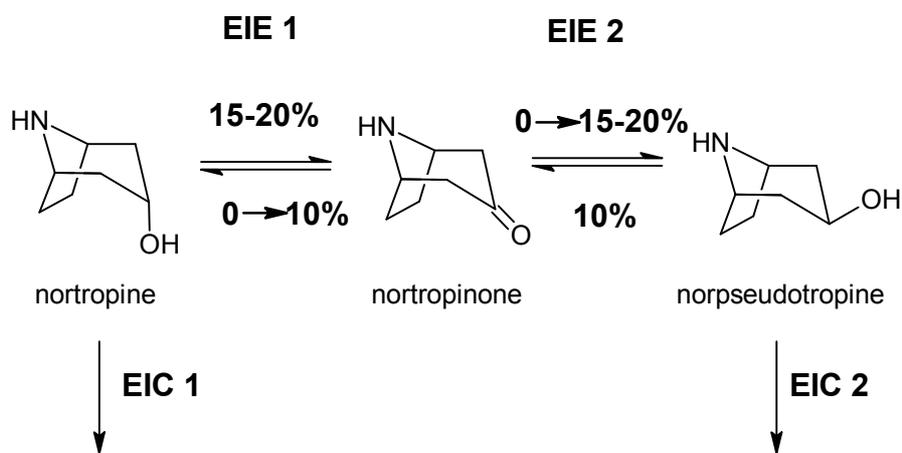
Toutefois, les résultats obtenus à partir des expériences réalisées dans des conditions de cultures similaires avec les substrats marqués au deutérium (Chapitre 3, § 3.3.3.1) ont montré qu'approximativement 80 à 85% de la nortropine et 90% de la norpseudotropine sont bien métabolisés directement. On peut donc affirmer qu'au maximum 15 à 20% de la nortropine et 10% de la norpseudotropine pourra passer d'une voie à l'autre. Toutefois, dans ce pourcentage il reste impossible de dire quelle proportion après oxydation en nortropinone est ensuite réellement métabolisée sous forme de nortropine ou de norpseudotropine.

Pour résoudre ce problème, il faudrait pouvoir établir des modèles permettant de calculer la teneur isotopique en  $^{15}\text{N}$  des substrats à tout moment de la réaction et qui soient représentatifs des deux hypothèses et comparer les résultats obtenus aux résultats expérimentaux. Néanmoins, pour établir de tels modèles complexes, il est nécessaire de connaître le fractionnement isotopique existant lors de la dégradation de chacun des deux substrats. Pour cela il faut mesurer précisément les effets isotopiques cinétiques existant pour chacune des réactions de dégradation. La dernière partie de ce travail consistera donc en la mesure et en l'interprétation des EIC.

### 3.3.3.3 Proposition de modèle pour l'interprétation des résultats de culture en présence de co-substrats nortropine + norpseudotropine

Etablir un modèle de cette étape métabolique est très complexe, certains paramètres étant difficilement voire pas du tout accessibles et certains étant interdépendants. Néanmoins, il peut être intéressant de tester la robustesse d'un modèle le plus proche possible de la réalité afin d'évaluer le poids des différents facteurs et tenter de proposer une hypothèse la plus solide possible.

On peut résumer le flux réactionnel tel que proposé dans la Figure 50.

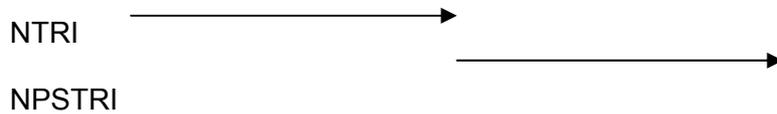


**Figure 50. Flux métaboliques pour le mélange de co-substrats : nortropine + norpseudotropine**

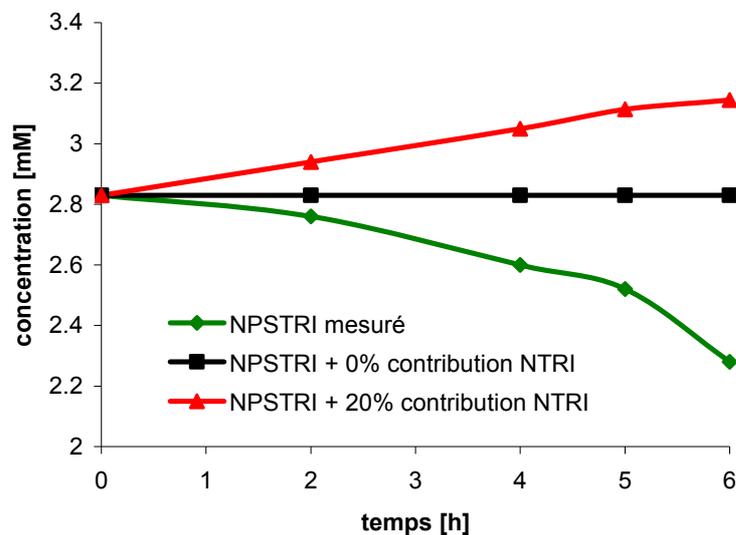
Pour rappel, les données biologiques précédemment présentées (voir § 3.2.1, 3.2.2 et 3.2.4.) montrent clairement que la nortropine donne, en condition de culture, naissance à de la norpseudotropine par épimérisation. Par contre pour la norpseudotropine, on n'observe jamais de nortropine formée. Et lorsque les deux substrats sont mis en mélange, on observe lors de 6 premières heures la consommation majoritaire de la nortropine jusqu'à disparition complète, puis ensuite la consommation rapide de la norpseudotropine restante. On peut donc décomposer la croissance en deux séquences : de 0 à 6h une séquence de co-métabolisme puis après 6h de culture une séquence de métabolisme sur norpseudotropine seule. Si cette deuxième partie a déjà été bien étudiée dans le cadre du métabolisme sur substrat seul (Chapitre 3 § 3.2.2 et Chapitre 4 § 4.3.1), ce n'est pas le cas de la première séquence pour laquelle il peut être intéressant de mieux comprendre l'impact sur le métabolisme d'échange nortropine ↔ norpseudotropine.

La première hypothèse que l'on peut tester est la situation où la nortropine est le substrat privilégié et est consommée en premier pour la croissance avec formation de norpseudotropine par épimérisation qui vient se rajouter à la norpseudotropine initiale. Dans

ce cas, l'évolution au cours de la croissance de la concentration et de la teneur isotopique en  $^{15}\text{N}$  de la norpseudotropine observées doit être en cohérence avec les données théoriques attendues pour cette hypothèse. Pour cette hypothèse, on connaît les concentrations et les teneurs isotopiques initiales de la nortropine et de la norpseudotropine et leur évolution au cours de la culture.



Cette hypothèse peut rapidement être écartée car on voit que, même dans les premières heures de la réaction, il y a obligatoirement consommation de norpseudotropine. Cette consommation sera d'autant plus importante si la contribution de la nortropine au pool de norpseudotropine est importante (Figure 51).



**Figure 51. Concentration attendue pour la norpseudotropine en fonction de la contribution de la nortropine**

D'autre part, si on calcule la quantité de chacun des substrats métabolisé en intégrant un transfert possible de 0 à 20% de la nortropine à la norpseudotropine (Figures 52 et 53) on peut affirmer que, quel que soit le cas, la nortropine est métabolisée préférentiellement à la norpseudotropine. En cas de co-métabolisme il y a donc bien un substrat privilégié.

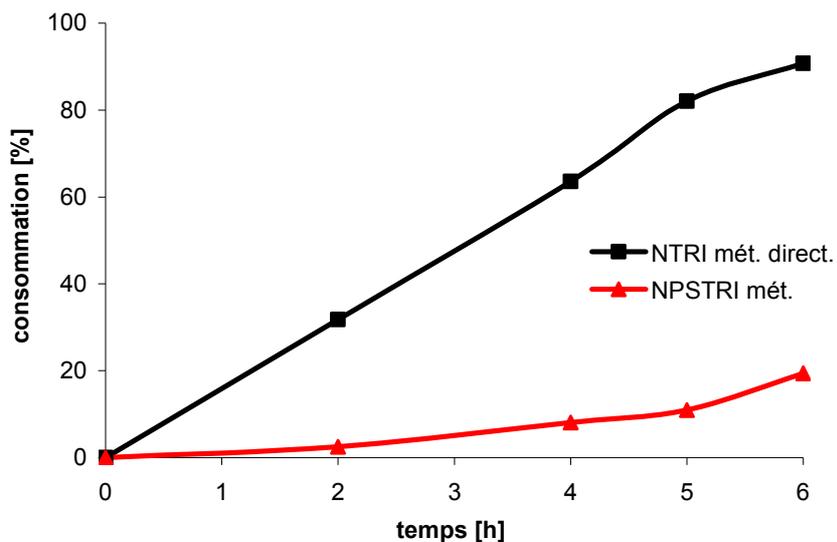


Figure 52. Taux de métabolisation des substrats pour une contribution de 0% de la nortropine à la norpseudotropine

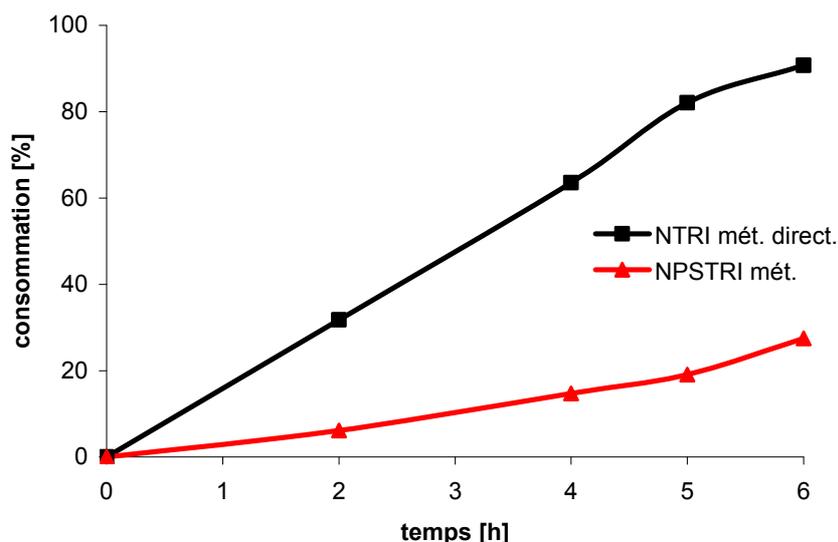
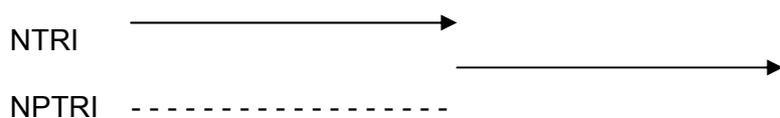


Figure 53. Taux de métabolisation des substrats pour une contribution de 20% de la nortropine à la norpseudotropine

La deuxième hypothèse implique qu'il y ait consommation concomitante des deux substrats avec un substrat préférentiel.



Pour vérifier cette hypothèse nous pouvons essayer de bâtir un modèle qui permette de calculer la valeur de la déviation isotopique de la norpseudotropine à un instant  $t$  de la culture intégrant le taux de transfert de la nortropine vers la norpseudotropine et le

fractionnement isotopique du à l'effet isotopique cinétique lors de la métabolisation directe de la norpseudotropine.

Pour ce modèle, la teneur isotopique est la somme de la contribution isotopique de la norpseudotropine initiale et de la contribution isotopique de la norpseudotropine issue de la nortropine :

$$\delta(^{15}N)_{NPSTRI} = \delta(^{15}N)_{NPSTRI(t)}^{NPSTRI} + \delta(^{15}N)_{NPSTRI(t)}^{NTRI}$$

**Contribution isotopique de la norpseudotropine initiale à la teneur isotopique de la norpseudotropine au temps t :**

Considérant que la concentration de la norpseudotropine consommée [NPSTRI]<sub>cons</sub> au temps t est égale à :

$$[NPSTRI]_{cons} = [NPSTRI]_{t_0} + \%_{inc} \cdot ([NTRI]_{t_0} - [NTRI]_t) - [NPSTRI]_t$$

on peut donc écrire que :

$$\delta(^{15}N)_{NPSTRI(t)}^{NPSTRI} = \frac{[NPSTRI]_t - \%_{inc} \cdot ([NTRI]_{t_0} - [NTRI]_t)}{[NPSTRI]_t} \cdot \delta(^{15}N)_{NPSTRI}^{EIC(t_0 \rightarrow t)}$$

- Avec :
- [NPSTRI]<sub>t</sub> concentration de la norpseudotropine au temps t
  - %<sub>inc</sub> pourcentage de nortropine transformée en norpseudotropine
  - [NTRI]<sub>t<sub>0</sub></sub> concentration de la nortropine au temps zéro
  - [NTRI]<sub>t</sub> concentration de la nortropine au temps t
  - $\delta(^{15}N)_{NPSTRI}^{EIC(t_0 \rightarrow t)}$  déviation isotopique moyenne de la nortropine entre le temps zéro et le temps t corrigée du facteur de fractionnement isotopique cinétique lié à la métabolisation de la norpseudotropine

La correction de l'effet isotopique cinétique sur la déviation isotopique de la norpseudotropine est effectuée à partir de l'équation suivante :

$$\delta(^{15}N)_{NPSTRI}^{EIC(t_0 \rightarrow t)} = \left( \frac{\left( \frac{\delta_{0/NPSTRI}}{1000} + 1 \right) \cdot e^{\ln\left(\frac{1-F}{EIC}\right)}}{1-F} - 1 \right) \cdot 1000$$

- Avec :
- $\delta_{0/NPSTRI}$  déviation isotopique au temps t<sub>0</sub> de la norpseudotropine
  - EIC effet isotopique cinétique lié à la métabolisation de la norpseudotropine (EIC=0.9942)
  - F facteur d'avancement de la réaction au temps t

La valeur d'EIC prise en compte (EIC=0.9942) a été mesurée expérimentalement (voir Chapitre 4 § 4.3.2).

**Contribution isotopique de la norpseudotropine issue de la nortropine à la teneur isotopique de la norpseudotropine au temps t :**

$$\delta(^{15}\text{N})_{NPSTRI(t)}^{NTRI} = \frac{\%_{inc} \cdot ([NTRI]_{t0} - [NTRI]_t)}{[NPSTRI]_t} \cdot \delta(^{15}\text{N})_{NTRI(t0-t)}^{EI}$$

Avec :	$\%_{inc}$	pourcentage de nortropine transformée en norpseudotropine
	$[NTRI]_{t0}$	concentration de la nortropine au temps zéro
	$[NTRI]_t$	concentration de la nortropine au temps t
	$[NPSTRI]_t$	concentration de la norpseudotropine au temps t
	$\delta(^{15}\text{N})_{NTRI(t0-t)}^{EI}$	déviations isotopiques moyennes de la nortropine entre le temps $t_0$ et le temps t corrigées du facteur de fractionnement isotopique lié à la transformation nortropine → norpseudotropine

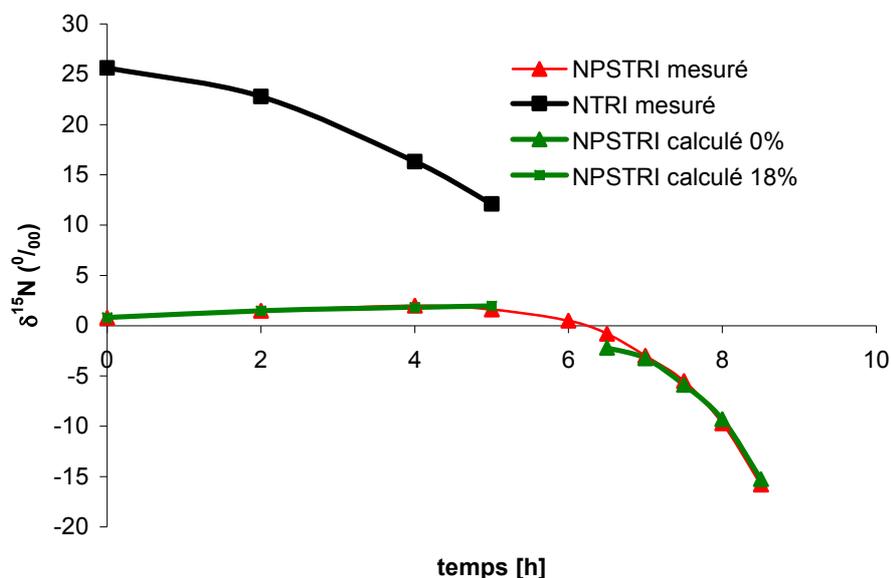
Corriger l'effet isotopique lié à la transformation nortropine → norpseudotropine est difficile. En effet, il s'agit, a priori, d'un fractionnement lié à deux effets isotopiques d'équilibre (EIE1 et EIE2). Toutefois, on peut aussi considérer que la consommation des produits déplace en permanence l'équilibre. Pour tenter d'approximer cet effet isotopique, on peut utiliser les données d'évolution de la déviation isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de la nortropine et de la norpseudotropine mesurées en fonction du temps pendant la dégradation de la nortropine (Chapitre 4 § 4.3.1). A partir de ces données on peut donc calculer un pseudo EIC par la méthode habituelle de calcul des effets isotopiques cinétiques (Chapitre 1 § 1.3.4.2) dont la valeur moyenne est de 0.9942.

La correction de l'effet isotopique sur la déviation isotopique de la nortropine est effectuée à partir de l'équation suivante :

$$\delta(^{15}\text{N})_{NTRI(t0-t)}^{EI} = \left( \frac{\left( \frac{\delta_{0/NTRI}}{1000} + 1 \right) \cdot e^{\ln\left(\frac{1-F}{EIC}\right)}}{1-F} - 1 \right) \cdot 1000$$

Si on applique ce modèle à nos données expérimentales pour la période de culture en co-métabolisme allant de 0 à 5h on obtient un résultat théorique (Figure 54, série NPSTRI calculée 18%) très proche des données expérimentales si on utilise un taux de nortropine transformée en norpseudotropine de 18% et 0% de transformation de norpseudotropine en nortropine. On peut également constater que, après 5 à 6h de culture, lorsque le système bascule d'une situation de co-métabolisme à une situation de métabolisme sur

norpseudotropine seule, le modèle proposé est toujours adapté mais avec un taux de nortropine transformée en norpseudotropine de 0% (Figure 54, série NPSTRI calculée 0%). Toutefois, il est important de garder à l'esprit, qu'en raison de la complexité de ce modèle et de la difficulté à mesurer certains paramètres indépendamment, les valeurs de ces paramètres permettant une bonne adéquation du modèle restent indicatives.



**Figure 54. Modélisation de la teneur isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de la norpseudotropine en fonction du temps**

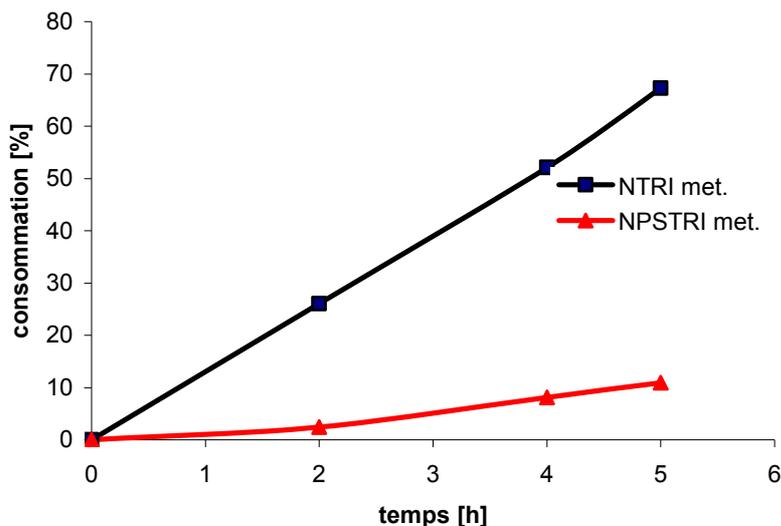
Avec : NTRI mesuré –  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de nortropine mesurée expérimentalement

NPSTRI mesurée –  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de norpseudotropine mesurée expérimentalement

NPSTRI calculée 0% –  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de norpseudotropine calculée si on utilise un taux de nortropine transformée en norpseudotropine de 0%

NPSTRI calculée 18% –  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de norpseudotropine calculée si on utilise un taux de nortropine transformée en norpseudotropine de 18%

Si on représente la consommation réelle des substrats en fonction du temps on observe que la nortropine est clairement le substrat privilégié avec, au bout de 5h de culture, 70% de la nortropine consommée et seulement 10% de la norpseudotropine (Figure 55).



**Figure 55. Taux de métabolisation des substrats au cours des premières heures de culture**

De ces données, on peut faire l'analyse suivante :

- la nortropine est un substrat préférentiel pour les bactéries *Pseudomonas* AT3.
- en situation de co-métabolisme le taux de conversion nortropine vers norpseudotropine atteint 18%. Cette valeur est à rapprocher des 17% maximum de métabolisme indirect mesuré en métabolisme seul avec les substrats marqués  $3\text{-}^2\text{H}$  (Chapitre 3, § 3.3.3.1).
- en situation de co-métabolisme le taux de conversion norpseudotropine vers nortropine semble nul (9% maximum de métabolisme indirect mesuré en métabolisme seul avec les substrats marqués  $3\text{-}^2\text{H}$  (Chapitre 3, § 3.3.3.1).

On peut conclure que, quelle que soit la situation métabolique, la norpseudotropine est très majoritairement métabolisée par voie directe et la mesure d'EIC faite pour sa dégradation (Chapitre 4, § 4.3.2) pourra être considérée comme suffisamment fiable pour permettre une interprétation mécanistique.

Pour la nortropine, par contre, en raison du ratio voie indirecte/voie directe, même s'il reste nettement en faveur de la voie directe, on peut craindre que l'EIC mesuré soit un EIC apparent.

### 3.4 Conclusions

La croissance des bactéries *Pseudomonas* a été étudiée avec différents alcaloïdes nortropaniques comme substrats (nortropine, norpseudotropine et nortropinone). Pour cela un milieu de culture spécifique a été développé.

Les courbes de croissance et les profils métaboliques ont été établies avec comme substrat la nortropine, la norpseudotropine et un mélange des deux substrats. Concernant les taux de croissance on n'observe pas de différences significatives entre les substrats.

Pour le profil métabolique, lorsque le substrat est la nortropine, on observe la formation de quantités significatives de norpseudotropine et de petites quantités de nortropinone. Ces composés sont consommés au cours de la réaction. Lorsque le substrat est la norpseudotropine, on n'observe la formation que de très faibles traces de nortropine et de nortropinone. Pour les cultures sur mélange des deux substrats, durant les premières heures la concentration de la nortropine diminue constamment et celle de la norpseudotropine reste quasi constante et ce n'est qu'après épuisement de la nortropine que l'on observe la diminution de la concentration en norpseudotropine jusqu'à épuisement correspondant à la fin de la croissance.

Ces résultats ont permis de montrer qu'il existe bien une possibilité d'échange métabolique entre la nortropine et la norpseudotropine sous le contrôle des tropinone réductases TR I et TR II.

Pour évaluer la part de métabolisme direct et indirect (après isomérisation) dans le métabolisme global plusieurs approches ont été tentées.

- des inhibiteurs potentiels des tropinone réductases ont été testés. Ces molécules (TBON et TBOL), qui sont des inhibiteurs connus des tropinone réductases des plantes, se sont avérées des molécules toxiques pour *Pseudomonas AT3* mais pas des inhibiteurs spécifiques des tropinone réductases de cette souche bactérienne. En effet si, *in vivo*, elles peuvent bloquer la croissance de *Pseudomonas AT3*, *in vitro*, aucune activité inhibitrice n'a été observée sur les extraits enzymatiques. Les activités enzymatiques ont été mesurées *in vitro* pour 8 substrats potentiels (tropine, pseudotropine, tropinone, nortropine, norpseudotropine, nortropinone, TBON et  $\beta$ -TBOL). Pour *Pseudomonas AT3* seules les activités pour tropine et nortropine étaient connues à ce jour. Ces résultats montrent que, à l'exception de la TBON et du TBOL, toutes les molécules testées sont des substrats potentiels des tropinone réductases, mais avec des différences importantes dans les activités permettant d'envisager deux hypothèses non exclusives : soit les tropinone réductases agissant sur la tropine et sur la nortropine diffèrent chez les bactéries soit les tropinone réductases des bactéries diffèrent de celles présentes chez les plantes.
- des substrats marqués au deutérium en position 3 sur le carbone portant le groupement hydroxyle ont été utilisés avec une souche mutante de *Pseudomonas AT3* pour laquelle le métabolisme aval est bloqué permettant l'accumulation d'un

composé, la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione, à partir duquel, en mesurant le taux d'incorporation de  $^2\text{H}$ , on peut déterminer la part de métabolisme direct. Les résultats montrent que 83% de la nortropine et 91% de la pseudotropine sont métabolisés directement, par contre, pour le reste il est impossible de dire quelle part après oxydation en nortropinone est ensuite métabolisée sous forme de nortropine ou de norpseudotropine.

- un mélange de nortropine et de norpseudotropine avec des  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) très différents a été utilisé de façon à avoir un marqueur stable de l'échange entre les voies directes et indirectes. L'étude métabolique faite en suivant le profil isotopique des substrats au cours du métabolisme donne des résultats totalement cohérents avec le profil métabolique établi précédemment. En effet, on observe un appauvrissement quasi constant de la nortropine tout au long du métabolisme, alors que pour la nortropine la déviation isotopique est quasi constante avec une légère tendance à l'enrichissement durant les premières heures de cultures puis entre 5 à 6h environ c'est un changement de tendance avec un appauvrissement qui devient rapidement important après 6h de culture. Dans ce cas l'hypothèse la plus réaliste est que les substrats sont métabolisés en parallèle mais la norpseudotropine consommée est compensée par celle générée à partir de la tropine après isomérisation et la norpseudotropine générée à partir de la nortropine ( $\delta^{15}\text{N}$  (‰)=25.6) vient enrichir la norpseudotropine initialement présente ( $^{15}\text{N}$  (‰)=0.8).

De l'ensemble de ces données on peut conclure que la norpseudotropine est métabolisée quasi exclusivement par voie directe (90% minimum), pour la nortropine par contre une partie non négligeable (20% environs) peut être métabolisée par voie indirecte.

Si on essaye de modéliser ces échanges en s'appuyant sur les expériences de co-métabolisme nortropine/norpseudotropine, on voit que l'on peut modéliser avec une bonne adéquation la valeur de la déviation isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  de la norpseudotropine au cours de la réaction avec des paramètres d'interconversion de 18% dans le sens nortropine vers norpseudotropine et de 0% dans le sens inverse. Si on rapproche ces données des données précédentes, on peut conclure que, quelle que soit la situation métabolique, la norpseudotropine est très majoritairement métabolisée par voie directe et la mesure d'EIC faite pour sa dégradation pourra être considérée comme suffisamment fiable pour permettre une interprétation mécanistique. Pour la nortropine, par contre, en raison du ratio voie indirecte / voie directe on peut craindre que l'EIC mesuré soit un EIC apparent.

La dernière partie de ce travail consistera donc en la mesure de l'EIC associé à la dégradation de la nortropine et de la norpseudotropine et à l'interprétation en termes de

mécanisme enzymatique de cette réaction. Pour l'EIC associé à la nortropine, il faudra tenter de modéliser le système de façon à établir plus exactement la part de substrat susceptible de transiter par la voie indirecte.

# Chapitre 4 : Analyse des effets isotopiques cinétiques liés à l'ouverture du cycle de la nortropine

## 4.1 Introduction

La mesure et l'interprétation des effets isotopiques cinétiques (EIC) constituent un outil puissant qui peut aider à élucider des mécanismes réactionnels enzymatiques.

Comme expliqué précédemment (voir Chapitre 1, § 1.3.4), l'interprétation de la valeur d'un effet isotopique cinétique n'est pas toujours évidente. Il existe beaucoup de facteurs qui peuvent modifier la valeur intrinsèque de cet effet et empêcher l'interprétation. De plus, dans le cas de l'azote, l'EIC doit souvent être corrigé en prenant en compte la valeur de l'effet isotopique d'équilibre associé.

Le point central des travaux rapportés ici est l'analyse des effets isotopiques cinétiques liés à la réaction d'ouverture du cycle de la nortropine. Ceci implique la rupture d'une liaison C–N. Les réactions enzymatiques responsables de la création ou de la rupture de liaisons C–N sont encore assez mal connues. Malgré cela, il a été montré que les effets isotopiques primaires et secondaires en  $^{15}\text{N}$  peuvent servir de base pour proposer des mécanismes réactionnels, même quand l'ordre de la liaison C–N n'est pas modifié. Pour illustrer ce propos, quelques exemples sont présentés dans la partie § 4.2.

## 4.2 Exploitation des effets isotopiques en $^{15}\text{N}$ pour identifier le mécanisme catalytique

### 4.2.1 Effets isotopiques primaires en $^{15}\text{N}$ lors de la rupture de liaison C–N

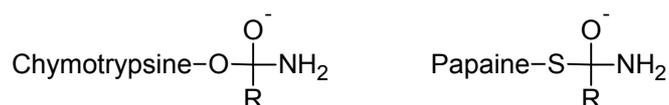
Pour une réaction chimique (catalysée ou non), la valeur maximale de l'EIC- $^{15}\text{N}$  lié à la rupture de la liaison C–N est de l'ordre de 1.02 à 1.03 [60] [61]. Dans le cas d'une réaction enzymatique, la valeur d'effet isotopique maximal pour la réaction donnée correspond à l'effet intrinsèque. Mais, malheureusement, la plupart du temps les effets mesurés expérimentalement ne correspondent pas aux effets intrinsèques des réactions enzymatiques.

Généralement, dans le cas de la rupture de la liaison C–N l'état de transition proposé est un intermédiaire tétraédrique. Si la dégradation de cet intermédiaire est la seule l'étape

limitante, la réaction est irréversible et l'EIC-<sup>15</sup>N mesuré devrait donc être égal ou très proche de la valeur maximale. Par exemple, pendant l'hydrolyse de la glutamine catalysée par l'enzyme carbamylphosphate synthétase, une valeur d'EIC-<sup>15</sup>N égale à 1.0217 a été mesurée [60]. Cette valeur est proche de la limite haute de la gamme de valeur des effets cinétiques sur l'azote. Les auteurs ont donc conclu que cette valeur correspond uniquement à l'étape limitante. En se basant sur cette valeur, les auteurs ont proposé une structure tétraédrique pour l'intermédiaire avec rupture irréversible de la liaison C–N. Un deuxième exemple porte sur la transamination de l'aspartate en présence d' $\alpha$ -cétoglutarate catalysée par l'aspartate aminotransférase [62]. Dans ce cas, l'effet isotopique primaire mesuré est aussi très fort (1.032) et un état de transition tétraédrique (carbinolamine) a été proposé. Les auteurs ont postulé que la dégradation de cette espèce est irréversible et que cette étape est l'étape limitante de la réaction.

Malheureusement, l'interprétation des EICs des réactions enzymatiques est souvent plus compliquée. Habituellement les EICs mesurés sont nettement inférieurs à la valeur maximale, et donc il est probable que l'effet isotopique mesuré ne correspond pas à l'effet intrinsèque. Le phénomène de masquage de la valeur intrinsèque provient généralement de la complexité du mécanisme enzymatique. Par exemple, on peut observer l'influence d'un groupement voisin sur la stabilité de l'intermédiaire tétraédrique, ce qui peut influencer la valeur de l'effet isotopique mesuré.

Cet effet est bien évident lorsque les EIC sont mesurés pendant l'hydrolyse du *N*-benzoyl-L-argininamide par la chymotrypsine et la papaïne : les EICs ne sont pas égaux pour les deux enzymes soit respectivement 1.010 et 1.024 [63]. La raison de cette différence est liée aux groupements catalytiques présents dans le site actif de l'enzyme. La chymotrypsine utilise un groupe –OH pour créer l'intermédiaire tétraédrique. La papaïne, par contre utilise un groupe –SH (Figure 56). Les groupements hydroxyle sont des nucléophiles moins fort que les thiols et donc l'intermédiaire dans le site actif de la chymotrypsine se décompose moins facilement que pour la papaïne. Ainsi, dans la chymotrypsine, l'étape limitante est la formation et la dégradation de l'intermédiaire tétraédrique alors que dans la papaïne c'est la rupture de la liaison C–N qui devient limitante.



**Figure 56. Structures des intermédiaires tétraédriques dans les sites actifs de la chymotrypsine et de la papaïne**

L'effet isotopique cinétique intrinsèque peut aussi être masqué par la présence d'un effet isotopique d'équilibre. Ceci peut s'expliquer par, d'une part, l'existence d'un équilibre

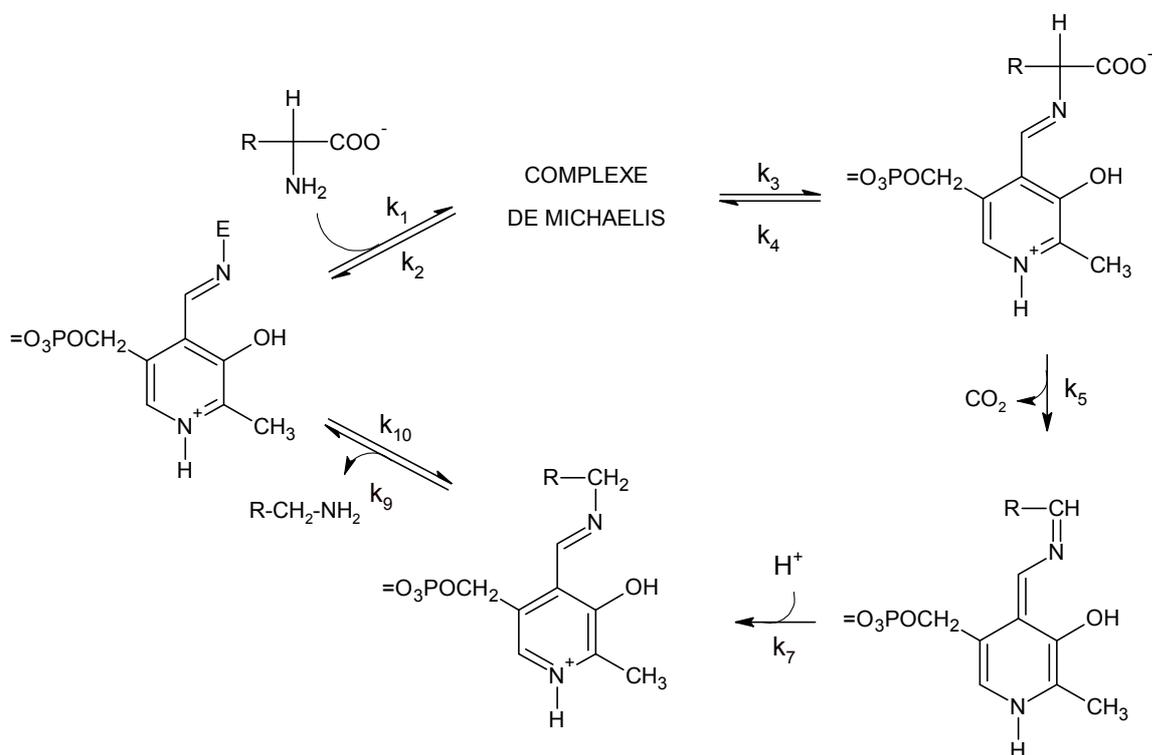
entre la forme protonée et non protonée du substrat en fonction du pH et du pKa de l'amine et/ou d'autre part, par le fait que la (dé)protonation des groupements aminos de l'enzyme peut influencer l'efficacité catalytique. Souvent, au cours de la réaction enzymatique, l'azote du substrat est protoné et il existe un équilibre entre les formes protonées et non protonées. Par exemple, pendant la réaction de la déamination de la cytidine, catalysée par l'enzyme cytidine désaminase mutée His102Asn, l'EIC-<sup>15</sup>N mesuré est de 1.0134 [64]. Un mécanisme impliquant la création d'un intermédiaire tétraédrique avec rupture de la liaison C–N comme étape limitante a été proposé malgré que la valeur d'EIC soit inférieure à la valeur maximale (1.02–1.03) prévue. Cette diminution de la valeur maximale a été justifiée par l'existence d'un effet cinétique d'équilibre (EIE) égal à 0.983 lié à la protonation du groupe –NH<sub>2</sub>. On peut donc calculer l'EIC intrinsèque en utilisant la correction par rapport à la présence de cet équilibre de protonation. L'EIC intrinsèque calculé est alors égal à 1.033. Cette valeur correspond bien à l'étape limitante proposée (rupture de la liaison C–N).

La valeur intrinsèque de l'EIC-<sup>15</sup>N peut être aussi liée à la (dé)protonation des groupes aminos de l'enzyme impliqués dans le mécanisme de la réaction. Par exemple pendant la déamination de la cytidine par la cytidine désaminase non-mutée l'EIC-<sup>15</sup>N mesuré est égal à 1.019 (pH=7.3) [64]. Cette valeur indique que la rupture de la liaison C–N n'est pas l'unique étape limitante. A pH plus bas (pH=4.2) la protonation des groupements aminos de l'enzyme est plus importante et l'efficacité catalytique est diminuée, changement reflété dans la valeur de l'EIC-<sup>15</sup>N légèrement moins importante (1.0123).

Un deuxième exemple concerne les changements de valeurs d'EIC en fonction du pH observés pendant la réaction de déamination de la phénylalanine et de la dihydrophénylalanine catalysée par la phénylalanine ammonia lyase (PAL) [65]. Pour ces deux substrats, les EICs ont été mesurés aux valeurs de pH égales à leurs valeurs de pK<sub>a</sub> : 9.1 pour la phénylalanine et 9.3 pour la dihydrophénylalanine. Les valeurs d'EIC obtenues sont pour la phénylalanine de 1.0170 à pH=9.1 et de 1.0021 à pH=9.3 et pour la dihydrophénylalanine de 1.0228 à pH=9.1 et de 1.0047 à pH=9.3 montrant ainsi clairement que les valeurs d'EIC dépendent de l'état d'ionisation du substrat. A pH inférieur au pK<sub>a</sub> les groupements aminos sont protonés et l'EIC mesuré reflète l'EIC intrinsèque et l'EIE de déprotonation. L'EIE est normal, car la liaison C–N est plus rigide dans la forme C–NH<sub>3</sub><sup>+</sup> que dans la forme C–NH<sub>2</sub>. Les valeurs d'EIC-<sup>15</sup>N pour les amines sont pour l'équilibre NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ↔ NH<sub>3</sub> de 1.0192 et pour l'équilibre phenylalanine –NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ↔ phenylalanine–NH<sub>2</sub> de 1.0167.

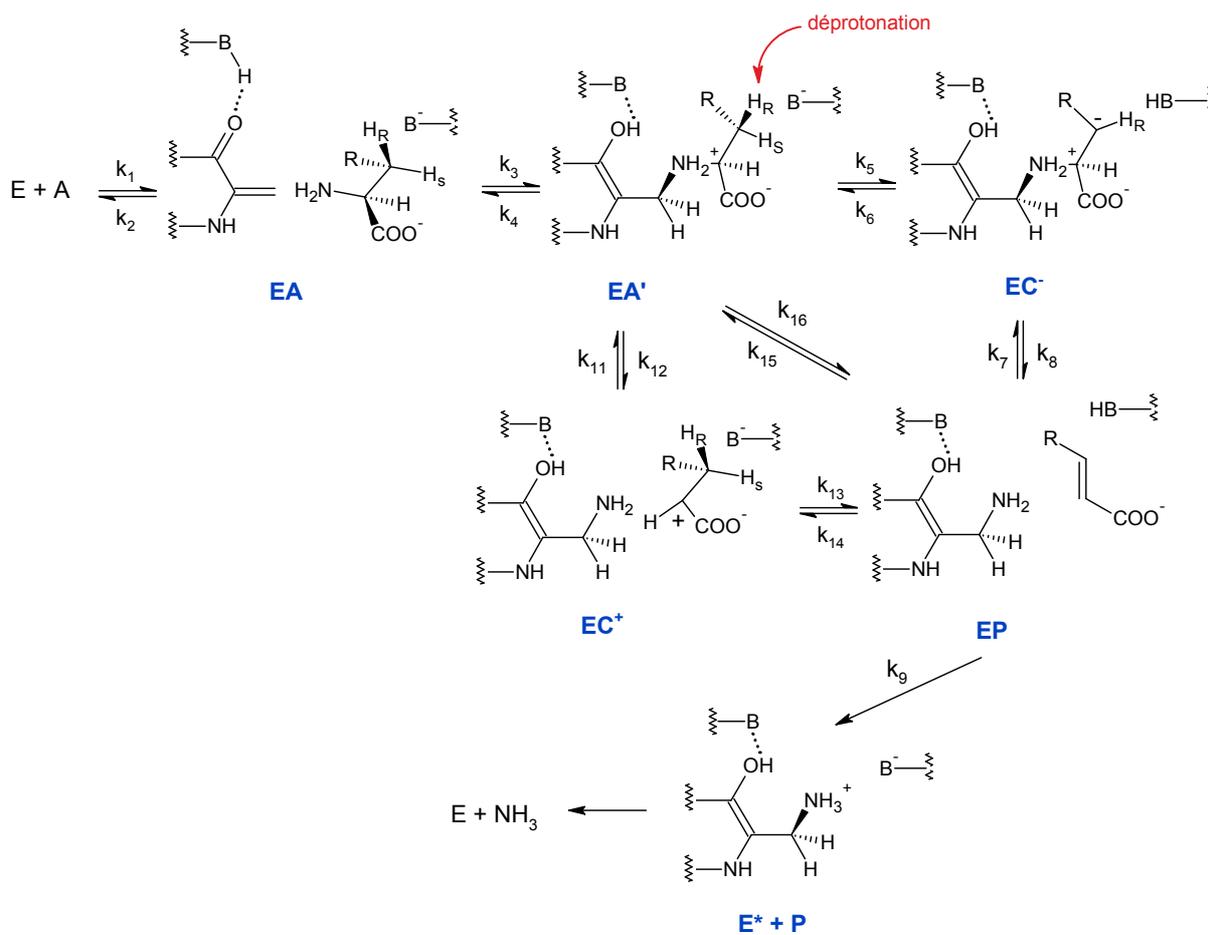
Dans plusieurs réactions enzymatiques, une forme active intermédiaire de type base de Schiff est créée. Dans ce cas encore, l'EIE de formation de la base de Schiff peut influencer sur la valeur de l'EIC de la réaction [61]. Par exemple, l'EIC-<sup>15</sup>N de la formation de la base de Schiff entre valine non-protoné et aldéhyde salicylique est égale à 0.9824. L'EIC-<sup>15</sup>N mesuré

(0.9855) de la décarboxylation de l'acide glutamique est justifié par la présence de ce type d'équilibre pendant la réaction enzymatique (Figure 57).



**Figure 57. Influence sur l'EIC d'un intermédiaire réactionnel de type base de Schiff [61]**

La situation peut être complexifiée par la présence de plusieurs substitutions isotopiques dans la molécule. Par exemple, dans les réactions où un proton intervient, la substitution par un deutérium pourra jouer sur la valeur intrinsèque de l'EIC-<sup>15</sup>N. Ce phénomène pourra être exploité pour aider à comprendre le mécanisme réactionnel. Ceci est le cas pour l'élucidation du mécanisme de la réaction catalysée par l'enzyme phénylalanine ammonia lyase (PAL), précédemment évoquée [65]. Les valeurs d'EIC-<sup>15</sup>N mesurées pour la phénylalanine (1.0021) et pour la dihydrophénylalanine (1.0047) ont été réduites après l'introduction du deutérium, ne donnant que 1.0010 pour la [3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]phénylalanine et 0.9921 pour la [3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]dihydrophénylalanine. Sur la base de cette diminution des EIC-<sup>15</sup>N et en prenant en compte l'existence d'un EIE de 1.016 pour la déprotonation, un mécanisme d'élimination de type E1cb avec une rupture de liaison C-H partiellement limitante a été proposé [65] (Figure 58).



**Figure 58. Elucidation de mécanisme réactionnel de la PAL basée sur l'observation d'EI [65]**

De même, un mécanisme de type E1cb a été proposé pour l'aspartase [66]. Par contre, la valeur de l'EIC-<sup>15</sup>N mesuré pour cette réaction (1.0239) est notamment plus importante que celle observée pour la réaction catalysée par PAL [65]. Dans ce cas où un mécanisme en deux étapes est aussi proposé, la rupture de la liaison C–N est considérée comme étant la seule étape limitante, contrairement à la PAL.

En résumé, il est évident que les effets isotopiques en <sup>15</sup>N associés à la rupture de liaisons C–N pourront être très utiles pour élucider les mécanismes réactionnels. Toutefois, ils doivent être exploités avec prudence. Quand la réaction est composée de plusieurs états de transition, il est tout à fait possible que l'EIC-<sup>15</sup>N soit totalement « étouffé » et que les valeurs mesurées ne correspondent pas à la valeur intrinsèque. A cause de la complexité de certaines réactions, l'analyse de l'EIC-<sup>15</sup>N n'est pas toujours un outil discriminant. Ce problème est bien illustré par le cas de la réaction catalysée par l'aspartate amine transférase [67]. L'EIC-<sup>15</sup>N mesuré est égal à 1.0056, beaucoup plus petit que l'EIC-<sup>15</sup>N théorique de la rupture de la liaison (1.02-1.03). Dans ce cas, la mesure des effets <sup>15</sup>N et <sup>13</sup>C n'ont apporté aucune indication sur l'étape limitante.

## 4.2.2 Effets isotopiques secondaires en $^{15}\text{N}$ lors de la rupture de liaison C–N

Des EIC- $^{15}\text{N}$  peuvent également être mesurés pendant les réactions où il n'y a pas de rupture de liaison C–N. Ces effets isotopiques cinétiques secondaires EIC (II)- $^{15}\text{N}$  ont de valeurs inférieures aux EIC- $^{15}\text{N}$ , typiquement dans la gamme de 0.9997 à 1.0011. Comme avec les EIC- $^{15}\text{N}$ , les EIC (II)- $^{15}\text{N}$  pourront aider à interpréter le mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique.

Des valeurs d'EIC- $^{15}\text{N}$  dans la gamme de 0.9997-1.0011 ont été mesurées pendant la déacylation de la *p*-nitrophénylacétate [47, 68]. Elles ont été attribuées à la contribution des formes de résonance de l'anion nitrophénolique (Figure 59).

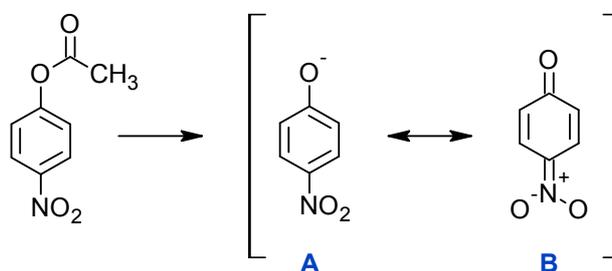
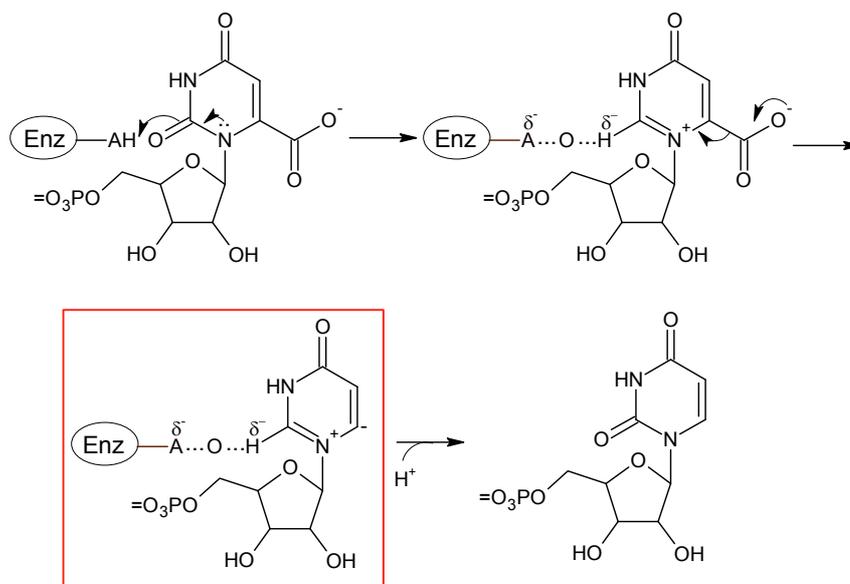
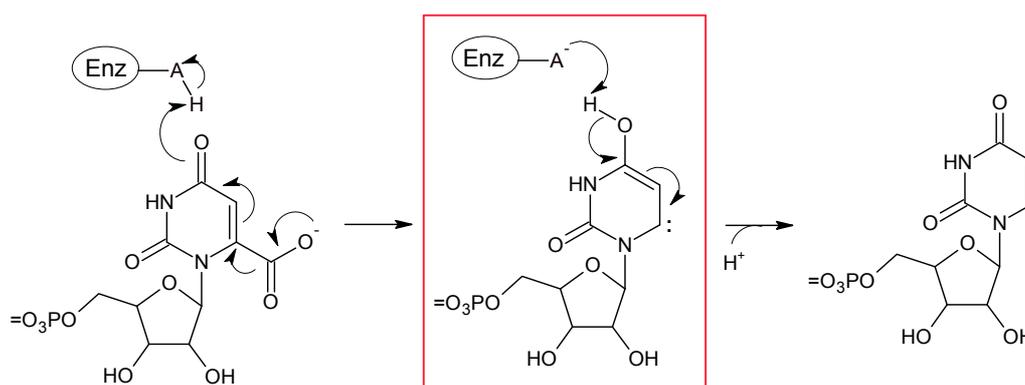


Figure 59. Résonance phényle ↔ quinone avec changement d'ordre de liaison de l'azote

Les EIC (II)- $^{15}\text{N}$  ont souvent aidé à discriminer entre deux mécanismes proposés. Pour la réaction catalysée par l'orotidine 5'-monophosphate décarboxylase (ODCase), deux mécanismes sont possibles: soit la formation d'un azote quaternaire soit le maintien de l'azote sous forme tertiaire (Figure 60). Un EIC (II)- $^{15}\text{N}$  de 1.0036 pour la position N-1 a été mesuré [69]. Ceci a été interprété comme n'indiquant aucun changement de l'ordre de la liaison C–N pendant la décarboxylation. Il est donc très probable que l'azote existe sous forme tertiaire pendant l'état de transition.



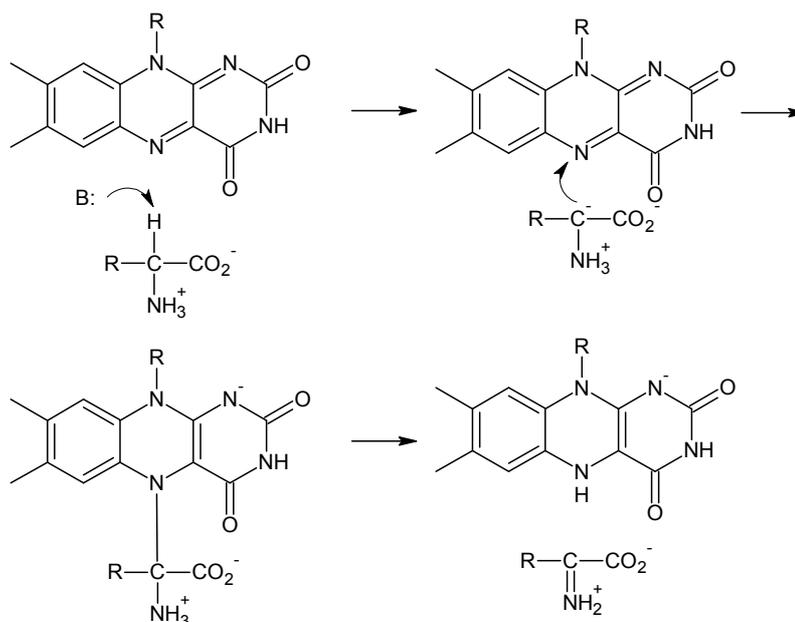
**Intermédiaire de type ylides (azote quaternaire)**



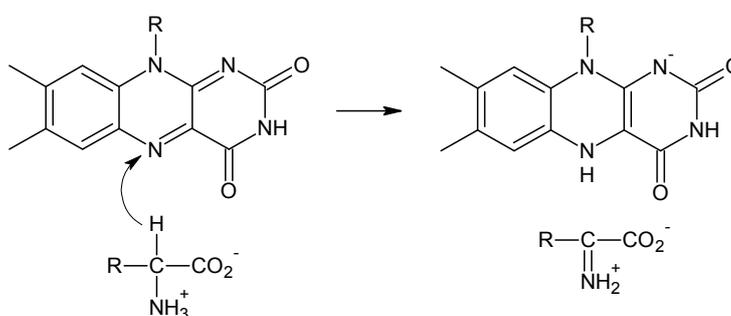
**Intermédiaire de type carbone avec protonation d'oxygène (azote tertiaire)**

**Figure 60. Structures des intermédiaires proposées pour la réaction de l'orotidine 5'-monophosphate décarboxylase [69]**

De même, l'EIC (II)-<sup>15</sup>N a été utilisé pour choisir entre deux mécanismes proposés pour l'oxydation des  $\alpha$ -hydroxyle et acides  $\alpha$ -aminés catalysée par les flavoprotéine oxydases [70] (Figure 61). Le premier mécanisme proposé est constitué de deux étapes avec élimination d'hydrogène et formation d'un carbanion. Dans l'autre, l'élimination de l'hydrogène est effectuée directement par la flavoprotéine sans formation d'anion. L'EIC (II)-<sup>15</sup>N déterminé (0.9963) indique qu'un transfert direct d'hydrogène est plus probable. La formation d'un carbanion est éliminée car dans ce cas il n'y aurait aucun changement d'ordre de la liaison pour l'azote et donc l'EIC (II)-<sup>15</sup>N serait égal à 1.000.



**Mécanisme avec intermédiaire de type carbanion**



**Mécanisme avec transfert direct d'hydrogène vers la flavine**

**Figure 61. Structures des intermédiaires proposées pour la réaction de la D-amino acid oxidase [70]**

### 4.2.3 Effets isotopiques primaires et secondaires en $^{15}\text{N}$ au cours de la création de la liaison C–N

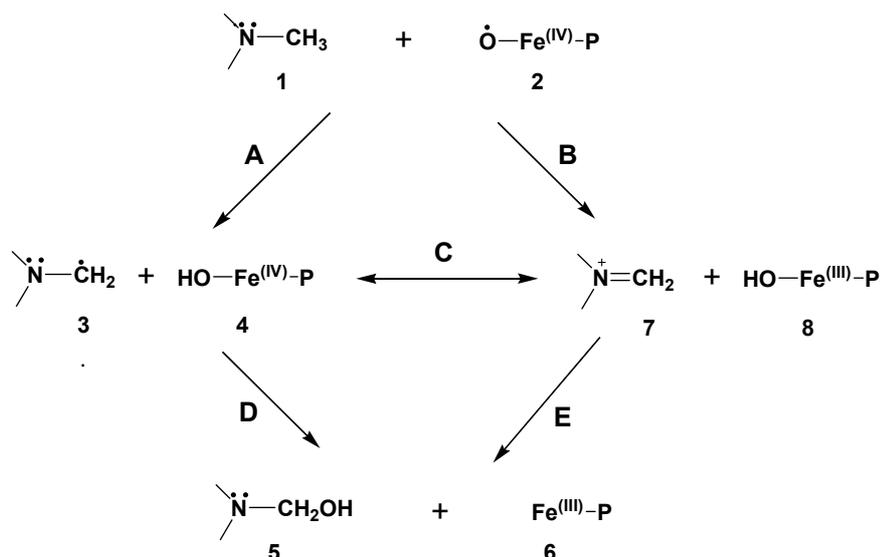
Le mécanisme de la substitution nucléophile  $\text{S}_{\text{N}}2$  a été étudié expérimentalement et modélisé [71]. Selon des études théoriques, un effet isotopique normal  $^{15}k_{\text{nuc}}$  de 1.028 est la valeur maximale possible dans le cas où l'état de transition est peu avancé (voir Chapitre 1.3.3.1). Avec l'augmentation de l'ordre de la liaison C–N ( $> 0.5$ ), l'effet devient de plus en plus inverse. Il a été observé pour plus de 20 expériences réalisées sur des substrats différents que  $^{15}k_{\text{nuc}}$  est dans la gamme 0.994–1.003 avec les effets normaux correspondants aux amines les plus basiques et par conséquent aux états de transition les moins avancés.

Pour l'addition de  $\text{NH}_3$  à une double liaison  $\text{C}=\text{C}$ , l'EIC- $^{15}\text{N}$  est inverse, environ 0.99. Ceci est en accord avec un changement dans l'état d'hybridation du carbone, de  $\text{sp}^2$  à  $\text{sp}^3$ . Par contre, dans l'environnement enzymatique, la valeur de l'EIC- $^{15}\text{N}$  pour la réaction d'addition du  $\text{NH}_3$  à la double liaison  $\text{C}=\text{C}$  du fumarate catalysée par l'aspartase est égale à 0.99, nettement plus faible [71].

En résumé, on peut constater que la gamme des effets isotopiques en  $^{15}\text{N}$  des réactions enzymatiques est de 0.98-1.03. Dans le cas de la rupture de la liaison  $\text{C}-\text{N}$  un EIC (I) normal maximal est attendu (1.02-1.03). Souvent, en fonction des paramètres comme le pH, l'EIE, et l'existence de plusieurs étapes partiellement limitantes pendant la catalyse, la valeur déterminée est inférieure à la valeur maximale, voire inverse. Généralement, les EIC (II)- $^{15}\text{N}$  se trouvent dans la gamme de 0.9997 à 1.0011. En ce qui concerne la création de la liaison  $\text{C}-\text{N}$  les EIC- $^{15}\text{N}$  primaires et secondaires sont contenus dans la fourchette de 0.990 à 1.005.

#### 4.2.4 Etudes précédentes des effets isotopiques en $^{15}\text{N}$ au cours de la dégradation des alcaloïdes

Le système enzymatique de type cytochrome P450 monooxygénase intervient régulièrement lors de réactions de *N*-déalkylation d'amines tertiaires [35]. Ceci est le cas pour la déméthylation de la nicotine chez la plante du tabac (*Nicotiana* spp.) [21]. Ces auteurs ont déterminé l'EIC- $^{15}\text{N}$  et l'EIC- $^2\text{H}$  pour la *N*-déméthylation de la nicotine *in vivo*, en exploitant des cellules de *N. plumbaginifolia* cultivées en milieu stérile. Des valeurs d'EIC- $^2\text{H}$  et d'EIC- $^{15}\text{N}$  de 0.5870 et de 1.0028 respectivement ont été mesurées. L'amplitude de l'EIC- $^{15}\text{N}$  implique un EIC (II)- $^{15}\text{N}$  et donc que la rupture de la liaison  $\text{C}-\text{N}$  n'est pas l'étape limitante de la réaction. Les valeurs de l'EIC- $^2\text{H}$  et de l'EIC- $^{15}\text{N}$  de 0.689 et de 1.0081 obtenues par calcul théorique pour les réactions partielles du mécanisme enzymatique proposé avec intervention de l'enzyme cytochrome P450 monooxygénase CYP82E4 [72] (Figure 62) sont en accord avec une l'hypothèse d'une étape limitante correspondant au transfert de l'hydroxyle du  $\text{Fe}^{(\text{III})}-\text{OH}$  vers l'iminium (E en Figure 62). De plus, les valeurs calculées infirment une autre hypothèse où l'ablation de l'hydrogène du groupe *N*-méthyle jouerait un rôle limitant. En effet, dans ce cas, les valeurs calculées pour l'étape A en Figure 62 seraient de 4.54 et 0.9995 pour l'EIC- $^2\text{H}$  et l'EIC- $^{15}\text{N}$  respectivement. Ce résultat diffère de ce qui est observé dans de nombreuses autres réactions de *N*-déméthylation [35].



**Figure 62. Mécanisme général proposé pour la *N*-déméthylation d'une amine et formes actives intermédiaires**

A, transfert d'atome d'hydrogène; B, transfert d'hydrure; C, équilibration de charge; D, transfert d'hydroxyde radicalaire; E, transfert d'hydroxyde ionique; P=porphyrine

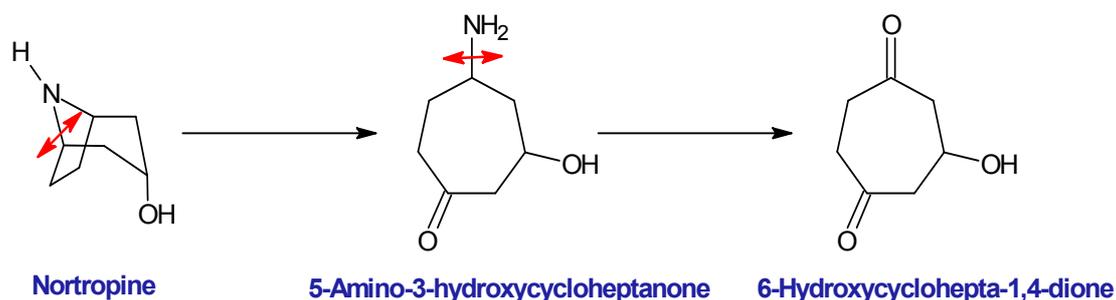
Il semble également très probable que la cytochrome P450 monooxygénase intervient lors de la déméthylation de la tropine par les *Pseudomonas* AT3 et MS2 (Kwiecień, R.A., résultats non publiés). Afin de sonder le mécanisme de *N*-déméthylation de la tropine, la voie réactionnelle a été modélisée par calcul théorique en exploitant la structure de l'enzyme cytochrome P450 monooxygénase CYP101 du *Pseudomonas putida*. Il a été constaté que le transfert d'un atome d'hydrogène du groupe *N*-méthyle au  $\text{Fe}^{(\text{IV})}\text{-O}^*$  joue un rôle important dans la réaction, la valeur de l'EIC- $^{15}\text{N}$  mesuré de 0.9969 (écart-type, 0.0009) étant en bon accord avec celle calculée pour l'étape A de la Figure 62. De plus, la barrière énergétique de 4.6–6.7 kcal/mol est en accord avec les valeurs de la littérature. Par contre, l'EIC- $^2\text{H}$  mesuré (1.08) et calculé (7.56) ne sont pas du même ordre, ce qui implique un état de transition peu ou très avancé dans la réaction partielle (voir Chapitre 1, § 1.3.3.1).

### 4.3 Analyse des effets isotopiques cinétiques au cours de la réaction d'ouverture du cycle de la nortropine et de la norpseudotropine

Pour mémoire, l'objectif majeur de ce travail est de mesurer le fractionnement isotopique au cours de la dégradation de la nortropine et de la norpseudotropine par des

bactéries *Pseudomonas* AT3, d'ensuite calculer les valeurs de l'EIC- $^{15}\text{N}$ , puis de proposer un mécanisme réactionnel pour la rupture de la liaison C–N au niveau du cycle (Figure 63).

Comme développé précédemment dans le chapitre 1 § 1.2.2, la libération de l'azote est effectuée en deux étapes avec la création d'un produit intermédiaire supposé la 5-amino-3-hydroxycycloheptanone, composé jamais isolé à partir des cultures. Toutefois, cette hypothèse est fortement étayée par la présence démontrée de la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione, produit de l'étape d'élimination de l'azote, dans le milieu de croissance de *Pseudomonas* MS2, souche inapte à métaboliser cette cétone [32]. L'élimination de l'ammoniaque nécessitant deux ruptures de liaison C–N, un fort effet isotopique est attendu.



**Figure 63. Réactions de coupure de liaisons C–N conduisant à la libération de l'atome d'azote lors du métabolisme de la nortropine**

Pour aborder cette problématique, l'évolution des valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) pendant la croissance des bactéries a été mesurée par GC-irm-MS afin de déterminer l'amplitude et le sens (enrichissement ou appauvrissement) du changement de la teneur isotopique lors de la dégradation de substrat. Il a également fallu s'assurer que la méthode analytique validée précédemment (voir Chapitre 2, § 2.4 et 2.5) s'appliquait bien à la mesure des déviations isotopiques  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) dans les cultures *in vivo* et que les variations de la teneur en  $^{15}\text{N}$  pendant la croissance étaient suffisantes pour calculer un EIC. Ensuite, l'application de l'analyse des EIC en  $^{15}\text{N}$  et en  $^2\text{H}$  pour la détermination du mécanisme de la rupture de la liaison C–N a été réalisée.

#### 4.3.1 Mesure des déviations isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ (‰) au cours du métabolisme des alcaloïdes tropaniques

L'évolution des  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de la nortropine et de la norpseudotropine en fonction du temps et de la dégradation du substrat sont présentées dans les Figures 64-67. Dans le cas du métabolisme de la nortropine les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de la norpseudotropine formée ont

été aussi mesurées (Tableau 23). De plus les écarts entre les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) initiales et finales ont été calculés afin de s'assurer qu'ils sont suffisamment grands et précis (précision  $< 0.5\text{‰}$ ) pour calculer les EICs (Tableaux 23 et 24).

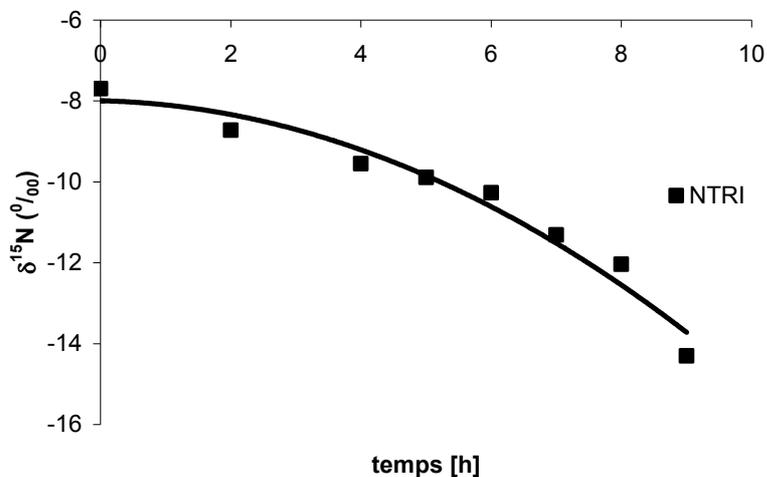


Figure 64. Evolution de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) en fonction du temps pendant la dégradation de la nortropine

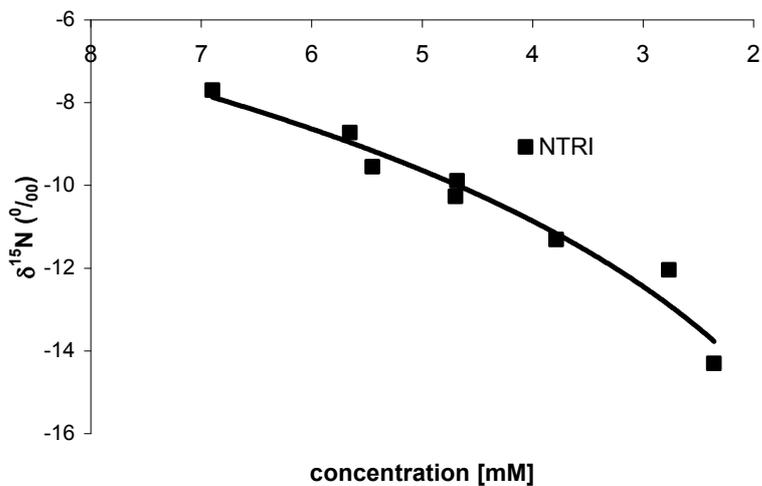


Figure 65. Evolution de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) en fonction de la concentration du substrat pendant la dégradation de la nortropine

**Tableau 23. Evolution du  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de la nortropine et de la norpseudotropine pendant la dégradation de la nortropine**

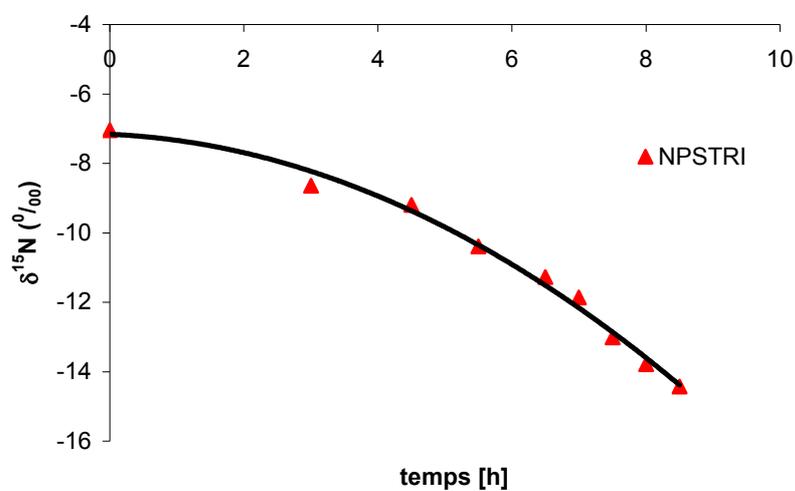
Nortropine Consommée (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		$\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰) <sup>b)</sup>
	nortropine		norpseudotropine		
	Moyenne <sup>a)</sup>	Ecart-type <sup>a)</sup>	Moyenne <sup>a)</sup>	Ecart-type <sup>a)</sup>	
0	-7.7	0.5			
46	-11.3	0.2			
60	-12.0	0.2	-7.6	0.2	3.7
66	-14.3	0.1	-8.5	0.4	3.5
$\Delta\delta^{15}\text{N}_{46}$ (‰) <sup>c)</sup>		3.6			
$\Delta\delta^{15}\text{N}_{60}$ (‰) <sup>c)</sup>		4.4		0.1	
$\Delta\delta^{15}\text{N}_{66}$ (‰) <sup>c)</sup>		6.6		0.8	

a) Chaque échantillon a été analysé trois fois par GC-irm-MS.

b)  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  (‰) à 60% de consommation =  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  (‰)<sub>60</sub> de la NPSTRI -  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  (‰)<sub>46</sub> de la NTRI;

$\Delta\delta^{15}\text{N}$  (‰) à 66% de consommation =  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  (‰)<sub>66</sub> de la NPSTRI -  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  (‰)<sub>60</sub> de la NTRI.

c)  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  (‰) à 46, 60 et 66% de consommation =  $\Delta\delta^{15}\text{N}_0$  (‰) -  $\Delta\delta^{15}\text{N}_\%$  (‰)



**Figure 66. Evolution de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) en fonction du temps pendant la dégradation de la norpseudotropine**

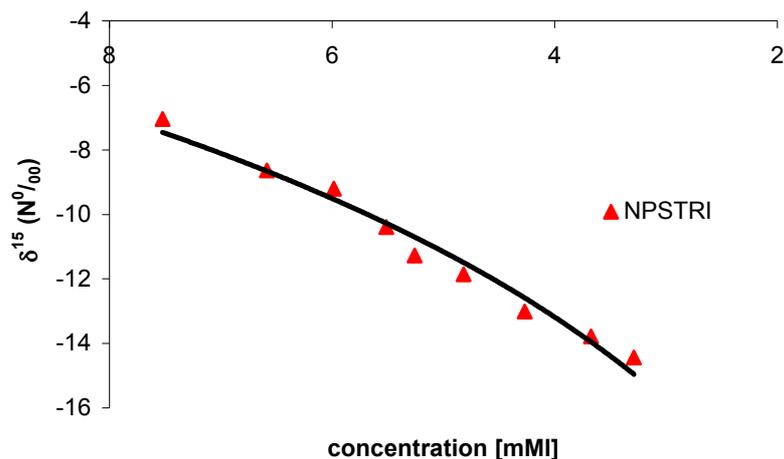


Figure 67. Evolution de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) en fonction de la concentration du substrat pendant la dégradation de la nortropine

Tableau 24. Evolution du  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) pendant la dégradation de la norpseudotropine

Norpseudotropine Consommée (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) norpseudotropine	
	Moyenne <sup>a)</sup>	Ecart-type <sup>a)</sup>
0	-7.0	0.5
43	-13.0	0.2
52	-13.8	0.2
56	-14.4	0.2
$\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰) <sub>43</sub>	6.0	
$\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰) <sub>52</sub>	6.8	
$\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰) <sub>56</sub>	7.4	

<sup>a)</sup> Chaque échantillon a été analysé trois fois par GC-irm-MS

Les Figures 64 à 67 montrent que la valeur de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) a évolué au cours de la consommation du substrat de la même manière quel que soit le substrat (nortropine ou norpseudotropine). De plus, cette évolution suit la même tendance qu'on l'observe en fonction du temps ou en fonction de la concentration résiduelle. A partir des données présentées dans les Tableaux 23 et 24 on peut constater que les écarts entre les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de départ et celles déterminées à un degré d'avancement supérieur à 50% environ sont suffisants pour permettre le calcul des effets isotopiques, le  $\Delta\delta^{15}\text{N}$  (‰) étant compris

entre 3.6 et 7.4‰, avec des écart-types de 0.4‰ environ. Tout au long de la croissance des bactéries on observe un appauvrissement du substrat. Les isotopomères contenant de l'<sup>15</sup>N sont donc métabolisés préférentiellement à ceux contenant de l'<sup>14</sup>N, ce qui implique un EIC-<sup>15</sup>N inverse.

#### 4.3.2 Calcul des effets isotopiques en azote-15 au cours de la dégradation des alcaloïdes nortropaniques

Les EIC-<sup>15</sup>N lors la dégradation de la nortropine et de la norpseudotropine ont été calculés à partir des  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) mesurées sur les alcaloïdes extraits de douze cultures réalisées pour moitié avec la nortropine comme substrat et pour moitié avec la norpseudotropine selon le protocole 5.8.2. Les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) en abondance naturelle mesurées par CG-irm-MS sur les dérivés carbamate (voir protocole 5.7.1) ont été utilisées pour calculer les effets isotopiques selon les équations suivantes :

$EIC = \frac{\ln(1-F)}{\ln\left[(1-F)\left(\frac{R_t}{R_0}\right)\right]}$	Avec :
$F = \frac{S_0 - S_t}{S_0}$	<p><math>F</math>            facteur d'avancement de la réaction</p> <p><math>R_0</math>            rapport isotopique du substrat au temps zéro</p> <p><math>R_t</math>            rapport isotopique du substrat au temps t</p> <p><math>S_0</math>            quantité de substrat au temps zéro</p> <p><math>S_t</math>            quantité de substrat au temps t</p>

Les valeurs d'EICs ainsi obtenues pour la nortropine et la norpseudotropine sont présentées dans le Tableau 25.

Selon le Tableau 25, l'EIC-<sup>15</sup>N moyen mesuré pour la dégradation de la nortropine est égal à 0.9947 et de 0.9942 pour la norpseudotropine. Toutefois, une question reste concernant la fiabilité de ces données : les valeurs correspondent-elles bien aux vraies valeurs d'EIC intrinsèque ou ne sont-elles que des valeurs apparentes et quelle est la fiabilité de ces données du point de vue de l'interprétation mécanistique ?

**Tableau 25. Valeurs d'EIC-<sup>15</sup>N obtenues pour la dégradation de la nortropine et de la norpseudotropine**

nortropine			norpseudotropine		
Culture	EIC <sup>a)</sup>		Culture	EIC <sup>b)</sup>	
	Moyenne <sup>c)</sup>	Ecart-type <sup>c)</sup>		Moyenne <sup>c)</sup>	Ecart-type <sup>c)</sup>
1	0.9945	0.0009	7	0.9939	0.0001
2	0.9947	0.0005	8	0.9942	0.0003
3	0.9946	0.0004	9	0.9945	0.0003
4	0.9943	0.0012	10	0.9944	0.0005
5	0.9947	0.0012	11	0.9939	0.0003
6	0.9956	0.0005	12	0.9942	0.0003
<b>Moyenne<sup>d)</sup></b>	<b>0.9947</b>	<b>0.0009</b>	<b>Moyenne<sup>d)</sup></b>	<b>0.9942</b>	<b>0.0003</b>

<sup>a)</sup> EICs calculés à partir des  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) mesurées avec F entre 0.5 et 0.7.

<sup>b)</sup> EICs calculés à partir des  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) mesurées avec F entre 0.6 et 0.75.

<sup>c)</sup> Chaque échantillon a été analysé trois fois par CG-irm-MS.

<sup>d)</sup> Valeurs calculées sur la totalité des résultats.

#### 4.3.2.1 EIC-<sup>15</sup>N pendant la dégradation de la norpseudotropine

Comme le montre les résultats présentés dans le chapitre 3, la norpseudotropine est consommée, comme substrat unique de croissance, quasi exclusivement par voie directe (< 10% par voie indirecte). Ainsi, l'épimérisation entre la norpseudotropine et la nortropine étant très faible, on peut raisonnablement affirmer que la valeur d'EIC déterminée de 0.9942 (écart-type, 0.0003) est fiable et représente la valeur de l'EIC intrinsèque de cette réaction.

#### 4.3.2.2 EIC-<sup>15</sup>N pendant la dégradation de la nortropine

Par contre, l'interprétation de la valeur obtenue pour la nortropine est plus compliquée. Comme rapportée dans la partie § 3.2.1, au cours de la consommation de la nortropine comme substrat unique, une oxydation en nortropinone pouvant atteindre 20% environ a été démontrée. De plus, selon le modèle présenté en partie § 3.3.3.3, une proportion importante de ces 20% est convertie en norpseudotropine. On peut donc considérer que la valeur apparente mesurée de l'EIC de 0.9947 (écart-type, 0.0009) est la résultante de  $\geq 80\%$  de contribution de l'EIC de dégradation et de  $\leq 20\%$  de contribution de l'EI lié à l'épimérisation (Chapitre 3, Figure 50).

Une question majeure est donc : quel est l'impact réel de la part de métabolisme par voie indirecte sur la valeur d'EIC calculée ? Un premier élément à prendre en compte pour tenter de répondre à cette question est que 80% au moins de la nortropine est métabolisée directement (Chapitre 3, § 3.3.3.1). D'autre part, pour les 20% restant, même si la totalité est épimérisée en norpseudotropine on a constaté qu'en situation de co-métabolisme c'est la nortropine qui est dégradée préférentiellement, comme le montre les cultures sur co-substrat (Chapitre 3, Figure 48). Il semble donc très probable que pour les cultures avec la nortropine comme seul substrat la norpseudotropine formée n'est que très peu métabolisée pour des degrés d'avancement de réaction compris entre 0.5 et 0.7 correspondant aux conditions de mesure des EIC. Il semble donc possible de conclure que l'impact sur la valeur d'EIC pour la nortropine est très limité. Ceci semble d'ailleurs conforté par les valeurs quasi similaires mesurées pour les deux composés (nortropine 0.9947 (écart-type, 0.0009); norpseudotropine 0.9942 (écart-type, 0.0003)).

Il est également possible d'estimer la valeur de l'EI lié à l'épimérisation car il a été possible, pour des degrés d'avancement de réaction suffisants, de mesurer les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) pour la norpseudotropine produite par isomérisation (Tableau 23). On observe ainsi, pour des degrés d'avancement de 0.6 et 0.66, une différence notable entre la valeur moyenne de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de la nortropine et celle de la norpseudotropine produite. Ces éléments montrent qu'il existe bien un EI associé à l'épimérisation. A partir de ces données on peut calculer un pseudo EIE de valeur moyenne 0.9942 (Annexe 2, Tableau A.2.1) dont la proximité avec la valeur mesurée pour l'EIC lié au métabolisme de la nortropine montre que la valeur de l'EIC est peu affectée.

En conclusion, si on considère, d'une part, que l'EI lié à l'épimérisation est proche en valeur de l'EIC lié au métabolisme direct de la nortropine et que, d'autre part, la norpseudotropine formée en cours de métabolisme est majoritairement accumulée et pas métabolisée, on peut avancer que l'EIC mesuré est très proche voire identique à l'EIC réel.

#### **4.3.2.3 Premières conclusions sur les EIC-<sup>15</sup>N pendant la dégradation de la nor(pseudo)tropine**

1. Les amplitudes pour les deux valeurs étant relativement faibles (0.53 and 0.58% pour la nortropine et pour la norpseudotropine respectivement) et l'effet isotopique étant inverse, on peut postuler que l'effet mesuré n'est pas lié à la rupture de la liaison C–N. Pour mémoire (voir Chapitre § 4.2), habituellement les effets liés à la rupture des liaisons sont normaux, c'est-à-dire supérieur à 1.00 et

souvent dans la gamme de 1.02-1.03. L'interprétation de ces données en lien avec le mécanisme réactionnel proposé sera développée dans le chapitre, § 4.4.

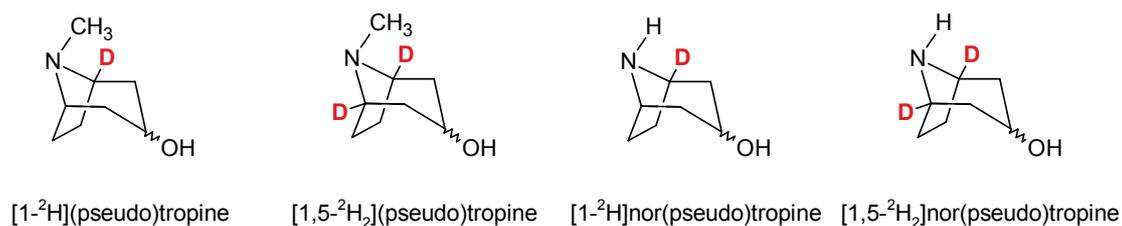
2. Ces deux valeurs sont très proches, voire quasi identiques et donc il est tout à fait probable que les deux substrats sont dégradés par la même enzyme. Cette proposition est en accord avec la métabolisation préférentielle de la nortropine en cas de co-métabolisme.

Si la rupture de la liaison C–N n'est pas l'étape limitante, on peut envisager que celle-ci soit liée à la rupture de liaisons C–H. Au cours de la réaction, l'hydrogène d'un des carbones tertiaires 1 ou 5 (voir Figure 68) est éliminé. Il a donc semblé important d'effectuer la mesure des EIC-<sup>2</sup>H sur les positions 1 et 5 pour établir si cette rupture intervient dans l'étape limitante de la réaction.

### 4.3.3 Mesure des effets isotopiques en deutérium au cours de la dégradation de la [1-<sup>2</sup>H]nor(pseudo)tropine et de la [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nor(pseudo)tropine

L'hypothèse est que, selon le modèle d'étude présenté en Figure 63, l'un ou l'autre de ces hydrogènes sur les positions 1 et 5 doit participer à la réaction de rupture de la liaison C–N. En effet, le produit d'ouverture du cycle porte un groupement carbonyle sur le carbone concerné (Figure 63) et donc, l'hydrogène en position 1 ou 5 est éliminé, réaction qui nécessite la coupure de la liaison C–H avec la possibilité d'un EIC-<sup>2</sup>H associé.

Les mesures d'EIC-<sup>2</sup>H ont été faites en exploitant des composés marqués spécifiquement en <sup>2</sup>H sur les carbones 1 ou/et 5 qui ont été synthétisés au laboratoire par Anaïs Fournial, chercheuse postdoctorale sur le projet ANR-2008 ISOMODTS PCV08-320274. Pour cela, elle a adapté la stratégie qu'elle avait développée pour introduire du deutérium en positions 1 ou 1,5 de la (pseudo)tropine [73] (Figure 68) pour préparer de la [1-<sup>2</sup>H]nortropine, de la [1-<sup>2</sup>H]norpseudotropine, de la [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nortropine, et de la [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]norpseudotropine (Figure 68) (voire les protocoles de synthèses, présentés en Annexe 1).



**Figure 68. Les alcaloïdes marqués en en deutérium sur les positions 1 et 1,5**

Les bactéries *Pseudomonas* ont été cultivées avec comme substrat un mélange de composé marqué et non-marqué. Selon la quantité de composé marqué disponible, l'enrichissement en  $^2\text{H}$  du substrat était de l'ordre de : [1- $^2\text{H}$ ]nortropine (1/1); [1- $^2\text{H}$ ]norpseudotropine (2/1); [1,5- $^2\text{H}_2$ ]nortropine (1/2); [1,5- $^2\text{H}_2$ ]norpseudotropine (1/1). La croissance a été arrêtée après consommation d'environ 80% du substrat initial. Les variations des taux d'enrichissements ont été mesurées pour les substrats en début et en fin de réaction en établissant le rapport d'intensité des pics isotopiques par CG-MS (procédure 5.8.3). Les rapports de M+1/M ou de M+2/M sont rapportés dans le Tableau 26.

**Tableau 26. Rapports d'intensité des pics isotopiques pour les alcaloïdes de série nortropanique enrichis en deutérium pendant leur dégradation par les cultures de *Pseudomonas***

Substrat	nortropine		norpseudotropine	
	$t_0$	$t_x$ <sup>a)</sup>	$t_0$	$t_x$ <sup>a)</sup>
	<b>M+1 / M</b>		<b>M+1 / M</b>	
[1- $^2\text{H}$ ]alcaloïde	0.97	0.91	1.85	1.82
	0.96	0.92	1.89	1.95
	<b>M+2 / M</b>		<b>M+2 / M</b>	
[1,5- $^2\text{H}_2$ ]alcaloïde	0.57	0.56	1.03	1.09
	0.68	0.63	1.09	1.04

<sup>a)</sup>  $t_x$  = temps quand 80% environ du substrat a été consommé.

Les résultats montrent qu'il n'y a aucun fractionnement isotopique significatif, ce qui implique aucun EIC- $^2\text{H}$  au cours de la dégradation de ces quatre composés même pour un degré d'avancement de la réaction important. Il est évident donc que l'EIC est nul (égal à 1.00) et que, clairement, l'ablation de l'hydrogène ne fait pas partie de l'étape cinétiquement limitante de la réaction.

## 4.4 Proposition d'un mécanisme pour la réaction de l'ouverture du cycle

### 4.4.1 Choix du modèle de base

Cette réaction nécessite que la liaison entre l'azote et le carbone en position 1 ou 5 soit rompue et que simultanément un oxygène soit introduit sur ce même carbone (Figure 69). Trois étapes clés peuvent être évoquées :

- L'ablation d'un hydrogène porté par le carbone tertiaire en position 1 ou 5<sup>1</sup> pour générer un radical.
- La désactivation de ce radical par oxydation.
- La coupure oxydative de la liaison N–C.

Le modèle général adopté implique une réaction en deux étapes. L'ablation de l'hydrogène et l'introduction d'un groupement hydroxyle est une réaction de catalyse classique de la cytochrome P450 monooxygénase. La seconde étape peut être envisagée comme un simple mécanisme acido-basique de type "push/pull" ou "pull/push". Ceci peut résulter de l'action d'une alcool déshydrogénase, ou encore être dû à une réaction non-enzymatique avec l'eau (voir Figure 69).

Étape 1 : CYP450 Monooxygénase

Étape 2 : Alcool déshydrogénase

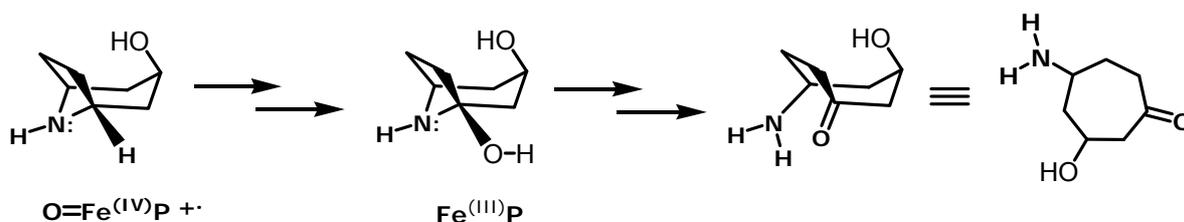


Figure 69. Modèle général pour la rupture oxydative de la liaison N–C1 ou N–C5 de la nor(pseudo)tropine

(NB : La figure ne montre que l'exemple de la nortropine)

<sup>1</sup> Chimiquement les positions 1 et 5 sont équivalentes mais, lorsque le substrat est orienté dans le site actif de l'enzyme, leurs positions relatives par rapport au centre réactionnel diffèrent. Néanmoins, pour faciliter la discussion, le carbone 1 sera celui considéré comme étant impliqué dans la réaction.

#### 4.4.2 Modèle de l'oxydation en 5' de la nicotine

L'introduction d'une fonction cétone dans un hétérocycle a déjà été étudiée pour la nicotine: la réaction majeure permettant la détoxification de la nicotine chez les mammifères est l' $\alpha$ -oxydation du cycle pyrrolidinyl de la nicotine conduisant à la cotinine (Figure 70). Avant d'aller plus loin dans l'analyse d'un modèle pour la nor(pseudo)tropine, il semble utile d'étudier plus en détails l'exemple précédent qui présente des similarités.

Cette réaction a été initialement étudiée dans les microsomes hépatiques humains. Le produit principal de l'oxydation, la cotinine, est ensuite oxydée en d'autres positions du cycle pyrrolidinyl et la *cis*-3'-hydroxycotinine est le produit majeur d'excrétion [74]. Il est généralement admis que la dégradation dans les microsomes hépatiques est initiée par l'action de la cytochrome P450 monooxygénase sur la nicotine impliquant l'ablation de l'hydrogène 5'-pro(*E*) pour former un intermédiaire ionique  $\Delta^{1,5'}$ -iminium [75]. Ceci a été démontré par la capture de cet intermédiaire par  $\text{CN}^-$  pour former un adduit  $\alpha$ -cyano stable [76]. L'intermédiaire ionique  $\Delta^{1,5'}$ -iminium est, ensuite, hydroxylé en position 5' puis oxydé à nouveau par une aldéhyde oxydase pour créer le groupement cétonique en 5'. Si, effectivement, l'introduction du groupement hydroxyle pourrait résulter de l'action de la CYP450 monooxygénase, il a été démontré que l'oxygène introduit provenait de l'eau [77] et donc que cela n'était pas compatible avec le mécanisme classique de type "oxygen rebound" associé à la CYP monooxygénase. D'après la littérature [78], il est probable que l'hydroxylation soit réalisée par l'aldéhyde oxydase, réagissant sur l'iminium en solution libre [79] afin donner la cotinine [74].

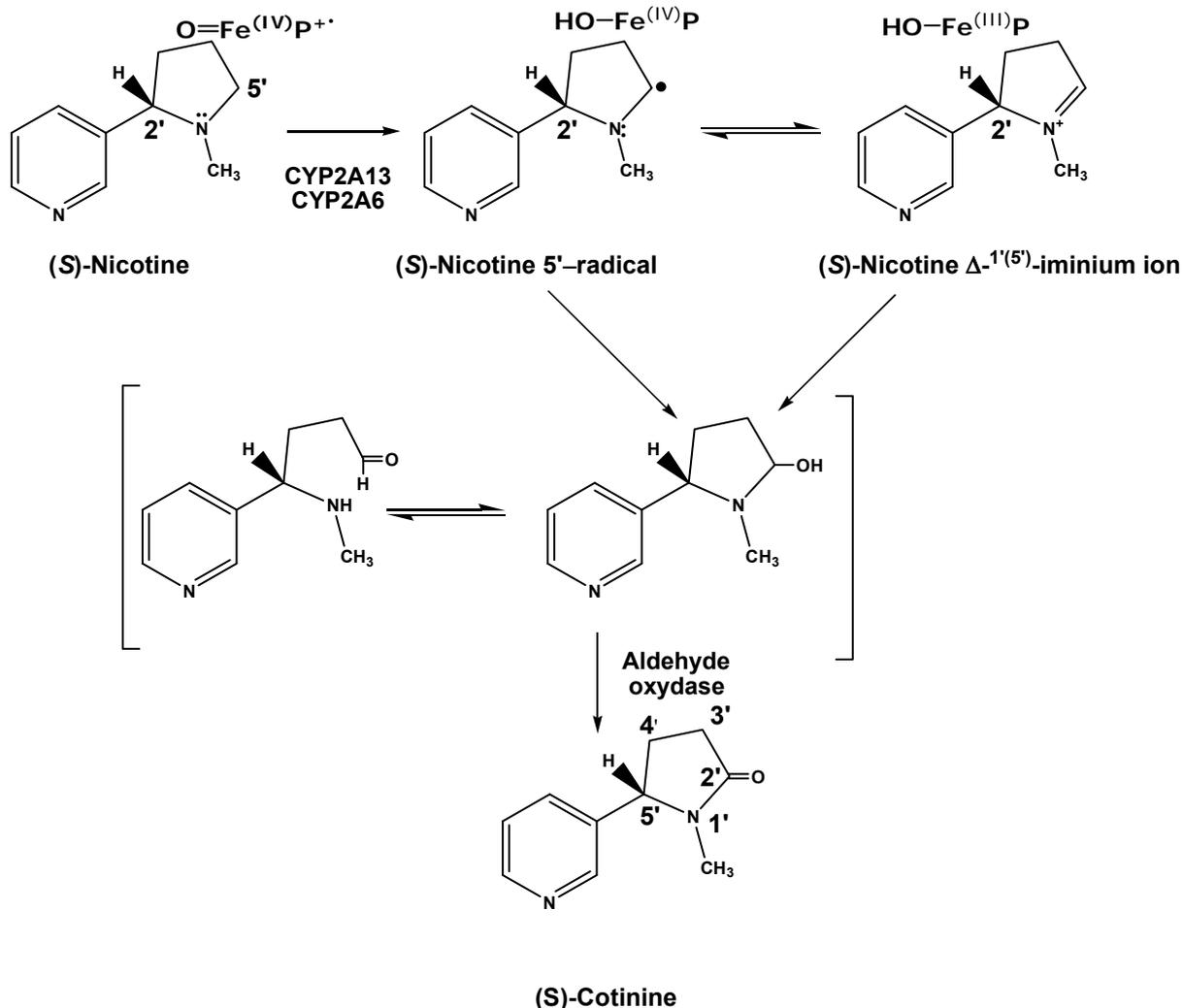


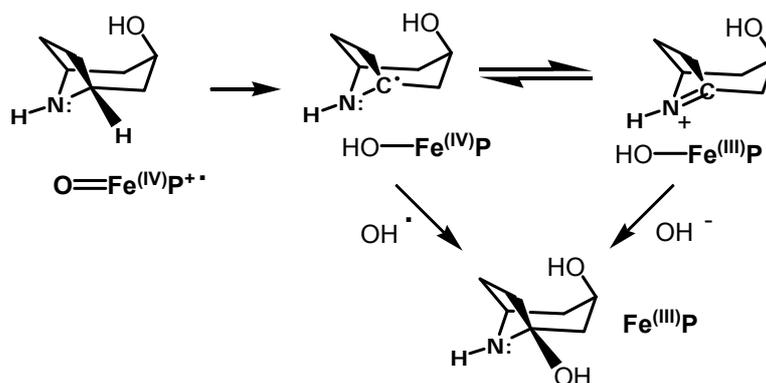
Figure 70. Modèle schématique pour l' $\alpha$ -oxydation de la partie pyrrolidinyl de la nicotine par les microsomes hépatiques

#### 4.4.3 Proposition d'un modèle pour la coupure oxydative de la nor(pseudo)tropine

De la même manière que pour la nicotine, la coupure oxydative de la nor(pseudo)tropine implique l'introduction d'une fonction cétone et pourrait donc, au premier abord, présenter un mécanisme similaire. Toutefois, l'application de ce modèle à la coupure oxydative de la nor(pseudo)tropine rencontre immédiatement des difficultés.

La première étape est, très probablement, similaire, avec l'ablation de l'hydrogène en position 1 par action de la CYP450 monooxygénase et création concomitante d'un radical sur cette même position.

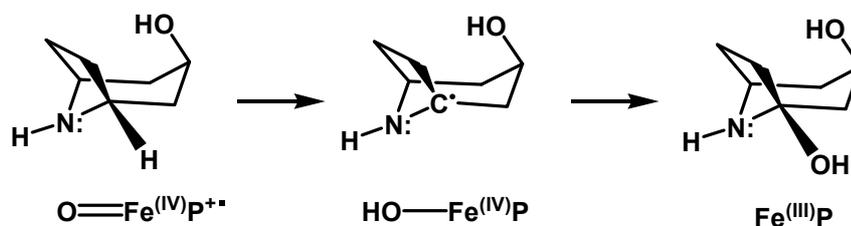
Pour la suite du mécanisme, il y a deux différences structurales fondamentales entre nor(pseudo)tropine et nicotine qui entrent en jeu et qui rendent tout parallèle mécanistique improbable. Premièrement, l'azote est présent sous forme d'amine secondaire, ce qui en fait une base plus forte. Deuxièmement, la rupture de liaison se fait entre l'azote et un carbone tertiaire et non secondaire. Par conséquent, le cas d'une réaction analogue à celle conduisant à la formation de la cotinine sera comme présenté sur Figure 71.



**Figure 71. Schéma de l'hydroxylation théorique de la nortropine par voie impliquant une intermédiaire de type iminium**

La formation de l'intermédiaire iminium (Figure 71) n'est pas envisageable dans le cas de la structure bicyclique rigide présente, tout au moins pas sans exercer d'extrêmement fortes contraintes sur les liaisons C<sub>1</sub>—C<sub>7</sub> et C<sub>1</sub>—C<sub>2</sub>. Par conséquent, on peut conclure qu'un intermédiaire iminium est par nature stériquement impossible. De plus, les calculs théoriques en phase gazeuse montrent que la distance entre N et C dans les intermédiaires (Figures 74 et 76) est légèrement supérieure à celle d'une simple liaison, ce qui est incompatible avec un intermédiaire iminium (Kwiecień, R.A., résultats non publiés).

Par conséquent, pour le modèle de travail, il est préférable de proposer que l'oxygène soit introduit à partir de dioxygène par action de la CYP450 monooxygénase via une réaction classique de type « oxygen rebound » (Figure 72).



**Figure 72. Modèle général pour l'étape 1 de la réaction partielle de rupture oxydative de la liaison N-C1 de la nor(pseudo)tropine : participation de la CYP450 monooxygénase**

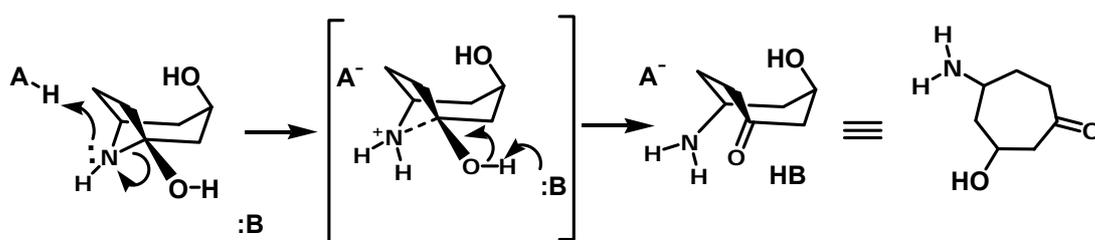
(NB : La figure ne montre que l'exemple de la nortropine)

Bien qu'aucune preuve n'ait encore été apportée pour justifier de l'origine de l'oxygène, ce modèle s'accorde bien avec les données théoriques. En effet, les calculs réalisés en phase gazeuse sont totalement compatibles avec le chemin réactionnel proposé et peuvent être définis un état de transition et des effets isotopiques pour l'ablation de l'hydrogène abstraction (Chapitre 4.3.3).

L'étape "d'oxygène rebound" à partir de Fe–OH vers le carbone radicalaire conduirait à la formation de la 1-hydroxynortropine. Ce composé n'a jamais été observé ni pour les plantes ni pour *Pseudomonas* AT3. Toutefois, considérant, le fait que toutes calystegines d'origine naturelle connues (polyhydroxylées norpseudotropines) sont hydroxylées en position C-1 [80], il est tentant de postuler que l'hydroxyle en position 1 est le premier introduit et qu'une hydroxylation ultérieure est nécessaire pour stabiliser la structure.

Pour *Pseudomonas*, étant donné que le composé hydroxylé en 1 n'est pas observé dans le milieu on peut envisager qu'il soit, en fait, rapidement oxydé. Deux possibilités peuvent être proposées pour cette oxydation. Soit il s'agit d'une réaction enzymatique par l'action d'une alcool déshydrogénase soit d'une réaction non enzymatique par hydrolyse directe impliquant un échange d'hydrogène avec l'eau. Ce qui est certain, c'est qu'il ne peut s'agir d'une réaction catalysée par un aldéhyde oxydase, comme pour la nicotine, pour les raisons évoquées auparavant.

Dans le cas d'une réaction enzymatique impliquant une oxydoréductase le schéma réactionnel global peut être résumé comme présenté sur Figure 73.



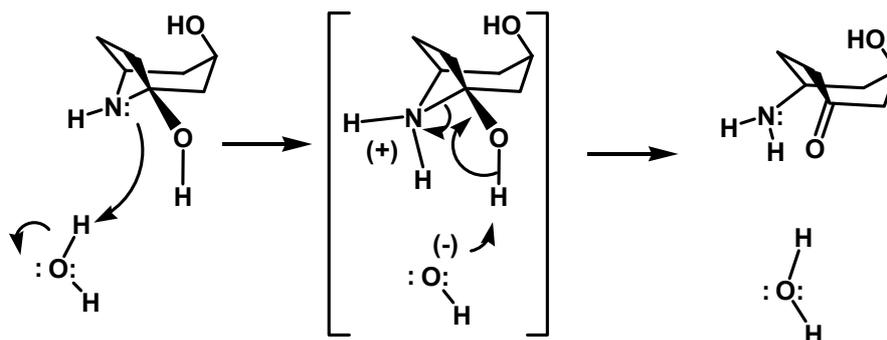
**Figure 73. Modèle général pour l'étape 2 de la réaction partielle de rupture oxydative de la liaison N–C1 de la nor(pseudo)tropine : participation d'une alcool déshydrogénase**

(NB : La figure ne montre que l'exemple de la nortropine)

Pour ce modèle, la réaction pourrait être initiée par la protonation de l'azote ou par l'ablation de l'hydrogène du groupement hydroxyle. La protonation peut être due à un résidu acide, comme le glutamate, ou au NAD(P)H. Pour l'ablation d'hydrogène, la base peut être soit un résidu d'acide aminé soit un ion hydroxyle. Dans le site actif présumé de l'enzyme, la protonation de l'azote par transfert d'un H<sup>+</sup> à partir d'un résidu acide permet de fragiliser la liaison N–C. Les calculs théoriques donnent dans ce cas une valeur de 0.779 pour l'indice de

liaison de Wiberg, une valeur très inférieure à celle d'une liaison simple forte (1.000). Toutefois, la protonation, n'est par elle-même, suffisante pour conduire à la rupture de la liaison. Par conséquent, l'intervention d'un résidu basique est nécessaire pour jouer le rôle d'accepteur de l'hydrogène du groupement hydroxyle, permettant la rupture de la liaison et la formation de la fonction cétone en position C.

Une hypothèse alternative serait que l'eau sert, tout à la fois, de donneur et d'accepteur de proton, tel que montré dans le Figure 74.



**Figure 74. Modèle général pour l'étape 2 de la réaction partielle de la rupture oxydative de la liaison N-C1 de la nor(pseudo)tropine : participation d'une molécule de l'eau**

(NB : La figure ne montre que l'exemple de la nortropine)

Dans ce cas, la cascade de réactions est probablement initiée par la protonation de N, la coupure de la liaison et l'ablation de l'hydrogène se faisant ensuite spontanément.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de preuves expérimentales qui permettent de trancher entre ces deux alternatives. Toutefois, des réflexions peuvent être menées sur la base des études théoriques réalisées récemment au laboratoire par Dr Renata Kwiecień sur cette réaction. Bien que ces résultats, non publiés à l'heure actuelle, ne fassent, en aucune façon, partie de ce travail, ils seront utilisés dans la discussion suivante pour approfondir la réflexion sur les mécanismes hypothétiques.

#### **4.4.3.1 Effets isotopiques théoriques et expérimentaux en rapport avec le modèle proposé**

Pour mémoire, les effets isotopiques mesurés en  $^{15}\text{N}$  lors de l'ouverture du cycle de la nortropine et de la norpseudotropine sont de 0.9947 et de 0.9942 respectivement. Ces valeurs très proches l'une de l'autre impliquent un mécanisme de réaction équivalent, très probablement catalysé par la même enzyme. On peut également noter que les amplitudes

des valeurs de l'EIC sont relativement faibles (0.53 and 0.58% respectivement) et que les EIC sont inverses. Pour ces raisons, on peut considérer que l'étape limitante n'est pas la rupture de la liaison C–N et, de plus, à l'inverse des mécanismes réactionnels décrit dans le chapitre § 4.2.1, l'intervention d'un état de transition tétraédrique (carbinolamine) n'est pas envisageable.

#### **4.4.3.2 Les effets isotopiques résultent-ils de l'ablation de l'hydrogène en position 1 ?**

Les effets isotopiques associés à l'ablation d'un hydrogène ont été mesurés expérimentalement pour de nombreux systèmes et ont fait l'objet de très nombreuses études [81]. Dans l'exemple de la *N*-déméthylation, les valeurs de EIC-<sup>2</sup>H mesurées expérimentalement sont très variables, le plus souvent comprises entre 2.5 et 4.5, et la plupart du temps très inférieures aux valeurs théoriques calculées [82-84]. Dans de nombreux cas, seul un effet minime voire nul a pu être mesuré (voir [84] et les publications y incluses). Cela pourrait être le reflet d'un état de transition très ou, au contraire, très peu avancé (voir Chapitre 1.3.3.1), mais cet aspect serait pris en compte dans les valeurs théoriques calculées. L'explication donnée le plus souvent est celle d'un effet isotopique masqué. Ce type d'effet masqué est rencontré fréquemment dans les réactions multi étapes catalysées par les CYP450 monooxygénases. Dans notre cas, cela signifie que l'ablation de l'hydrogène de C1 par l'enzyme (Figure 72) n'est pas l'étape limitante. En effet, les valeurs théoriques calculées indiquent un effet EIC-<sup>2</sup>H de valeur comprise entre 6.66 et 7.63 selon l'état de spin de l'atome de fer du cycle porphyrinique, valeurs totalement incompatibles avec la valeur de 1.00 mesurée expérimentalement. Ceci pourrait donc expliquer pourquoi aucun effet isotopique EIC-<sup>2</sup>H n'a été observé pour l'ouverture du cycle de la nor(pseudo)tropine. Ceci est comparable à ce qui est observé pour l'ablation du 5'-pro(*E*)-hydrogène de la nicotine, réaction pour laquelle aucun EIC-<sup>2</sup>H significatif n'a été mesuré [76].

D'autre part, les valeurs théoriques calculées pour l'azote indiquent un effet EIC-<sup>15</sup>N quasi nul de valeur égal à 0.9996, ce qui est normal, l'atome d'azote n'étant pas impliqué dans le mécanisme réactionnel.

Il semble donc raisonnable d'éliminer la réaction partielle proposée en Figure 72 comme étant représentative de l'étape limitante.

#### **4.4.3.3 Les effets isotopiques résultent-ils de la protonation de l'atome d'azote ?**

Comme illustré dans les Figures 73 et 74, un simple mécanisme acido-basique de type "push/pull" ou "pull/push" peut être proposé pour la rupture simultanée de la liaison C–N

avec l'oxydation en cétone de l'hydroxyle à C1. En l'absence de toute autre donnée expérimentale, il n'est pas possible de dire comment cette réaction se déroule.

Toutefois, des éléments d'information concernant la probabilité de ce mécanisme peuvent être obtenus en comparant les effets isotopiques mesurés expérimentalement et les valeurs théoriques calculées au laboratoire par Dr Renata Kwiecień.

Considérant que la protonation de  $>N-H$  est un processus qui peut se produire spontanément dans les conditions de la réaction (milieu aqueux à pH physiologique), le modèle dans lequel la protonation initie la coupure oxydative a été retenu (Figure 74). La réaction du doublet libre de l'azote avec l'eau résulte en la formation des espèces  $NH_2^+$  et  $OH^-$ . L'ion hydroxyle formé récupère ensuite le proton du groupement hydroxyle pendant que conjointement l'atome d'azote récupère son doublet libre lors de la rupture de la liaison C–N. Un état de transition a été obtenu pour cette réaction correspondant à une barrière d'énergie de 16.7 kcal/mol (relativement au substrat). Dans l'état de transition, la liaison N–C est affaiblie (indice de liaison de Wiberg=0.756), la liaison C–O est renforcée (indice de liaison de Wiberg=1.138) et, point critique, le H du groupement hydroxyle en C1 est faiblement lié tout à la fois à l'oxygène du groupement hydroxyle et à celui de l'ion hydroxyle  $OH^-$  (indices de liaison de Wiberg=0.378 and 0.352, respectivement). L'état de transition est à la limite de la rupture de liaison. Toutefois le produit de la rupture a une énergie de 2.82 kcal/mol relativement au substrat, ce qui indique que la réaction est probablement en équilibre rapide. Toutefois, il est important de garder à l'esprit qu'il s'agit de valeurs calculées en phase gazeuse et ne prenant en compte ni les effets de solvation ni l'environnement enzymatique.

De plus, du point de vue métabolique, le composé 5-amino-3-hydroxycycloheptanone (**19**) n'est pas accumulé *in vivo*, par conséquent la réaction de conversion de l'ion 5'hydroxynor(pseudo)tropinium en composé **19** doit être fortement déplacé vers la formation du composé **19** en raison de sa rapide métabolisation ultérieure.

Ainsi que mentionné auparavant, cette étape peut être enzymatique ou « spontanée ». Une preuve pourrait être apportée par la mesure de l'effet isotopique de solvant. Un effet plus grand est attendu si la réaction est non-enzymatique. Les effets isotopiques EICs- $^2H$  ont été calculés pour les deux transferts d'hydrogène : 1.90 pour la protonation de N et 3.85 pour l'oxydation de l'hydroxyle. Toutefois, s'il y a un échange rapide dans l'étape de protonation on ne mesurera qu'un faible voire négligeable effet isotopique de solvant.

Un élément supplémentaire en faveur du modèle concerté est apporté par la comparaison des valeurs calculées des EIC- $^{15}N$  associées à chacune des étapes du modèle

proposé (Figure 73) avec les valeurs expérimentales (0.9947 and 0.9942 for nortropine and norpseudotropine respectivement). La protonation a un effet calculé associé  $EIE^{-15}N$  de 0.988. Toutefois, en phase gazeuse, aucun état de transition correspondant à la dégradation spontanée de cette espèce n'a pu être déterminé. De plus, celle-ci serait associée à un effet calculé d' $EIE^{-15}N$  normal (1.026) incompatible avec les données expérimentales. Par contre, quand on a la participation d'un accepteur d'hydrogène (Figures 73 et 74), un effet inverse a été calculé  $EIC^{-15}N=0.992$  qui est proche de la valeur mesurée.

En conclusion, un modèle pouvant servir de base de travail pour l'étude du mécanisme d'ouverture de cycle de la nortropine par rupture de la liaison C-N peut être résumé par le schéma suivant (Figure 75).

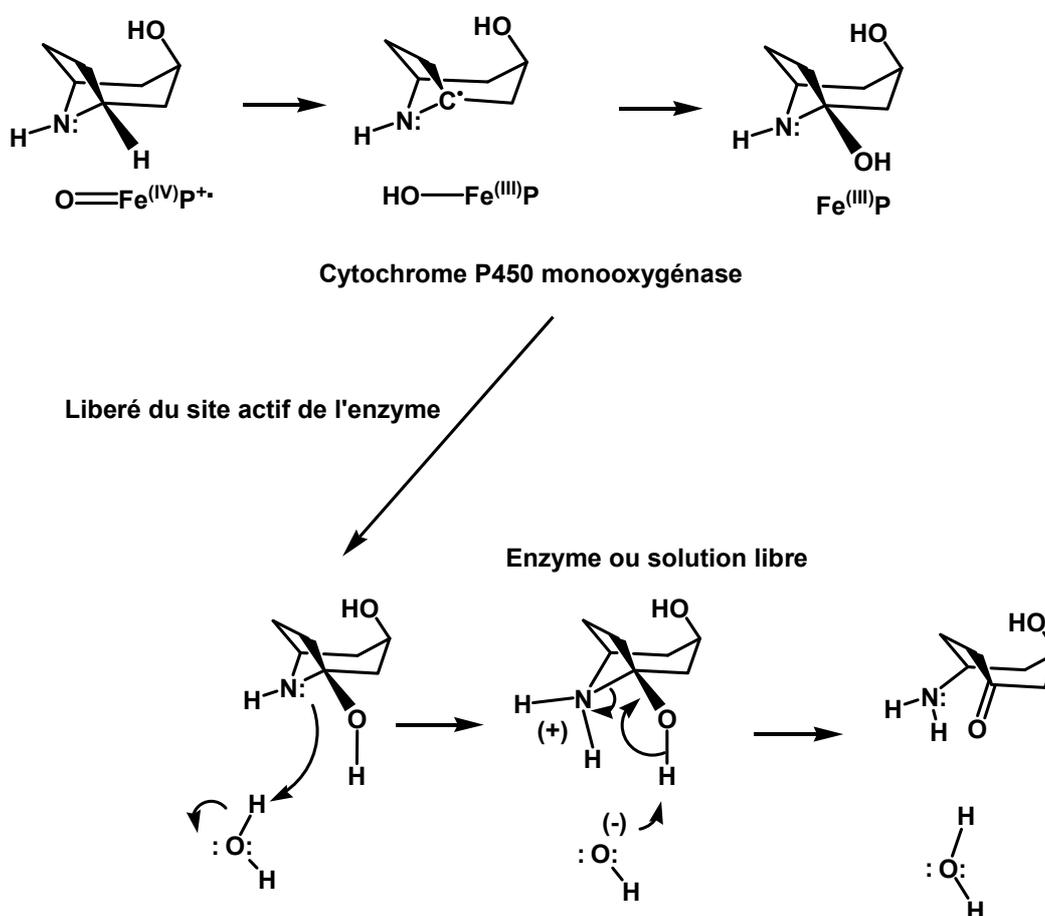


Figure 75. Modèle général pour la réaction partielle de la rupture oxydative de la liaison N-C1 de la nor(pseudo)tropine

## Chapitre 5 : Matériel et méthodes

### 5.1 Méthodes d'extraction directe

Cette partie porte sur l'extraction du milieu aqueux des alcaloïdes tropaniques et des métabolites soit par adsorption en phase solide, soit par partition entre deux phases de liquides non-miscibles.

#### 5.1.1 Extraction en phase solide

Cette technique utilise le module d'extraction Visiprep® (Supelco) fonctionnant sous vide léger. Les cartouches pour l'échange d'ions forts sont de marque Discovery® DSC-SCX (Supelco; 3 mL; 500 mg de phase). L'extraction est effectuée par un échangeur de cations SCX (Strong Cation Exchange) avec un groupement de type acide benzènesulfonique greffé sur un support silice (EPS).

Les trois alcaloïdes étudiés ayant un  $pK_a \leq 10.9$  [55], pour les fixer sur la phase SCX le pH de l'échantillon est ajusté à une valeur au moins 2 unités de pH inférieure à 10.9. Dans ce cas l'amine est sous forme protonée (cationique).

Pour l'EPS sur 500 mg de phase SCX, le conditionnement des cartouches est effectué en rinçant celles-ci avec environ 5 mL de méthanol puis avec environ 5 mL d'eau distillée (pH compris entre 5 et 7). L'échantillon est passé lentement sur la colonne pour échanger les alcaloïdes avec  $H^+$ , puis la colonne est rincée avec environ 2 mL d'eau distillée (pH entre 5 et 7). La cartouche est ensuite séchée pendant une heure sous un flux d'azote gazeux grâce au module Visidry® (Supelco) qui s'adapte sur la colonne. Les alcaloïdes sont ensuite décrochés de la phase stationnaire par un éluant dont le pH est supérieur à 10.9 (ils sont sous forme neutre). L'élution des composés se fait avec 5 mL de méthanol basifié par environ 6% d'ammoniaque.

Après extraction, les échantillons sont évaporés sous un flux d'azote gazeux et dissous dans une solution de méthanol contenant l'étalon interne (pseudotropine à 1 mg/mL). Pour l'analyse par GC, trois injections de chaque échantillon sont réalisées. La quantification des alcaloïdes nortropaniques a été effectuée par GC-FID (protocole § 5.3.1).

#### 5.1.2 Extraction liquide-liquide des alcaloïdes

Le mélange obtenu après incubation est basifié (pH > 12) avec NaOH 10 M et les produits sont extraits par du dichlorométhane (5 x 20 mL). Après chaque extraction le

mélange est centrifugé (4500 g; 10 min) pour séparer les phases. Les phases organiques collectées sont rassemblées et séchées ( $\text{MgSO}_4$ ) puis filtrées et évaporées à l'évaporateur rotatif. Le résidu est dissous dans du méthanol et le rapport de concentrations entre les produits est déterminé par GC-FID (protocole § 5.4.1).

### 5.1.3 Extraction liquide-liquide de la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione

La culture bactérienne ( $\text{DO}_{550}=0.7$ ; 45 mL) est prélevée dans un flacon Falcon® (50 mL) et centrifugée (4500 g; 10 min). Le milieu est ensuite acidifié ( $\text{pH}=5.5$ ) par HCl 2 M et extrait à l'acétate d'éthyle (5 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées ( $\text{MgSO}_4$ ) puis filtrées et évaporées à l'évaporateur rotatif. Le résidu est dissous dans de l'acétate d'éthyle et analysé par GC-FID (protocole § 5.4.2).

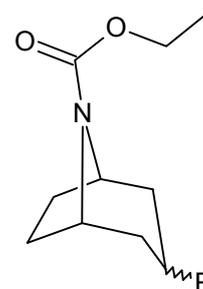
## 5.2 Méthodes d'extraction après dérivation des alcaloïdes

Cette partie porte sur le développement de la méthodologie d'extraction du milieu aqueux des alcaloïdes nortropaniques par dérivation directe dans le milieu. Les alcaloïdes sous forme de dérivés sont ensuite extraits par extraction liquide-liquide. Les méthodes de fonctionnalisation de l'azote par le chloroformiate d'éthyle ou d'acétylation par l'anhydride acétique sont présentées. Les essais de dérivation du groupement  $-\text{OH}$  par l'anhydride acétique ou butyrique ou benzoïque sont également rapportés. Enfin la méthode optimisée de dérivation de l'azote par le chloroformiate d'éthyle en système bi-phasique retenue pour ces études est décrite.

### 5.2.1 Dérivation des alcaloïdes nortropaniques par le chloroformiate d'éthyle dans l'eau en présence de pyridine

Matériel :

- Chloroformiate d'éthyle (pureté > 99%; Janssen Chimica)
- Nortropine et nortropinone•HCl (Boehringer Ingelheim)
- Norpseudotropine (synthèse : protocole § 5.9.1)
- Pyridine anhydre (99.8%; Sigma Aldrich)
- Solution saturée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- Acétate d'éthyle (grade Rectapur > 99%)
- $\text{MgSO}_4$  anhydre (Sigma Aldrich)



R: =O ; -OH

Protocole [85] [86] :

Une solution d'alcaloïdes est préparée en mélangeant : nortropinone (8 mg; 0.065 mmol), nortropine (8 mg; 0.063 mmol) et norpseudotropine (8 mg; 0.063 mmol) dans le milieu MP-Mg/2 refroidi (4°C; 10 mL). La pyridine (0.5 mL; 0.006 mmol) et le chloroformiate d'éthyle (1.0 mL; 10 mmol) sont ajoutés goutte à goutte. Le mélange est agité à température ambiante pendant 30 min. Une solution saturée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.0 mL) est ensuite ajoutée. La phase aqueuse est extraite par de l'acétate d'éthyle (3 x 4 mL). Les phases organiques collectées sont rassemblées et séchées (MgSO<sub>4</sub>) puis filtrées et évaporées sous un flux d'azote gazeux. Le résidu est dissous dans 1 mL d'acétate d'éthyle et analysé qualitativement par GC-FID (protocole § 5.4.3).

## 5.2.2 Acylation du groupement hydroxyle des dérivés carbamates

Trois agents pour l'acylation du groupe hydroxyle sont testés : l'anhydride acétique, l'anhydride butyrique et l'anhydride benzoïque.

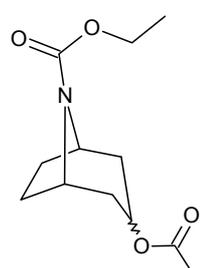
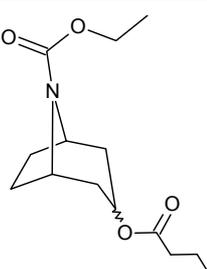
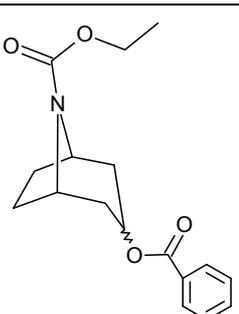
Matériel :

- Alcaloïdes nortropaniques dérivés par le chloroformiate d'éthyle selon le protocole § 5.2.1
- Pyridine anhydre (99.8%; Sigma Aldrich)
- Anhydride acétique (> 98%; Sigma Aldrich)
- Anhydride butyrique (> 97%; Fluka)
- Anhydride benzoïque (> 97%; Fluka)
- Acétate d'éthyle (grade Rectapur > 99%)

Protocole :

Le mélange des trois alcaloïdes dérivés par le chloroformiate d'éthyle (0.06 mmol de chaque dont 0.18 mmol en total) (voir le protocole § 5.2.1) est dissous dans la pyridine (0.5 mL; 0.006 mmol). L'anhydride d'acide correspondant (pour la quantité voir Tableau 27) est ensuite ajouté et le mélange est agité à température ambiante pendant 10 h. Les réactifs sont ensuite évaporés sous un flux d'azote gazeux, le résidu est dissous dans l'acétate d'éthyle (1 mL) et l'analyse effectuée par GC-FID sur colonne PTA-5 (protocole § 5.4.3). Les temps de rétention sont présentés dans le Tableau 28. La formation des produits a été confirmée par spectrométrie de masse (EI).

**Tableau 27. Quantités de réactifs utilisés pour la dérivation de groupe hydroxyle**

Réactif	Quantité (mmol)	Formule du produit
Anhydride acétique	1.05	
Anhydride butyrique	0.61	
Anhydride benzoïque	0.24	

### 5.2.2.1 Dérivation par l'anhydride acétique

Lors de la dérivation avec l'anhydride acétique, la nortropinone-EC n'a pas réagi. La norpseudotropine-EC a été acétylée quantitativement sur le groupement hydroxyle donnant un seul produit. Avec la nortropine-EC un mélange du produit de départ et du composé acétylé sur le groupement hydroxyle dans un rapport 3/7 a été obtenu.

(Pour les spectres GC-MS des dérivés carbamates d'éthyle, voir le protocole § 5.2.4.)

#### NTRI-EC-Ac :

- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  241 ( $M^{+}$ , 41), 182 (60), 152 (46), 139 (100), 110 (15), 82 (12), 68 (22), 67 (17), 28 (40).

#### NPSTRI-EC-Ac :

- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  241 ( $M^{+}$ , 32), 182 (45), 152 (42), 139 (100), 110 (13), 82 (10), 68 (14), 67 (12), 28 (17).

### 5.2.2.2 Dérivation par l'anhydride benzoïque

Dans le cas de l'anhydride benzoïque la nortropinone-EC n'a pas réagi. La nortropine-EC et la norpseudotropine-EC ont été dérivées quantitativement sur la fonction hydroxyle.

#### NTRI-EC-Bnz :

- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  303 ( $M^{+}$ , 6), 230 (10), 198 (25), 182 (30), 181 (100), 152 (44), 110 (18), 68 (44), 67 (36), 28 (76).

#### NPSTRI-EC-Bnz :

- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  303 ( $M^{+}$ , 6), 230 (3), 198 (5), 182 (22), 181 (28), 152 (24), 139 (100), 110 (10), 68 (18), 67 (18), 28 (32).

### 5.2.2.3 Dérivation par l'anhydride butyrique

Dans le cas de la dérivation la nortropinone-EC n'a pas réagi. La norpseudotropine-EC a été butyrylée quantitativement sur le groupement hydroxyle donnant un seul produit. La nortropine-EC n'a pas réagi quantitativement mais a donné un mélange de nortropine-EC et de nortropine-EC-But en ratio 1/2.5.

#### NTRI-EC-But :

- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  269 ( $M^{+}$ , 12), 198 (20), 182 (48), 181 (44), 152 (24), 139 (100), 110 (12), 68 (19), 67 (17).

#### NPSTRI-EC-But

- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  269 ( $M^{+}$ , 8), 182 (33), 181 (19), 139 (100), 110 (9), 82 (5), 68 (13), 67 (13).

**Tableau 28. Temps de rétention des alcaloïdes dérivés par le chloroformiate d'éthyle et les anhydrides d'acides**

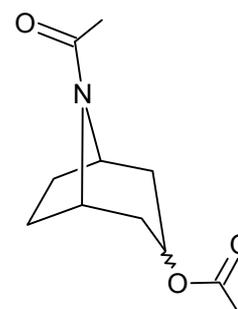
Anhydride acétique				
Composé	NTRO-EC <sup>a)</sup>	NTRI-EC <sup>a)</sup>	NPSTRI-EC-Ac	NTRI-EC-Ac
Temps de rétention (min)	15.08	15.69	16.34	16.69
Anhydride benzoïque				
Composé	NTRO-EC <sup>a)</sup>	NTRI-EC <sup>a)</sup>	NPSTRI-EC-Bnz	NTRI-EC-Bnz
Temps de rétention (min)	15.08	15.69	17.50	17.52
Anhydride butyrique				
Composé	NTRO-EC <sup>a)</sup>	NTRI-EC <sup>a)</sup>	NPSTRI-EC-But	NTRI-EC-But
Temps de rétention (min)	15.08	15.69	17.33	17.39

<sup>a)</sup> Dérivation du groupement hydroxyle non effectué.

### 5.2.3 Dérivation des alcaloïdes nortropaniques par l'anhydride acétique

Matériel :

- Nortropine et nortropinone•HCl (Boehringer Ingelheim)
- Norpseudotropine (synthèse : protocole § 5.9.1)
- Pyridine anhydre (99.8%; Sigma Aldrich)
- Anhydride acétique (> 98%; Sigma Aldrich)
- Acétate d'éthyle (grade Rectapur > 99%)



Protocole :

Un des alcaloïdes : nortropine, norpseudotropine ou nortropinone (2 mg; 0.016 mmol) est dissous dans la pyridine (1 mL; 0.012 mmol) et l'acétique anhydride est ajouté (0.1 mL; 1.05 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 10 h. Les réactifs sont ensuite évaporés sous un flux d'azote gazeux, le résidu est dissous dans l'acétate d'éthyle (1 mL) et analysé par GC-FID sur colonne PTA-5 (protocole § 5.4.3).

Pour la nortropinone, la réaction est quantitative. Pour la norpseudotropine, les deux groupements hydroxyle et amino ont été dérivés quantitativement. Pour la nortropine, un

mélange de mono et di-dérivés est obtenu. La formation des produits a été confirmée par l'analyse MS (EI). Les temps de rétention GC sont indiqués dans le Tableau 29.

**NTRO-Ac :**

- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  167 ( $M^{+\circ}$ , 100), 124 (35), 82 (53), 68 (90), 67 (76) 28 (8).

**NTRI-Ac :**

- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  169 ( $M^{+\circ}$ , 100), 154 (58), 126 (48), 82 (57), 68 (48), 67 (15), 28 (12).

**NTRI-Ac-Ac :**

- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  211 ( $M^{+\circ}$ , 45), 196 (13), 168 (42), 152 (25), 126 (17), 110 (100), 82 (17), 68 (36), 67 (20), 28 (10).

**NPSTRI-Ac-Ac :**

- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  211 ( $M^{+\circ}$ , 46), 196 (8), 168 (18), 152 (23), 126 (12), 110 (100), 82 (16), 68 (35), 67 (22), 8 (6).

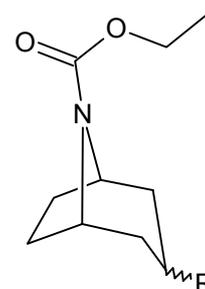
**Tableau 29. Temps de rétention des alcaloïdes dérivés par l'anhydride acétique**

Alcaloïde	Temps de rétention (min)
NTRO-Ac	15.09
NTRI-Ac	15.77
NPSTRI-Ac-Ac	16.05
NTRI-Ac-Ac	16.46

### 5.2.4 Dérivation des alcaloïdes nortropaniques par le chloroformiate d'éthyle en système bi-phasique

Matériel :

- Chloroformiate d'éthyle (pureté > 99%; Janssen Chimica)
- Nortropine et nortropinone•HCl (Boehringer Ingelheim)
- Norpseudotropine (synthèse : protocole § 5.9.1)
- $Na_2CO_3$  anhydre (Sigma Aldrich)
- $MgSO_4$  anhydre (Sigma Aldrich)
- Acétate d'éthyle (grade Rectapur > 99%)



R: =O ; -OH

- Dichlorométhane (grade Rectapur > 99%)

Protocole [56, 57] :

À une solution 16.5 mM de nortropine (210 mg; 1.65 mmol) dans l'eau (100 mL) est ajouté du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 mg). Un mélange de chloroformiate d'éthyle (15 mL; 0.157 mol) dans du dichlorométhane (60 mL) est ensuite ajouté. Le milieu réactionnel est agité vigoureusement pendant 20 min. La phase organique (dichlorométhane) est ensuite séparée. La phase aqueuse est saturée en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et extraite à l'acétate d'éthyle (4 x 50 mL). Les phases organiques collectées sont rassemblées et séchées (MgSO<sub>4</sub>) puis filtrées et évaporées pour donner la nortropine-EC.

La **nortropine-EC** (0.3 g; 1.51 mmol) est obtenue sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 92%. Le produit obtenu est caractérisé par RMN et MS :

- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 1.22 (t,  $J=7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.77 (dd,  $J=14.2$  Hz,  $J=1.4$  Hz, 2H), 1.83-1.95 (m, 2H), 2.04 (dt,  $J=14.7$  Hz,  $J=4.4$  Hz, 2H), 2.10-2.21 (m, 2H), 2.10-2.21 (brs, OH), 4.03-4.15 (m, 1H), 4.03-4.15 (q,  $J=7.2$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.12-4.26 (m, 2H).
- **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 14.8, 28.2, 38.6, 52.8, 60.9, 65.1, 154.0.
- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  199 (M<sup>+</sup>, 49), 170 (100), 126 (61), 82 (37), 68 (32), 67 (15), 28 (58).

Le protocole de dérivation de la nortropinone et la norpseudotropine est le même que celui décrit pour la nortropine.

La **norpseudotropine-EC** (0.31 g; 1.56 mmol) est obtenue sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 95%. Le produit obtenu est caractérisé par RMN et MS :

- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 1.25 (t,  $J=7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.49-1.68 (m, 4H), 1.86 (brs, OH), 1.89-2.00 (m, 4H), 4.02-4.18 (tt,  $J=10.7$  Hz,  $J=5.7$  Hz, 1H), 4.02-4.18 (q,  $J=7.1$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.23-4.34 (m, 2H).
- **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 14.9, 28.4, 40.7, 53.1, 61.1, 64.1, 153.9.
- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  199 (M<sup>+</sup>, 48), 170 (87), 141 (60), 140 (68), 126 (100), 82 (61), 68 (50), 67 (28), 28 (78).

La **nortropinone-EC** (0.31 g; 1.57 mmol) est obtenue sous la forme d'une huile transparente avec un rendement de 95%. Le produit obtenu est caractérisé par RMN et MS :

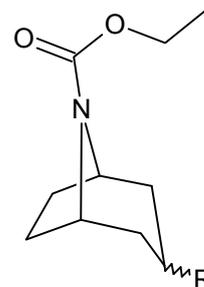
- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 1.25 (t,  $J=7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.57-1.70 (m, 2H), 1.95-2.40 (m, 2H), 2.30 (d,  $J=16.0$  Hz, 2H), 2.92-2.52 (m, 2H), 4.15 (q,  $J=7.1$  Hz, 2H), 4.40-4.60 (m, 2H).
- **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 14.8, 29.0, 48.9, 53.2, 61.5, 154.0, 207.9.
- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  197 (M<sup>+</sup>, 20), 140 (100), 139 (97), 82 (23), 68 (34), 67 (20), 28 (12).

*Cette méthode de dérivation a été choisie pour l'extraction des alcaloïdes nortropaniques du milieu bactérien.*

### 5.2.5 Dérivation des alcaloïdes nortropaniques par le chloroformiate d'éthyle en système bi-phasique (validation de la méthode)

Matériel :

- Idem que pour le protocole § 5.2.4
- 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylphénol (Sigma Aldrich)



R: =O ; -OH

Protocole :

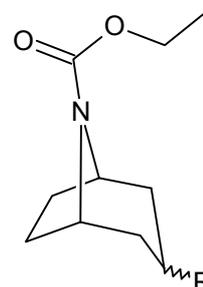
À une solution (0.4-8.0 mM) du substrat (un des alcaloïdes ou le mélange) (0.5-10 mg; 0.004-0.080 mmol) dans l'eau (10 mL) est ajouté du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mg; 10%). Ensuite un mélange de chloroformiate d'éthyle (0.75 mL; 7.87 mmol) dans du dichlorométhane (3 mL) est ajouté. Le milieu réactionnel est ensuite vigoureusement agité pendant 10 min. La phase organique est ensuite séparée. La phase aqueuse est saturée en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et extraite à l'acétate d'éthyle (4 x 3 mL). Les phases organiques collectées sont rassemblées et séchées (MgSO<sub>4</sub>) puis filtrées et évaporées.

Le résidu est dissous dans du méthanol contenant l'étalon interne 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylphénol (BHT) (1 mg/mL). L'analyse quantitative est effectuée par CG-FID (protocole § 5.3.2).

## 5.2.6 Extraction des alcaloïdes tropaniques du milieu bactérien par dérivation directe dans le milieu bactérien

Matériel :

- Chloroformiate d'éthyle (pure > 99%; Janssen Chimica)
- Nortropine et nortropinone\*HCl (Boehringer Ingelheim)
- Norpseudotropine (synthèse : protocole § 5.9.1)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhydre (Sigma Aldrich)
- MgSO<sub>4</sub> anhydre (Sigma Aldrich)
- Acétate d'éthyle (grade Rectapur > 99%)
- Dichlorométhane (grade Rectapur > 99%)
- Méthanol (HiPerSolv Chromanorm)
- 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylphénol (Sigma Aldrich)



R: =O ; -OH

Protocole :

À un échantillon biologique décongelé (10 mL), est ajouté du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mg; 10%). Un mélange de chloroformiate d'éthyle (0.75 mL; 7.87 mmol) dans du dichlorométhane (3 mL) est ensuite ajouté. Le milieu réactionnel est ensuite vigoureusement agité pendant 10 min. Une émulsion étant créée, la phase organique n'est obtenue qu'après centrifugation (4500 g; 4 min). La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (2 x 3 mL) : chaque fois, une centrifugation (4500 g; 4 min) pour séparer les phases est nécessaire. Puis, la phase aqueuse est saturée par du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et extraite à l'acétate d'éthyle (4 x 3 mL). La phase organique n'est obtenue qu'après centrifugation (4500 g; 4 min). Les phases organiques collectées (de dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle) sont rassemblées et séchées (MgSO<sub>4</sub>), filtrées et évaporées sous un flux d'azote gazeux.

Le résidu est dissous dans du méthanol contenant du BHT (1 mg/mL). L'analyse quantitative est effectuée par CG-FID (protocole § 5.3.2). La mesure de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) est effectuée par GG-irm-MS (protocole § 5.7.1).

## 5.2.7 Préparation de la nortropine et de la norpseudotropine avec valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) écartées

Une solution de nortropine (500 mg; 3.93 mmol) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est déposée sur une colonne de silice NORMASIL 60 (15 g). L'éluant utilisé est un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH/NEt<sub>3</sub> (46/46/1). La présence du composé dans les fractions récupérées est suivie par GC-FID sur colonne ZB-WAX (protocole § 5.3.2). Les fractions récupérées sont évaporées à

l'évaporateur rotatif. La valeur de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de chaque fraction est déterminée par EA-irm-MS (protocole § 5.7.2). Les valeurs de déviation isotopique en  $^{15}\text{N}$  de chaque fraction sont rapportées dans le Tableau 30.

La norpseudotropine est fractionnée sur colonne selon le même protocole. Les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) sont rapportées dans le Tableau 30.

**Tableau 30. Les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) des alcaloïdes fractionnés sur la colonne**

Fraction	Masse de départ (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)			
		Nortropine <sup>a)</sup>		Norpseudotropine <sup>b)</sup>	
		Moyenne <sup>c)</sup>	Ecart-type <sup>c)</sup>	Moyenne <sup>c)</sup>	Ecart-type <sup>c)</sup>
1	39	-81.9	0.4	-60.8	0.2
2	36	-8.2	0.1	-11.8	0.1
3	20	49.3	1.0	42.7	0.4

<sup>a)</sup> valeur de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) initiale de la nortropine égale à -7.9 ‰; écart-type 0.2.

<sup>b)</sup> valeur de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) initiale de la norpseudotropine égale à -7.5 ‰; écart-type 0.2.

<sup>c)</sup> valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) mesurées par EA-irm-MS : chaque échantillon a été encapsulé et analysé deux fois.

### 5.2.7.2. Validation de la mesure de déviation isotopique dans la gamme d'abondance naturelle.

Les fractions 1 et 3 de la nortropine et de la norpseudotropine préparées selon le protocole § 5.2.7.1 sont ensuite dérivées par le chloroformiate d'éthyle (protocole § 5.2.5). L'échantillon est ensuite analysé par GC-irm-MS (protocole § 5.7.1).

## 5.3 Méthodes de quantification par GC-FID

La quantification par GC-FID a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), d'un injecteur avec/sans division et d'un four programmable jusqu'à 450°C. Le gaz vecteur est l'hélium.

### 5.3.1 Quantification des composés après l'EPS

Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire PTA-5 (Supelco; 30 m x 0.32 mm x 0.5 µm) dont la phase est constituée de diphényle 5% / diméthylpolysiloxane 95%, traitée pour minimiser les interactions non-spécifiques avec les amines. La méthode de programmation chromatographique est présentée dans le Tableau 31.

<b>Tableau 31. Méthode chromatographique utilisée pour la quantification des alcaloïdes après EPS</b>			
<b>Paramètre</b>	<b>Description</b>		
<b>Type d'injection</b>	Avec division, rapport de 30 /1		
<b>Débit d'hélium</b>	1.2 mL/min 24 cm/sec		
<b>Température de l'injecteur</b>	240°C		
<b>Température du FID</b>	260°C		
<b>Temps d'analyse</b>	10.6 min		
<b>Conditions d'élution thermique</b>	<b>Rampe (°C/min)</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Retenue (min)</b>
		80	1
	10	120	-
	25	260	-

Dans les conditions analytiques décrites ci-dessus, le temps de rétention de chaque composé est présenté dans le Tableau 32.

<b>Tableau 32. Temps de rétention des alcaloïdes analysés sur colonne PTA-5, après EPS</b>	
<b>Alcaloïde</b>	<b>Temps de rétention (min)</b>
nortropine	7.47
norpseudotropine	7.57
pseudotropine	7.75

Un étalonnage est réalisé pour la nortropine et la norpseudotropine avec des concentrations comprises entre 1 et 4 mg/mL dans du méthanol avec comme étalon interne

la pseudotropine (1 mg/mL). Les coefficients de réponse relatifs calculés sont rapportés dans le Tableau 33.

Tableau 33. Coefficients de réponse relatifs des alcaloïdes (1.0 à 4.0 mg/mL) / PSTRI (1 mg/mL)		
composé	nortropine	norpseudotropine
	$K_{NTRI}/K_{PSTRI}$	$K_{NPSTRI}/K_{PSTRI}$
Moyenne <sup>a)</sup>	0.88	1.19
Écart-type <sup>a)</sup>	0.04	0.01
CV (%)	4.5	0.8

<sup>a)</sup> Chaque échantillon est analysé trois fois.

### 5.3.2 Quantification des composés dérivés par le chloroformiate d'éthyle

Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire ZB-WAX, (Phenomenex; 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) dont la phase stationnaire est polaire, de type polyéthylène glycol (PEG) désactivée. La méthode chromatographique est présentée dans le Tableau 34.

Tableau 34. Méthode chromatographique utilisée pour quantifier les dérivés carbamates des alcaloïdes nortropaniques			
Paramètre	Description		
Type d'injection	Avec division, ratio de 40 / 1		
Débit d'hélium	1.2 mL/min		
	31 cm/sec		
Température de l'injecteur	240°C		
Température du FID	250°C		
Temps d'analyse	19.3 min		
Conditions d'élution thermique	Rampe (°C/min)	Température (°C)	Retenue (min)
		80	1
	10	150	-
	15	260	4

Dans les conditions analytiques décrites ci-dessus le temps de rétention de chaque composé est indiqué dans le Tableau 35.

**Tableau 35. Temps de rétention des alcaloïdes nortropaniques-EC et du BHT**

Alcaloïde	Temps de rétention (min)
BHT	10.93
NTRO-EC	14.02
NTRI-EC	15.75
NPSTRI-EC	16.20

Un étalonnage est réalisé pour la nortropine-EC, la norpseudotropine-EC et la nortropinone-EC avec des concentrations comprises entre 0.5 et 3.0 mg/mL dans le méthanol contenant comme étalon interne le BHT (1 mg/mL). Les coefficients de réponse relatifs calculés et la résolution entre les pics sont présentés dans le Tableau 36.

**Tableau 36. Coefficients de réponse relatifs et résolution chromatographique des dérivés EC des alcaloïdes (0.5 à 3.0 mg/mL) / BHT (1 mg/mL)**

composé	nortropinone-EC	nortropine-EC	norpseudotropine-EC
	$K_{\text{NTRO-EC}}/K_{\text{BHT}}$	$K_{\text{NTRI-EC}}/K_{\text{BHT}}$	$K_{\text{NPSTRI-EC}}/K_{\text{BHT}}$
<b>Moyenne</b> <sup>a)</sup>	1.82	1.71	2.11
<b>Écart-type</b> <sup>a)</sup>	0.10	0.05	0.03
<b>CV (%)</b>	5.4	2.8	1.3
		$R_{\text{NTRI-EC}}/R_{\text{NTRO-EC}}$	$R_{\text{NPSTRI-EC}}/R_{\text{NTRI-EC}}$
		45.2	13.6

<sup>a)</sup> Chaque échantillon est analysé trois fois

### 5.3.3 Quantification de la TBON et du TBOL

Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire PTA-5 (Supelco; 30 m x 0.32 mm x 0.5  $\mu\text{m}$ ) dont la phase est constituée de diphényle 5% / diméthylsiloxane 95%, traitée pour minimiser les interactions non-spécifiques avec les amines. La méthode de programmation chromatographique est présentée dans le Tableau 37.

Un étalonnage est réalisé pour la TBON, le  $\alpha$ -TBOL et le  $\beta$ -TBOL avec des concentrations comprises entre 0.5 et 2.0 mg/mL (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg/mL) dans le méthanol contenant comme étalon interne le *N*-méthyl-4-piperidinol (4NMP 4 mg/mL).

**Tableau 37. Méthode chromatographique utilisée pour la quantification de la TBON et du TBOL**

Paramètre	Description		
Type d'injection	Avec division, ratio de 40 / 1		
Débit d'hélium	1.4 mL/min 27 cm/sec		
Température de l'injecteur	240°C		
Température du FID	260°C		
Temps d'analyse	27.40 min		
	<b>Rampe</b>	<b>Température</b>	<b>Retenue</b>
	<b>(°C/min)</b>	<b>(°C)</b>	<b>(min)</b>
Conditions d'éluion thermique		80	1
	5	110	-
	1	125	-
	25	260	-

Dans les conditions analytiques décrites ci-dessous le temps de rétention de chaque composé et les coefficients de réponse relatifs calculés sont présentés dans le Tableau 38.

**Tableau 38. Coefficients de réponse relatifs de la TBON, du  $\alpha$ -TBOL et du  $\beta$ -TBOL (0.5 à 2.0 mg/mL) / 4NMP (4 mg/mL)**

composé	TBON	$\alpha$ -TBOL	$\beta$ -TBOL
	$K_{TBON}/K_{4NMP}$	$K_{\alpha-TBOL}/K_{4NMP}$	$K_{\beta-TBOL}/K_{4NMP}$
Moyenne <sup>a)</sup>	0.88	1.56	1.56
Écart-type <sup>a)</sup>	0.02	0.2	0.04
CV (%)	2.3	1.2	2.5
Temps de rétention (min)	15.50	18.23	18.71

<sup>a)</sup> Chaque échantillon est analysé trois fois

## 5.4 Analyse par GC-FID

### 5.4.1 Analyse de la tropinone, de la tropine et de la pseudotropine

Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire ZB-WAX, (Phenomenex; 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m) dont la phase stationnaire est polaire, de type polyéthylène glycol

(PEG) désactivée. La méthode de programmation chromatographique est présentée dans le Tableau 39.

<b>Tableau 39. Méthode chromatographique pour analyser la tropinone et la (pseudo)tropine</b>			
<b>Paramètre</b>	<b>Description</b>		
<b>Type d'injection</b>	Avec division, ratio de 40 / 1		
<b>Débit d'hélium</b>	1.2 mL/min 31 cm/sec		
<b>Température de l'injecteur</b>	240°C		
<b>Température du FID</b>	250°C		
<b>Temps d'analyse</b>	19.3 min		
<b>Conditions d'élution thermique</b>	<b>Rampe (°C/min)</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Retenue (min)</b>
		80	1
	10	150	-
	15	260	4

Dans les conditions analytiques décrites ci-dessus, le temps de rétention de chaque composé est indiqué dans le Tableau 40.

<b>Tableau 40. Temps de rétention de la tropinone et de la (pseudo)tropine</b>		
<b>Temps de rétention (min)</b>		
<b>Tropinone</b>	<b>Tropine</b>	<b>Pseudotropine</b>
9.44	10.62	11.61

#### **5.4.2 Analyse de la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione**

Le chromatographe en phase gazeuse est équipé d'une colonne HP-5 (30 m; 0.32 mm; 0.25 µm). La méthode de programmation chromatographique est présentée dans le Tableau 41.

Le temps de rétention de la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione dans les conditions décrites ici est égal à 9.62 min.

<b>Tableau 41. Méthode chromatographique pour analyser la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione</b>			
<b>Paramètre</b>	<b>Description</b>		
<b>Type d'injection</b>	Avec division, ratio de 40 /1		
<b>Débit d'hélium</b>	1.2 mL/min 24 cm/sec		
<b>Température de l'injecteur</b>	240°C		
<b>Température du FID</b>	250°C		
<b>Temps d'analyse</b>	19.3 min		
<b>Conditions d'élution thermique</b>	<b>Rampe (°C/min)</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Retenue (min)</b>
		80	1
	10	150	-
	15	260	4

### 5.4.3 Analyse des alcaloïdes dérivés

Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire PTA-5 (Supelco; 30 m x 0.32 mm x 0.5 µm) dont la phase est constituée de diphényle 5% / diméthylsiloxane 95%, traitée pour minimiser les interactions non spécifiques avec les amines. La méthode de programmation chromatographique est présentée dans le Tableau 42.

<b>Tableau 42. Méthode chromatographique d'analyse des alcaloïdes nortropaniques dérivés</b>			
<b>Paramètre</b>	<b>Description</b>		
<b>Type d'injection</b>	Avec division, ratio de 40 /1		
<b>Débit d'hélium</b>	1.2 mL/min 24 cm/sec		
<b>Température de l'injecteur</b>	260°C		
<b>Température du FID</b>	260°C		
<b>Temps d'analyse</b>	19.0 min		
<b>Conditions d'élution thermique</b>	<b>Rampe (°C/min)</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Retenue (min)</b>
		80	1
	10	150	-
	15	300	-

## 5.5 Méthodes pour la culture de cellules bactériennes

Appareillage :

- Autoclave : Sanoclav (Fisher Bioblock Scientific)
- Centrifugeuse SIGMA 3K15
- pH-mètre (Hanna instruments)
- Spectrophotomètre UV-visible (Supertronics Genesys 5)

### 5.5.1 Préparation de milieu de culture

Le milieu de base est préparé à partir de cinq solutions mères A, B, C, D et E. La composition de chaque solution aqueuse en sels minéraux est présentée dans le Tableau 43.

**Tableau 43. Composition du milieu bactérien pauvre en minéraux**

Désignation du milieu : Milieu MP-Mg/2			
Solution	Composé	Concentration de solution mère (g/L)	Quantité <sup>a)</sup>
A	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.56	1 mL
B	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.4	1 mL
C	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0.34	1 mL
D	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	24.62	0.5 mL
E	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16	50 mL
	Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14	

<sup>a)</sup> Quantité de solution mère utilisée pour préparer 1 L de milieu.

Les solutions A, B, C et D sont prélevées à l'aide d'une pipette automatique (1000 µL) et une éprouvette graduée de 50 mL est utilisée pour la solution E. Ces cinq solutions sont ajoutées à l'eau distillée (800 mL). Le pH, de 6.7 est remonté à 7.2, à l'aide d'une solution de NaOH 0.1 M. Le volume est ensuite ajusté à 900 mL et le pH est vérifié de nouveau.

Puis, le milieu est réparti dans des fioles de 500 mL et de 250 mL en fractions de 90 et de 45 mL, respectivement. Le col des fioles est fermé avec un bouchon de laine de quartz

enveloppé de tissu de coton et fermé avec une feuille de papier d'aluminium. Les fioles sont autoclavées avant utilisation, pendant 20 min à 121°C.

### 5.5.2 Préparation de la solution de substrat ou d'inhibiteur pour les bactéries

Le composé (Tableau 44) est pesé (500 mg) puis dissous dans du milieu MP-Mg/2 non stérile (45 mL). Le pH est remonté à 7.2 à partir d'une solution de HCl (2 M). Le volume est ensuite ajusté à 50 mL avec le milieu MP-Mg/2. La solution est stérilisée à l'aide d'une seringue et d'un filtre d'acétate de cellulose stérile (0.2 µm, Minisart®) et stocké dans des flacons stériles (Falcon®, 50 mL) à une température de -20°C.

**Tableau 44. Concentrations des solutions de substrats ou d'inhibiteurs utilisées pour les cultures**

composé	Concentration (mM)	Concentration (mg/mL)
Nortropine	78.7	
Norpseudotropine	78.7	
Nortropinone	80.0	
Tropine	70.9	
Pseudotropine	70.9	
Tropinone	71.9	10
Acide tropique	60.2	
Hyoscyamine	34.6	
TBON	70.4	
α-TBOL	69.4	
β-TBOL	69.4	

### 5.5.3 Préparation des cultures bactériennes

Le matériel utilisé pour les cultures bactériennes est stérile. Toutes les étapes du protocole biologique sont réalisées sous une hotte à flux laminaire, préalablement désinfectée par une solution d'éthanol à 70%.

À une fiole contenant le milieu stérile MP-Mg/2 (45 ou 90 mL) (pour la préparation du milieu voir protocole § 5.5.1), est introduite la solution du substrat (5 ou 10 mL) à une concentration de 8 mM (~1 mg/mL).

Les cellules bactériennes *Pseudomonas* de souche AT3 sont stockées dans des cryo-tubes à -80°C ou sur agar dans une boîte de Petri à une température de 4°C.

La culture stockée à -80°C (conservation dans le milieu de base MP-Mg/2 contenant 15% de glycérol) (protocole § 5.5.5) est mise en suspension dans le milieu de culture contenant le substrat à une concentration de 8 mM (1 mg/mL) par légère agitation.

La culture stockée sur l'agar (protocole § 5.5.6) est collectée à l'aide d'une pipette stérile (un morceau d'environ 2 mm de l'agar contenant les cellules) et suspendue dans le milieu contenant le substrat par légère agitation.

La pré-culture préalablement réalisée est laissée sous agitation (200 rev/min; 30°C). La croissance des bactéries est suivie à l'aide du spectrophotomètre UV-visible ( $\lambda=550$  nm) : la dispersion optique ( $DO_{550}$ ) mesure la densité des cellules dans le milieu qui est proportionnelle au nombre de cellules présentes. Lorsque la concentration bactérienne est importante (avec une  $DO_{550}$  comprise entre 0.6 et 0.9), la pré-culture est centrifugée (4500 g; 10 min) dans un pot stérile (50 ou 200 mL). Les cellules sont suspendues dans du milieu MP-Mg/2 frais (15 mL) et centrifugées de nouveau. Cette étape est répétée deux fois. Ensuite le culot est repris dans du milieu frais (5 mL).

Un volume (1-2 mL) de la solution des cellules lavées est prélevé à l'aide d'une pipette automatique et versé dans une fiole Erlenmeyer contenant 50 ou 100 mL de milieu avec substrat (8 mM).

Une première mesure de la  $DO_{550}$  est alors réalisée afin de connaître la quantité initiale de bactéries dans le milieu. La  $DO_{550}$  initiale est de l'ordre de 0.2. La culture est ensuite mise sous agitation (200 rev/min; 30°C). Des aliquotes de 5 mL de culture sont prélevés au cours de la croissance afin de suivre l'évolution de la consommation des substrats et les changements de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰). L'extraction des métabolites est effectuée selon le protocole § 5.2.6, la quantification selon le protocole § 5.3.2 et les mesures de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) selon le protocole § 5.7.1.

Le système de pré-culture et de culture pour l'étude du métabolisme des alcaloïdes par *Pseudomonas* AT3 est présenté Figure 76.

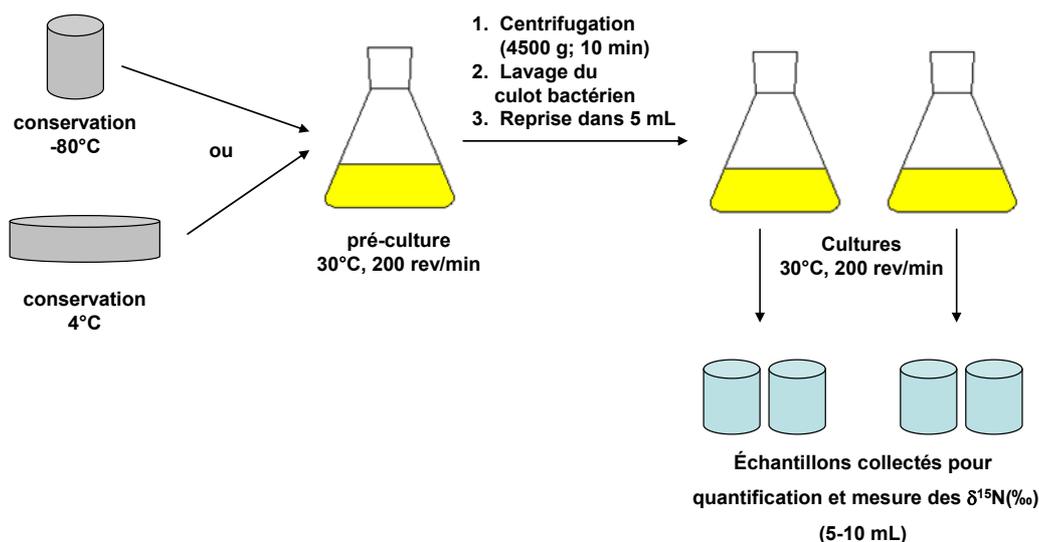


Figure 76. Système de pré-culture et de culture pour l'étude de métabolisme des alcaloïdes par *Pseudomonas* AT3

#### 5.5.4 Culture de *Pseudomonas* MS2

La culture des bactéries *Pseudomonas* souche MS2 est préparée selon le même protocole que § 5.5.3. La différence est que la souche de MS2 utilise comme substrat de croissance un mélange d'acide tropique (0.5 mg/mL; 3.0 mM) et d'alcaloïde (0.5 mg/mL; 4 mM).

#### 5.5.5 Préparation du stock des bactéries (-80°C)

Le stock des cellules conservé à -80°C est préparé de nouveau chaque année. La pré-culture sur l'hyoscyamine (1 mg/mL; 3.4 mM) est préparée selon le protocole § 5.5.3. Les cellules lavées sont ensuite reprises dans du milieu contenant de la tropine (1 mg/mL; 8.0 mM) et cultivées jusqu'à une  $\text{DO}_{550} \approx 0.9$ . Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du milieu frais puis reprises dans le milieu de base (10 mL) contenant 15% de glycérol stérile. En aliquote de 0.3 mL, la suspension des bactéries est versée dans des tubes cryogéniques stériles. Les tubes sont conservés pendant 24 h à -20°C puis transférés à -80°C.

#### 5.5.6 Sélection des bactéries *Pseudomonas*

La pré-culture sur l'hyoscyamine (1 mg/mL; 3.4 mM) est préparée selon le protocole § 5.5.3. Les cellules lavées sont ensuite reprises dans du milieu contenant de la tropine (1

mg/mL; 8.0 mM) et cultivées jusqu'à une  $DO_{550} \approx 0.9$ . Les cellules sont ensuite lavées deux fois puis reprises dans le milieu de base (5 mL).

Les boîtes de Petri contenant un plateau de milieu gélifié par de l'agar avec de la tropine sont préparées. Dans un Erlenmeyer (500 mL) est versée l'agar (5 g) et du milieu de base (250 mL). La fiole est autoclavée puis refroidie jusqu'à  $\sim 45^{\circ}\text{C}$ , une solution de tropine (28 mL; 80 mM) stérile est ensuite introduite. La solution d'agar (2%) contenant la tropine (8 mM) est ensuite versée sur des boîtes de Petri (80 cm diamètre;  $\sim 15$  ml par boîte) pour créer les plateaux. Ceux-ci sont laissés sous une hotte à flux laminaire, préalablement désinfectée par de l'éthanol (70%) jusqu'à ce qu'ils aient refroidi et figé. Les plateaux fermés et protégés par du Parafilm contre le séchage sont conservés à une température de  $4^{\circ}\text{C}$ .

Un volume (0.1 mL) de la solution des bactéries est introduit sur la surface d'agar et distribué à l'aide d'une pipette pasteur « radeuse ». La culture est laissée à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 2-3 jours. Quand la surface d'agar est couverte par les cultures des cellules, celle qui a poussé le plus vite est transportée sur un nouveau plateau d'agar et laissée à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 2-3 jours. Les plateaux avec les cellules sont ensuite stockés à une température de  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 3 mois.

### **5.5.7 Culture *Pseudomonas* AT3 sur le mélange nortropine + norpseudotropine**

À une fiole contenant le milieu stérile (45 mL) sont ajoutés les substrats : solution de nortropine (2.5 mL) et solution de norpseudotropine (2.5 mL), à l'aide d'une pipette stérile (5 mL). Les solutions des substrats sont préparées selon le protocole § 5.5.2. Pour la synthèse de la norpseudotropine voir le protocole 5.9.1. La solution des bactéries provenant de la pré-culture sur la nortropine est ensuite ajoutée (1 mL). La culture est effectuée suivant le protocole biologique § 5.5.3. Des aliquotes (5-10 mL) sont collectés pendant la croissance. L'extraction, la quantification et les mesures de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) des alcaloïdes sont effectués selon les protocoles § 5.2.6 et § 5.7.1, respectivement.

### **5.5.8 Cultures de *Pseudomonas* AT3 sur des alcaloïdes en présence d'inhibiteur (TBON, $\beta$ -TBOL)**

La solution de TBON (10 mg/mL; 70 mM) (pour la synthèse voir protocole § 5.9.3) et de  $\beta$ -TBOL (10 mg/mL; 69 mM) (pour la synthèse voir protocole § 5.9.4) est préparée selon le protocole § 5.5.2. La culture de *Pseudomonas* AT3 (50 mL) est réalisée selon le protocole

biologique § 5.5.3 mais avant de mettre la fiole dans l'incubateur, la solution de TBON ou de  $\beta$ -TBOL est ajoutée à l'aide d'une pipette stérile. Pour les quantités ajoutées d'inhibiteurs voir le Tableau 45.

**Tableau 45. Volumes de solutions d'inhibiteurs ajoutés au milieu bactérien**

Inhibiteur	Concentration dans le milieu (mM)	Volume de la solution d'inhibiteur <sup>a)</sup> ajouté (mL)
<b>TBON</b>	0.14	0.10
	0.35	0.25
	0.70	0.50
	1.40	1.00
	3.50	2.50
	5.60	4.00
	8.50	6.10
<b><math>\beta</math>-TBOL</b>	0.14	0.10
	1.40	1.00

<sup>a)</sup> Les solutions mères préparées selon le protocole § 5.5.2 ont été utilisées, pour la TBON (70 mM) et pour le  $\beta$ -TBOL (69 mM).

Des aliquotes (5 mL) sont prélevés pendant la croissance et la quantification des alcaloïdes est effectuée selon le protocole d'extraction § 5.2.6 et le protocole de quantification § 5.3.2.

Pour quantifier les inhibiteurs dans le milieu bactérien, les cellules sont centrifugées (4500 g; 10 min) et le surnageant est extrait directement par du dichlorométhane (5 x 10 mL). La phase organique est ensuite séparée, séchée (MgSO<sub>4</sub>) puis filtrée et évaporée. Le résidu est dissous dans du méthanol contenant l'étalon interne (*N*-méthyl-4-piperidinol (4NMP), 4 mg/mL) et une analyse quantitative est réalisée par GC (voir le protocole § 5.3.3).

Pour la quantification du TBON,  $\alpha$ -TBOL et  $\beta$ -TBON dans les cellules, le culot obtenu par centrifugation est lavé une fois avec du milieu bactérien (2 x 5 mL). Le culot des cellules lavées est dispersé dans du dichlorométhane et l'ensemble est agité vigoureusement. La phase organique est ensuite séparée, séchée (MgSO<sub>4</sub>) puis filtrée et évaporée sous un flux d'azote gazeux. Le résidu est dissous dans du méthanol contenant l'étalon interne 4NMP (4 mg/mL) et analysé par GC (voir protocole § 5.3.3).

Les temps de rétention de la TBON et des  $\alpha$ - et  $\beta$ -TBOL sont indiqués dans le Tableau 38.

### **5.5.9 Etude des échanges entre nortropine et norpseudotropine en utilisant des substrats marqués**

Les composés utilisés pour ces études la [3-<sup>2</sup>H]tropine, la [3-<sup>2</sup>H]pseudotropine, la [3-<sup>2</sup>H]nortropine, la [3-<sup>2</sup>H]norpseudotropine ont été synthétisés selon les protocoles § A.1.2 et § A.1.1 par Anaïs Fournial du laboratoire CEISAM (voir Annexe 1). Les solutions de ces composés dans le milieu bactérien MP-Mg/2 (10 mg/mL) sont ensuite préparées selon le protocole § 5.5.2.

La culture des bactéries *Pseudomonas* MS2 est préparée selon le protocole biologique § 5.5.3. A la fin de la croissance ( $DO_{550}$  0.75-0.80 environ) la culture est arrêtée.

Le produit accumulé dans le milieu, la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione est extrait selon le protocole § 5.1.3. La présence de ce composé dans le milieu est confirmée par GC (voir le protocole analytique § 5.4.2). La quantification en deutérium retenu dans le composé accumulé est faite par GC-MS. Le ratio entre les signaux (M+1)/M est calculé.

### **5.5.10 Culture sur le mélange de substrats avec des teneurs isotopiques en <sup>15</sup>N significativement différentes**

La nortropine et la norpseudotropine utilisées pour cette expérience sont obtenus après fractionnement sur colonne de silice (voir protocole § 5.2.7.1) et la dérivation est réalisée selon le protocole § 5.2.5. Les valeurs des  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) des fractions utilisées pour cette expérience ont été mesurées par GC-irm-MS (protocole analytique § 5.7.1). Les solutions de nortropine (78.7 mM;  $\delta^{15}\text{N}$  (‰)=25.6) et de norpseudotropine (78,7 mM;  $\delta^{15}\text{N}$  (‰)=0.8) dans le milieu bactérien sont préparées selon le protocole § 5.5.2. Les cultures sont préparées selon le protocole § 5.5.3 sauf qu'elles sont effectuées sur le mélange de nortropine ( $\delta^{15}\text{N}$  (‰)=25.6; 1.73 mM) et de norpseudotropine ( $\delta^{15}\text{N}$  (‰)=0.8; 2.83 mM) dans une fiole contenant 45 mL de milieu MP-Mg/2.

Les aliquotes sont prélevés pendant la croissance et la quantification des métabolites est faite selon le protocole § 5.2.6. Les mêmes échantillons sont ensuite analysés pour vérifier les déviations isotopiques par GC-irm-MS (voir le protocole § 5.7.1).

## 5.6 Méthode de mesure des activités enzymatiques

### 5.6.1 Préparation des extraits cellulaires

Matériel :

- Tampon phosphate de sodium (100 mM; pH=7.0)
- Solution du dithiothréitol (DTT) dans le tampon phosphate (100 mM; pH=7.0; 1 mg/mL)

Protocole :

La culture bactérienne est réalisée avec la tropine comme substrat (voir les protocoles § 5.5.2 et § 5.5.3). Lorsque la  $DO_{550}$  est  $\approx 1.01$ , la culture est centrifugée (4500 g; 10 min; 5°C), le culot est lavé deux fois avec du tampon phosphate (100 mM; pH=7.0; 10 mL) et les cellules sont ensuite suspendues dans du tampon phosphate (100 mM; pH=7.0) contenant du DTT (1 mg/mL). La rupture des cellules est effectuée par ultrasonication (3 x 15 W; 3 min; pulse 5 sec; 4°C). Les débris sont éliminés par centrifugation (4500 g; 10 min; 5°C) puis filtration sur membrane d'acétate de cellulose (0.2  $\mu$ m). L'extrait enzymatique est stocké dans un tube Falcon® (15 mL) sur glace. L'activité de l'extrait cellulaire est mesurée selon le protocole § 5.6.2.

Un nouvel extrait est préparé le jour-même pour effectuer les études.

### 5.6.2 Mesure de l'activité enzymatique des enzymes TR I et TR II

Matériel :

- Solution de tropinone dans du MP (72 mM; 10 mg/mL) (voir protocole § 5.5.2)
- Solution de tropine dans du MP (71 mM; 10 mg/mL) (voir protocole § 5.5.2)
- Solution de pseudotropine dans du MP (71 mM; 10 mg/mL) (voir protocole § 5.5.2)
- Solution de nortropinone dans du MP (80 mM; 10 mg/mL) (voir protocole § 5.5.2)
- Solution de nortropine dans du MP (79 mM; 10 mg/mL) (voir protocole § 5.5.2)
- Solution de norpseudotropine dans du MP (79 mM; 10 mg/mL) (voir protocole § 5.5.2)
- Solution de TBON dans du MP (70 mM; 10 mg/mL) (voir protocole § 5.5.2)
- Solution de  $\beta$ -TBOL dans du MP (69 mM; 10 mg/mL) (voir protocole § 5.5.2)
- Solution de  $NADP^+$  dans l'eau acidifiée par une goutte de HCl (7.7 mg/mL)
- Solution de NADPH dans de l'eau (7.7 mg/mL)
- Tampon de TRIZMA dans de l'eau (300 mM; 0.36 g/mL; pH=8.8)
- Tampon de phosphate de sodium (250 mM; pH=6.4)

### 5.6.2.1 Protocole de mesure de l'activité envers les cétones

Dans une cuvette de quartz (1.5 mL), sont introduits du tampon phosphate pH=6.4 (0.68 mL), l'extrait cellulaire (0.1 mL), et de l'eau ou l'inhibiteur (le TBON ou le  $\beta$ -TBOL) (0.1 mL) et l'ensemble est agité doucement. La solution de substrat (tropinone ou nortropinone) (0.1 mL) et la solution de cofacteur (NADPH) (0.02 mL) sont ensuite introduites. Le contenu de la cuvette est agité doucement de nouveau et incubé à 30°C pendant 1.5 min. L'activité est mesurée en exploitant le spectrophotomètre UV-VIS pour mesurer le changement de l'absorption du NADPH en fonction du temps (30°C,  $\lambda=343$  nm; 6 - 8 min).

### 5.6.2.2 Protocole de mesure de l'activité envers les alcools

Dans une cuvette de quartz (1.5 mL), sont introduits du tampon pH=8.8 (0.68 mL), l'extrait cellulaire (0.1 mL), et de l'eau ou l'inhibiteur (le TBON ou le  $\beta$ -TBOL) (0.1 mL) et l'ensemble est agité doucement. La solution de substrat (nortropine ou norpseudotropine ou tropine ou pseudotropine) (0.1 mL) et la solution de cofacteur (NADP<sup>+</sup>) (0.02 mL) sont ensuite introduites. Le contenu de la cuvette est agité doucement de nouveau et incubé à 30°C pendant 1.5 min. L'activité est mesurée en exploitant le spectrophotomètre UV-VIS pour mesurer le changement de l'absorption du NADPH en fonction du temps (30°C,  $\lambda=343$  nm; 6 - 8 min).

## 5.6.3 Mesures de la concentration des protéines

La mesure de la concentration des protéines dans l'extrait est faite selon la méthode de Warburg et Christian [87].

L'extrait cellulaire est dilué au dixième dans du tampon phosphate et l'absorbance ( $\lambda=260$  nm et  $\lambda=280$  nm) est mesurée trois fois. Les valeurs mesurées sont ensuite utilisées pour calculer la concentration des protéines selon l'équation :

$$Concentration_{protéines} (mg / mL) = 1.55A_{280} - 0.76A_{260}$$

## 5.6.4 Incubation des cétones avec les extraits cellulaires

Dans un flacon Falcon® (15 mL) sont introduits du tampon phosphate (250 mM; pH=6.4, 0.8 mL), une solution de glucose déshydrogénase (3.8 U/mg; 0.1 mL), une solution de NADP<sup>+</sup> (1.3 mM, 7.7 mg/mL; 0.1 mL), une solution de NADPH (1.3 mM, 7.7 mg/mL; 0.1 mL) et une solution de glucose (0.5 M, 0.1 mL) et le tout est agité doucement. Le mélange

est incubé (5 min; 30°C) et ensuite sont ajoutés l'extrait cellulaire (0.2 mL) et le substrat (la tropinone ou la nortropinone) (10 mg/mL; 0.2 mL). Le mélange est agité doucement de nouveau et incubé pendant 6 h.

## **5.7 Méthode de mesure des déviations isotopiques**

### **5.7.1 Méthode de mesure des déviations isotopiques par CG-irm-MS**

Le spectromètre de masse de rapport isotopique Delta V Advantage (Thermo Fisher Scientific) couplé par une interface de combustion Interface III (Thermo Fisher Scientific) à un chromatographe en phase gazeuse (Thermo Fisher Scientific) est utilisé pour mesurer les déviations isotopiques  $\delta^{15}\text{N}$  (‰).

Le chromatographe en phase gazeuse GC Trace (Thermo Fisher Scientific) est équipé d'une colonne capillaire ZB-WAX, d'un injecteur sans division (splitless) avec insert désactivé pour minimiser l'adsorption des composés polaires, et d'un four programmable jusqu'à 450°C.

La colonne ZB-WAX (Phenomenex; 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ) possède une phase stationnaire polaire type polyéthylène glycol (PEG) désactivée.

L'interface de la transformation d'échantillon sous la forme de gaz est constituée :

- d'un four d'oxydation chauffé à 940°C,
- d'un four de réduction chauffé à 650°C,
- d'une membrane Nafion (copolymère de tetrafluoroéthylène et d'acide perfluoro-3,6-dioxa-4-méthyl-7-octene-sulfonique),
- d'un piège cryogénique à  $\text{CO}_2$ .

La méthode de programmation de GC pour analyser les alcaloïdes nortropaniques–EC est présentée dans le Tableau 46.

**Tableau 46. Méthode chromatographique pour analyser des alcaloïdes nortropaniques-EC**

Paramètre	Description		
Type d'injection	Sans division		
Débit d'hélium	1.2 mL/min 31 cm/sec		
Température de l'injecteur	240°C		
Température du FID	Pas branché		
Temps d'analyse	46 min		
Conditions d'élution thermique	Rampe (°C/min)	Température (°C)	Retenue (min)
		35	3
	15	160	-
	2	220	-
	25	260	3

La méthode de programmation d'introduction du gaz de référence (azote atmosphérique) et du système de balayage pendant l'analyse des alcaloïdes-EC est présente dans le Tableau 47.

**Tableau 47. Méthode de programmation d'introduction du gaz de référence et du système de balayage pendant l'analyse des alcaloïdes-EC**

Temps (sec)	Gaz de référence		Système de balayage		Split	
	ouvert	fermé	ouvert	fermé	ouvert	fermé
0			x		x	
30	x					
50		x				
80	x					
100		x				
130	x					
150		x				
1200				x		
2760			x			x

L'étalon externe, une solution de tropinone 1 mg/mL (100 µg N/mL) dans du méthanol, est injecté toutes les 9 à 12 injections.

La méthode de programmation GC pour analyser la tropinone est présentée dans le Tableau 48.

<b>Tableau 48. Méthode chromatographique pour l'analyse de la tropinone</b>			
<b>Paramètre</b>		<b>Description</b>	
<b>Type d'injection</b>		Sans division	
<b>Débit d'hélium</b>		1.2 mL/min 32 cm/sec	
<b>Température de l'injecteur</b>		240°C	
<b>Température du FID</b>		Pas branché	
<b>Temps d'analyse</b>		18.3 min	
<b>Conditions d'élution thermique</b>	<b>Rampe (°C/min)</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Retenue (min)</b>
		35	3
	15	160	-
	2	174	-

La méthode de programmation d'introduction du gaz de référence et du système de balayage pendant l'analyse de tropinone est présentée dans le Tableau 49.

<b>Tableau 49. Méthode de la programmation d'introduction de gaz de référence et le système de balayage pendant l'analyse de tropinone</b>						
<b>Temps (sec)</b>	<b>Gaz de référence</b>		<b>Système de balayage</b>		<b>Split</b>	
	<b>ouvert</b>	<b>fermé</b>	<b>ouvert</b>	<b>fermé</b>	<b>ouvert</b>	<b>fermé</b>
<b>0</b>			<b>x</b>		<b>x</b>	
<b>30</b>	<b>x</b>					
<b>50</b>		<b>x</b>				
<b>80</b>	<b>x</b>					
<b>100</b>		<b>x</b>				
<b>130</b>	<b>x</b>					
<b>150</b>		<b>x</b>				
<b>400</b>				<b>x</b>		
<b>1100</b>			<b>x</b>			<b>x</b>

## 5.7.2 Méthode de mesure des déviations isotopiques par AE-irm-MS

Le spectromètre de masse de rapport isotopique Delta V Advantage (Thermo Fisher Scientific) couplé par l'interface Conflo III (Thermo Fisher Scientific) à un analyseur élémentaire Flash EA 1112 HT (Thermo Fisher Scientific) équipé avec un four de combustion en quartz (chauffé à 1100°C) est utilisé pour mesurer les déviations isotopiques  $\delta^{15}\text{N}$  (‰).

L'interface Conflo III est constituée de :

- un piège à eau (perchlorate de magnésium),
- une colonne chromatographique de type PORAPAK Q avec détection par un TCD,
- un système de dilution de gaz avec He (le flux d'hélium lors l'analyse est constant et égal à environ 100 mL/min).

La méthode de programmation d'introduction du gaz de référence et la dilution d'échantillon analysé est présentée dans le Tableau 50.

**Tableau 50. Méthode de programmation d'introduction de gaz de référence et de dilution d'échantillon**

Temps (sec)	Analyse élémentaire		Dilution		Gaz de référence N <sub>2</sub>		Gaz de référence CO <sub>2</sub>		Changement du gaz
	ouvert	fermé	ouvert	fermé	ouvert	fermé	ouvert	fermé	
0									
30					x				
50						x			
80					x				
100						x			
130					x				
150						x			
160	x								
165		x							
300			x						CO <sub>2</sub>
450							x		
470								x	
500							x		
520								x	
550							x		
570								x	

## 5.8 Méthode de mesure des effets isotopiques

### 5.8.1 Mesure de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) au cours du métabolisme des alcaloïdes tropaniques

La culture soit sur nortropine soit sur norpseudotropine est préparée selon le protocole § 5.5.3. Au cours de croissance des aliquotes sont prélevés (5.0 mL) pour quantifier les métabolites présents dans le milieu bactérien (voir protocole § 5.2.6). Les échantillons sont ensuite analysés par GC-irm-MS (voir protocole § 5.7.1).

### 5.8.2 Calcul des effets isotopiques cinétiques en azote-15 au cours de la dégradation des alcaloïdes nortropaniques

Les déviations isotopiques des alcaloïdes mesurées au cours de la dégradation par les bactéries *Pseudomonas* AT3 (protocoles § 5.5.3 et § 5.2.6) sont utilisées pour calculer les valeurs des effets isotopiques cinétiques selon l'équation de Bigeleisen [88].

Avec :

$$EIC = (V/K) = \frac{\ln(1-F)}{\ln\left[(1-F)\left(\frac{R_t}{R_0}\right)\right]}$$

$F$  facteur d'avancement de la réaction

$R_0$  rapport isotopique du substrat au temps zéro

$$\text{où } F = \frac{S_0 - S_t}{S_0}$$

$R_t$  rapport isotopique du substrat au temps  $t$

$$\text{où } \frac{R_t}{R_0} = \frac{\frac{\delta_t}{1000} + 1}{\frac{\delta_0}{1000} + 1}$$

$S_0$  quantité de substrat au temps zéro

$S_t$  quantité de substrat au temps  $t$

$\delta_0$   $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de substrat au temps zéro

$\delta_t$   $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de substrat au temps  $t$

### 5.8.3 Mesures des effets isotopiques en deutérium au cours de la dégradation des alcaloïdes nortropaniques

Les composés utilisés pour cette expérience sont de la [1-<sup>2</sup>H]nor(pseudo)tropine et de la [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nor(pseudo)tropine. Pour la synthèse de ces composés voir les protocoles § A.1.3 et § A.1.4 (Annexe 1).

Les solutions des composés marqués dans le milieu bactérien MP-Mg/2 (10 mg/mL) sont préparées selon le protocole § 5.5.2. Les cultures des bactéries *Pseudomonas* AT3 sont effectuées sur un mélange de composé marqué en deutérium (2.5 mL de solution mère) et de composé non marqué (2.5 mL de la solution mère) ajoutés à un fiole stérile contenant 45 mL de milieu afin d'obtenir une concentration finale en substrat de 1 mg/mL. Les cultures sont effectuées selon le protocole § 5.5.3. Des aliquotes sont prélevés au début et à la fin de la croissance. La croissance est arrêtée quand la DO<sub>550</sub> mesurée est de ≈0.8-0.9. Les cultures sont ensuite prélevées et les métabolites sont extraits selon le protocole § 5.2.6.

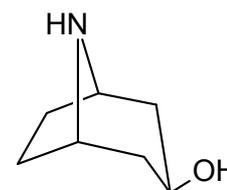
Le résidu est dissous dans le méthanol et analysé par spectrométrie de GC-MS classique. L'effet isotopique est calculé avec le ratio entre les pics (M+1)/M ou (M+2)/M au temps initial de croissance et en fin de culture.

## 5.9. Méthode de synthèse des composés non-marqués

### 5.9.1 Synthèse de la norpseudotropine

Matériel :

- Nortropinone•HCl (Boehringer Ingelheim)
- Solution de NaOH (10 M)
- Dichlorométhane (VWR GPR Rectapur > 99%)
- MgSO<sub>4</sub> anhydre (Sigma Aldrich)
- Toluène anhydre (Sigma Aldrich 99.8%)
- iso-Butanol anhydre (ACS 99.5%)
- Sodium



Protocole :

Le pH d'une solution de nortropinone•HCl (4.04 g; 0.023 mol) dans l'eau distillée (50 mL) est ajusté à une valeur inférieure à 12. La cétone est ensuite extraite par le dichlorométhane (5 x 50 mL). La phase organique est séchée (MgSO<sub>4</sub>), filtrée et évaporée. La nortropinone (2.99 g; 0.024 mol) est obtenue sous la forme d'une poudre blanche avec un

rendement de 96%. La nortropinone est ensuite utilisée dans la deuxième étape de synthèse.

Dans un ballon à bicol de 100 mL équipé d'un réfrigérant sous un courant d'azote gazeux, sont introduits le sodium (4.23 g; 0.18 mol) et le toluène anhydre (22.5 mL). Le mélange est porté à reflux pendant 1.5 h. Le ballon est ensuite refroidi à une température de 75°C et la solution de nortropinone (2.99 g; 0.024 mol) dans l'iso-butanol anhydre (11.2 mL; 0.12 mol) et de l'iso-butanol anhydre (22.4 mL; 0.24 mol) sont introduits. Le mélange est à nouveau porté à reflux pendant 3 h. Après retour à température ambiante, la phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en NaCl (3 x 30 mL). Le pH de la phase aqueuse est ajusté à 12 et elle est extraite par du dichlorométhane (4 x 40 mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées (MgSO<sub>4</sub>), filtrées et évaporées.

S'il y a plus de 5% d'impuretés dans le produit brut obtenu, le produit est purifié sur colonne de silice (40-63 µm, éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH/NEt<sub>3</sub> 46/46/1).

La norpseudotropine (2.89 g; 0.023 mol) est obtenue sous la forme d'une poudre jaune avec le rendement de 95%.

- **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 1.31-1.45 (m, 2H), 1.49-1.60 (m, 2H), 1.66-1.78 (m, 2H), 1.81-1.95 (m, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.76-3.89 (tt, J=10.7 Hz, J=6.2 Hz, 1H)
- **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 29.2, 42.8, 54.3, 63.6.
- MS (EI) (intensivité relative) m/z 127 (M<sup>+</sup>, 24), 110 (27), 99 (36), 82 (35), 68 (100), 67 (27).

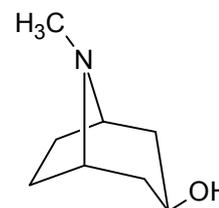
## 5.9.2 Synthèse de la pseudotropine

La synthèse de la pseudotropine est effectuée selon le protocole § 5.9.1 à partir de la tropinone.

La pseudotropine est obtenue sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 95%.

Les caractéristiques spectrales RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de ce composé sont cohérentes avec celles décrites dans la littérature [89, 90].

- **<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 1.46-1.55 (m, 2H), 1.56-1.68 (m, 2H), 1.70-1.82 (m, 2H), 1.86-2.04 (m, 2H), 2.26 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.13 (m, 2H, CHN), 3.45 (brs, OH), 3.82 (tt, J=10.7 Hz, J=6.2 Hz, 1H, CHOH).
- **<sup>13</sup>C RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 26.8, 38.7, 39.6, 60.6, 63.5.

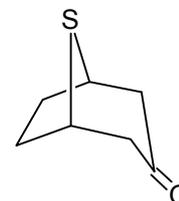


- **MS (EI)** (intensivité relative)  $m/z$  141 ( $M^{+\circ}$ , 27), 124 (48), 96 (77), 94 (16), 83 (54), 82(100).

### 5.9.3 Synthèse de la TBON

Matériel :

- Tropinone (Sigma Aldrich >98%)
- Ethanol (ACS)
- Iodométhane (Sigma Aldrich)
- Ether diéthylique (Merck)
- $Na_2S \cdot 9H_2O$
- HCl (0.1 M)
- Solution du NaCl sat.



Protocole [91] :

Dans un ballon à bicol équipé d'une ampoule à addition, sont introduits la tropinone (0.61 g; 4.38 mmol) et l'éthanol anhydre (10 mL). Un mélange d'iodométhane (1.88 g; 0.83 ml) et d'éthanol (10 mL) est ensuite ajouté goutte à goutte. L'agitation se poursuit pendant 2 h à température ambiante. L'éthanol est alors évaporé, puis l'éther diéthylique froid est introduit dans le ballon qui est alors laissé au congélateur pendant 2 h. Le précipité formé est filtré et lavé avec l'éther diéthylique. La tropinone méthiodide est obtenue sous forme de poudre jaune (0.65 g; 4.2 mmol) avec un rendement de 96%. Elle est utilisée dans la deuxième étape.

Un mélange d'eau (175 mL) et de  $Na_2S \cdot 9H_2O$  (3.39 g; 14.1 mmol) est dégazé dans un bain à ultrasons. Dans un ballon à tricol sont introduites la tropinone iodométhane et une solution aqueuse de  $Na_2S \cdot 9H_2O$  (0.064 M, 175 mL). Le mélange est agité sous atmosphère d'azote, porté à reflux (85°C; 2 h), puis refroidi à température ambiante et extrait par l'éther diéthylique (3 x 150 mL). Les phases organiques sont rassemblées et lavées par HCl 0.1 M (1 x v/v), puis par une solution aqueuse sat de NaCl. (3 x 150 mL), séchées ( $MgSO_4$ ), filtrées et évaporées.

Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (40-63  $\mu m$ , éluant : éther diéthylique/éther de pétrole 4/1).

Le produit est obtenu sous forme de cristaux jaunes (0.30 g; 2.11 mmol) avec un rendement de 46%.

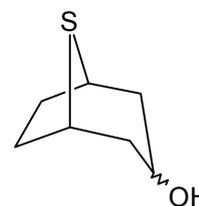
Les caractéristiques spectrales  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR [92] [93] et MS [91] de ce composé décrites dans la littérature sont cohérentes avec celles obtenues dans notre laboratoire.

- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 1.94-2.07 (m, 2H), 2.07-2.24 (m, 2H), 2.64 (dd,  $J=17.0$  Hz,  $J=2.7$  Hz, 2H), 2.75 (dd,  $J=17.4$  Hz,  $J=4.3$  Hz, 2H), 3.74-3.86 (m, 2H).
- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 34.4, 45.6, 53.0, 209.2.
- MS (EI) (intensivité relative)  $m/z$  142 ( $\text{M}^+$ , 100), 114 (54), 99 (19), 85 (75), 67 (29), 58 (48).

#### 5.9.4. Réduction du TBON, synthèse de $\alpha$ -TBOL et $\beta$ -TBOL

Matériel :

- TBON (la synthèse voir le protocole § 5.9.3)
- Méthanol (VWR)
- $\text{NaBH}_4$



Protocole [11] :

Un mélange de TBON (0.15 g; 1.4 mmol), de méthanol (6 mL), d'eau distillée (12 mL) et de  $\text{NaBH}_4$ , est agité pendant 12 h à température ambiante, puis lavé par dichlorométhane (3 x 20 mL), séchés ( $\text{MgSO}_4$ ), filtré et évaporé.

L'analyse GC du résidu (voir le protocole § 5.3.3) a confirmé la présence des deux alcools  $\alpha$ -TBOL et  $\beta$ -TBON dans un rapport 1/3.5.

Le résidu est purifié et les deux isomères séparés sur colonne de gel de silice (40-63  $\mu\text{m}$ , éluant : éther diéthylique /éther de pétrole 4/1).

L' $\alpha$ -TBOL est obtenu sous forme d'une poudre blanche (18 mg; 0.13 mmol) avec un rendement de 9%.

Les caractéristiques spectrales  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR de ce composé ont été décrites dans la littérature [93] et sont cohérentes avec celles obtenues dans notre laboratoire.

- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 1.59 (brs, OH), 1.94-2.12 (m, 4H), 2.20-2.29 (m, 2H), 2.37-2.52 (m, 2H), 3.55 (m, 2H), 4.10 (tt,  $J=5.1$  Hz,  $J=1.6$  Hz, 1H).
- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 33.9, 42.6, 45.2, 66.0.
- MS (EI) (intensivité relative)  $m/z$  144 ( $\text{M}^+$ , 100), 110 (22), 95 (42), 85 (66), 67 (34).

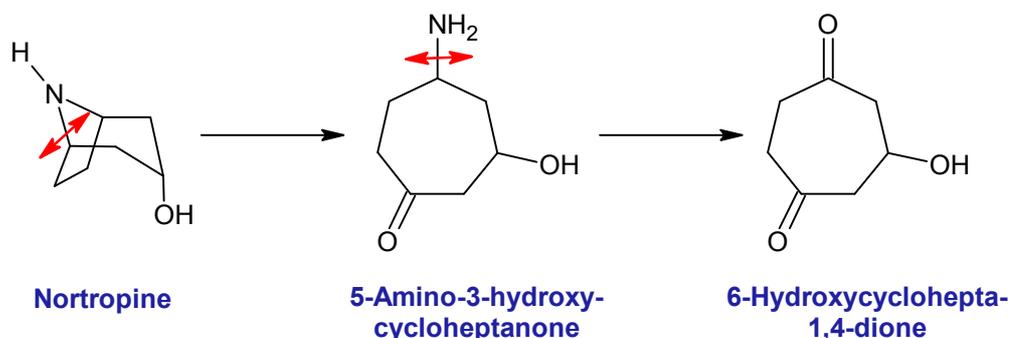
Le  $\beta$ -**TBOL** est obtenu sous forme d'une poudre blanche (66 mg; 0.42 mmol) avec un rendement de 30%.

Les caractéristiques spectrales  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR de ce composé ont été décrites dans la littérature [93] et sont cohérentes avec celles obtenues dans notre laboratoire.

- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 1.72 (dd,  $J=11.6$  Hz, 2H), 1.85 (brs OH), 1.88-2.07 (m, 4H), 2.24 (dt,  $J=12.5$  Hz,  $J=5.6$  Hz, 2H), 3.59 (m, 2H, CHS), 3.9 (tt,  $J=10.8$  Hz,  $J=6.0$  Hz, 1H, CHOH).
- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 33.6, 44.2, 45.9, 65.9.
- MS (EI) (intensivité relative)  $m/z$  144 ( $\text{M}^+$ , 100), 97 (17), 87 (87), 67 (33).

## Conclusions

L'objectif de ce travail de thèse a été la détermination *in vivo* des effets isotopiques cinétiques (EIC), en abondance naturelle, liés à la rupture d'une liaison C–N lors du catabolisme de la nortropine (Figure 77) par les bactéries *Pseudomonas*.



**Figure 77. Séquence de ruptures des liaisons C-N pendant le métabolisme bactérien**

Pour réaliser cette étude, il fallait développer et valider une méthode de mesure des effets isotopiques (EI). Pour pouvoir proposer une interprétation en termes mécanistiques de ces EI il était également essentiel de procéder à une analyse du flux métabolique lors du catabolisme de la nortropine.

Pour la mesure des effets isotopiques cinétiques de la réaction enzymatique conduisant à la rupture de la liaison C–N du cycle azoté de la nortropine et de la norpseudotropine, il était nécessaire de déterminer avec justesse et précision le degré d'avancement de la réaction et la teneur isotopique du substrat à ce même degré d'avancement. Pour cela, nous avons mis au point et validé une méthode qui nécessite la dérivation préalable des substrats sous forme de carbamates. La quantification est réalisée par GC-FID et les mesures de déviation isotopique par GC-irm-MS.

La nouvelle méthode de dérivation par le chloroformiate d'éthyle peut être appliquée à la quantification des alcaloïdes nortropaniques dans le milieu bactérien. De plus, cette méthode n'introduit pas de fractionnement isotopique significatif. La stabilité des composés dérivés a aussi été confirmée. Les deux types de mesures ont été validés sur une gamme de concentration en substrat allant de 1.6 à 8.0 mM.

Les mesures de déviation isotopiques ont également été validées sur une gamme couvrant largement la gamme d'abondance naturelle de la nortropine (-80‰ à +50‰) et de la norpseudotropine (-60‰ à +40‰).

Pour les études de flux métabolique, la croissance des bactéries *Pseudomonas* a été étudiée avec différents alcaloïdes nortropaniques comme substrats (nortropine, norpseudotropine et nortropinone). Pour cela, un milieu de culture spécifique a été développé.

Les courbes de croissance et les profils métaboliques ont été établis avec, comme substrats la nortropine, la norpseudotropine et la nortropinone et avec un mélange nortropine/norpseudotropine.

Concernant les taux de croissance, on n'observe pas de différences significatives entre les substrats sauf pour la nortropinone où la croissance est plus lente.

Pour le profil métabolique des différences significatives apparaissent :

- lorsque le substrat est la nortropine, on observe la formation de quantités significatives de norpseudotropine (jusqu'à environ 20% de la totalité initiale de nortropine) et de petites quantités de nortropinone. Ces composés sont néanmoins consommés au cours de la réaction.
- lorsque le substrat est la norpseudotropine, on n'observe la formation que de traces de nortropine et de nortropinone.
- pour les cultures sur mélange des deux substrats, durant les premières heures la concentration de la nortropine diminue constamment et celle de la norpseudotropine reste quasi constante et ce n'est qu'après épuisement de la nortropine que l'on observe la diminution de la concentration en norpseudotropine jusqu'à épuisement correspondant à la fin de la croissance.

Ces résultats mettent en évidence un échange métabolique apparent entre nortropine et norpseudotropine sous le contrôle des enzymes tropinone réductases TR I et TR II et soulèvent un certain nombre de questions :

## **Comment sont régis les échanges entre nortropine, nortropinone et norpseudotropine ?**

Pour aborder cette question plusieurs expériences ont été réalisées :

- des études avec des inhibiteurs potentiels des tropinone réductases (TBON et TBOL) ont été effectuées. La TBON a eu un effet toxique (> 0.14 mM) pendant les tests *in vivo*, allant jusqu'à bloquer la croissance de *Pseudomonas* AT3 (> 5.6 mM). Par contre, *in vitro*, aucune activité inhibitrice (> 7.0 mM) n'a été observée sur les extraits

enzymatiques. Pour le  $\beta$ -TBOL, aucune activité inhibitrice n'a été détectée ni *in vivo* ni *in vitro*.

- les activités enzymatiques ont été mesurées *in vitro* pour 8 substrats potentiels (tropine, pseudotropine, tropinone, nortropine, norpseudotropine, nortropinone, TBON et  $\beta$ -TBOL). A l'exception de la TBON et du TBOL, toutes les molécules testées sont des substrats des tropinone réductases mais avec des différences importantes dans les niveaux d'activité. L'activité pour la nortropine est 1.5 fois plus grande que pour la tropine. De plus, au niveau des alcaloïdes nortropaniques, il existe un échange bidirectionnel entre la norpseudotropine et la nortropinone, contrairement à ce qui est observé avec la pseudotropine.
- l'étude *in vivo* du métabolisme des substrats marqués au deutérium en position 3 a montré que 83% de la nortropine et 91% de la pseudotropine sont métabolisés directement, sans qu'il soit possible de déterminer quantitativement la répartition entre nortropine et norpseudotropine de la nortropinone oxydée.
- l'étude *in vivo* de la dégradation d'un mélange de nortropine et de norpseudotropine avec des  $\delta^{15}\text{N}$  très différents a confirmé un échange entre la nortropine (25.6‰) et la norpseudotropine (0.8‰). L'étude métabolique faite en suivant le profil isotopique des substrats au cours du métabolisme donne des résultats totalement cohérents avec le profil métabolique établi précédemment. En effet, bien que la concentration de la norpseudotropine varie peu durant les premières heures de culture on observe une tendance à l'enrichissement de celle-ci. Dans ce cas, l'hypothèse la plus réaliste est que les substrats sont métabolisés en parallèle mais la norpseudotropine consommée est compensée par celle générée à partir de la nortropine après isomérisation.

Pour tenter d'étayer cette hypothèse, un modèle approximé de calcul de flux métabolique a été proposé (voir § 3.3.3.3). Ce modèle prend en compte le taux d'isomérisation et le fractionnement éventuel au niveau de l'échange entre nortropine et norpseudotropine (pseudo EI évalué à approximativement 0.9942). Dans ces conditions, le modèle nécessite que 20% environ de la nortropine consommée se transforme en norpseudotropine pour permettre de justifier l'augmentation en  $\delta^{15}\text{N}$  de la norpseudotropine. Il a ainsi été confirmé qu'il existe une possibilité de métabolisme indirect après épimérisation (nortropine  $\rightleftharpoons$  nortropinone  $\rightleftharpoons$  norpseudotropine) conjointement au métabolisme direct de la nortropine et de la norpseudotropine.

## **Peut-on déterminer le degré d'échange réel entre nortropine et norpseudotropine ?**

En situation de co-substrat, le modèle proposé implique que 20% environ de la nortropine consommée se transforme en norpseudotropine. Si on rapproche cette donnée des observations faites sur substrat seul, ceci représenterait la totalité de la nortropine qui a perdu son  $^2\text{H}$  au cours de la consommation de la  $[3\text{-}^2\text{H}]$ nortropine. D'autre part, cette valeur de 20% environ est également cohérente avec le profil métabolique obtenu avec la nortropine comme substrat unique qui montre qu'au moins 20% de la nortropine est épimérisée en norpseudotropine (voir § 3.2.1).

Toutefois, ceci ne semble pas cohérent avec les études enzymatiques qui montrent que, *in vitro*, l'activité de TR I qui catalyse l'oxydation de la nortropine en nortropinone est deux fois plus forte que celle de TR II qui catalyse l'oxydation de la norpseudotropine en nortropinone (Tableau 19). Mais, selon les données qui figurent dans les Tableaux 19 et 20, la réduction de la nortropinone est globalement 5 fois plus forte et, de plus, favorise la réaction retour vers la nortropine (75/25). Ceci devrait donc, au contraire, favoriser la formation de nortropine. Bien sûr, les observations sur extraits enzymatiques ne prennent pas en compte l'influence du flux métabolique liée au catabolisme direct des substrats et leur éventuelle compétition en tant que substrat.

## **Existe-t-il une compétition pour l'ouverture du cycle entre la nortropine et la norpseudotropine ?**

Le modèle établi pour la situation de co-métabolisme nortropine/norpseudotropine montre que lors des premières heures de culture c'est la nortropine qui est consommée en priorité jusqu'à quasi épuisement et qu'ensuite la norpseudotropine est consommée à une vitesse équivalente à celle de la nortropine. Ceci présente des similarités avec les observations faites sur substrat seul :

- quand la nortropine est le seul substrat il y a accumulation continue de norpseudotropine jusqu'au point où la concentration de celle-ci égale celle de la nortropine. Après cela c'est la consommation conjointe des deux substrats qui est observée (voir § 3.2.1).
- quand nortropine et norpseudotropine sont présents initialement en concentrations similaires, il faut attendre qu'approximativement 80% de la nortropine soient consommés avant d'observer une baisse significative de la concentration de la pseudotropine (voir § 3.2.4).

- quand on utilise comme substrat un mélange de nortropine et de norpseudotropine ayant des teneurs isotopiques significativement différentes ( $\Delta\delta^{15}\text{N} = +24.8\text{‰}$  en faveur de la nortropine), on observe au cours des six premières heures de culture un enrichissement de la norpseudotropine. Simultanément on observe un appauvrissement constant de la nortropine (voir § 3.3.3.2).
- quand la norpseudotropine est le seul substrat présent, on n'observe que des traces de nortropine (voire § 3.2.2).

Ces éléments sont tous compatibles avec l'hypothèse d'une cytochrome P450 monooxygénase qui dégraderait chacun des deux substrats avec des vitesses similaires mais avec une affinité plus forte pour la nortropine.

Ceci pourrait expliquer pourquoi on observe la formation de quantités significatives de norpseudotropine en présence de concentrations équivalentes ou supérieures en nortropine et pas l'inverse. Durant le métabolisme, TR I rentre en compétition pour la nortropine avec la CYP450 monooxygénase. Durant les premiers temps du métabolisme, la concentration en nortropinone produite est faible vis-à-vis de la concentration en nortropine rendant la réaction de conversion nortropinone → nortropine par TR I hautement improbable. Par contre, lorsque la nortropine est le seul substrat, la conversion nortropinone → norpseudotropine par TR II est, elle, favorisée. Toutefois, la norpseudotropine formée étant en faible concentration par rapport à la nortropine et étant défavorisée du point de vue de l'affinité, elle n'est pas le substrat privilégié de la CYP450 monooxygénase et donc s'accumule dans le milieu.

A l'inverse, s'il y a production de nortropine à partir de la norpseudotropine, la faible concentration en nortropine est compensée par la forte affinité vis-à-vis de la CYP450 monooxygénase et elle est consommée directement. Ceci reste toutefois mineur, les études avec la  $[3\text{-}^2\text{H}]$ norpseudotropine montrant que taux l'épimérisation ne peut dépasser 10%.

Ceci restant purement spéculatif, il est nécessaire de s'intéresser plus particulièrement à la cytochrome P450 monooxygénase de *Pseudomonas* qui catalyserait la dégradation de ces deux substrats.

**Peut-on proposer un mécanisme réactionnel basé sur les mesures des EIC qui soit compatible avec l'hypothèse d'une réaction catalysée par une enzyme de type cytochrome P450 monooxygénase ?**

La dernière partie de ce travail concernait la mesure des EIC associés à la dégradation de la nortropine et de la norpseudotropine et leur exploitation pour proposer un modèle de mécanisme enzymatique. Cette partie a été réalisée avec l'appui du Dr Renata Kwiecień, membre de l'équipe EBSI pour la totalité des calculs théoriques.

Les valeurs des EIC-<sup>15</sup>N expérimentaux calculés sur la base des fractionnements isotopiques lors de la dégradation de la nortropine et de la norpseudotropine sont de 0.9946 (écart-type 0.0009) et 0.9942 (écart-type 0.0003) respectivement, correspondant à un effet dit inverse et indiquant que la rupture de la liaison C–N n'est pas l'étape limitante de la réaction. Les éléments de réflexion, obtenus lors de l'étude métabolique, permettent de considérer que la perturbation liée à la réaction d'épimérisation est probablement négligeable dans les deux cas, et que ces valeurs peuvent être considérées comme très proches, voire identiques. Ceci permet d'étayer l'hypothèse d'une réaction catalysée par une enzyme unique. Pour les effets isotopiques EIC-<sup>2</sup>H correspondant à la position 1 (ou 5) du cycle les résultats montrent qu'il n'y a aucun fractionnement isotopique significatif et que l'ablation de l'hydrogène ne fait pas partie de l'étape cinétiquement limitante de la réaction.

A partir de ces données expérimentales et des mécanismes comparables décrits dans la littérature, un mécanisme réactionnel global en deux étapes clés a pu être proposé et chacune des étapes discutée en comparant les données expérimentales avec les données théoriques calculées pour chaque hypothèse. De cela, il résulte un modèle impliquant une cytochrome P450 monooxygénase pour l'étape 1 conduisant à l'introduction d'un groupement hydroxyle en C1 (ou C5). Pour l'étape 2, les résultats indiquent un simple mécanisme acido-basique de type "push/pull" ou "pull/push" pour la rupture simultanée de la liaison C–N avec l'oxydation en cétone de l'hydroxyle formé à l'étape 1.

## Quelles sont les perspectives ?

Pour développer et compléter les études menées dans cette thèse il serait nécessaire :

- d'affiner le modèle mécanistique

Prouver l'implication d'un système CYP 450 : Une preuve de l'implication ou non d'un système de type CYP450 pourrait être apporté par la vérification de la provenance de l'oxygène introduit dans la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione. En effet, si un système CYP450 est impliqué l'oxygène proviendra du dioxygène, dans le cas contraire il proviendra de l'eau du milieu. Pour réaliser ces expériences on peut cultiver les bactéries *Pseudomonas* souche MS2 en présence de soit H<sub>2</sub><sup>18</sup>O soit <sup>18</sup>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O et étudier l'incorporation en <sup>18</sup>O dans le

produit accumulé **(20)**. Si dans le premier cas on note l'incorporation d' $^{18}\text{O}$  cela signifie que le groupe hydroxyle introduit sur le carbone 1 ou 5 provient de l'eau du milieu et que la réaction n'est pas catalysée par une monooxygénase du cytochrome P450 mais par un autre type d'enzyme. Par contre, si en présence de  $^{18}\text{O}_2$  dans  $\text{H}_2\text{O}$  il y a incorporation d' $^{18}\text{O}$ , cela constituera que la réaction est catalysée par le cytochrome P450.

Une autre approche pour vérifier si le CYP450 est impliqué dans le métabolisme est d'utiliser des inhibiteurs classiques de ces systèmes enzymatiques comme le monoxyde de carbone.

- de caractériser *in vitro* les enzymes responsables des deux premières ruptures de liaison C-N: ceci nécessite la purification préalable des enzymes des bactéries *Pseudomonas* AT3 et MS2 responsables de la déméthylation de la tropine et de la rupture de la liaison C-N du cycle de la nortropine et leur caractérisation avant de mesurer spécifiquement leur activité envers la (pseudo)tropine et la nor(pseudo)tropine.
- de mesurer *in vitro* les valeurs d'EIC pour les enzymes isolées : afin d'obtenir une valeur spécifique à cette réaction hors d'un contexte de flux métabolique.
- d'étudier la troisième rupture de la liaison C-N lors la dégradation de la tropine (désamination) : pour cette étude il sera nécessaire de synthétiser l'intermédiaire métabolique 5-amino-3-hydroxycycloheptanone **(19)** puis de vérifier si ce composé il peut être utilisé comme substrat de croissance pour les bactéries *Pseudomonas* AT3. Il faudra, ensuite, mettre en point et valider un protocole de quantification et de mesure des déviations isotopiques en azote-15 pour ce composé. Ceci permettra la mesure du fractionnement isotopique *in vivo* lors de l'étape de désamination et le calcul de l'EIC associé. Ces expériences devront, idéalement, être également conduites *in vitro* sur les enzymes purifiées. A partir des données obtenues et selon leur pertinence, on pourra envisager de proposer un mécanisme selon la même démarche que pour les travaux réalisés précédemment en comparant les résultats expérimentaux avec les résultats obtenus par calculs théoriques pour les différentes hypothèses mécanistiques.

Pour les perspectives à plus long terme, ces travaux peuvent conduire à l'élaboration d'inhibiteurs des enzymes responsables de la dégradation des principes actifs du type alcaloïde tropanique. Pour cela, il faudrait réaliser la conception et la synthèse d'analogues structuraux des états de transition des mécanismes réactionnels de ces enzymes. Ceci

permet d'envisager de bloquer, grâce à ces analogues, les enzymes qui catalysent la dégradation des principes actifs, améliorant ainsi la stabilité des composés thérapeutiques. Ce type de projet nécessite une approche pluridisciplinaire faisant appel à l'expérimentation biochimique et à la chimie théorique pour l'analyse et l'interprétation du métabolisme sur cellules humaines *in vivo* et *in vitro*, à la mesure des effets isotopiques cinétiques *in vivo* et leur exploitation pour déterminer les mécanismes réactionnels en faisant appel à la chimie *in silico* et à la synthèse organique pour la préparation des analogues.

## Références bibliographiques :

1. Molinié R (2005). Effet isotopique cinétique de l'azote au cours de la déméthylation des alcaloïdes par les plantes et les bactéries., Thèse de l'Université de Nantes, Nantes, pp. 212.
2. Mayant C (2005). Etude de l'effet isotopique cinétique en  $^{15}\text{N}$  au cours de la dégradation de la nortropine par *Pseudomonas* AT3., Rapport de stage M2R, Université de Nantes, Nantes, pp. 25.
3. Le Faouder P (2007). Etude du métabolisme d'alcaloïdes tropaniques par *Pseudomonas* AT3., Rapport de stage MR2, Université de Nantes, Nantes, pp. 23.
4. Cordell GA (1993). *The Alkaloids*, Volume 44 (Academic Press, Inc.: San Diego );pp. 379.
5. Eich E (2008). *Solanaceae and Convolvulaceae: secondary metabolites*. (Springer: Berlin); pp. 637.
6. Roberts MF, Wink M (1998). *Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications* (Plenum Press: New York); pp. 486.
7. Andersson K (2004). Antimuscarinics for treatment of overactive bladder. *The Lancet Neurology* **3**: 46-53.
8. Ali-Melkkilä T, Kanto J, Iisalo E (1993). Pharmacokinetics and related pharmacodynamics of anticholinergic drugs. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **37**: 633-642.
9. Renner UD, Oertel R, Kirch W (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine. *Therapeutic Drug Monitoring* **27**: 655-664.
10. Gryniewicz G, Gadzikowska M (2008). Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Pharmacological Reports* **60**: 439-463.
11. Dräger B, Portsteffen A, Schaal A, McCabe PH, Peerless ACJ, Robins RJ (1992). Levels of tropinone-reductase activities influence the spectrum of tropane esters found in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Planta* **188**: 581-586.
12. Scholl Y, Höke D, Dräger B (2001). Calystegines in *Calystegia sepium* derive from the tropane alkaloid pathway. *Phytochemistry* **58**: 883-889.
13. Portsteffen A, Dräger B, Nahrstedt A (1994). The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root cultures by two specific reductases. . *Phytochemistry* **37**: 391-400.
14. Portsteffen A, Dräger B, Nahrstedt A (1992). Two tropinone reducing enzymes from *Datura stramonium* transformed root cultures. *Phytochemistry* **31**: 1135-1138.
15. Nakajima K, Hashimoto T, Yamada Y (1994). Opposite stereospecificity of two tropinone reductases is conferred by the substrate-binding sites. *The Journal Of Biological Chemistry* **269**: 11695-11698.
16. Dräger B (2006). Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry* **67**: 327-337.
17. Nakajima K, Yamashita A, Akama H, Nanatsu T, Kato H, Hashimoto T, Oda J, Yamada Y (1998). Crystal structures of two tropinone reductases: different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 4876-4881.

18. Bartholomew BA, Smith MJ, Long MT, Darcy PJ, Trudgill PW, Hopper DJ (1995). Tropine dehydrogenase: purification, some properties and an evaluation of its role in the bacterial metabolism of tropine. *Biochemical Journal* **307**: 603-608.
19. Kitamura Y, Shigehiro M, Ikenaga T (1996). Tropic acid moiety of atropine may be recycled in *Duboisia*. *Phytochemistry* **42**: 1331-1334.
20. Robins RJ, Molinié R, Kwiecien RA, Paneth P, Lebreton J, Bartholomeusz TA, Roscher A, Dräger B, Meier AC, Mesnard F (2007). Progress in understanding the *N*-demethylation of alkaloids by exploiting isotopic techniques. *Phytochemistry Reviews* **6**: 51-63.
21. Molinié R, Kwiecien RA, Paneth P, Hatton W, Lebreton J, Robins RJ (2007). Investigation of the mechanism of nicotine demethylation in *Nicotiana* through <sup>2</sup>H and <sup>15</sup>N heavy isotope effects: Implication of cytochrome P450 oxidase and hydroxyl ion transfer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **458**: 175-183.
22. Harald J, Binder T, Höchstetter H, Thiermann H (2010). LC-ESI MS/MS quantification of atropine and six other antimuscarinic tropane alkaloids in plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**: 751-763.
23. Chen HX, Chen Y, Du P, Han F (2007). LC-MS for identification and elucidation of the structure of *in-vivo* and *in-vitro* metabolites of atropine. *Chromatographia* **65**: 413-418.
24. Chen HX, Chen Y, Du P, Han F, Wang H, Zhang H (2006). Sensitive and specific liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for atropine and its eleven metabolites in rat urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**: 142-150.
25. Chen HX, Chen Y, Wang H, Du P, Han F, Zhang H (2005). Analysis of scopolamine and its eighteen metabolites in rat urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* **67**: 984-991.
26. Niemer H, Bucherer H, Kohler A (1959). Über den Abbau von Atropin durch *Corynebacterium belladonnae*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* **317**: 238-242.
27. Niemer H, Bucherer H (1961). Über den Abbau von Atropin durch *Corynebacterium belladonnae* II. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* **326**: 9-12.
28. Kaczkowski J (1959). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **28**: 677-694.
29. Kaczkowski J, Mozejko-Toczko M (1960). Bacteria decomposing tropane alkaloids. *Acta Microbiologica Polonica* **9**: 173-179.
30. Long MT, Hopper DJ, Trudgill PW (1993). Atropine metabolism by a *Pseudomonas* sp.: Diauxic growth and oxidation of the product from esterase-mediated cleavage. *FEMS Microbiology Letters* **106**: 111-116.
31. Bartholomew BA, Smith MJ, Darcy PJ, Trudgill PW, Hopper DJ (1993). The synthesis and separation of [3-<sup>2</sup>H]tropine and [3-<sup>2</sup>H]pseudotropine. *Journal of Labelled and Radiopharmaceuticals* **34**: 85-91.
32. Bartholomew BA, Smith MJ, Trudgill PW, Hopper DJ (1996). Atropine metabolism by *Pseudomonas* strain AT3: Evidence for nortropine as an intermediate in tropine breakdown and reactions leading to succinate. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3245-3250.

33. Long MT, Bartholomew BA, Smith MJ, Trudgill PW, Hopper DJ (1997). Enzymology of oxidation of tropic acid to phenylacetic acid in metabolism of atropine by *Pseudomonas* sp. strain AT3. *Journal of Bacteriology* **179**: 1044-1050.
34. Bartholomew BA, Smith MJ, Long MT, Darcy PJ, Trudgill PW, Hopper DJ (1993). The isolation and identification of 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione as a novel intermediate in the bacterial degradation of atropine. *Biochemical Journal* **293**: 115-118.
35. Guengerich FP, Okazaki O, Seto Y, Macdonald TL (1995). Radical cation intermediates in *N*-dealkylation reactions. *Xenobiotica* **25**: 689-709.
36. Guengerich F (2005). Human cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, 3rd Edition, Ortiz de Montellano P, ed. (New York: Plenum Press), pp. 377-530.
37. Hummel W, Schütte H, Kula MR (1988). Enzymatic determination of L-phenylalanine and phenylpyruvate with L-phenylalanine dehydrogenase. *Analytical Biochemistry* **170**: 397-401.
38. Hummel W, Schütte H, Schmidt E, Wandrey C, Kula MR (1987). Isolation of L-phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4 and its application for the production of L-phenylalanine. *Applied Microbiology and Biotechnology* **26**: 409-416.
39. Hummel W, Schmidt E, Wandrey C, Kula MR (1986). L-Phenylalanine dehydrogenase from *Brevibacterium* sp. for production of L-phenylalanine by reductive amination of phenylpyruvate. *Applied Microbiology and Biotechnology* **25**: 175-185.
40. Martin G (1992). L'analyse isotopique par résonance magnétique nucléaire. *Annales des falsifications et de l'expertise chimique* **909**: 249-270.
41. Roth E (1997). Critical evaluation of the use and analysis of stable isotopes. *Pure and Applied Chemistry* **69**: 1753-1828.
42. Mook WG (2001). Eau atmospherique. In *Isotopes de l'environnement dans le cycle hydrologique* Volume II. (Vienna: IAEA), pp. 7-13.
43. Bigeleisen J, Mayer MG (1947). Calculation of equilibrium constants for isotopic exchange reactions. *Journal of the Chemical Physics* **15**: 261-267.
44. Cook PF (1991). *Enzyme Mechanism from Isotope Effects* (CRS Press: Boca Raton); pp. 500.
45. Isaacs NS (1987). In *Physical Organic Chemistry*. (London: Longman Group ), pp. 255-281.
46. Leskovac V (2003). *Comprehensive Enzyme Kinetics* (Kluwer Academics Publisher: Amsterdam); pp. 438.
47. Hess AR, Hengge AC, Cleland WW (1998). Isotope effects on enzyme-catalysed acyl transfer from *p*-nitrophenyl acetate: concerted mechanisms and increased hyperconjugation in the transition state. *Journal of the American Chemical Society* **120**: 2703-2709.
48. Marangoni AG (2003). *Enzyme Kinetics. A Modern Approach* (A John Wiley & Sons: Chichester); pp. 229.
49. Botosoa EP, Blumenstein C, MacKenzie DA, Silvestre V, Remaud GS, Kwiecien RA, Robins RJ (2009). Quantitative isotopic <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance at natural abundance to probe enzyme reaction mechanisms via site-specific isotope fractionation: The case of the

- chain-shortening reaction for the bioconversion of ferulic acid to vanilin. *Analytical Biochemistry* **393**: 182-188.
50. Baillif V, Robins RJ, Le Feunteun S, Lesot P, Billaut I (2009). Investigation of fatty acid elongation and desaturation steps in *Fusarium lateritium* by quantitative two-dimensional deuterium NMR spectroscopy in chiral oriented media. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 10783-10792.
  51. Waechter H, Sigrist MW (2007). Mid-infrared laser spectroscopic determination of isotope ratios of N<sub>2</sub>O at trace levels using wavelength modulation and balanced path length detection. *Applied Physics B* **87**: 539-546.
  52. Waechter H, Mohn J, Tuzson B, Emmenegger L, Sigrist MW (2008). Determination of N<sub>2</sub>O isotopomers with quantum laser based absorption spectroscopy. *Optics Express* **16**: 9239-9244.
  53. Menditto A, Patriarca M, Magnusson B (2007). Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision. *Accreditation and Quality Assurance* **12**: 45-47.
  54. Scientific T (2004). DELTA V advantage Installation Acceptance, QSV-00220 Ref. 05 of Mar 05, 2004.
  55. Dräger B (2002). Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A* **978**: 1-35.
  56. Yamamoto S, Kakuno K, Okahara S, Kataoka H, Makita M (1980). Gas chromatography of phenolic amines, 3-methoxycatecholamines, indoleamines and related amines as their *N,O*-ethoxycarbonyl derivatives. *Journal of Chromatography A* **194**: 399-403.
  57. Kim KR, Paik MJ, Kim JH, Dong SW, Jeong DH (1997). Rapid gas chromatographic profiling and screening of biologically active amines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **15**: 1309-1318.
  58. Kosieradzka K, Tea I, Gentil E, Robins RJ (2010). Determination of the natural abundance  $\delta^{15}\text{N}$  of nortropane alkaloids by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry of their ethylcarbamate esters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**: 1405-1414.
  59. Dräger B, Schaal A (1994). Tropinone reduction in *Atropa belladonna* root cultures. *Phytochemistry* **35**: 1441-1447.
  60. Rishavy MA, Cleland WW, Lusty CJ (2000). <sup>15</sup>N isotope effects in glutamine hydrolysis catalyzed by carbamyl phosphate synthetase: evidence for a tetrahedral intermediate in the mechanism. *Biochemistry* **39**: 7309-7315.
  61. Abell LM, O'Leary MH (1988). Nitrogen isotope effects on glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **27**: 3325-3330.
  62. Wright SK, Rishavy MA, Cleland WW (2003). <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N kinetic isotope effects on the reaction of the ammonia-rescued K258A mutant of aspartate aminotransferase. *Biochemistry* **42**: 8369-8376.
  63. O'Leary MH, Urberg M, Young AP (1974). Nitrogen isotope effects on the papain-catalyzed hydrolysis of *N*-benzoyl-L-argininamide. *Biochemistry* **13**: 2077-2081.

64. Snider MJ, Reinhardt L, Wolfenden R, Cleland WW (2002).  $^{15}\text{N}$  kinetic isotope effects on uncatalyzed and enzymatic deamination of cytidine. *Biochemistry* **41**: 415-421.
65. Hermes JD, Weiss PM, Cleland WW (1985). Use of nitrogen-15 and deuterium isotope effects to determine the chemical mechanism of phenylalanine ammonia-lyase. *Biochemistry* **24**: 2959-2697.
66. Nuiiry II, Hermes JD, Weiss PM, Chen C-Y, Cook PF (1984). Kinetic mechanism and location of rate-determining steps for aspartase from *Hafnia alvei*. *Biochemistry* **23**: 5168-5175.
67. Rishavy MA, Cleland WW (2000).  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  kinetic isotope effects on the reaction of aspartate aminotransferase and the tyrosine-225 to phenylalanine mutant. *Biochemistry* **39**: 7546-7551.
68. Hess AR, Hengge AC, Cleland WW (1997). Kinetic isotope effects for acyl transfer from *p*-nitrophenyl acetate to hydroxylamine show a pH-dependent change in mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **119**: 6980-6983.
69. Rishavy MA, Cleland WW (2000). Determination of the mechanism of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase by isotope effects. *Biochemistry* **39**: 4569-4574.
70. Kurtz KA, Rishavy MA, Cleland WW, Fitzpatrick PF (2000). Nitrogen isotope effects as probes of the mechanism of D-amino acid oxidase. *Journal of the American Chemical Society* **122**: 12896-12897.
71. Kohen A, Limbah H-H (2006). *Isotope Effects in Chemistry and Biology*. (CRC Press: Boca Raton); pp. 1074.
72. Sziminsky B, Gavilano L, Bowen SW, Dewey RE (2005). Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 14919-14924.
73. Fournial A, Ranaivondrambola T, Mathé-Allainmat M, Robins RJ, Lebreton J (2010). A short and efficient synthesis of bridgehead mono- and dideuterated tropinones. *European Journal of Organic Chemistry*: 152-156.
74. Gorrod JW, Schepers G (1999). *Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and Their Metabolites*. (Elsevier: Amsterdam); pp. 45-67.
75. Peterson LA, Castagnoli NJ (1988). Regio- and stereochemical studies on the  $\alpha$ -carbon oxidation of (S)-nicotine by cytochrome P-450 model systems. *Journal of Medicinal Chemistry* **31**: 637-640.
76. Peterson LA, Trevor A, Castagnoli NJ (1987). Stereochemical studies on the cytochrome P-450 catalyzed oxidation of (S)-nicotine to the (S)-nicotine  $\Delta^{1(5)}$ -iminium species. *Journal of Medicinal Chemistry* **30**: 249-254.
77. Murphy PJ (1973). A newly discovered intermediate in the metabolism of nicotine to nicotine  $\Delta^{1'5'}$  iminium ion. A newly discovered intermediate in the metabolism of nicotine. *Journal of Biological Chemistry* **248**: 2796-2800.

78. Brandägne S, Lindblom L (1979). The enzyme "aldehyde oxidase" is an iminium oxidase. Reaction with nicotine  $\Delta^{1(5)}$ iminium ion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **91**: 991-996.
79. Hill DL, Laster WR, Struck RF (1972). Enzymatic metabolism of cyclophosphamide and nicotine and production of a toxic cyclophosphamide metabolite. *Cancer Research* **32**: 658-665.
80. Dräger B (2004). Chemistry and biology of calystegines. *Natural Product Reports* **21**: 211 - 223.
81. Anderson VE, Cassno AG, Harris ME (2006). Nucleophile isotope effects. In *Isotope Effects in Chemistry and Biology*. (Boca Raton: CRC Press), pp. 893-914.
82. Dinnocenzo JP, Banach T (1989). Deprotonation of tertiary amine cation radicals. A direct experimental approach. *Journal of the American Chemical Society* **111**: 8646-8653.
83. Dinnocenzo JP, Karki SB, Jones J (1993). On isotope effects for the cytochrome P-450 oxidation of substituted *N,N*-dimethylamines. *Journal of the American Chemical Society* **115**: 7111-7116.
84. Hjelmeland LM, Aronow L, Trudell JR (1977). Intramolecular determination of primary kinetic isotope effects in hydroxylations catalyzed by cytochrome P-450. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **76**: 541-549.
85. Husek P, Huang ZH, Sweeley CC (1992). Gas chromatographic determination of amines, aminoalcohols and acids after treatment with alkyl chloroformates *Analytica Chimica Acta* **259**: 185-192.
86. Wells RJ (1999). Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **843**: 1-18.
87. Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH, Jones KM (1986). *Data for biochemical research* (Clarendon Press: Oxford); pp. 580.
88. Saunders WH (1986). Kinetic isotope effects. (New York: Tech. Chem. (N. Y.)), pp. 556-611.
89. Hayakawa Y, Noyori R (1974). The stereoselective reduction of tropinone to tropine. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **47**: 2617.
90. Iida H, Watanabe Y, Kibayashi C (1985). A new synthetic route to tropane alkaloids based on [4 + 2]nitroso cycloaddition to 1,3-cycloheptadienes. *Journal of the Organic Chemistry* **50**: 1818-1825.
91. Parr AJ, Walton NJ, Bensalem S, McCabe PH, Routledge W (1991). 8-Thiabicyclo[3.2.1]octan-3-one as a biochemical tool in the study of tropane alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* **30**: 2607-2609.
92. Majewski M, DeCaire M, Nowak P, Wang F (2001). Studies on enolate chemistry of 8-thiabicyclo[3.2.1]-octan-3-one: enantioselective deprotonation and synthesis of sulfur analogs of tropane alkaloids. *Canadian Journal of Chemistry* **79**: 1792-1798.
93. Muraoka O, Nishimura M, Tanabe G (1996). Photochemical behaviour of omega-thiabicyclo [3.n.1]alkan-3-one: a mechanistic and exploratory study. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions I*: 2265-2269.

94. Robinson R (1917). A synthesis of tropinone. *Journal of Chemical Society Transactions* **111**: 762-768.
95. Mondal N, Mandal SC, Das GK, Mukherjee S (2003). Theoretical study on the mechanism of Robinson's synthesis of tropinone. *Journal of Chemical Research*: 580-583.

# ANNEXES

## ANNEXE 1 : Synthèse des composés marqués

### A.1.1 Synthèse de la [3-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride et la [3-<sup>2</sup>H]norpseudotropine hydrochloride (Fournial, A ; non publié)

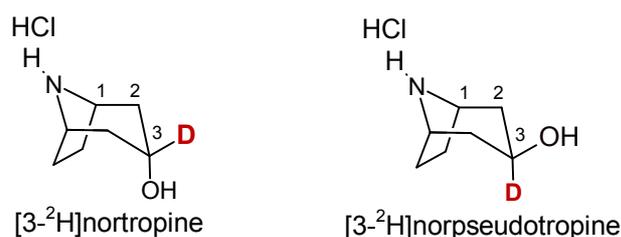


Figure A.1.1 Composés deutériés en position 3 : [3-<sup>2</sup>H]nortropine et [3-<sup>2</sup>H]norpseudotropine

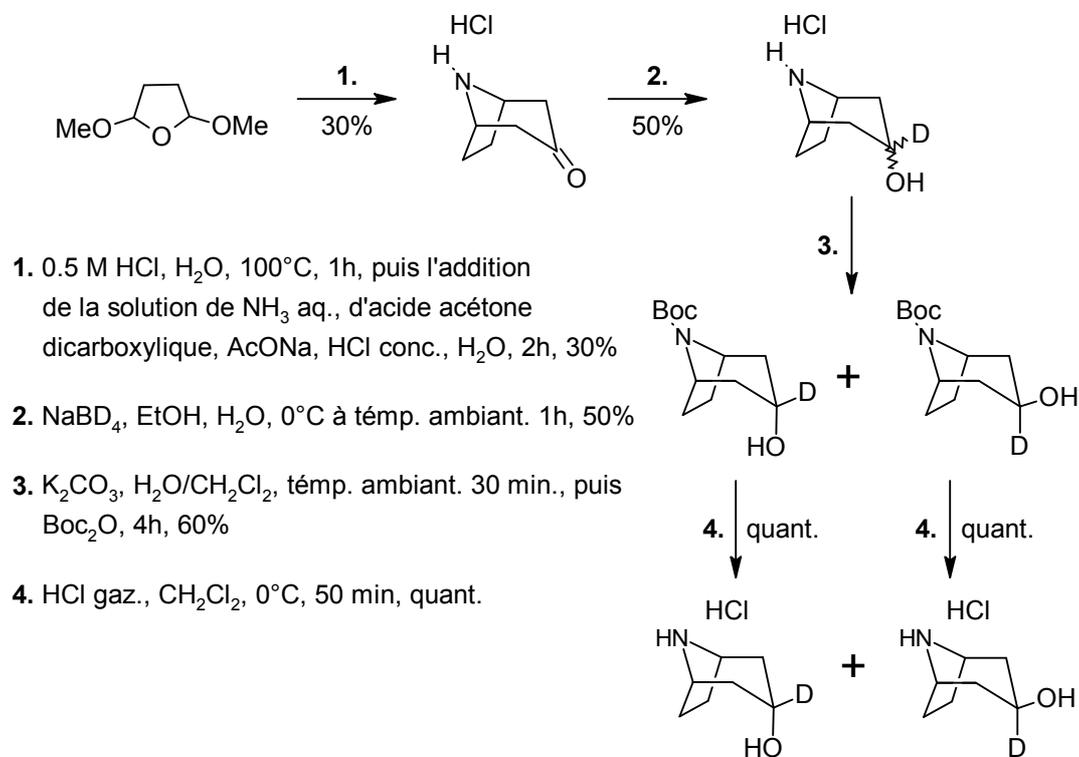


Figure A.1.2 Schéma de synthèse de la [3-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride et de la [3-<sup>2</sup>H]norpseudotropine hydrochloride

La mode opératoire exploite la condensation classique de Robinson [94] [95] réduction et une dérivation en N-Boc afin séparer les épimères.

### Synthèse de la nortropinone hydrochloride

Au 2,5-diméthoxytetrahydrofurane (7.0 g, 52.9 mmol) est ajouté à une solution aqueuse d'HCl 0.5 M (56 mL) et le mélange est porté à 100°C pendant 1 h puis refroidi à 10°C. Celui-ci est ajouté à une solution contenant d'eau (50 mL), de NaOAc (24.3 g, 296.6 mmol), de solution aqueuse 25% de NH<sub>3</sub> (7.0 mL, 84.7 mmol), de HCl (6.9 mL, 82.8 mmol) et d'acide acétone dicarboxylique (13.9 g, 95.3 mmol). Le tout est chauffé à 30°C pendant 2 h et ensuite refroidi à température ambiante. Le pH est ajusté à 10 (NaOH 2 M), NaCl (8.0 g) est ajouté et la solution est extraite par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 70 mL). Les phases organiques collectes sont acidifiées (HCl 2 M) dans éther diéthylique et évaporées à l'évaporateur rotatif.

Le produit est obtenu sous forme de poudre rose (2.6 g, rendement 30%).

- **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$ : 1.81-1.94 (m, 2H), 2.06-2.20 (m, 2H), 2.42 (d,  $J=17.0$  Hz, 2H), 2.86 (dd,  $J=4.2$  Hz,  $J=17.3$  Hz, 2H), 4.19-4.27 (m, 2H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz)  $\delta$ : 27.9, 46.8, 56.2, 203.8.

### Synthèse de la [3-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride (dia5) et la [3-<sup>2</sup>H]norpseudotropine hydrochloride (dia6)

La nortropinone hydrochloride (1.0 g, 6.2 mmol) est dissoute dans un mélange d'éthanol (6.5 mL) et d'eau (13.0 mL). Le mélange est refroidi (0°C) et du sodium borodeuteride (519 mg, 12.4 mmol) dissous dans l'eau (6.5 mL) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 h puis acidifié (pH=5.5, HCl 6M) et concentré sous pression réduit. Le produit brut (2.3 g, 50%) est utilisé dans l'étape suivante.

- **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$ : 1.61 (d,  $J=13.1$  Hz, 2H), 1.83 (dd,  $J=6.5$  Hz,  $J=14.9$  Hz, 2H), 1.93 (dd,  $J=8.8$  Hz,  $J=17.1$  Hz, 6H), 2.07 (dd,  $J=2.8$  Hz,  $J=15.5$  Hz, 2H<sub>dia5</sub>), 2.28-2.37 (m, 2H<sub>dia5</sub>), 3.80-3.88 (m 2H<sub>dia5</sub>), 3.88-3.99 (m, 2H<sub>dia6</sub>).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz)  $\delta$ : 27.1 (dia5 et dia6), 36.8 (dia5), 38.4 (dia6), 55.5 (dia5), 56.3 (dia6), 61.6 (t,  $J=21.5$  Hz dia6), 62.7 (t,  $J=22.3$  Hz dia5).

### Synthèse de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[3-<sup>2</sup>H]nortropine et de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[3-<sup>2</sup>H]norpseudotropine

À une solution de [3-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride (dia5) et de la [3-<sup>2</sup>H]norpsudotropine hydrochloride brut (1.0 g, 6.2 mmol) dans un mélange eau/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1 ; 31 mL) est ajouté du carbonate de potassium (4.2 g, 31.0 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pour 30 min puis du di-*tert*-butyl dicarbonate (8 g, 37.2 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) est ajouté. Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 h, lavé par une solution de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jusqu'à ce que le pH=7, puis la phase aqueuse est extraite par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL). Les phases organiques rassemblées sont ensuite séchées (MgSO<sub>4</sub>), filtrées et évaporées. Le produit brut (8.1 g) est purifié sur colonne de gel de silice (40-63 µm, éluant : de 50/50 à 10/90 d'éther de pétrole/éther diéthylique). L'évaporation des fractions adéquates a rendu de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[3-<sup>2</sup>H]nortropine (215 mg) et de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[3-<sup>2</sup>H]norpsudotropine (493 mg).

#### **l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[3-<sup>2</sup>H]nortropine**

- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  : 1.44 (s, 9H), 1.68 (d,  $J$ =14.6 Hz, 2H), 1.86-2.22 (m, 6H), 4.16 (d,  $J$ =21.4 Hz, 2H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 28.0 (d,  $J$ =56.5), 28.4, 38.1 (d,  $J$ =28.3), 52.5 (d,  $J$ =62.4), 64.9, 79.0, 153.3.

#### **l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[3-<sup>2</sup>H]norpsudotropine**

- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  : 1.45 (s, 9H), 1.54-1.66 (m, 4H), 1.92 (d,  $J$ =11.0 Hz, 4H), 4.21 (d,  $J$ =23.5 Hz, 2H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  : 27.9 (d,  $J$ =42.4 Hz), 28.4, 40.3 (d,  $J$ =40.9 Hz), 52.8 (d,  $J$ =5.9 Hz), 63.6 (t,  $J$ =21.6 Hz), 79.3, 153.2.

#### **Synthèse de la [3-<sup>2</sup>H]norpsudotropine hydrochloride**

De l'acide chlorhydrique est bullé dans une solution de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[3-<sup>2</sup>H]norpsudotropine (405 mg, 1.7 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) à température de 0°C. L'avancement de la réaction est suivi par le CCM (10/90 éther de pétrole/éther diéthylique). Quand la réaction est finie, le mélange est concentré sous pression réduit. La [3-<sup>2</sup>H]norpsudotropine hydrochloride (282 mg, quantitative) pure est obtenu.

- **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$  : 1.73 (d,  $J$ =13.8 Hz, 2H), 1.96-2.03 (m, 2H), 2.05-2.14 (m, 4H), 4.04-4.09 (m, 2H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz)  $\delta$  : 27.1, 38.6, 56.5, 61.6 (t,  $J$ =21.7 Hz).

## Synthèse de la [3-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride

De l'acide chlorhydrique est bullé dans une solution de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[3-<sup>2</sup>H]nortropine (200 mg, 0.8 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) à température de 0°C. L'avancement de la réaction est suivi par le CCM (10/90 éther de pétrole/éther diéthylique). Quand la réaction est finie, le mélange est concentré sous la pression réduite. La [3-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride (124 mg, 85%) pure est obtenu.

- <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ: 1.98 (d, *J*=15.5 Hz, 2H), 2.03-2.11 (m, 2H), 2.19 (dd, *J*=3.2 Hz, *J*=15.6 Hz, 2H), 2.47-2.55 (m, 2H), 3.97-4.03 (m, 2H).
- <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ: 27.1, 37.0, 55.7, 62.7 (t, *J*=22.7 Hz).

### A.1.2 Synthèse de la [3-<sup>2</sup>H]tropine et la [3-<sup>2</sup>H]pseudotropine

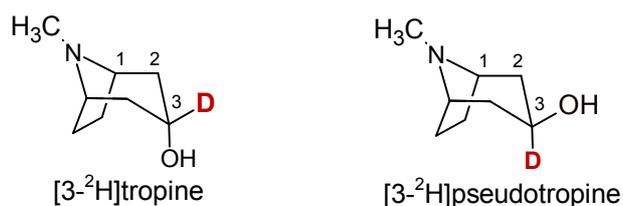


Figure A.1.3. Composés deutériés en position 3 : [3-<sup>2</sup>H]tropine et [3-<sup>2</sup>H]pseudotropine

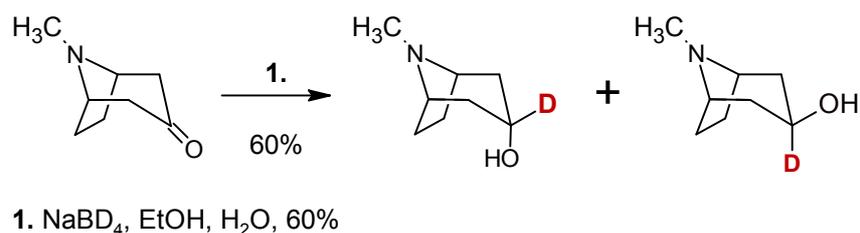


Figure A.1.4. Schéma de synthèse de la [3-<sup>2</sup>H]tropine et de la [3-<sup>2</sup>H]pseudotropine

Le mode opératoire est décrit dans la littérature [31]. Les composés ont été séparés par cristallisation.

### A.1.3 Synthèse de la [1-<sup>2</sup>H]nor(pseudo)tropine hydrochloride et de la [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nor(pseudo)tropine hydrochloride

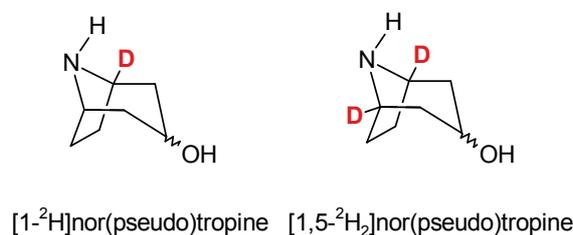


Figure A.1.5. Composés deutérié en position 1 et/ou 5

#### A.1.3.1 Synthèse de la [1-<sup>2</sup>H]nor(pseudo)tropine hydrochloride

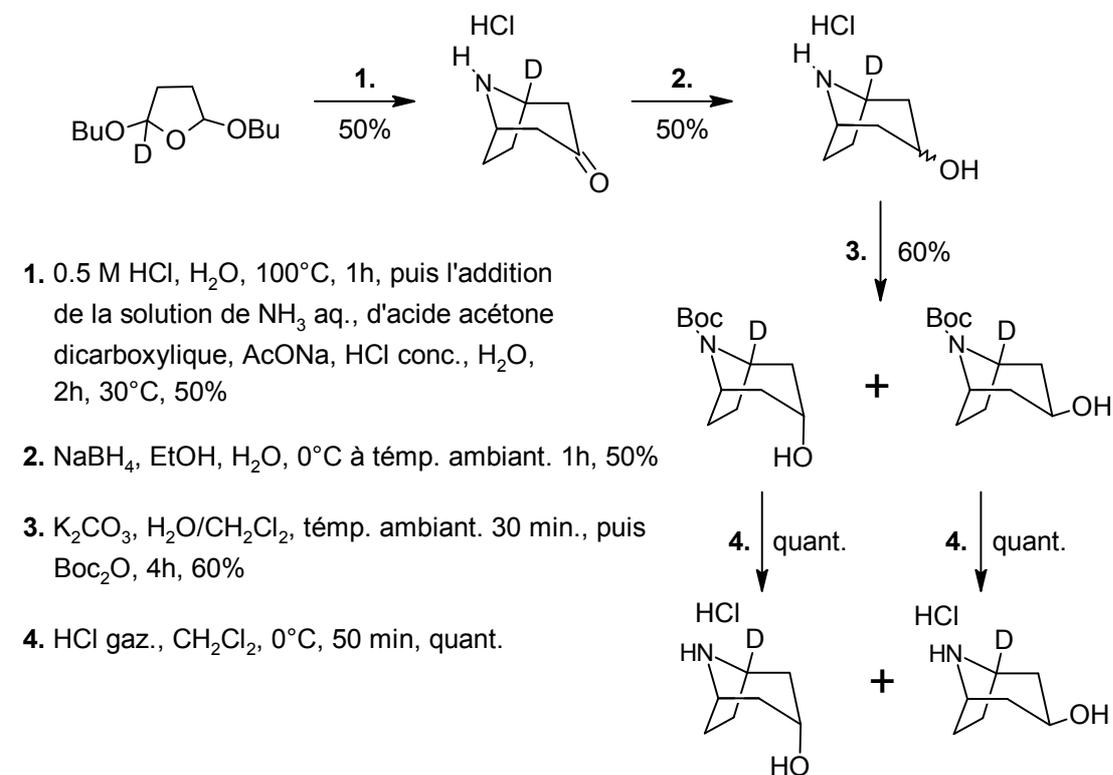


Figure A.1.6. Schéma de synthèse de la [1-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride et de la [1-<sup>2</sup>H]norpseudo-tropine hydrochloride

La mode opératoire exploite la condensation classique de Robinson [94] [95], réduction et une dérivation en N-Boc afin séparer les épimères.

#### Synthèse de la [1-<sup>2</sup>H]nortropinone hydrochloride

Le [1-<sup>2</sup>H]2,5-diméthoxytetrahydrofurane brut (4.7 g, 21.6 mmol) est ajouté à une solution aqueuse de HCl 0.5 M (43 mL). Le mélange est porté à 100°C pendant 2 h et ensuite refroidi à 10°C. Celui-ci est ajouté à une solution d'eau (23.0 mL), de NaOAc (9.9 g, 120.6 mmol), de solution aqueuse 25% de NH<sub>3</sub> (3.0 mL, 43.2 mmol), d'HCl (2.8 mL 18 M, 33.6 mmol) et d'acide acétone dicarboxylique (5.9 g, 40.7 mmol). Le mélange est chauffé à 30°C pendant 2 h, refroidi à température ambiante et le pH ajusté à 10 (NaOH 2 M). Le NaCl (5 g) est ensuite ajouté et la solution est extraite par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). Les phases organiques collectées sont acidifiées (HCl 2 M) dans éther diéthylique et évaporées à l'évaporateur rotatif.

Le produit [1-<sup>2</sup>H]nortropinone hydrochloride est obtenu sous forme de poudre rose (1.7 g, rendement 50%).

- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  : 1.92 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 2.34-2.45 (m, 2H), 2.51 (d,  $J=16.6$  Hz, 2H), 3.31(d,  $J=16.6$  Hz, 2H), 4.41 (s, 1H), 10.41 (d,  $J=77.1$ , 2H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  : 27.1, 46.1, 54.7, 202.1.

### **Synthèse de la [1-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride (dia3) et [1-<sup>2</sup>H]norpseudotropine hydrochloride (dia4)**

La [1-<sup>2</sup>H]nortropinone hydrochloride (470 mg, 2.8 mmol) est dissoute dans un mélange d'éthanol (3.0 mL) et d'eau (6.0 mL). Le mélange est refroidi (0°C) et le sodium borodeuteride (229 mg, 6.0 mmol) dissous dans l'eau (3.0 mL) est ajouté goutte a goutte. Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 h, puis acidifié (pH=5.5, HCl 6 M) et concentré sous pression réduit. Le produit brut (237 mg, 50%) est utilisé dans l'étape suivante.

- **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$  : 1.64 (dd,  $J=10.9$  Hz et  $J=13.8$  Hz, 2H), 1.08-2.06 (m, 6H), 2.06-2.16 (m, 2H), 2.34-2.41 (m, 2H<sub>dia3</sub>), 3.85-4.04 (m, 2H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz)  $\delta$  : 27.0 (dia3 et dia4), 37.0 (dia3), 38.6 (dia4), 55.6 (dia3), 56.4 (dia4), 62.0 (dia4), 63.2 (dia3).

### **Synthèse de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1-<sup>2</sup>H]nortropine et de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1-<sup>2</sup>H]norpseudotropine**

À une solution de [1-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride (dia3) et de la [1-<sup>2</sup>H]norpseudotropine hydrochloride (dia4) brut (473 mg, 2.8 mmol) dans un mélange eau/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1 ; 14 mL) est ajouté du carbonate de potassium (2.0 g, 14.4 mmol). Le

mélange est agité à température ambiante (30 min), du di-*tert*-butyl dicarbonate (3.7 g, 17.3 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) est ajouté. Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 h, lavé par une solution de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jusqu'à ce que le pH=7, puis la phase aqueuse est extraite par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 mL). La phase organique est ensuite séchée (MgSO<sub>4</sub>), filtrée et évaporée. Le produit brut (6.0 g) est purifié sur colonne de gel de silice (40-63 μm, éluant : de 50/50 à 10/90 d'éther de pétrole/éther diéthylique). L'évaporation des fractions adéquates a rendu de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1-<sup>2</sup>H]nortropine (84 mg) et de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1-<sup>2</sup>H]norpsudotropine (286 mg).

#### **l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1-<sup>2</sup>H]nortropine**

- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 1.41(s, 9H), 1.61-1.72 (m, 2H), 1.78-2.30 (m, 7H), 4.00-4.20 (m, 2H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ: 8.0 (d, *J*=56.5 Hz), 28.4, 38.1 (d, *J*=28.3 Hz), 52.5 (d, *J*=62.4 Hz), 64.9, 79.0, 153.3.

#### **l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1-<sup>2</sup>H]norpsudotropine**

- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 1.44 (s, 9H), 1.52-1.63 (m, 3H), 1.70-1.99 (m, 5H), 3.99-4.4 (m, 1H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ: 27.9 (d, *J*=56.6 Hz), 28.4, 40.3 (d, *J*=39.7 Hz), 52.8 (d, *J*=52.8 Hz), 63.9, 79.3, 153.2.

#### **Synthèse de la [1-<sup>2</sup>H]norpsudotropine hydrochloride**

De l'acide chlorhydrique est bullé dans une solution de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1-<sup>2</sup>H]norpsudotropine (275 mg, 1.2 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) à température 0°C. L'avancement de la réaction est suivi par le CCM (10/90 éther de pétrole/éther diéthylique). Quand la réaction est finie, le mélange est concentré sous pression réduit. La [1-<sup>2</sup>H]norpsudotropine hydrochloride (173 mg, 90%) pure est obtenu.

- **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ: 1.68 (t, *J*=12.3 Hz, 2H), 1.82-1.91 (m, 6H), 3.85-4.08 (m, 2H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ: 27.0, 38.6, 56.0 (*J*=23.5 Hz), 56.4, 62.0.

#### **Synthèse de la [1-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride**

De l'acide chlorhydrique est bullé dans une solution de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1-<sup>2</sup>H]nortropine (84 mg, 0.3 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) à température 0°C.

L'avancement de la réaction est suivi par le CCM (10/90 éther de pétrole/éther diéthylique). Quand la réaction est finie, le mélange est concentré sous pression réduite. La [1-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride (62 mg, quant.) pure est obtenu.

- <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ : 1.82-2.01 (m, 4H), 2.10 (dd, J=4.2 Hz et J=15.5 Hz, 2H), 2.34-2.44 (m, 2H), 3.85-4.00 (m, 2H).
- <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) δ : 27.0, 37.0, 55.3 (J=23.0 Hz), 55.7, 63.2.

### A.1.3.2 Synthèse de la [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nor(pseudo)tropine hydrochloride

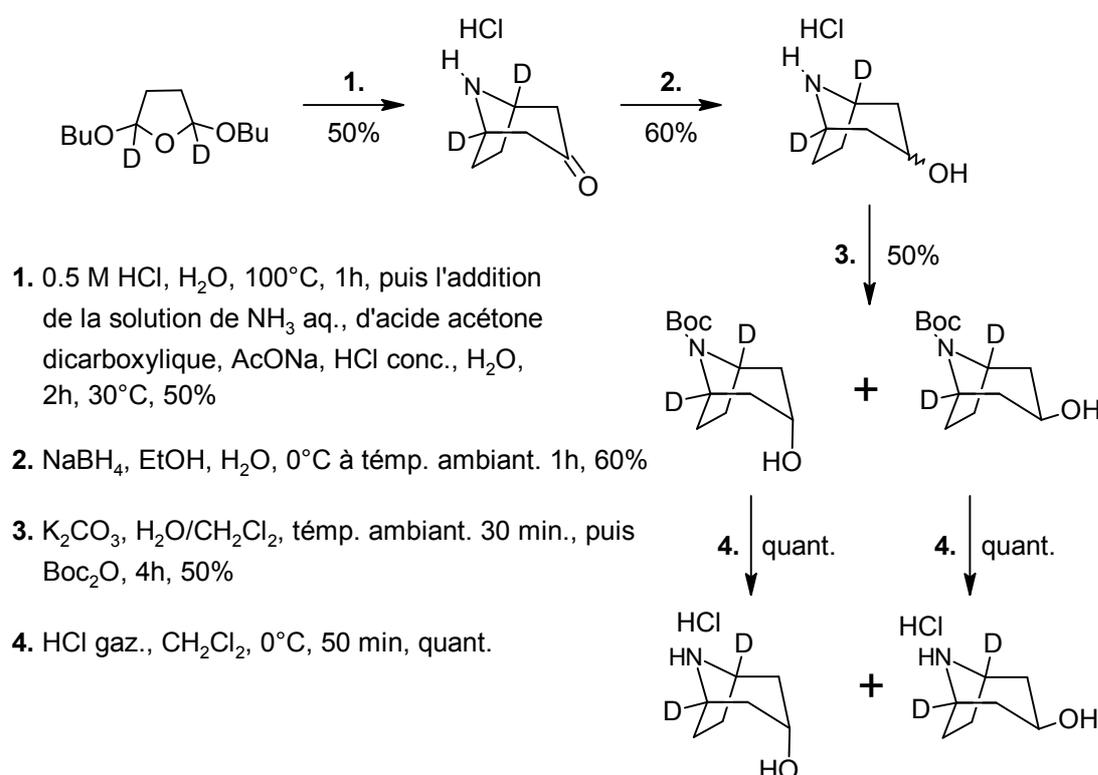


Figure A.1.7. Schéma de synthèse de la [1,5-<sup>2</sup>H]nortropine hydrochloride et de la [1,5-<sup>2</sup>H]norpseudo-tropine hydrochloride

### Synthèse de la [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nortropinone hydrochloride

Le [2,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]2,5-diméthoxytetrahydrofurane brut (5.5 g, 25.1 mmol) est ajouté à une solution aqueuse de HCl 0.5 M (50 mL). Le mélange est porté à 100°C pendant 2 h et il est ensuite refroidi à 10°C. Celui-ci est ajouté à une solution d'eau (17.8 mL), de NaOAc (11.6 g, 141.0 mmol), de solution aqueuse 25% de NH<sub>3</sub> (2.6 mL, 40.3 mmol), de HCl (2.6 mL 18 M, 31.2 mmol) et d'acide acétone dicarboxylique (5.8 g, 40.3 mmol). Le mélange est chauffé à 30°C pendant 2 h, refroidi à température ambiante, puis le pH est ajusté à 10 (NaOH 2 M).

Le NaCl (5 g) est ensuite ajouté et la solution est extraite par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). Les phases organiques collectées sont acidifiées (HCl 2 M) dans éther diéthylique et évaporées à l'évaporateur rotatif.

Le produit, pure [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nortropinone hydrochloride est obtenu sous forme de poudre rose (2.0 g, rendement 50%).

- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz,)  $\delta$ : 1.87 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 2.42 (dd,  $J=12.4$  Hz,  $J=24.2$  Hz, 4H), 3.29 (d,  $J=16.6$  Hz, 2H), 10.40 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz,)  $\delta$ : 27.0, 46.1, 54.4 (t,  $J_{C-H}=22.3$  Hz), 202.2.

### **Synthèse de [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nortropine hydrochloride (dia1) et [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]norpseudotropine hydrochloride (dia2)**

La [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nortropinone hydrochloride (1.0 g, 6.1 mmol) est dissoute dans le mélange d'éthanol (6.5 mL) et d'eau (13 mL). Le mélange est refroidi (0°C) et le sodium borohydride (415 mg, 109 mmol) dissous dans l'eau (6.5 mL) est ajouté gouté à gouté. Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 h, acidifié (pH=5.5, HCl 6M), puis concentré sous pression réduit. Le produit brut (600 mg, 60%) est utilisé dans l'étape suivante.

- **<sup>1</sup>H NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz)  $\delta$ : 1.67 (dd,  $J=11.4$  Hz,  $J=14.0$  Hz, 2H), 1.91-2.13 (m, 7H), 2.31 (d,  $J=11.4$  Hz, 2H<sub>dia1</sub>), 4.00-4.16 (m, 1H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (D<sub>2</sub>O, 75 MHz)  $\delta$ : 25.5, 36.6, 61.2.

### **Synthèse de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1,5-<sup>2</sup>H]nortropine et de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1,5-<sup>2</sup>H]norpseudotropine**

À une solution de [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nortropine hydrochloride (dia1) brut et de la [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]norpseudotropine (dia2) brut (1.0 g, 6.0 mmol) dans un mélange eau/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1 ; 30 mL) est ajouté du carbonate de potassium (4.1 g, 30.3 mmol). Le mélange est agité à température ambiante (30 min) et le di-*tert*-butyl dicarbonate (7.9 g, 36.3 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) est ajouté. Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 h, lavé par une solution de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jusqu'à ce que le pH=7, puis la phase aqueuse est extraite par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL). La phase organique est ensuite séchée (MgSO<sub>4</sub>), filtrée et évaporée. Le produit brut (10.0 g) est purifié sur colonne de gel de silice (40-63  $\mu$ m, éluant : de 50/50 à 10/90 d'éther de pétrole/éther diéthylique). L'évaporation des fractions adéquates a rendu de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1,5-<sup>2</sup>H]nortropine (120 mg) et de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1,5-<sup>2</sup>H]norpseudotropine (360 mg).

### **l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1,5-<sup>2</sup>H]nortropine**

- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 1.42 (s, 9H), 1.67 (d,  $J=14.5$  Hz, 2H), 1.85-2.15 (m, 7H), 4.10 (t,  $J=4.9$  Hz, 1H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ : 28.0 (d,  $J=56.5$  Hz), 28.4, 38.1 (d,  $J=35.0$  Hz), 52.2, 65.0, 79.0, 153.3.

### **l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]norpseudotropine**

- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 1.44 (s, 9H), 1.53-1.65 (m, 4H), 1.77-1.97 (m, 4H), 4.01-4.14 (m, 1H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ : 27.9 (d,  $J=56.5$  Hz), 28.4, 40.3 (d,  $J=39.7$  Hz), 52.6, 63.9, 79.3, 153.2.

### **Synthèse de la [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]norpseudotropine hydrochloride**

De l'acide chlorhydrique est bullé dans une solution de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1,5<sup>2</sup>H]norpseudotropine (326 mg, 1.42 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) à température 0°C. L'avancement de la réaction est suivi par le CCM (10/90 éther de pétrole/éther diéthylique). Quand la réaction est finie, le mélange est concentré sous pression réduit. La [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]norpseudotropine hydrochloride (221 mg, 95%) pure est obtenu.

- **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$ : 1.61 (dd,  $J=10.9$  Hz et  $J=14.0$  Hz, 2H), 1.82-1.91 (m, 2H), 1.93-2.03 (m, 4H), 3.89-3.49 (m, 1H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz)  $\delta$ : 27.0, 38.6, 56.1, 62.0.

### **Synthèse de la [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nortropine hydrochloride**

De l'acide chlorhydrique est bullé dans une solution de l'ester *tert*-butylique de l'acide *N*-carboxylique-[1,5<sup>2</sup>H]nortropine (106 mg, 0.4 mmol) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) à température 0°C. L'avancement de la réaction est suivi par le CCM (10/90 éther de pétrole/éther diéthylique). Quand la réaction est finie, le mélange est concentré sous pression réduit. La [1,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nortropine hydrochloride (70 mg, quant.) pure est obtenu.

- **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz)  $\delta$ : 1.83-2.01 (m, 2H), 2.09 (dd,  $J=4.4$  Hz et  $J=15.5$  Hz, 2H), 2.35-2.45 (m, 2H), 3.95 (t,  $J=4.5$  Hz, 1H).
- **<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz)  $\delta$ : 6.9, 37.0, 55.3, 63.1.

## Annexe 2 : Calculs pour modèle de métabolismes du mélange des substrats (nortropine + norpseudotropine)

Modélisation de la teneur isotopique  $\delta^{15}\text{N}$  de la norpseudotropine en fonction du temps 0 à 5 heures

$$\delta(^{15}\text{N})_{NPSTRI} = \delta(^{15}\text{N})_{NPSTRI(t)}^{NPSTRI} + \delta(^{15}\text{N})_{NPSTRI(t)}^{NTRI}$$

$$\delta(^{15}\text{N})_{NPSTRI} = \left( \frac{[NPSTRI]_{t0} - [NPSTRI]_{cons}}{[NPSTRI]_f} \cdot \left( \frac{\left( \frac{\delta_{0/NPSTRI}}{1000} + 1 \right) \cdot e^{\left( \frac{1-F}{EIC} \right)}}{1-F} \right) \cdot 1000 \right) +$$

$$\left( \frac{\left( 18\%_{inc} \cdot ([NTRI]_{t0} - [NTRI]_f) \right)}{[NPSTRI]_f} \cdot \left( \frac{\left( \frac{\delta_{0/NTRI}}{1000} + 1 \right) \cdot e^{\left( \frac{1-F}{EI} \right)}}{1-F} \right) \cdot 1000 \right)$$

**Tableau A2.1. Estimation de valeur d'effet isotopique au niveau d'équilibre nortropine↔norpseudothopine**

	$NTRI_{t_0}$	$NTRI_t$	F	1-F	$\ln(1-F)$	$\delta_{NPSTRI}$	$R_{NPSTRI}$	$\delta_{ONTRI}$	$R_{ONTRI}$	$R_{NRSTRI}/R_{ONTRI}$	$F^* R_{NRSTRI}/R_{ONTRI}$	$1-(F^* R_{NRSTRI}/R_{ONTRI})$	$\ln(1-(F^* R_{NRSTRI}/R_{ONTRI}))$	EI
	(mM)	(mM)				(‰)		(‰)						
min	6.93	4.80	0.31	0.69	-0.367	-2.1	0.9978	-7.7	0.9923	1.0056	0.3091	0.6909	-0.3697	0.9933
max	6.93	4.80	0.31	0.69	-0.367	-2.1	0.9978	-12.0	0.9880	1.0099	0.3104	0.6896	-0.3717	0.9880
moy	6.93	4.80	0.31	0.69	-0.367	-2.1	0.9978	-9.5	0.9905	1.0074	0.3096	0.6904	-0.3705	0.9911
min	6.93	3.78	0.45	0.55	-0.606	-3.8	0.9963	-7.7	0.9923	1.0039	0.4564	0.5436	-0.6095	0.9945
max	6.93	3.78	0.45	0.55	-0.606	-3.8	0.9963	-12.0	0.9880	1.0083	0.4583	0.5417	-0.6131	0.9886
moy	6.93	3.78	0.45	0.55	-0.606	-3.8	0.9963	-9.5	0.9905	1.0058	0.4572	0.5428	-0.6109	0.9921
min	6.93	2.76	0.60	0.40	-0.921	-7.6	0.9924	-7.7	0.9923	1.0001	0.6018	0.3982	-0.92078	0.9998
max	6.93	2.76	0.60	0.40	-0.921	-7.6	0.9924	-12.0	0.9880	1.0045	0.6044	0.3956	-0.9274	0.9927
moy	6.93	2.76	0.60	0.40	-0.921	-7.6	0.9924	-9.5	0.9905	1.0019	0.6029	0.3971	-0.9235	0.9969
min	6.93	2.36	0.66	0.34	-1.077	-8.5	0.9915	-7.7	0.9923	0.9992	0.6589	0.3411	-1.0756	1.0015
max	6.93	2.36	0.66	0.34	-1.077	-8.5	0.9915	-12.0	0.9880	1.0035	0.6618	0.3382	-1.0841	0.9937
moy	6.93	2.36	0.66	0.34	-1.077	-8.5	0.9915	-9.5	0.9905	0.0011	0.6602	0.3398	-1.0794	0.9979
													<b>moyenne</b>	<b>0.9942</b>

**Tableau A2.2. Calculs de déviation isotopique de la norpseudotropine provenant de la nortropine (0 à 5h)**

Temps (h)	$\delta_{NTRI}$	$R_{NTRI}$	EI	$NTRI_{t0}$ (mM)	$NTRI_t$ (mM)	F	$\ln(1-F)$	$\ln(1-F)/EI$	$\exp(\ln(1-F)/EI)$	$1-\exp(\ln(1-F)/EI)$	$(1-\exp(\ln(1-F)/EI))/F$	$R_{NPSTRI}$ recalculé	$\delta(^{15}N)_{NTRI(t0 \rightarrow t)}^{EI}$
	mesuré moyenne (‰)	mesuré moyenne											
0	25.6	1.0256	0.9942	1.73	1.73	0.0	0	0	1	0			25.6
2	24.6	1.0246	0.9942	1.73	1.18	0.3	-0.3826	-0.3848	0.6806	0.3194	1.0048	1.0295	29.50
4	22.7	1.0227	0.9942	1.73	0.63	0.6	-1.0102	-1.0161	0.3620	0.6379	1.0034	1.0262	26.16
5	21.5	1.0215	0.9942	1.73	0.31	0.8	-1.7193	-1.7294	0.1774	0.8226	1.0022	1.0236	23.69

**Tableau A2.3. Correction de l'effet isotopique cinétique sur la déviation isotopique de la norpseudotropine**

Temps (h)	$\delta(^{15}N)_{NPSTRI}^{EIC(t0 \rightarrow t)}$ (‰)	1-F	$\ln(1-F)$	$\ln(1-F)/EIC$	$\exp(\ln(1-F)/EIC)$
0	0.8				
2	0.5	0.9753	-0.0250	-0.0254	0.9749
4	-0.3	0.9187	-0.0848	-0.0897	0.9177
5	-0.7	0.8904	-0.1160	-0.1175	0.8891

Tableau A2.4. Calculs de déviation isotopique de la norpseudotropine 0 à 5h

Temps (h)	NTRI (mM)	NPSTRI (mM)	$(18\%(\text{NTRI}_{t_0}-\text{NTRI}_t))/\text{NPSTRI}_t$ (mM)	$\delta(^{15}\text{N})_{\text{NTRI}(t_0 \rightarrow t)}^{\text{EI}}$ (‰)	$\delta(^{15}\text{N})_{\text{NPSTRI}(t)}^{\text{NTRI}}$ (‰)	$(\text{NPSTRI}_t - (18\%(\text{NTRI}_{t_0}-\text{NTRI}_t)))/\text{NPSTRI}_t$ (mM)	$\delta(^{15}\text{N})_{\text{NPSTRI}}^{\text{EIC}(t_0 \rightarrow t)}$ (‰)	$\delta(^{15}\text{N})_{\text{NPSTRI}(t)}^{\text{NPSTRI}}$ (‰)	$\delta(^{15}\text{N})_{\text{NPSTRI}}$ (‰)
0	1.73	2.83	0	25.6	0	1	0.8	0.8	0.8
2	1.18	2.76	0.036	29.50	1.1	0.96	0.5	0.5	1.6
4	0.63	2.6	0.0769	26.16	2.0	0.92	-0.3	-0.3	1.7
5	0.31	2.52	0.103	23.69	2.5	0.90	-0.7	-0.7	1.8

**Modèle de la déviation isotopique de la norpseudotropine 6.5 à 8.5 heures**

$$\delta(^{15}N)_{NPSTRI} = \delta(^{15}N)_{NPSTRI(t)}^{NPSTRI}$$

$$\delta(^{15}N)_{NPSTRI} = \left( \frac{[NPSTRI]_{t_0} - [NPSTRI]_{cons}}{[NPSTRI]_t} \cdot \left( \frac{\left( \frac{\delta_{0/NPSTRI}}{1000} + 1 \right) \cdot e^{\left( \frac{1-F}{EIC} \right)}}{1-F} \right) \right) \cdot 1000$$

**Tableau A2.5. Correction de l'effet isotopique cinétique sur la déviation isotopique de la norpseudotropine 6.5 à 8.5h**

Temps (h)	$\delta_{0NPSTRI}$ (‰)	$\delta(^{15}N)_{NPSTRI}^{EIC(t_0 \rightarrow t)}$ (‰)	1-F	ln(1-F)	ln(1-F)/EIC	exp(ln(1F)/EIC)	$(\delta_{0NPSTRI}/1000)+1$
6.5	0.8	-2.0	0.81	-0.2161	-0.2189	0.8034	1.0008
7	0.8	-4.0	0.70	-0.3622	-0.3670	0.6928	1.0008
7.5	0.8	-5.7	0.61	-0.4922	-0.4986	0.6074	1.0008
8	0.8	-9.8	0.45	-0.8092	-0.8198	0.4405	1.0008
8.5	0.8	-15.2	0.29	-1.2266	-1.2428	0.2886	1.0008

**Tableau A2.6. Calculs de la déviation isotopique de la norpseudotropine lors 6.5 à 8.5 h**

Temps (h)	NPSTRI (mM)	NPSTRI cons (mM)	$(NPSTRI_{t_0} - NPSTRI_{cons})/NPSTRI_t$	$\delta(^{15}N)_{NPSTRI}^{EIC(t_0 \rightarrow t)}$ (‰)	$\delta(^{15}N)_{NPSTRI(t)}^{NPSTRI}$ (‰)
0	2.83			0.8	
6.5	1.97	0.86	1	-2.0	-2.0
7	1.73	1.1	1	-4.0	-4.0
7.5	1.26	1.57	1	-5.7	-5.7
8	0.83	2	1	-9.8	-9.8
8.5	0.4	2.43	1	-15.2	-15.2

## Liste des figures

Figure 1. Les principaux alcaloïdes tropaniques exploités par l'homme .....	3
Figure 2. Structure cyclique des alcaloïdes tropaniques .....	3
Figure 3. Voies de biosynthèse du <i>N</i> -méthyl- $\Delta'$ -pyrrolinium.....	6
Figure 4. Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques .....	7
Figure 5. Etape de régulation par les tropinones réductases I et II.....	8
Figure 6. Le métabolisme de l'atropine chez bactéries <i>Pseudomonas</i> AT3 .....	14
Figure 7. Séquence de ruptures des liaisons C–N pendant le métabolisme bactérien .....	15
Figure 8. Dégradation de la tropine et de la pseudotropine par les bactéries.....	17
Figure 9. Influence de la différence d'énergie de point zéro sur la réactivité des liaisons C– <sup>1</sup> H.....	20
Figure 10. Valeur de l'effet isotopique et son interprétation .....	21
Figure 11. Symétrie de l'état de transition .....	22
Figure 12. Résonance phényle $\leftrightarrow$ quinone avec changement d'ordre de liaison de l'azote .....	23
Figure 13. Différence d'états de transition pour une réaction non catalysée, par catalyse classique et par catalyse enzymatique.....	25
Figure 14. Vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.....	25
Figure 15. Représentation de Lineweaver-Burk du changement des paramètres cinétiques d'une réaction enzymatique dû à la substitution isotopique .....	27
Figure 16. Schéma du spectromètre de masse de rapport isotopique couplé avec l'analyseur élémentaire.....	31
Figure 17. Schéma du spectromètre de masse de rapport isotopique couplé avec la chromatographie gazeuse et l'interface de combustion.....	32
Figure 18. Structures des dérivés carbamates obtenus après réaction avec le chloroformiate d'éthyle.....	42
Figure 19. Etude de la linéarité pour la quantification par GC des dérivés EC des alcaloïdes avec le BHT comme étalon interne .....	45
Figure 20. Taux de recouvrement des alcaloïdes en fonction de la concentration initiale.....	46
Figure 21. Taux de recouvrement des alcaloïdes en fonction de la concentration initiale : vérification des interactions entre composés .....	47
Figure 22. Séparation en GC-irm-MS des pics de nortropinone-EC, nortropine-EC et la norpseudotropine-EC.....	53
Figure 23. Variation en teneur isotopique en fonction de la quantité d'alcaloïde injecté .....	54
Figure 24. Variation en teneur isotopique en fonction d'amplitude du signal .....	54
Figure 25. Variation en teneur isotopique en fonction du volume injecté (échantillon 1 mg/mL) .....	55
Figure 26. Variation en teneur isotopique en fonction de l'amplitude du signal : test du volume injecté (échantillon 1 mg/mL) .....	55
Figure 27. Variation en teneur isotopique en fonction du volume injecté.....	56
Figure 28. Variation en teneur isotopique en fonction de l'amplitude du signal : test du volume injecté (échantillon 2 mg/mL) .....	56
Figure 29. Vérification des interactions entre composés : variations de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) des alcaloïdes dérivés en fonction de la concentration .....	57

Figure 30. Vérification des interactions entre composés : variation de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) des alcaloïdes dérivés en fonction de la concentration .....	58
Figure 31. Influence du milieu de culture sur les courbes de croissance des bactéries <i>Pseudomonas</i> AT3 .....	61
Figure 32. Courbe de croissance des bactéries <i>Pseudomonas</i> AT3 / substrat : nortropine .....	62
Figure 33. Profil métabolique au cours de la croissance des bactéries <i>Pseudomonas</i> AT3 / substrat : nortropine.....	62
Figure 34. Courbe de croissance des bactéries <i>Pseudomonas</i> AT3 / substrat : norpseudotropine.....	64
Figure 35. Profil métabolique au cours de la croissance des bactéries <i>Pseudomonas</i> AT3 / substrat : norpseudotropine .....	65
Figure 36. Courbe de croissance des bactéries <i>Pseudomonas</i> AT3 / co-substrats : nortropine + norpseudotropine .....	66
Figure 37. Profil métabolique au cours de la croissance / co-substrats : nortropine + norpseudotropine.....	67
Figure 38. Structures des inhibiteurs de la tropinone réductase I.....	70
Figure 39. Inhibition de TR I par la TBON, le $\alpha$ -TBOL et le $\beta$ -TBOL chez <i>Datura stramonium</i> .....	70
Figure 40. Croissance des cultures de <i>Pseudomonas</i> AT3 sur nortropine en présence de TBON.....	71
Figure 41. Mesure de l'effet toxique de la TBON sur les cultures de <i>Pseudomonas</i> AT3 sur nortropine.....	71
Figure 42. Limites de toxicité de la TBON sur les bactéries <i>Pseudomonas</i> AT3.....	72
Figure 43. Croissance des cultures de <i>Pseudomonas</i> AT3 sur norpseudotropine en présence de TBON.....	72
Figure 44. Mesure de l'effet toxique + inhibiteur de la TBON sur les cultures de <i>Pseudomonas</i> AT3 sur norpseudotropine.....	73
Figure 45. Courbe de croissance de <i>Pseudomonas</i> AT3 en présence de $\beta$ -TBOL / substrat : nortropine .....	74
Figure 46. Courbe de croissance de <i>Pseudomonas</i> AT3 en présence de $\beta$ -TBOL / norpseudotropine.....	74
Figure 47. Métabolisme des alcaloïdes marqués en position 3 [ $3\text{-}^2\text{H}$ ] par <i>Pseudomonas</i> MS2 (NB la numérotation des structures des diones fait référence à la numérotation des substrats tropaniques).....	80
Figure 48. Profil métabolique au cours de la croissance / co-substrats : nortropine ( $\delta^{15}\text{N}$ (‰)=25.6) + norpseudotropine ( $\delta^{15}\text{N}$ (‰)=0.8).....	84
Figure 49. Profil isotopique en $^{15}\text{N}$ de la nortropine et la norpseudotropine au cours de la croissance / co-substrats : nortropine + norpseudotropine.....	84
Figure 50. Flux métaboliques pour le mélange de co-substrats : nortropine + norpseudotropine.....	86
Figure 51. Concentration attendue pour la norpseudotropine en fonction de la contribution de la nortropine .....	87
Figure 52. Taux de métabolisation des substrats pour une contribution de 0% de la nortropine à la norpseudotropine .....	88
Figure 53. Taux de métabolisation des substrats pour une contribution de 20% de la nortropine à la norpseudotropine .....	88
Figure 54. Modélisation de la teneur isotopique $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de la norpseudotropine en fonction du temps .....	91

Figure 55. Taux de métabolisation des substrats au cours des premières heures de culture .....	92
Figure 56. Structures des intermédiaires tétraédriques dans les sites actifs de la chymotrypsine et de la papaïne .....	97
Figure 57. Influence sur l'EIC d'un intermédiaire réactionnel de type base de Schiff [60] .....	99
Figure 58. Elucidation de mécanisme réactionnel de la PAL basée sur l'observation d'EI [64] .....	100
Figure 59. Résonance phényle ↔ quinone avec changement d'ordre de liaison de l'azote .....	101
Figure 60. Structures des intermédiaires proposées pour la réaction de l'orotidine 5'-monophosphate décarboxylase [68].....	102
Figure 61. Structures des intermédiaires proposées pour la réaction de la D-amino acid oxidase [69].....	103
Figure 62. Mécanisme général proposé pour la N-déméthylation d'une amine et formes actives intermédiaires .....	105
Figure 63. Réactions de coupure de liaisons C–N conduisant à la libération de l'atome d'azote lors du métabolisme de la nortropine .....	106
Figure 64. Evolution de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) en fonction du temps pendant la dégradation de la nortropine .....	107
Figure 65. Evolution de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) en fonction de la concentration du substrat pendant la dégradation de la nortropine.....	107
Figure 66. Evolution de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) en fonction du temps pendant la dégradation de la norpseudotropine .....	108
Figure 67. Evolution de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) en fonction de la concentration du substrat pendant la dégradation de la nortropine.....	109
Figure 68. Les alcaloïdes marqués en deutérium sur les positions 1 et 1,5 .....	113
Figure 69. Modèle général pour la rupture oxydative de la liaison N–C1 ou N–C5 de la nor(pseudo)tropine .....	115
Figure 70. Modèle schématique pour l' $\alpha$ -oxydation de la partie pyrrolidinyl de la nicotine par les microsomes hépatiques.....	117
Figure 71. Schéma de l'hydroxylation théorique de la nortropine par voie impliquant une intermédiaire de type iminium.....	118
Figure 72. Modèle général pour l'étape 1 de la réaction partielle de rupture oxydative de la liaison N–C1 de la nor(pseudo)tropine : participation de la CYP450 monooxygénase.....	118
Figure 73. Modèle général pour l'étape 2 de la réaction partielle de rupture oxydative de la liaison N–C1 de la nor(pseudo)tropine : participation d'une alcool déshydrogénase .....	119
Figure 74. Modèle général pour l'étape 2 de la réaction partielle de la rupture oxydative de la liaison N–C1 de la nor(pseudo)tropine : participation d'une molécule de l'eau.....	120
Figure 75. Modèle général pour la réaction partielle de la rupture oxydative de la liaison N–C1 de la nor(pseudo)tropine.....	123
Figure 76. Système de pré-culture et de culture pour l'étude de métabolisme des alcaloïdes par <i>Pseudomonas</i> AT3.....	144
Figure 77. Séquence de ruptures des liaisons C-N pendant le métabolisme bactérien .....	160

## Liste des tableaux

Tableau 1. Distribution naturelle des isotopes.....	18
Tableau 2. Comparaison entre l'EA-irm-MS et la GC-irm-MS .....	33
Tableau 3. Taux de recouvrement des alcaloïdes tropaniques : influence de la nature .....	39
Tableau 4. Taux de recouvrement des alcaloïdes tropaniques : influence de la nature du composé .....	39
Tableau 5. Taux de recouvrement des alcaloïdes tropaniques à partir des solutions aqueuses.....	40
Tableau 6. Taux de recouvrement des alcaloïdes tropaniques à partir des milieux ..	40
Tableau 7. Taux de recouvrement des alcaloïdes tropaniques en mélange à partir des milieux de cultures .....	41
Tableau 8. Rendements de dérivation des alcaloïdes nortropaniques par le chloroformiate d'éthyle.....	44
Tableau 9. Coefficients de réponse relatifs .....	45
Tableau 10. Validation dans la gamme de concentrations biologiques : taux de recouvrement (%) et déviation isotopique $\delta^{15}\text{N}$ (‰) des dérivés carbamates .....	48
Tableau 11. Vérification des interactions entre composés : taux de recouvrement (%) et déviation isotopique $\delta^{15}\text{N}$ (‰) des dérivés carbamates.....	49
Tableau 12. Vérification des effets de matrice : taux de recouvrement (%) et déviation isotopique $\delta^{15}\text{N}$ (‰) des dérivés carbamates .....	50
Tableau 13. Validation dans la gamme de déviations isotopiques en $^{15}\text{N}$ en abondance naturelle : taux de recouvrement (%) et déviation isotopique $\delta^{15}\text{N}$ (‰) des dérivés carbamates.....	51
Tableau 14. DO <sub>550</sub> et concentration des alcaloïdes dans le milieu bactérien / substrat : nortropine .....	63
Tableau 15. DO <sub>550</sub> et concentration des alcaloïdes dans le milieu bactérien / substrat : norpseudotropine .....	64
Tableau 16. DO <sub>550</sub> et concentration des alcaloïdes dans le milieu bactérien / substrat : nortropinone.....	66
Tableau 17. Croissance et concentration des alcaloïdes dans le milieu bactérien / co-substrats : nortropine + norpseudotropine.....	68
Tableau 18. Evolution du contenu intra et extra cellulaire en TBON et TBOL au cours de la croissance sur la nortropine .....	75
Tableau 19. Activité spécifique des extraits enzymatiques de <i>Pseudomonas</i> AT3....	77
Tableau 20. Composition du mélange obtenu après incubation d'extrait enzymatique avec la (nor)tropinone .....	77
Tableau 21. Taux d'incorporation du $^2\text{H}$ dans la 6-hydroxycyclohepta-1,4-dione par <i>Pseudomonas</i> MS2 .....	81
Tableau 22. Suivi métabolique et isotopique de la nortropine et la norpseudotropine au cours de la croissance.....	83
Tableau 23. Evolution du $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de la nortropine et de la norpseudotropine pendant la dégradation de la nortropine .....	108
Tableau 24. Evolution du $\delta^{15}\text{N}$ (‰) pendant la dégradation de la norpseudotropine	109
Tableau 25. Valeurs d'l'EIC- $^{15}\text{N}$ obtenues pour la dégradation de la nortropine et de la norpseudotropine.....	111

Tableau 26. Rapports d'intensité des pics isotopiques pour les alcaloïdes de série nortropanique enrichis en deutérium pendant leur dégradation par les cultures de <i>Pseudomonas</i> .....	114
Tableau 27. Quantités de réactifs utilisés pour la dérivation de groupe hydroxyle ..	127
Tableau 28. Temps de rétention des alcaloïdes dérivés par le chloroformiate d'éthyle et les anhydrides d'acides.....	129
Tableau 29. Temps de rétention des alcaloïdes dérivés par l'anhydride acétique...	130
Tableau 30. Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) des alcaloïdes fractionnés sur la colonne.....	134
Tableau 31. Méthode chromatographique utilisée pour la quantification des alcaloïdes après EPS.....	135
Tableau 32. Temps de rétention des alcaloïdes analysés sur colonne PTA-5, après EPS.....	135
Tableau 33. Coefficients de réponse relatifs.....	136
Tableau 34. Méthode chromatographique utilisée pour quantifier les dérivés carbamates des alcaloïdes nortropaniques.....	136
Tableau 35. Temps de rétention des alcaloïdes nortropaniques-EC et du BHT.....	137
Tableau 36. Coefficients de réponse relatifs et résolution chromatographique des.....	137
Tableau 37. Méthode chromatographique utilisée pour la quantification de la TBON et du TBOL.....	138
Tableau 38. Coefficients de réponse relatifs de la TBON, du $\alpha$ -TBOL et du $\beta$ -TBOL (0.5 à 2.0 mg/mL) / 4NMP (4 mg/mL).....	138
Tableau 39. Méthode chromatographique pour analyser la tropinone et la (pseudo)tropine.....	139
Tableau 40. Temps de rétention de la tropinone et de la (pseudo)tropine.....	139
Tableau 41. Méthode chromatographique pour analyser la.....	140
Tableau 42. Méthode chromatographique d'analyse des alcaloïdes nortropaniques dérivés.....	140
Tableau 43. Composition du milieu bactérien pauvre en minéraux.....	141
Tableau 44. Concentrations des solutions de substrats ou d'inhibiteurs utilisées pour les cultures.....	142
Tableau 45. Volumes de solutions d'inhibiteurs ajoutés au milieu bactérien.....	146
Tableau 46. Méthode chromatographique pour analyser des alcaloïdes nortropaniques-EC.....	151
Tableau 47. Méthode de programmation d'introduction du gaz de référence et du système de balayage pendant l'analyse des alcaloïdes-EC.....	151
Tableau 48. Méthode chromatographique pour l'analyse de la tropinone.....	152
Tableau 49. Méthode de la programmation d'introduction de gaz de référence et le système de balayage pendant l'analyse de tropinone.....	152
Tableau 50. Méthode de programmation d'introduction de gaz de référence et de dilution d'échantillon.....	153

## Liste de travaux réalisés pendant la thèse

### Articles dans des revues disposant d'un comité de lecture

1. **Kosieradzka Katarzyna, Illa Tea, Emmanuel Gentil, Richard J. Robins** ;  
« Determination of the natural abundance  $\delta^{15}\text{N}$  of nortropane alkaloids by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry of their ethylcarbamate esters »  
*Anal. Bioanal. Chem.* (2010); 396 : 1405-1414 (IF2008=3.33)

### Communications dans des congrès

1. Affiche ; **Katarzyna Kosieradzka, Emmanuel Gentil, Isabelle Louvet, Richard J. Robins** ; « Isotopic fractionation during nortropane degradation in *Pseudomonas* cultures » Conférence ISOTOPES 2009 à Cluj-Napoca, Roumanie, 25-29 mai 2009
2. Communication orale ; **Katarzyna Kosieradzka, Emmanuel Gentil, Richard J. Robins** ; « Fractionnement isotopique pendant la dégradation des alcaloïdes nortropaniques chez les bactéries *Pseudomonas* AT3 » 4èmes Journées de Jeunes Chercheurs de la Société Française des Isotopes Stables (SFIS) ; Campus INRA-AgroParisTech Thiverval-Grignon 22-23 Octobre 2009

### Autres (actions de communication grand public)

1. communication orale ; **Katarzyna Kosieradzka, Emmanuel Gentil, Richard J. Robins** ; « Fractionnement isotopique pendant la dégradation des alcaloïdes nortropaniques chez les bactéries *Pseudomonas* AT3 » Journées de l'école doctorale 3MPL à Angers 2-3 juillet 2009

## Mesure des effets isotopiques cinétiques lors de la dégradation d'alcaloïdes tropaniques par les souches des bactéries *Pseudomonas* AT3 et MS2

Lors de l'utilisation des alcaloïdes tropaniques nortropine et norpseudotropine comme substrats de croissance par des bactéries *Pseudomonas* AT3, une liaison C–N est rompue. Dans le but d'élucider le mécanisme de cette réaction, les fractionnements isotopiques en  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  en abondance naturelle et en  $^2\text{H}/^1\text{H}$  des composés spécifiquement marqués ont été mesurés, données qui permettent le calcul des effets isotopiques (EICs). Réaliser cette démarche a exigé le développement d'un protocole analytique qui a permis d'extraire du milieu bactérien les métabolites et de les quantifier précisément, afin de calculer le facteur d'avancement de la réaction. Ce but a été atteint grâce au développement d'une méthode de dérivation dont le double objectif est de rendre les composés moins soluble dans l'eau et plus adaptés aux exigences d'une analyse par CG. Les rapports isotopiques en  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ont été mesurés par spectrométrie de masse de rapports isotopiques qui demande une précision de moins de 0,5‰. Afin de s'assurer de la fiabilité des EICs mesurés, il faut tout d'abord bien définir les rôles respectifs de la nortropine et de la norpseudotropine dans le métabolisme. Il a été montré que la nortropine est significativement transformée en norpseudotropine (~20%) malgré que l'inverse soit moins important (<10%). Cette étude a exploité plusieurs approches : les composés enrichis en  $^2\text{H}$  ; l'étude en  $^{15}\text{N}$  en abondance naturelle ; les propriétés des enzymes impliquées. Un EIC- $^{15}\text{N}$  faible et inverse a été obtenu mais aucun EIC en  $^2\text{H}$  n'a été trouvé. Ces renseignements nous ont permis de proposer un modèle de mécanisme de rupture de la liaison C–N en accord avec les valeurs d'EIC obtenues par calcul théorique.

**Mots clef:** Spectrométrie de masse de rapports isotopiques, effet isotopique, azote-15, alcaloïde, nortropine, norpseudotropine, chromatographie en phase gazeuse, dérivation, *Pseudomonas* AT3

## Measurement of kinetic isotope effects during the degradation of tropane alkaloids by the bacterium *Pseudomonas* strains AT3 and MS2

During the use of the tropane alkaloids nortropine and norpseudotropine as substrates for growth by the bacterium *Pseudomonas* AT3, a C–N bond is ruptured. With the objective of elucidating the mechanism of this reaction, the isotope fractionations in  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  at natural abundance and in  $^2\text{H}/^1\text{H}$  in appropriately specifically enriched substrates were measured. These data can be used to calculate the kinetic isotope effects (KIEs). For this, it was necessary to develop a protocol to extract the metabolites from the growth medium and quantify them precisely, so as to assess the extent of advancement of the reaction. This was achieved using a derivatisation procedure that rendered the alkaloids both less water soluble and more amenable to analysis by GC. The isotope ratios in  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  were determined by isotope ratio mass spectrometry, which requires a precision of below 0.5‰. In order to ensure the reliability of the isotope KIEs obtained, it was necessary to define the metabolic relationship between nortropine and norpseudotropine. It was shown that nortropine is significantly transformed into norpseudotropine (approx. 20%), although the reverse occurs to a much lesser extent (<10%). This study exploited several approaches: the use of compounds enriched in  $^2\text{H}$ ;  $^{15}\text{N}$  at natural abundance; the properties of the enzymes involved. A weak and inverse KIE in  $^{15}\text{N}$  was obtained, although no KIE in  $^2\text{H}$  was detected. These data enable a model for the rupture of the C–N bond to be put forward, which is in agreement with the values for the KIEs obtained by theoretical calculation.

**Keywords:** Isotope ratio mass spectrometry, isotopic effect, nitrogen-15, alkaloids, nortropine, norpseudotropine, gas chromatography, derivatisation, *Pseudomonas* AT3