

# Synthèse d'un inhibiteur d'enzyme : le 2-aza-2,3-dihydrosqualène

Manipulation pour les étudiants en licence et maîtrise de chimie

Pierre Llopiz\* maître de conférences, Serge Neunlist\* maître de conférences

**Summary :** *The synthesis of 2-aza-2,3-dihydrosqualen*

*The synthesis of 2-aza-2,3-dihydrosqualen from squalen is described on educational point of view. The target molecule is an inhibitor of the 2,3-oxidosqualen cyclase involved in biosynthesis of sterols. The experimental part is now well perfected. The gap between chemistry and biological sciences can be filled thanks to this synthesis, leading to a supplementary motivation for students.*

**Mots clés :** *Synthèse, inhibiteur, enzyme, squalène.*

**Key-words :** *Organic synthesis, inhibitor, enzym, squalen.*

**L**a chimie organique peut être définie comme la chimie des composants du monde vivant. Pour l'enseignant cela permet des « diversions » qui ne peuvent qu'éveiller l'intérêt des étudiants.

La synthèse multistade suivante en est une illustration concrète ; elle met en évidence l'interactivité entre synthèse organique et sciences biologiques au sens large, le produit final de cet enchaînement réactionnel ayant été reconnu comme inhibiteur non compétitif de la 2,3-oxydosqualène-cyclase [1]. Nous avons constaté que le fait de montrer clairement l'utilité biologique des produits, tant intermédiaires que finals, sensibilise nettement les étudiants et les motive d'autant plus qu'ils sont conscients de la finalité de leur travail.

Du point de vue expérimental, cette manipulation en cinq étapes consécutives (*figure 1*) passe en revue différents mécanismes réactionnels et fait appel à de nombreuses techniques. La pureté des produits est contrôlée par spectroscopie d'absorption infrarouge et par résonance magnétique nucléaire du proton.

La curiosité des étudiants a toujours nécessité, de la part des enseignants, des développements à propos de la structure des membranes cellulaires [2] ainsi que du mode d'action et de la provenance des molécules jouant le rôle de renforteur membranaire (hopanoïdes pour les procaryotes, stérols pour les eucaryotes) (*figure 2*) [3]. Les voies de biosynthèse menant au squalène et au 2,3-oxydosqualène [4, 5, 6] peu-

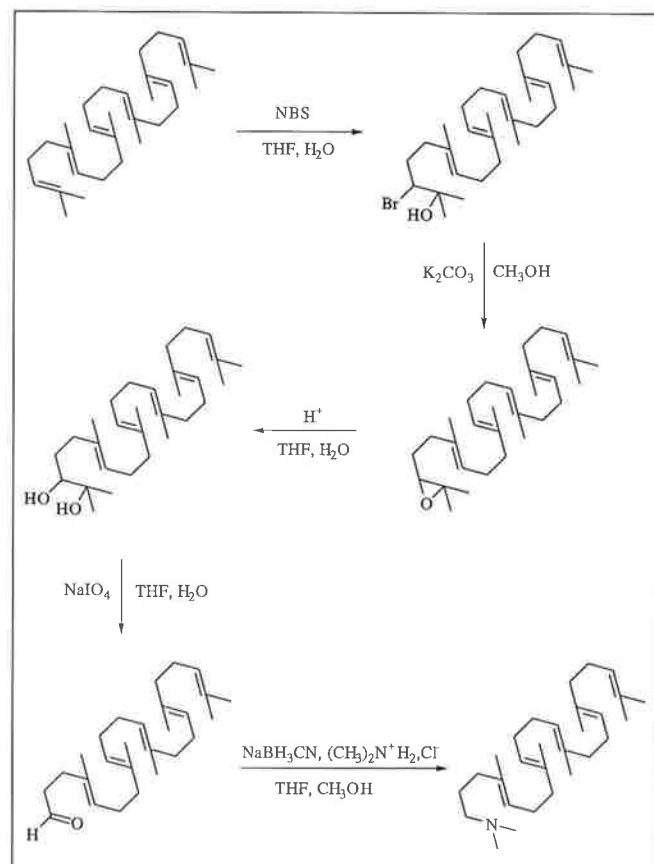


Figure 1 - Synthèse du 2-aza-2,3-dihydrosqualène.

\* Laboratoire de limnologie organique, URA 135 du CNRS, École Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse, 3 rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse Cedex.  
Tél. : 03.89.42.70.20. Fax : 03.89.43.77.90.  
E.mail : P.Llopiz@univ-mulhouse.fr ou S.Neunlist@univ-mulhouse.fr

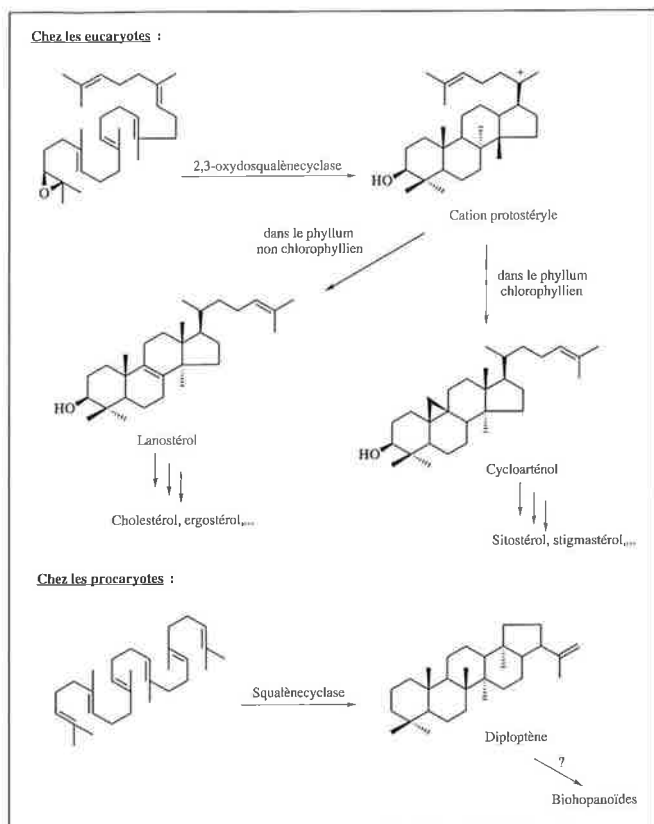


Figure 2 - Réactions menant aux renforceurs membranaires.

vent être explorées ainsi que les techniques de marquages pour suivre les intermédiaires biosynthétiques. Il est naturel après cela d'aborder les différences entre procaryotes et eucaryotes et les discussions s'achèvent en général autour des thèmes de l'évolution.

Tous les rendements mentionnés dans le texte sont des moyennes statistiques obtenues ces dernières années à partir des résultats d'une soixantaine d'étudiants.

La première étape est une addition électrophile sur une double liaison carbone-carbone. Elle illustre les difficultés à travailler sur des substrats plurifonctionnels : le produit souhaité est obtenu avec un rendement moyen ( $\rho = 30\%$  après purification par chromatographie). Toutefois, le squalène de départ est un produit commercial bon marché et 20 grammes suffisent pour mener à son terme la séquence réactionnelle. En suivant strictement les conditions opératoires, notamment en ce qui concerne les conditions de solvation favorisant le repliement de la chaîne carbonée et donc l'attaque à une extrémité, on obtient 7 g de monobromhydrine du squalène. La séparation par flash-chromatographie est un peu fastidieuse ; pour beaucoup d'étudiants, c'est le premier contact avec cette technique et cela permet d'appréhender de façon concrète les possibilités et les limites de ce type de purification.

L'obtention de 2,3-oxidosqualène, par un mécanisme de type  $S_N2$  intramoléculaire, s'effectue sans difficulté avec un très bon rendement (90 %) sans purification supplémentaire. Le composé obtenu est un intermédiaire clé de la biosynthèse des stéroïdes [7]. Si tous les étudiants ont entendu parler de cholestérol, il n'en est pas de même pour son rôle de renforceur membranaire ; il faut, à ce moment du travail, parler des

membranes biologiques, des hormones stéroïdes et des autres substances chimiques de structure ou de fonctions analogues.

La troisième étape consiste à hydrolyser l'époxyde, en milieu acide, pour former le vic-diol ( $\rho = 70\%$ ). Elle est suivie de la coupure de la liaison carbone-carbone par le périodate de sodium pour former le tris-nor-squalène aldéhyde ( $\rho = 90\%$ ) ; cela représente la perte de trois atomes de carbone de la molécule initiale et peut sembler curieux aux yeux de nos étudiants. Il faut leur expliquer que c'est la meilleure et la voie la plus facile pour substituer un atome d'azote à un atome de carbone dans la chaîne carbonée.

Enfin, la cinquième étape, une amination réductive ( $\rho = 45\%$ ), mène au produit final désiré qui permet une discussion approfondie sur les inhibiteurs enzymatiques et leur utilité en pharmacologie ou pour l'étude de mécanismes enzymatiques.

Une telle synthèse, dont le rendement global se situe autour de 7,5 %, peut être effectuée dans tous les laboratoires de chimie car elle ne nécessite aucun équipement particulier. Incluse dans les cursus universitaires classiques, elle favorise l'ouverture d'esprit interdisciplinaire nécessaire à une meilleure intégration des étudiants dans le monde du travail.

## Partie expérimentale

### Monobromhydrine du squalène

(3-bromo-2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracéco-6,10,14,18,22-pentaèn-2-ol)

Le tétrahydrofurane doit être préalablement déperoxydé par passage sur une colonne d'alumine activée [8].

Dissoudre 20 g de squalène dans 15 mL de tétrahydrofurane et refroidir à 0 °C en agitant ; ajouter de l'eau jusqu'à voir apparaître un trouble (condition importante pour favoriser le repliement de la chaîne carbonée du squalène, le rendant plus réactif aux extrémités). Additionner lentement 11 g de N-bromosuccinimide et suffisamment d'eau pour que la solution reste trouble. Maintenir sous agitation à 0 °C pendant 1 heure après la fin de l'addition, puis rajouter 15 mL d'eau. Une chromatographie sur couche mince de silice (éluant : dichlorométhane) permet de voir le produit désiré ( $R_f = 0,45$ ) ainsi qu'un produit secondaire plus polaire qui est la dibromhydrine. Évaporer le solvant puis extraire le milieu réactionnel au pentane ; séparer la phase organique, la faire sécher sur sulfate de magnésium, filtrer et évaporer le pentane. L'huile obtenue, mélange de mono- et de dibromhydrine du squalène, doit être chromatographiée sur colonne de gel de silice (0,040-0,063 mm) en utilisant du dichlorométhane comme éluant.

Infrarouge :  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3 600-3 400, 3 000-2 850, 1 665, 1 450, 1 380, 1 220, 1 150, 1 110, 940, 835, 775.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS) :  $\delta = 1,32$  (3H, s), 1,34 (3H, s), 1,65 (6x3H, m), 2,05 (18H, s), 3,97 (1H, dd), 5,20 (5H, m).

### 2,3-Oxydosqualène

Mélanger 6 g de monobromhydrine de squalène et 6 g de carbonate de potassium dans 150 mL de méthanol ; agiter à température ambiante pendant 3 heures en suivant l'avance-

ment de la réaction par CCM (éluant : dichlorométhane), le produit ( $R_f = 0,55$ ) étant légèrement moins polaire que le réactif. Ajouter 90 mL d'eau puis évaporer le méthanol ; la solution aqueuse est extraite au pentane. Séparer la phase organique ; la sécher sur sulfate de magnésium, filtrer et évaporer le solvant pour obtenir le 2,3-oxydosqualène.

Infrarouge :  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3 000-2 850, 1 665, 1 450, 1 380, 1 150, 1 110, 835, 745, 690.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS) :  $\delta = 1,28$  (3H, s), 1,32 (3H, s), 1,65 (6x3H, m), 2,05 (18H, m), 2,70 (1H, t), 5,20 (5H, m).

## Abréviations

CCM	: chromatographie sur couche mince
$R_f$	: rapport frontal
RMN	: résonance magnétique nucléaire
TMS	: tétraméthylsilane
s	: singulet
d	: doublet
t	: triplet
m	: multiplet

## 2,3-Dihydrosqualène-2,3-diol

Mélanger, sous atmosphère d'azote, 5 g de 2,3-oxydosqualène, 50 mL de tétrahydrofurane et 8 mL d'acide perchlorique à 3 %. Laisser agiter une nuit sous atmosphère inerte. Vérifier par CCM (éluant : dichlorométhane) qu'il ne reste plus de réactif. Évaporer le tétrahydrofurane puis ajouter 50 mL d'eau. Extraire au diéther ; après séparation, laver la phase organique avec une solution aqueuse saturée d'hydrogencarbonate de sodium puis à l'eau ; la sécher sur sulfate de magnésium et évaporer l'éther.

Infrarouge :  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3 600-3 200, 3 000-2 850, 1 665, 1 450, 1 380, 1 120, 1 070, 835, 600.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS) :  $\delta = 1,15$  (3H, s), 1,18 (3H, s), 1,62 (6x3H, m), 2,02 (18H, m), 3,40 (1H, m), 5,20 (5H, m).

## Tris-nor-squalène aldéhyde

Dissoudre 2 g de 2,3-dihydrosqualène-2,3-diol dans 20 mL de tétrahydrofurane. Mettre sous atmosphère d'azote et agiter pendant 2 heures avec une solution de 3 g de période de sodium dans 8 mL d'eau. Ajouter alors 60 mL d'eau

et extraire au diéther. Séparer la phase organique et la sécher sur sulfate de magnésium.

Le Tris-nor-squalène aldéhyde est obtenu après évaporation du solvant. Légèrement fragile, il doit être engagé rapidement dans l'étape suivante.

Infrarouge :  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3 000-2 850, 1 720, 1 665, 1 450, 1 380, 1 150, 1 110, 1 020, 840.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS) :  $\delta = 1,62$  (6x3H, m), 2,02 (18H, m), 2,40 (2H, m), 5,20 (5H, m), 9,72 (1H, s).

## 2-Aza-2,3-dihydrosqualène

((4E,8E,12E,16E)-N,N-diméthyl-4,8,13,17,21-pentaméthyl-docosa-4,8,12,16,20-penténylamine)

Dissoudre 1 g de tris-nor-squalène aldéhyde dans 20 mL de mélange tétrahydrofurane/méthanol (1/1; v/v) sous atmosphère d'azote. Ajouter, sous agitation, une solution de 0,5 g de cyanoborohydrure de sodium et 1 g de chlorhydrate de diméthylamine dans 20 mL de méthanol. Maintenir l'agitation pendant la nuit. Vérifier par CCM la présence du produit désiré (éluant : chloroforme/méthanol/triéthylamine ; 80/20/1, v/v ;  $R_f = 0,6$ ). Additionner 100 mL d'eau, agiter puis évaporer les solvants. Extraire au diéther ; laver la phase organique à l'eau et la sécher sur sulfate de magnésium. L'évaporation du solvant donne le produit final avec une pureté satisfaisante.

Infrarouge :  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3 000-2 850, 1 665, 1 450, 1 380, 1 220, 1 145, 1 100, 1 060, 1 040, 830, 760.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS) :  $\delta = 1,58$  (6x3H, m), 2,02 (18H, m), 2,40 (2x3H, s), 2,50 (2H, d), 5,20 (5H, m).

## Références

- [1] Duriatti A., Bouvier-Navé P., Benveniste P., Schuber F., Delprino L., Balliano G., Cattel L., *Biochem. J.*, **1985**, 34, p. 2765-2777.
- [2] Stryer L., *Biochemistry*, Freeman, New York, **1988**, p. 283-312.
- [3] Ourisson G., Rohmer M., Poralla K., *Ann. Rev. Microbiol.*, **1987**, 41, p. 301-333.
- [4] Stryer L., *Biochemistry* ; Freeman, New York, **1988** ; p. 555-558.
- [5] Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H., *Biochem. J.*, **1993**, 295, p. 517-524.
- [6] Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S., Sahn H., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1996**, 118, p. 2564-2566.
- [7] Abe I., Rohmer M., Prestwich G. D., *Chem. Rev.*, **1993**, 93, p. 2189-2206.
- [8] Perrin D.D., Armarego W.L.F., *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon press, Oxford, **1988**, p. 284.