

THESE

CH

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR TROISIEME CYCLE

SPECIALITE: CHIMIE ORGANIQUE

PAR

DANIEL GAUDRY

SUJET DE LA THESE:

SYNTHESE ET ETUDE DE QUELQUES THIAZOLES COMME PRECURSEURS
EVENTUELS DE LA THIAMINE; DOSAGE ET IDENTIFICATION DE L'HYDROXY-ETHYL
THIAMINE DANS DES EXTRAITS BACTERIENS.

Soutenue le 12 septembre 1977 devant la commission d'examen

M.S.DAVID

Président

M.R.AZERAD

} Examineurs

M.M.GOLFIER

THESE

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR TROISIEME CYCLE

SPECIALITE: CHIMIE ORGANIQUE

ST4 / 4186.

PAR

DANIEL GAUDRY

SUJET DE LA THESE:

SYNTHESE ET ETUDE DE QUELQUES THIAZOLES COMME PRECURSEURS
EVENTUELS DE LA THIAMINE; DOSAGE ET IDENTIFICATION DE L'HYDROXY-ETHYL
THIAMINE DANS DES EXTRAITS BACTERIENS.

Soutenue le 12 septembre 1977 devant la commission d'examen

M.S.DAVID

Président

M.R.AZERAD

M.M.GOLFIER

} Examineurs

METHODES GENERALES

Les points de fusion sont pris sur un appareil REICHERT ou BUCHI, et ne sont pas corrigés; les spectres R.M.N. sont obtenus grâce à un appareil VARIANT ou un appareil fonctionnant à 240 MHz construit à l'institut d'électronique. Les spectres I.R. sont obtenus grâce à un appareil UNICAM. Le spectrofluorimètre est un appareil AMINCO et nous remercions Mr le professeur SHECHTER pour nous avoir permis de l'utiliser. Les spectres UV. sont obtenus grâce à un appareil JOBIN et YVON ou SHIMADZU. Les incubations ont été réalisées dans une chambre thermostatée à 37°C sur un agitateur dérivé d'un appareil NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC. Les comptages ont été réalisés sur un spectromètre à scintillation liquide INTERTECHNIQUE.

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

- E.coli : Escherichia.coli
S.typhimurium : Salmonella.typhimurium
L.fermenti : Lactobacillus.fermenti
TZ : thiazole
T : thiamine
HET : hydroxy éthyl thiamine
rdt. : rendement
coll. : collaborateur(s)
trityl : triphényl méthyl
glc : glucose
vitamine B1 : T+HET
aro: proton(s) lié(s) à un noyau **benzénique**
PF : point de fusion
PE : point d'ébullition
PM : poids moléculaire
max : maximum
IR : infra-rouge
R.M.N. : résonance magnétique nucléaire
UV : ultra violet
CCM : chromatographie sur couche mince

PLAN DE LA PARTIE THEORIQUE

- 1 PREMIERE PARTIE
 - 1,1 INTRODUCTION
 - 1,2 METHODES DE SYNTHESE EMPLOYEES
 - 1,2,1 METHODE DE BRESLOW
 - 1,2,1,1 SYNTHESE DES NITRILES
 - 1,2,1,2 SYNTHESE DES THIOAMIDES
 - 1,2,1,3 SYNTHESE DES α -HALO CETONES
 - 1,2,1,4 CONDENSATION SUR LES α -HALO CETONES
 - 1,2,1,5 CONDENSATION AVEC LA THIOUREE
 - 1,2,1,6 CONDENSATION AVEC LA THIOACETAMIDE
 - 1,2,2 SYNTHESE DES THIAZOLES PAR LA METHODE DE Y.OKA ET COLL. (4)
 - 1,2,3 METHODE DE METZGER ET COLL. ET DE ERLLENMEYER
 - 1,2,4 METHODE DE KISS ET COLL.
 - 1,2,5 METHODE DE Y.OKA ET COLL. (5)
 - 1,2,6 UTILISATION DE LA METHODE DE ERLLENMEYER
 - 1,2,6,1 PROTECTION DU THIAZOLE XV
 - 1,2,6,2 PROTECTION DES ALDEHYDES
 - 1,2,6,3 CONDENSATION DU THIAZOLE PROTEGE AVEC UN ALDEHYDE
 - 1,2,6,4 DEPROTECTION DES THIAZOLES OBTENUS
 - 1,3 ESSAIS BIOLOGIQUES DES THIAZOLES OBTENUS
- 2 DEUXIEME PARTIE
 - 2,1 INTRODUCTION
 - 2,2 PROPORTION DES DEUX FORMES DANS LES EXTRAITS
 - 2,3 ORIGINE ET IDENTITE DE HET
 - 2,4 INCORPORATION DE LA THIAMINE MARQUEE PAR DES CELLULES DE LA SOUCHE 83-1
 - 2,5 INCORPORATION DE LA THIAMINE MARQUEE PAR DES CELLULES DE LA SOUCHE 70-17

1,1 INTRODUCTIONORIGINE DE NOTRE TRAVAIL

Des résultats (1), obtenus dans notre laboratoire par incubation sans croissance de cellules du mutant 83-1 (auxotrophe pour le shikimate) de E. coli chez qui la synthèse de la thiamine a été déprimée par incubation en présence d'adénosine (21), ont montré que la tyrosine est un facteur de biosynthèse du "thiazole" XV. Dans les cellules ainsi traitées la quantité de thiamine synthétisée est en relation étroite avec la quantité de tyrosine fournie lors de l'incubation. Des expériences avec des traceurs radio-actifs ont montré que seul le carbone asymétrique (carbone-2) de la tyrosine est incorporé dans la thiamine. La marque est retrouvée sur le carbone -2 du "thiazole" XV. Cette incorporation a été retrouvée (34) par d'autres auteurs dans une souche sauvage d'une espèce voisine: S. typhimurium.

Comme on pouvait s'y attendre, nous avons constaté que l'acide parahydroxyphénylpyruvique, en relation métabolique avec la tyrosine, la remplace parfaitement. Comme on ne connaît pas de mutant chez qui l'interconversion de ces deux métabolites est bloquée, la seule expérience envisageable pour savoir lequel des deux est le précurseur réel est l'emploi de l'azote 15 comme traceur. Les difficultés théoriques (présence de transaminases qui disperseront la marque) et surtout pratiques (manipulation de grandes quantités de milieu) nous ont fait renoncer à cette expérience.

L'origine des cinq autres carbones du "thiazole" XV est encore inconnue. On sait qu'ils ne proviennent ni d'un acide aminé ni d'un intermédiaire ou dérivé du cycle de KREBS. Des expériences

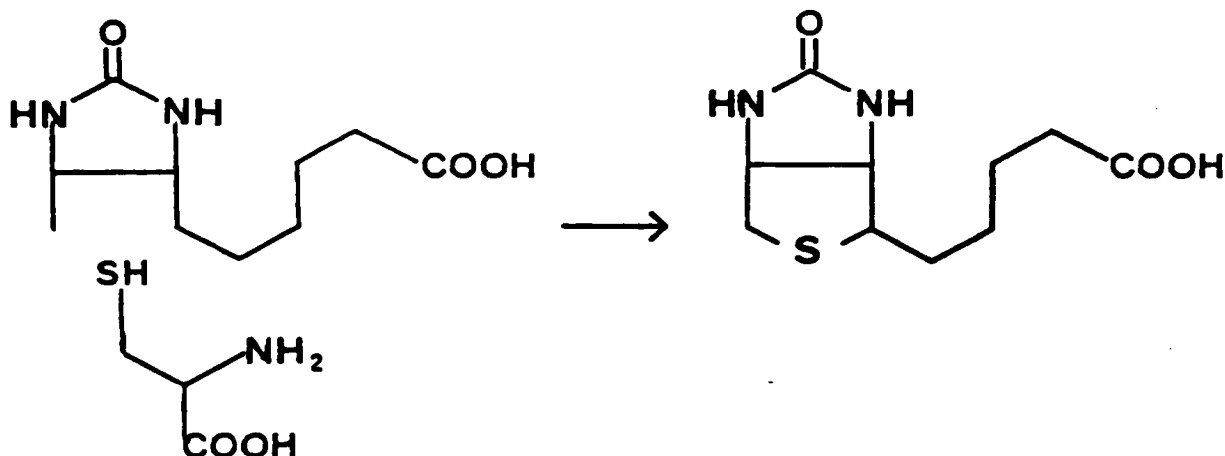
avec des sources générales de carbone marquées spécifiquement au ^{14}C pourraient certainement apporter des informations sur ce sujet, mais leur coût élevé les a fait remettre jusqu'ici.

L'aptitude à remplacer la tyrosine et le parahydroxyphénylpyruvate comme facteur de biosynthèse du thiazole XV a été examiné pour divers composés chimiquement apparentés à l'un au moins de ces produits. La tyramine et tous ses analogues ne remplacent absolument pas la tyrosine. L'élimination du C-1 de la tyrosine n'est donc pas la première étape de son utilisation. Les analogues acides aminés ou acides cétoniques, méthylés sur l'oxygène phénolique ou portant un hydroxyle ou un méthoxy supplémentaire en 3 la remplacent parfaitement. Mais on ne peut affirmer que l'un quelconque de ces analogues est un intermédiaire obligatoire. L'ensemble de ces analogues peuvent simplement être utilisés en remplacement. Toutefois, la méthionine est apparue comme un autre facteur indispensable à la biosynthèse du thiazole XV, sans fournir ni carbone ni soufre. Cela suggère qu'elle jouerait, dans cette biosynthèse, le rôle d'agent méthylant (sous forme de S-adénosyl-méthionine (SAM)) et qu'une méthylation devrait intervenir à une étape. De fait, en présence des analogues O-méthylés précités, la méthionine n'est plus indispensable, mais la synthèse du thiazole XV est ralentie. Cela confirme que la méthionine intervient sous sa forme (SAM) capable d'échanger des méthyles, mais semble montrer qu'aucun des analogues méthylés n'est un intermédiaire.

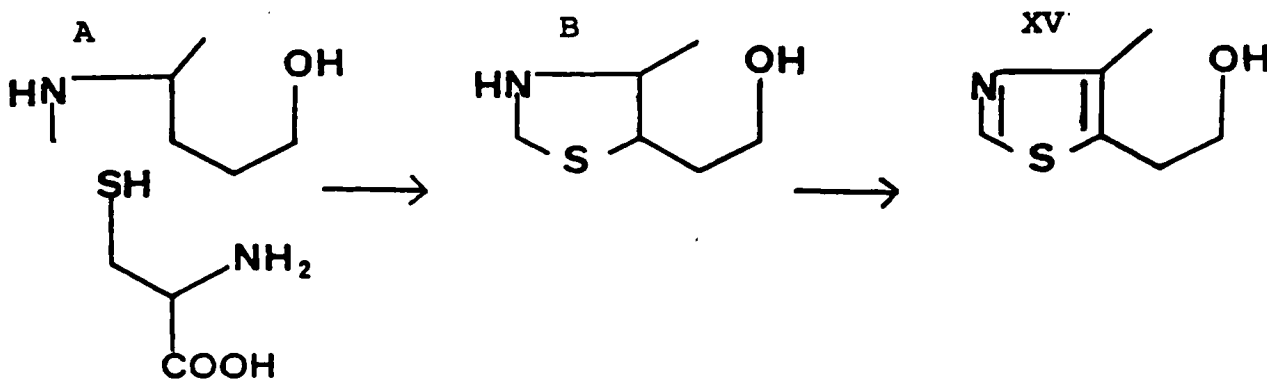
L'origine du soufre est connue. Des travaux effectués dans notre laboratoire sur E.coli et, par d'autres auteurs (37) sur S.thymurium indiquent que la cystéine fournit uniquement le soufre et

aucun carbone. Cette situation, formellement analogue à la biosynthèse de la biotine, nous a amené à faire un parallèle entre les deux. Deux produits dont nous disposons par ailleurs nous ont paru intéressants à tester.

CAS DE LA BIOTINE:



HYPOTHESE TESTEE:



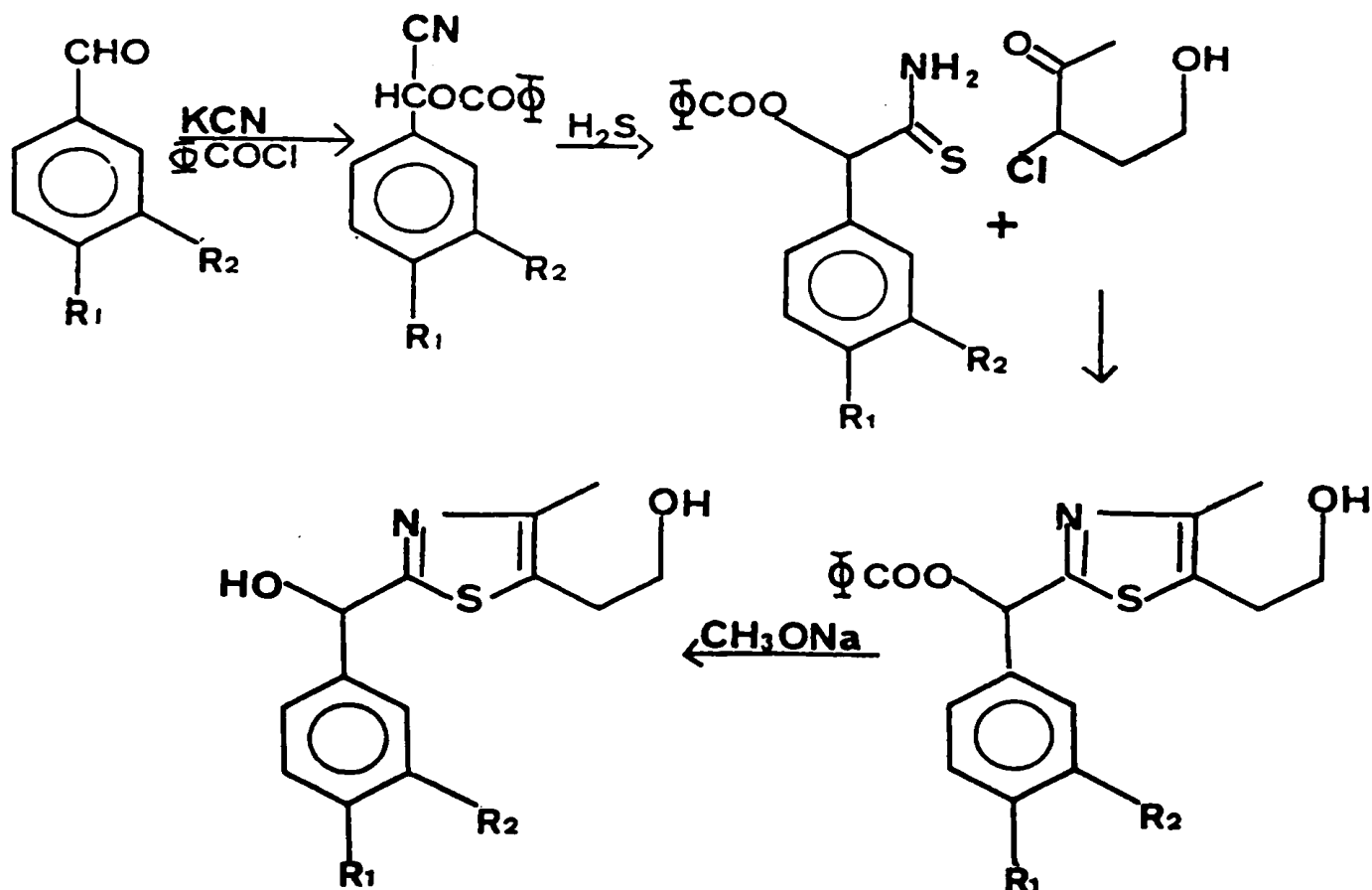
Ni l'amine alcool A ni la "thiazolidine" B ne remplacent la tyrosine chez E.coli 83-1 ou le thiazole XV chez E.coli 26-43 auxotrophe pour ce produit. Cette hypothèse envisageant un départ précoce des autres carbones de la tyrosine étant fausse, nous avons envisagé l'hypothèse selon laquelle le départ des autres carbones de la tyrosine pourrait avoir lieu après la formation de l'hétérocycle. Les données exposées ci-dessus nous ont amenées à envisager

A priori ces synthèses nous semblaient faciles à réaliser par analogie avec le travail de BRESLOW (8) sur le thiazole XXI, mais ce ne devait pas être le cas.

1,2 METHODES DE SYNTHESE EMPLOYEES

La méthode de BRESLOW, qui nous a paru séduisante, consiste à faire la synthèse totale du thiazole par une condensation de HANTZSCH (2). Cette condensation se fait par action d'une chloro- ou bromo-cétone sur une thioamide. Ces thioamides, non décrites, nous semblaient accessibles facilement à partir des nitriles presque tous décrits.

1,2,1 METHODE DE BRESLOW ($R_1 = R_2 = H$):



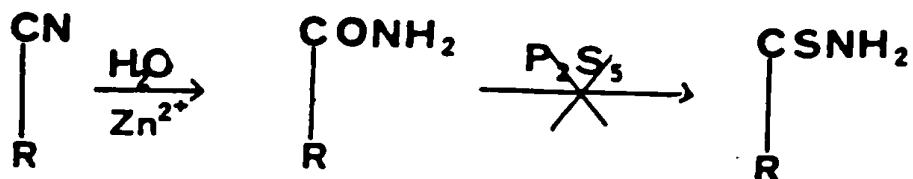
1,2,1,1 SYNTHESE DES NITRILES

Le problème que nous avons rencontré est qu'aucune des synthèses publiées (9, 10, 11) sauf (12) ne sont utilisables pour une échelle supérieure au gramme. Il nous a fallu adapter la seule synthèse publiée (12) qui soit aisée d'emploi et généralisable. L'idée principale est de faire réagir un système à deux phases. La phase aqueuse basique dans laquelle la cyanhydrine se forme, et la phase organique qui l'extrait et permet sa benzylation. Ce procédé permet en effet d'éviter la formation du produit final en milieu aqueux où il est insoluble et où il s'agglomère en une sorte de "guimauve" intraitable en grande quantité. Lorsque la réaction est terminée, le produit recherché est dans la phase organique et il suffit de la traiter convenablement pour obtenir le produit attendu.

1,2,1,2 SYNTHESE DES THIOAMIDES

La difficulté que nous avons rencontrée au cours de cette synthèse est la manipulation de H_2S liquide anhydre en grande quantité (de l'ordre de deux à trois moles, 75 ml environ). Cette difficulté est liée aux constantes physiques de H_2S (PF: $-85,5^{\circ}C$; PE: $-60,7^{\circ}C$ pour 1 atm).

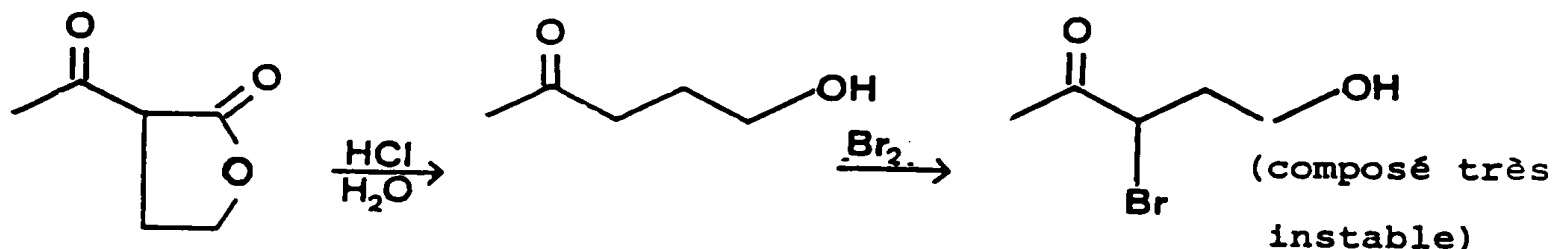
Nous avons songé aussi à une autre méthode pour obtenir ces thioamides. Elle consiste à traiter l'amide correspondante par P_2S_5 . L'amide est d'un accès facile à partir du nitrile. On traite le nitrile par de l'eau en milieu acétique en présence d'ions Zn^{2+} (13). Mais l'amide est déshydratée en nitrile dans les conditions de la réaction. De fait, cette méthode est principalement employée pour les amides N substituées où cette possibilité n'existe pas.



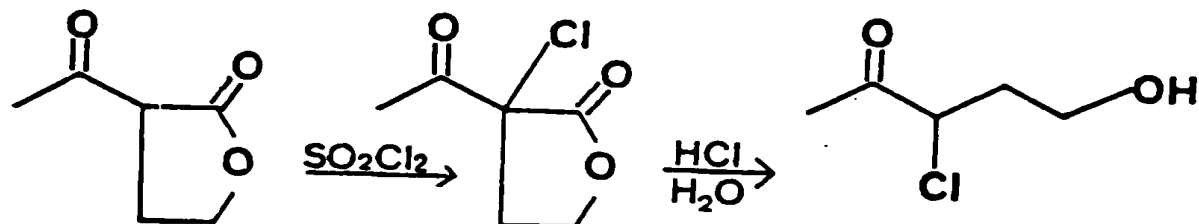
1,2,1;3 SYNTHESE DES α HALO CETONES

Celles-ci se font facilement par les méthodes décrites

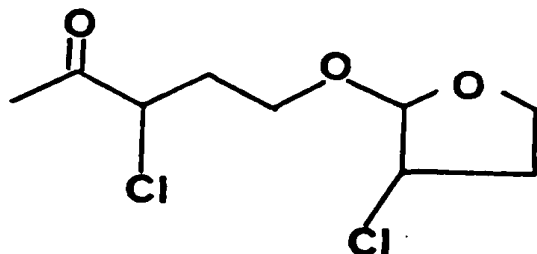
(14, 15, 16)



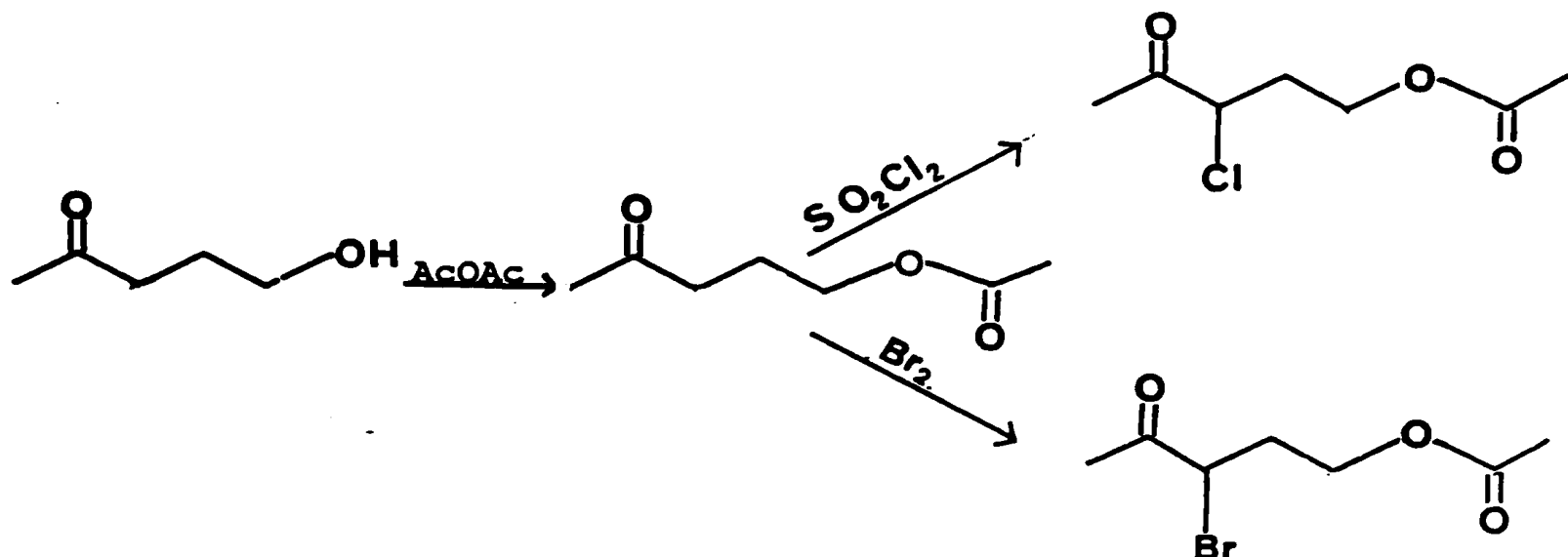
Ou



qui se dimère pendant la distillation en :



FUJITA et Coll. (32) utilisent cette chlorocétone pour des condensations en milieu aqueux après un chauffage qui la transforme en monomère. Pour empêcher cette dimérisation nous avons acétylé la fonction alcool, puis bromé ou chloré :



1,2,1,4... CONDENSATION DES THIOAMIDES SUR LES α HALO-CETONES

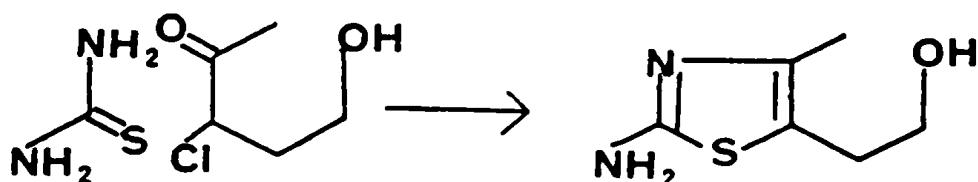
Avec la thioamide XIV et la bromocétone XXXIII dans l'éthanol (synthèse de BRESLOW), et après débenzoylation par le méthylate de Na, on obtient le thiazole XXI dans les mêmes conditions que BRESLOW.

Avec les autres thioamides, il en est tout autrement. Les thioamides IX, X, XI, XII et XIII se décomposent à chaud en une grande quantité de produits (même en l'absence d' α halo-cétone). A froid, même avec la α halo-cétone XXXIV, il n'y a pas de réaction. Afin de confirmer a posteriori que la réaction n'a pas lieu du tout, nous avons utilisé les produits finaux obtenus (cf infra) par une autre méthode. Après réaction d'une des thioamides avec la halo-cétone XXXIV, débenzoylation par du méthylate et CCM, il nous a été impossible de détecter le thiazole attendu en face du thiazole témoin.

Nous avons alors testé les α halo-cétones par réaction avec des thioamides simples: la thiourée et la thioacétamide.

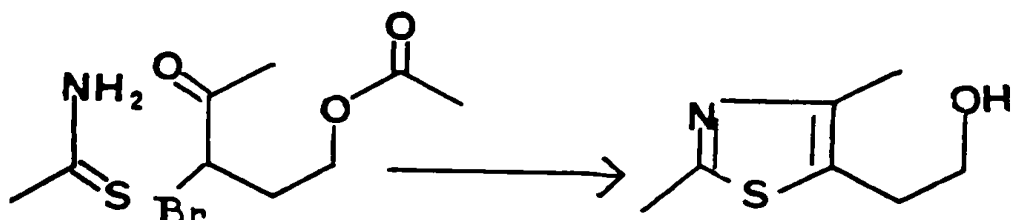
1,2,1,5 CONDENSATION AVEC LA THIOUREE SELON H.KAWASAKI et COLL. (17)

Cette condensation se fait en présence de thiourée et de XXXI dimère qui après 15 minutes de reflux dans eau-alcool est dissocié en monomère. Le rendement est bon et la réaction a lieu facilement.



1,2,1,6 CONDENSATION AVEC LA THIOACETAMIDE

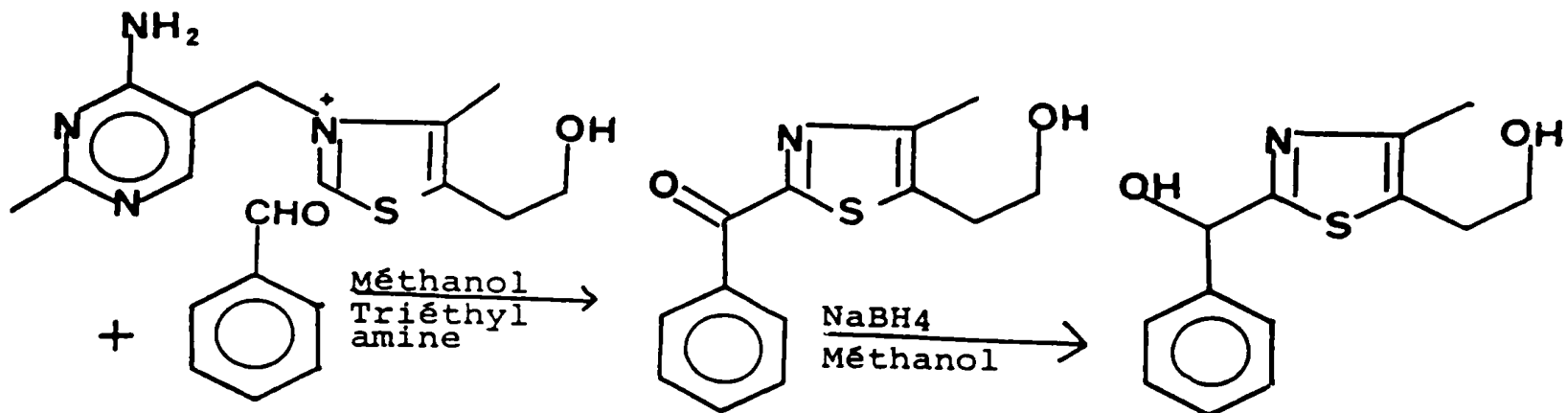
La condensation se fait en présence de XXXIV en excès et de thioacétamide, HBr est capté par du tamis moléculaire de 4 Å. Le thiazole XVII ainsi obtenu est cristallisé sous forme de picrate et, après hydrolyse par la soude à reflux, on obtient le thiazole XVIII attendu correspondant à celui décrit dans la littérature (18).



1,2,2 SYNTHÈSE DES THIAZOLES PAR LA METHODE DE Y.OKA ET COLL. (4)

Cette méthode est une méthode de dégradation consistant à faire réagir la thiamine sur un aldéhyde aromatique. Parmi beaucoup de produits non identifiés, il se forme les dérivés oxydés des thiazoles attendus, qui, après réduction, permettent d'obtenir ces thiazoles.

Exemple avec le benzaldéhyde:



Nous avons donc appliqué cette méthode avec les aldéhydes suivants: XLII, XLIII, XLIV et XLV.

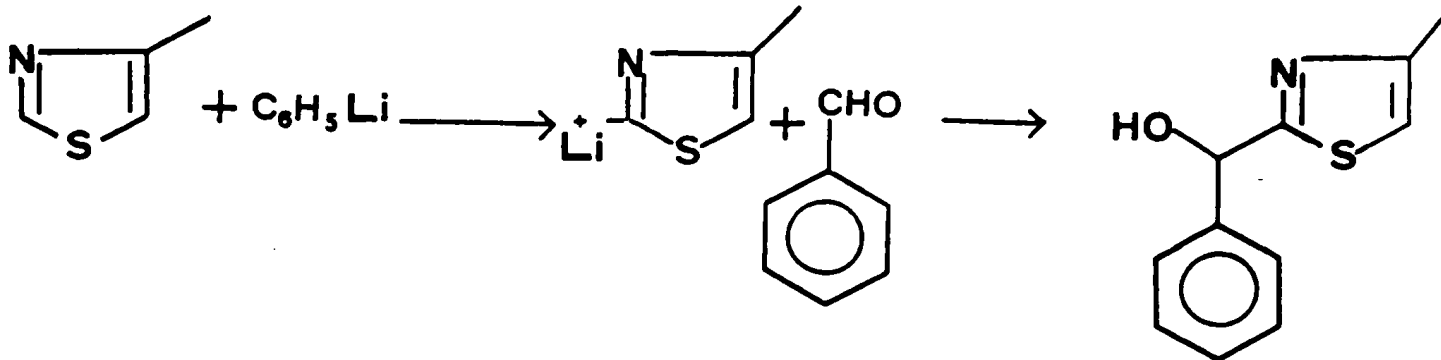
La réaction conduit à une destruction complète de la thiamine. Le produit le plus important identifié est la "benzoïne" correspondante. Le thiazole recherché est un produit minoritaire. Les auteurs décrivent la réaction avec l'aldéhyde XLII où l'on obtient 20% de rdt. Le mélange complexe obtenu est résolu sur colonne. Pour les aldéhydes XLIII et XLIV le rendement diminue encore, et pour l'aldéhyde XLV nous n'avons rien pu obtenir.

La cétone est ensuite aisément réduite en alcool par NaBH₄ et le thiazole correspondant est purifié sur colonne pour, dans la mesure du possible, ôter tout produit de départ actif sur les bactéries, afin que le test soit valable.

Nous avons alors cherché une méthode susceptible de nous donner accès aux derniers thiazoles recherchés. Nous avons le choix entre plusieurs méthodes exposées ci-dessous.

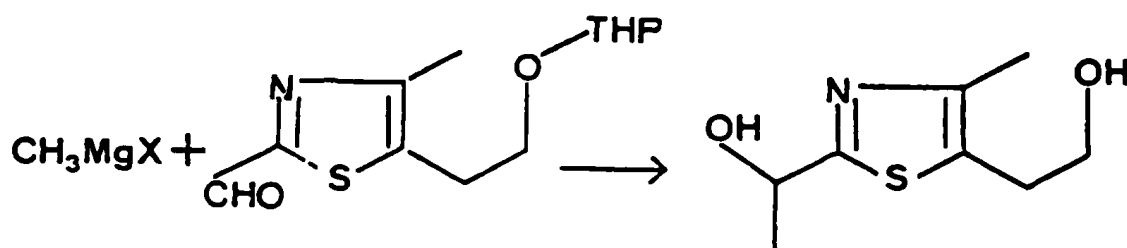
1,2,3 LA METHODE DE METZGER ET COLL. ET DE ERLLENMEYER (6,7)

Dans cette méthode on traite le thiazole par un lithien pour métaller en 2, puis on fait agir un aldéhyde; exemple de ERLLENMEYER:



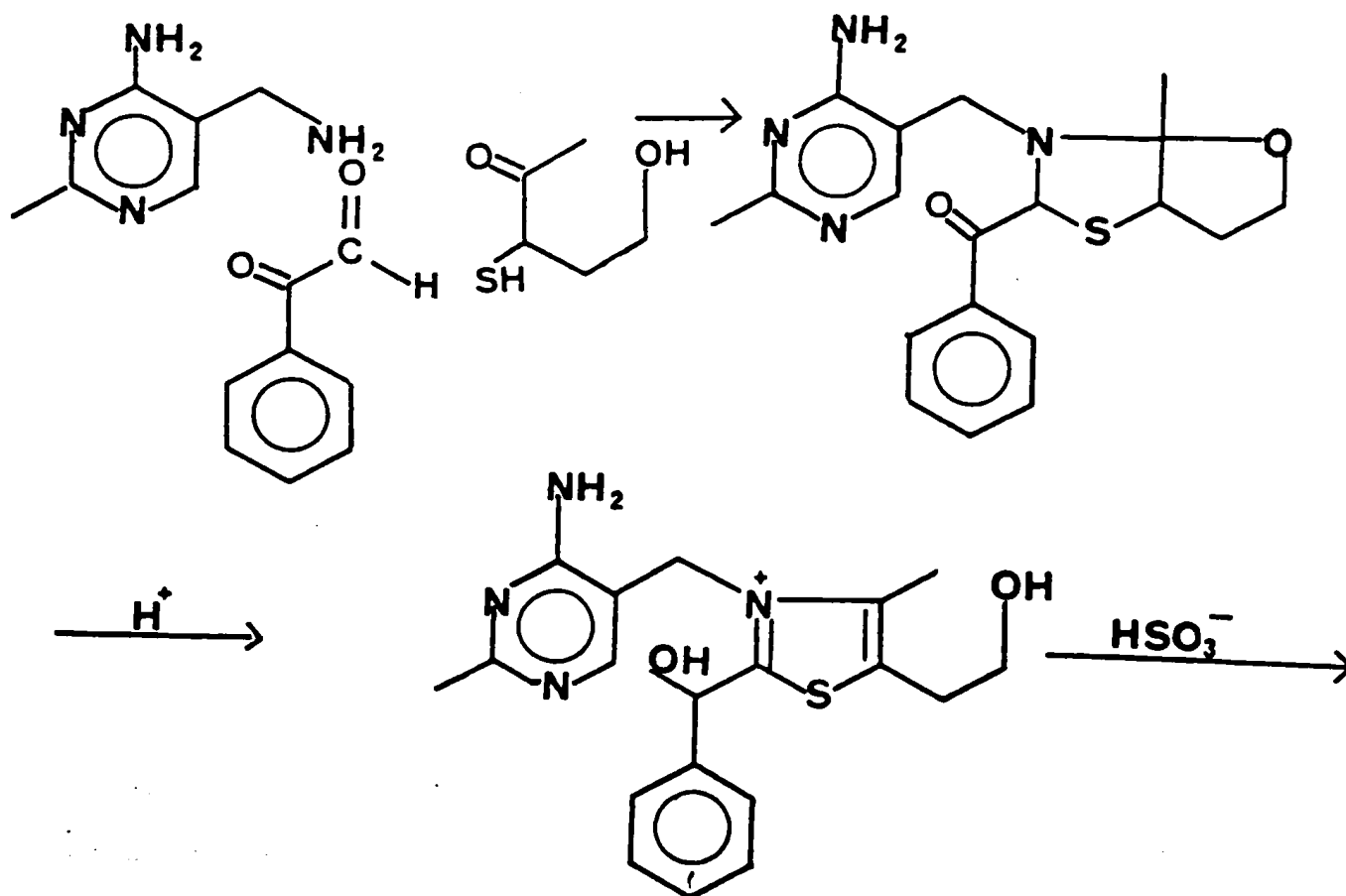
1,2,4 LA METHODE DE KISS ET COLL. (3)

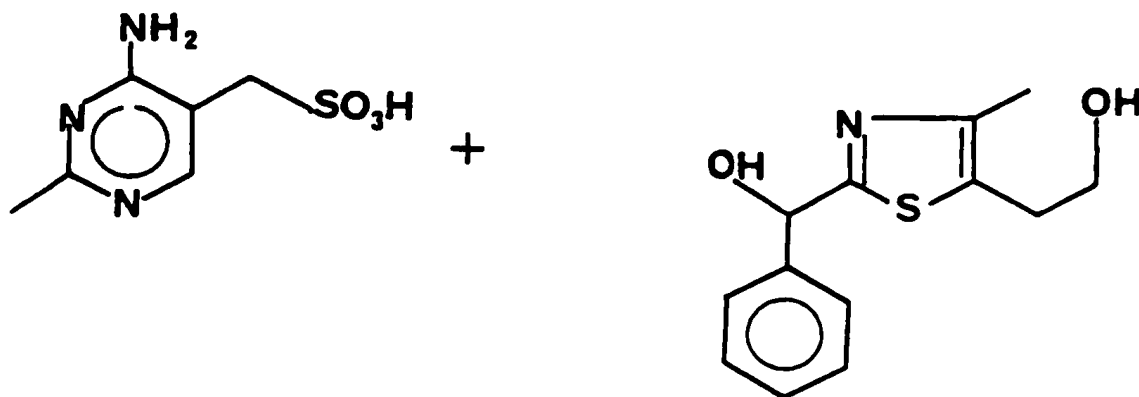
Elle consiste à condenser un magnésien sur un aldéhyde:



1,2,5 LA METHODE DE Y.OKA ET COLL. (5)

Elle consiste à préparer la "dihydro-thiamine" puis à la transformer en thiamine que l'on clive au bisulfite. Exemple de Y.OKA:





Nous avons choisi d'abord la méthode de Y.OKA mais nous n'avons pas pu réaliser la condensation avec le dihydroxy-3,4 phénylglyoxal.

Nous avons alors décidé d'utiliser la méthode d'ERLENMEYER, celle-ci nous paraissant plus facile à mettre en œuvre que celle de KISS et coll. IL nous a fallu mettre au point une méthode de protection des aldéhydes et du thiazole XV.

1,2,6 UTILISATION DE LA METHODE DE ERLLENMEYER

1,2,6,1 PROTECTION DU THIAZOLE XV

La protection de l'OH libre du thiazole XV a été faite de différentes façons: par un "tétrahydropyranyl" (THP) XX; mais le produit obtenu est liquide et difficile à conserver anhydre;

par un "benzyl" XXI; mais on ne peut plus l'ôter par hydrogénation catalytique, le thiazole empoisonnant le catalyseur;

Par un "trityl"; on obtient facilement un produit cristallin facile à déprotéger et convenant à l'usage recherché.

1,2,6,2 PROTECTION DES ALDEHYDES

La protection de l'OH d'aldéhyde phénol est extrêmement difficile à réaliser. Le THP est impossible à introduire car l'aldéhyde ne supporte pas les conditions acides nécessaires (hémiacétalisation intermoléculaire?). L'utilisation

du benzyle est risquée. car on n'est pas assuré de pouvoir déprotéger par hydrogénation le thiazole final. Le trityl est obtenu avec de mauvais rendements. Le triméthylsilyl (TMS) a été choisi car c'était le seul possible, bien qu'il soit sensible à l'hydrolyse et donc délicat à manipuler.

1,2,6,3 CONDENSATION DU THIAZOLE PROTEGE AVEC UN ALDEHYDE

Cette condensation doit se faire dans des conditions aussi anhydres que possible dans un solvant capable de maintenir en solution à basse température réactifs et produits. Le tétrahydrofurane (THF) a été choisi.

Dans un premier temps le thiazole XX ou XXX est amené à réagir avec du n-butyl lithium qui le métalle en 2, puis on ajoute l'aldéhyde dissous dans du THF. On verse alors le mélange réactionnel dans l'eau et on fait buller CO_2 pour précipiter le carbonate de Li.

Cette condensation donne de bons résultats avec les aldéhydes XLII et XXXVII, moyens avec XXXVIII, mauvais avec XXXV et ne marche pas avec XLV.

1,2,6,4 DEPROTECTION DES THIAZOLES OBTENUS

- Par le THP: reflux dans l'acide acétique à 50% pendant une heure puis agitation avec du méthylate de Na 0,5 N pendant la nuit (pour hydrolyser les acétates qui se forment).

- Par le trityl: agitation la nuit dans THF-HCl 4 N (50-50) à température ambiante.

1,3 ESSAIS BIOLOGIQUES DES "THIAZOLES" AINSI OBTENUS

Nous avons employé deux méthodes.

- La bioautographie avec E.coli (26-43) auxotrophe pour le thiazole XV. Elle a pour avantage une purification supplémentaire par chromatographie sur plaque de silice, pour inconvénient une extrême sensibilité au thiazole XV, comme inconnue la perméabilité cellulaire à ces thiazoles modifiés (nous avons vérifié que HET ne rentre pas) et l'endroit où est muté E.coli (26-43).

- L'essai en milieu liquide sur E.coli (83-1) auxotrophe pour le shikimate, qui utilise le fait que, après traitement par l'adénosine selon (21), (83-1) ne synthétise de la thiamine qu'en présence de tyrosine. Nous avons testé ces produits en remplacement de la tyrosine.

Pour les bioautographies, précisons d'abord que, à la dose de 10 -20 µg déposée au départ de la chromatographie, tous les thiazoles testés -sauf XVIII et XIX- font répondre (26-43) . Nous avons cherché la limite de sensibilité pour chaque thiazole en déposant sur une plaque de silice des quantités décroissantes de chaque thiazole. Sur le tableau ci-dessous, nous avons indiqué les sensibilités maximum obtenues.

THIAZOLE NUMERO	LIMITE DE DETECTION	THIAZOLE NUMERO	LIMITE DE DETECTION
XV	50-100 µg	XXIV	1-2 µg
XVI	1-2 ng	XXV	50-100 ng
XVIII	ne supplémente pas	XXVI	1-2 µg
XIX	inhibiteur	XXVII	50-100 ng
XXI	1-2 µg	XXVIII	1-2 µg
XXII	1-2 µg	XXIII	1-2 µg

La sensibilité la plus grande est observée pour le thiazole XV. Ce thiazole est considéré, lui ou son phosphate en 5, comme le précurseur de la thiamine; il est donc normal d'observer une telle sensibilité.

Le thiazole XVI suscite une réponse importante car il est probablement utilisé comme le thiazole XV, pour faire HET qui est utilisée comme vitamine B1.

Pour les autres, ou ils ne supplémentent pas, ou une forte concentration est nécessaire. Deux d'entre eux toutefois se singularisent par une réponse à une quantité déposée faible.

Dans presque tous ces thiazoles, nous avons détecté des traces du thiazole XV. Nous avons aussi observé que le thiazole XXVII évolue en solution (du moins à travers la révélation des bioautographies!).

Cette évolution en solution du thiazole XXVII a été observée dans le méthanol, seul solvant courant, avec l'eau, où il soit légèrement soluble. Dans ce thiazole XXVII on a toujours noté une quantité de thiazole XV plus grande que dans les autres, quantité qui augmente avec le vieillissement de la solution. Il apparait aussi, dans ces conditions, (solution dans le méthanol neutre), un produit actif qui migre beaucoup plus que le thiazole XV dans le solvant d'étude utilisé. Ces faits laissent supposer une décomposition du thiazole XXVII en thiazole XV. Cette décomposition est accélérée par dépôt sur silice.

Pour assurer ce résultat nous avons utilisé la technique de la chromatographie en double dimension. En effet, la première migration sépare le thiazole XV et le thiazole XXVII. Si le thiazole XXVII se transforme réellement en thiazole XV, la seconde migration les séparera et la révélation mettra en évidence ce thiazole XV. C'est ce qui a lieu. De plus, la quantité de thiazole XV réapparu dépend du temps écoulé entre les deux migrations, de même que la quantité du

produit inconnu. Pour identifier ce produit inconnu, on a cherché à augmenter la décomposition en augmentant le délai et en essayant diverses conditions: méthylate de Na ou HCl dans le méthanol. Les quantités de thiazole XV apparues dans ces conditions sont les mêmes que dans le témoin. Ces quantités restent faibles (invisible sur plaques en UV) mais deviennent grandes pour (26-43). Au cours de ces essais en deux dimensions nous avons observé que le thiazole XXVII lui-même n'est que peu actif.

Ces résultats négatifs obtenus avec (26-43) ne sont pas concluants. En effet on ignore où est muté (26-43). Si cet endroit est la dernière étape, tous nos essais sont vains. C'est pourquoi on a examiné l'aptitude de cellules de (83-1) à synthétiser de la thiamine sans tyrosine quand on leur fournit ces thiazoles puisqu'elles ne présentent aucune déficience pour la biosynthèse du thiazole XV.

ADDITIFS AU MILIEU D'INCUBATION	VITAMINE B ₁ SYNTHETISEE PAR LES CELLULES EN PMOLES/MG DE CELLULES
Sans	70
Tyrosine 74 µg	750
Thiazole XXV 125µg (c= 5 10 ⁻⁴ M)	130
Thiazole XXV 250 µg (c= 10 ⁻³ M)	260
Thiazole XXVII 125 µg (c= 5 10 ⁻⁴ M)	130
Thiazole XXVII 25 µg (c= 10 ⁻⁴ M)	260

Ces faibles résultats positifs sont entièrement attribuables au thiazole XV contaminant (1/1000) d'après les bioautographies. Ces produits ne sont donc pas utilisés par (83-1) pour faire de la thiamine. Ils ne sont probablement pas précurseurs, et on ne peut pas affirmer qu'un quelconque de ces produits est un intermédiaire. Il faut apporter une réserve aux conclusions: il est possible qu'un

empêchement à l'entrée interdirait leur utilisation par les cellules. Il est aussi possible que les vrais intermédiaires soient phosphorylés en 5 et que les produits étudiés, ne pouvant pas servir de substrat à la kinase du thiazole XV, ne puissent pas être utilisés. Seul point positif, le thiazole XXVII est une source potentielle et limitée de thiazole XV, par un mécanisme non encore éclairci. C'est un fait qui mérite d'être approfondi; ainsi que le produit inconnu détecté après vieillissement de la solution méthanolique.

empêchement à l'entrée interdirait leur utilisation par les cellules. Il est aussi possible que les vrais intermédiaires soient phosphorylés en 5 et que les produits étudiés, ne pouvant pas servir de substrat à la kinase du thiazole XV, ne puissent pas être utilisés. Seul point positif, le thiazole XXVII est une source potentielle et limitée de thiazole XV, par un mécanisme non encore éclairci. C'est un fait qui mérite d'être approfondi; ainsi que le produit inconnu détecté après vieillissement de la solution méthanolique.

2 DEUXIEME PARTIE2,1 INTRODUCTION

Dans des extraits de divers micro-organismes, BROWN (29) a détecté la présence de α hydroxy éthyl thiamine (HET) à côté de la thiamine proprement dite, en particulier pour E.coli en fin de croissance exponentielle. La quantité de HET a été estimée sensiblement supérieure à celle de la thiamine elle-même.

Pour qui étudie la biosynthèse de la thiamine, l'existence de ces deux formes peut avoir une importance dans les expériences avec traceurs. En effet la mesure exacte du taux d'incorporation du traceur suppose la connaissance précise de la quantité exacte de thiamine endogène entraînée.

Or, certaines méthodes de dosages couramment utilisées (30, 31, 32) dont les méthodes bactériologiques avec un Lactobacille prennent en compte les deux formes à la fois, d'autres, (33) presque uniquement la thiamine.

Dans notre laboratoire, à des fins d'études biogénétiques, une série d'expériences avaient été faites avec des suspensions de cellules lavées, cultivées en présence d'adénosine et rendues ainsi capables de faire, sans croissance, d'importantes quantités de thiamine dosable bactériologiquement. Après l'incubation, la teneur des cellules en thiamine dosable bactériologiquement était souvent dix fois la normale. Il avait été vérifié par bioautographie de chromatogrammes que la proportion de HET était faible dans ces extraits, bien inférieure à 50% du total, et on l'avait toujours considérée comme négligeable.

Des expériences ultérieures, dont la signification reposait sur la comparaison exacte de taux d'incorporation de traceurs, étant prévues, nous avons décidé d'examiner plus rigoureusement la teneur

des deux formes dans divers extraits susceptibles d'être utilisés dans les expériences prévues.

Une méthode avait été publiée (23) permettant de doser les deux formes sans séparation. Il s'agit d'une méthode au thiochrome (XXXV). Elle utilise le fait que le complexe chloromercurique en milieu basique oxyde seulement la thiamine en thiochrome. D'autre part, HET peut être oxydé en thiochrome par le ferricyanure alcalin après destruction totale de la thiamine en cinq minutes en milieu basique et en présence d'une faible concentration d'ions mercuriques.

Ce procédé, appliqué à la lettre, nous a conduit à des résultats aberrants pour le dosage de HET. Contrairement à la publication, les ions mercure ne conduisent pas à une destruction totale de la thiamine en cinq minutes en présence de l'extrait, et, d'autre part, détruisent une partie de HET. Néanmoins, le principe était bon: en quadruplant la concentration en ions mercuriques, on détruit entièrement la thiamine en cinq minutes. D'autre part le taux de destruction de HET dépend de la quantité d'extrait, qui joue un rôle protecteur. Il est devenu nécessaire d'utiliser un étalonnage interne.

Avec ces modifications et l'utilisation d'un spectrofluorimètre, on peut doser avec une incertitude inférieure à 5% 20 ng de HET en présence de 200 à 300 ng de thiamine.

2,2 PROPORTION DES DEUX FORMES DANS LES EXTRAITS

L'application de cette méthode nous a d'abord permis de confirmer le résultat semi-quantitatif de BROWN : pour diverses souches de E.coli, dans les extraits de cellules prélevées pendant leur croissance exponentielle sur milieu sans thiamine, on a dosé 50-100 pmoles/mg, de HET pour une teneur en vitamine B₁ (T+ HET) de 75 à 100 pmoles/mg. Ce qui représente une proportion de HET voisine de 50%.

Pour les études biogénétiques, on utilise des suspensions de cellules lavées. Ces cellules ont été cultivées dans des conditions où leur teneur en vitamine B₁ a été artificiellement abaissée, ce qui a vraisemblablement provoqué une dérégulation de la biosynthèse. Pendant une incubation ultérieure d'une heure, ces cellules, indépendamment de leur croissance, synthétisent des quantités importantes de thiamine; de sorte qu'à partir d'une valeur initiale inférieure à la normale (du tiers à la moitié), la teneur en vitamine B₁ monte à une valeur de 5 à 10 fois supérieure. Avant incubation, les cellules venant de croître sur thiamine limitante ont une proportion de HET voisine de 50%, comme les cellules normales (10-20 pmoles/mg). Après incubation la proportion de HET dépend des conditions de l'incubation et de la souche.

Pour le mutant (70-17) auxotrophe pour la pyramine (XXXVI), dont la dérégulation est obtenue par limitation de XXXVI pendant la croissance, la proportion de HET est voisine de 35% après une incubation avec agitation (teneur totale en vitamine B₁ 750 pmoles/mg de cellules initiales). Sans agitation (suspension stagnante dans un erlen ou dans un tube de centrifugeuse) la proportion est voisine de 20% pour une même quantité totale de vitamine B₁.

L'autre souche couramment utilisée dans les études biogénétiques est le mutant de E.coli W (83-1) auxotrophe pour le shikimate. La dérégulation est obtenue par addition d'adénosine pendant la croissance selon (21). L'adénosine bloque la synthèse de XXXVI et il en résulte un abaissement de la concentration en thiamine pendant la croissance. Après une incubation sans phénylalanine ni tryptophane (croissance strictement impossible), sans agitation la proportion de HET est d'environ 12% pour une teneur en vitamine B₁ de 1 nmole par mg.

Dans les conditions d'incubation couramment utilisées (semi-anaérobiose), la proportion de la forme non identifiable à la thiamine proprement dite ne dépasse pas 20%. Il est clair que la présence de cette autre forme de vitamine B₁ dans les extraits ne peut pas perturber gravement les conclusions de certaines expériences biogénétiques: celles dont le but est d'examiner seulement l'incorporation ou la non incorporation d'un composé marqué. C'est une justification a posteriori du bien fondé des conclusions de ces expériences. Cela peut alors tout au plus contribuer à perturber les détails des résultats: que la tyrosine ait paru subir une dilution inexplicable par 2, chez un mutant auxotrophe pour le shikimate (1), lors de son incorporation dans la thiamine, est en partie explicable ainsi.

Mais s'il importe de comparer avec la précision permise par les mesures, (dosage de la thiamine et comptages radio-actifs), soit globalement 5%, le taux d'incorporation quand certaines conditions d'incubation varient, (par exemple du S de sulfate marqué en présence de divers compétiteurs soufrés) il convient de doser la thiamine proprement dite à l'exclusion de l'autre forme. A priori la proportion de l'autre forme peut fluctuer ou même dépendre des conditions précises de l'incubation elle-même.

Le seul avantage du dosage bactériologique est qu'il nécessite moins d'extrait. Mais le dosage au thiochrome n'en nécessite pas plus si on se contente de doser la thiamine proprement dite. Il est donc dans tous les cas préférable.

2,3 ORIGINE ET IDENTITE DE HET

Cet aspect pratique du problème étant résolu, nous avons cherché à éclaircir l'origine et la signification métabolique de ce qui

est dosable comme HET dans les extraits de E.coli.

Tout d'abord nous avons tenté d'établir qu'il ne s'agit pas d'un artefact d'extraction. Nous avons comparé les extraits de deux lots identiques de cellules. L'un a été soumis à une centrifugation pour séparer les cellules du milieu d'incubation et, comme d'habitude, a été resuspendu dans du tampon acétate ph 4,6 et chauffé 15 minutes à 10°C.

L'autre a été extrait par addition d'acide perchlorique dans le milieu d'incubation lui-même selon le procédé de AIRTH et FOERSTER (35). Les métabolites des cellules sont figés dans l'état où ils se trouvent (à condition qu'ils soient stables dans ces conditions), les enzymes sont inactivées instantanément. Les quantités de thiamine et de HET sont sensiblement les mêmes dans les deux cas. Ce qu'on dose sous forme de HET préexiste dans les cellules.

Mais s'agit-il vraiment de HET? Tout ce qu'on peut affirmer c'est que ce composé se comporte vis-à-vis du dosage comme HET: il est non oxydable en thiochrome par les ions Hg^{2+} , oxydable par le ferricyanure, et relativement stable en milieu alcalin. D'autres composés connus (hydroxyméthyl thiamine, dihydroxyéthyl thiamine) ont un comportement analogue.

Par bioautographie avec L. fermenti de chromatogrammes cellulose des extraits, nous avons, comme BROWN, vérifié que deux taches seulement étaient révélables. L'une correspond à la thiamine, l'autre à l'HET. Mais les séparations de ces analogues par chromatographie sont très difficiles. Nous avons cherché à vérifier plus nettement l'identité des formes en présence. Pour cela nous avons fait incuber des suspensions cellulaires préparées comme pour les expériences biogénétiques mais en remplaçant le facteur de biosynthèse par de la thiamine marquée au ^{14}C sur le C-2 du thiazole.

En principe ces cellules sont inaptes à synthétiser par elles-mêmes de la thiamine. Elles ne peuvent qu'incorporer celle qui leur est fournie dans le milieu. Au bout d'une heure on fait l'extraction des cellules. Après dosage des deux formes de vitamine B1, on ajoute de la thiamine et de l'HET inactive comme entraîneur. Les thiazoles XV et XVI issus du clivage bisulfite sont séparés très aisément par chromatographie sur une colonne de silice. On mesure leur activité spécifique dont on vérifie la constance au cours d'une seconde chromatographie.

Les résultats sont rassemblés dans les deux tableaux ci-dessous.

2,4 INCORPORATION DE LA THIAMINE MARQUEE PAR DES CELLULES DE LA SOUCHE 83-1

ESSAI NUMERO	0	1	2	3
QUANTITE DE CELLULES EN MG	22	22	22	0
DOSAGE EN NG TOTAL:				
T	170	5000	4000	6100
HET	170	174	780	0
A.S. MESUREE DU TZ XV EN D.P.M./ μ mole		2750	2013	3077
A.S. MESUREE DU TZ XVI EN D.P.M./ μ mole		0	327	0
A.S. CALCULEE SUR LA T ENTRAINEE EN D.P.M./ μ mole		42,8 10^6	47,7 10^6	39,2 10^6
A.S. CALCULEE SUR HET ENTRAINEE EN D.P.M./ μ mole		0	38,6 10^6	0
FRACTION DE L'ACTIVITE TOTALE INTRODUITE SUR				
T		83,5%	65%	100%
HET		0%	11%	0%
T+HET		83,5%	76%	100%

Dans l'essai n°2, on a ajouté 0,6 ml de la solution de T ¹⁴C au milieu d'incubation; après incubation, les cellules ont été lavées et extraites. L'extrait a été purifié sur une colonne de CG 50 H⁺. Dans les essais n° 0 et 1, le milieu d'incubation ne contenait aucun additif; mais, pour l'essai n°1 on a ajouté 0,6 ml de la solution de T ¹⁴C au culot de cellules avant l'extraction. Enfin dans l'essai n°3, en l'absence de toute cellule on a simplement dilué à 25 ml 0,6 ml de la solution de T ¹⁴C.

2,5 INCORPORATION DE LA THIAMINE MARQUEE PAR DES CELLULES DE LA SOUCHE 70-17

ESSAI NUMERO	0	1	2	3
QUANTITE DE CELLULES EN MG	17	17	17	0
DOSAGE EN NG TOTAL:				
T	110	5200	3100	6200
HET	40	60	1200	0
A.S. MESUREE DU TZ XV EN D.P.M./ μ mole		2378	1368	2800
A.S. MESUREE DU TZ XVI EN D.P.M./ μ mole		0	615	0
A.S. CALCULEE SUR LA T ENTRAINEE EN				
D.P.M./ μ mole		$36,9 \cdot 10^6$	$36,1 \cdot 10^6$	$35,7 \cdot 10^6$
A.S. CALCULEE SUR HET ENTRAINEE EN				
D.P.M./ μ mole		0	$40,5 \cdot 10^6$	0
FRACTION DE L'ACTIVITE TOTALE INTRODUITE SUR				
T		85%	49%	100%
HET		0%	19%	0%
T+HET		85%	68%	100%

Dans l'essai n°2, on a ajouté 0,6 ml de la solution de T ¹⁴C au milieu d'incubation; après incubation, les cellules ont été lavées et extraites. L'extrait a été purifié sur une colonne de CG 50 H⁺. Dans les essais n°0 et 1, le milieu d'incubation ne contenait aucun additif; mais, pour l'essai n°1 on a ajouté 0,6 ml de la solution de T ¹⁴C au culot de cellules avant l'extraction. Enfin dans l'essai n°3, en l'absence de toute cellule on a simplement dilué à 25 ml 0,6 ml de la solution de T ¹⁴C.

La proportion de HET dosée dans les extraits de 83-1 est environ 1/3 de celle dosée dans les extraits de 70-17. Mais, dans les deux cas, de l'activité a été entraînée par le thiazole XVI. L'activité spécifique calculée sur le composé extrait est très voisine de celle de la thiamine introduite, et de la thiamine extraite. De plus, cette cohérence confirme la validité des dosages utilisés et l'identité chimique du facteur apparenté à la thiamine et dosé à côté d'elle: il s'agit uniquement de HET qui se forme à partir de la thiamine ^{14}C introduite.

En passant, nous voulons tirer d'autres conclusions de ces expériences. Au cours d'une heure d'incubation, environ 70% de l'activité introduite dans le milieu sous forme de thiamine est retrouvée dans chacune des deux expériences soit sur la thiamine soit sur HET. Il reste environ 10% dans le milieu, non incorporé. Les pertes d'activité lors de l'extraction et de la purification se montent à 20% environ, comme le montre l'essai N°1 de chaque expérience. Il n'y a donc aucun renouvellement net du C-2 de la thiamine, pas plus chez les cellules où l'absence de tyrosine empêche la synthèse du thiazole XV que chez les cellules où l'absence de XXXVI exclu une synthèse nette de thiamine. Ce résultat est en contradiction totale avec les conclusions tirées récemment par BELLION et coll. (34) qui, dans des expériences analogues avec S. typhimurium, n'ont retrouvé que 30% de l'activité introduite sous forme de thiamine marquée, ce qu'ils attribuent à un renouvellement. En fait, une partie est fixée par HET qu'ils ignorent, une partie non mesurée par eux est restée dans le milieu, et leur expérience n'a que peu de signification.

Un dernier problème nous a préoccupé: les facteurs dont dépend la proportion de HET et le mécanisme de sa formation.

Il est clair que la présence de HET résulte du rôle coenzymatique de la thiamine pyrophosphate (TPP) dans la décarboxylation de l'acide pyruvique. Le pyrophosphate de HET est apparenté au carbanion intermédiaire qui constitue le produit de la décarboxylation et la forme biologiquement active de l'acétaldéhyde. Si cet intermédiaire se sépare de l'enzyme, il se protone et se transforme en pyrophosphate de HET. Cette séparation peut avoir lieu, soit uniquement au moment de la dénaturation de l'enzyme (extraction), soit par déplacement équilibré par la TPP. Quoi qu'il en soit, cela suppose qu'une concentration importante du carbanion intermédiaire existe dans la déshydrogénase du pyruvate.

Pendant l'incubation des cellules où la biosynthèse de la thiamine a été dérégulée, la synthèse de la thiamine est accompagnée d'une forte augmentation de la teneur en HET. Ce fait pourrait s'expliquer à la lumière de l'étude par DIETRICH et coll. (38) sur l'induction de la déshydrogénase du pyruvate chez E.coli K12 par son substrat. Le défaut de thiamine pendant la croissance a pu provoquer une accumulation de pyruvate et, en conséquence, une induction de la synthèse de l'apoenzyme. Pendant la synthèse ultérieure de coenzyme, celui-ci se fixe sur l'apoenzyme. Par suite de caractéristiques cinétiques particulières, la forme de carbanion intermédiaire serait présente en proportion importante. Nous avons pu en fait vérifier que chez des cellules en croissance normale, n'ayant à aucun moment subi de limitation en thiamine, la quantité de HET croissait si on fournissait de la thiamine exogène:

Voici en effet la concentration en HET trouvée dans une culture de (83-1) en croissance exponentielle, en fonction de la quantité de thiamine exogène fournie.

<u>THIAMINE FOURNIE</u>	<u>HET TROUVEE</u>
0	50 pmoles
1 mmole	250 pmoles
10 mmoles	300 pmoles

L'état initial des cellules et leur teneur en déshydrogénase du pyruvate n'a que peu d'influence sur la teneur ultérieure en HET.

En revanche on a vu que, selon les conditions d'incubation, la teneur en HET peut varier du simple au triple pour une même concentration en vitamine B1. L'aérobiose favorise l'accumulation de HET.

Pour terminer nous pouvons dire que désormais, dans des expériences biogénétiques, il faudra tenir compte du fait HET. Loin d'être un inconvénient, cette présence permettra de connaître la marque du "pool" pyruvate (et acétyl CoA) pendant la croissance, ce qui peut être très précieux.

PLAN DE LA PARTIE EXPERIMENTALE

- 1 SYNTHESES CHIMIQUES
- 1,1 PREPARATION DES NITRILES
- 1,2 PREPARATION DES AMIDES
- 1,3 REACTION AVEC P_2S_5
- 1,4 PREPARATION DES THIOAMIDES
- 1,5 PREPARATION DES THIAZOLES CETONIQUES
- 1,6 REDUCTION DES THIAZOLES CETONIQUES
- 1,7 ESSAIS DE CONDENSATION DES THIOAMIDES AVEC LES HALO CETONES
- 1,8 CONDENSATION DES GLYOXALS
- 1,9 SYNTHESE DU THIAZOLE XVII
- 1,10 SYNTHESE DU THIAZOLE XVIII
- 1,11 SYNTHESE DU THIAZOLE XIX
- 1,12 DEMETHYLATION
- 1,13 SYNTHESE DU THIAZOLE XX
- 1,14 SYNTHESE DU THIAZOLE XXXI
- 1,15 SYNTHESE DU THIAZOLE XXX
- 1,16 SYNTHESE DES TRIMETHYLSILYL ALDEHYDES
- 1,17 PREPARATION DE XLI
- 1,18 CONDENSATION DU THIAZOLE LITHIE EN 2 AVEC LES ALDEHYDES
- 1,18,1 UTILISATION DE XXX
- 1,18,2 UTILISATION DE XX
- 2 ETUDE DE LA THIAMINE DANS LES EXTRAITS BACTERIENS
- 2,1 SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES
- 2,2 CULTURES ET INCUBATIONS
- 2,3 EXTRATION DE LA VITAMINE B_1

2,4	DOSAGES DE LA VITAMINE B1
2,4,1	DOSAGE DE LA THIAMINE SEULE
2,4,2	DOSAGE DE HET SEULE
2,5	BIOAUTOGRAPHIES
2,6	EXPERIENCES RADIO-ACTIVES
2,7	SOLVANTS DE CHROMATOGRAPHIE DES THIAZOLES

SYNTHESES CHIMIQUESPREPARATION DES NITRILES1
1,1

Dans un erlen de un litre on introduit successivement et sous agitation vigoureuse 250 ml d'éther, 200 mmoles environ d'aldéhyde, 250 ml d'eau, 26 g de KCN (400 mmoles), et un excès de 1,5 fois de chlorure de benzoyle. Une agitation très forte est maintenue pendant trois heures. La phase éther est décantée puis lavée par 4X100 ml de soude à 10%, 100 ml d'hydrogénosulfite concentré puis évaporée; l'huile ou les cristaux obtenus sont dissous à chaud dans le minimum de toluène. La cristallisation a lieu au congélateur, les cristaux obtenus sont filtrés et séchés.

ALDEHYDE DE DEPARTNITRILE OBTENU

Benzaldéhyde

Benzoxy-2 phényl-2 acétonitrile (I) PF: 63°C (Litt. 63°C) 95% rdt. RMN acétone D6: δ 6,7 (1H, s, CH-2); 7,5 (8H, m, aro); 7,9 (1H, d, aro); 8,1 (1H, d, aro).

Méthoxy-4 benzal-
déhyde (XLII)

Benzoxy-2 (Méthoxy-4 phényl)-2 acétonitrile (II) PF: 65°C (Litt. 66°C) 95% rdt. UV λ_{max} : 235 m μ ϵ : 26000. RMN acétone D6: δ 3,68 (3H, s, OMe); 6,6 (1H, s, CH-2); 7 (1H, d, aro); 7,1 (1H, d, aro); 7,7 (5H, m, aro); 8,2 (1H, d, aro); 8,3 (1H, d, aro).

Hydroxy-4 benza-
déhyde (XLIII)

Benzoxy-2 (Benzoxy-4 phényl)-2 acétonitrile (VI) PF: 144°C (Litt. 143-144°C) 85% rdt UV λ_{max} : 236 m μ ϵ : 30300. RMN acétone D6 δ 6,8 (1H, s, CH-2); 7,5 (10H, m, aro); 8 (4H, m, aro).

Hydroxy-4 méthoxy-3
benzaldéhyde (XLIV)

Benzoxy-2 (Benzoxy-4 méthoxy-3 phényl)-2 acétonitrile (III) PF: 147-148°C (Litt 147-8°C) RMN acétone D6 δ 3,8 (3H, s, OMe); 6,7 (1H, s, CH-2); 7,5 (10H, m, aro); 8 (3H, m, aro).

Diméthoxy-3,4 benz-aldéhyde (XXXVII)	Benzoxy-2 (Diméthoxy-3,4 phényl)-2 acétonitrile (IV) PF: 60°C (Litt. 61°C) 80% rdt. RMN acétone D6 δ 3,8(6H,s,2 OMe);6,6(1H,s,CH-2);7,9(1H,d,aro);8,1(1H,d,aro).
Dihydroxy-3,4 benz-aldéhyde (XLV)	Benzoxy-2 (Dibenzoxy-3,4 phényl)-2 acétonitrile (V) PF: 147°C 88% rdt. Analyse pour C ₂₄ H ₁₉ N O ₆ PM: 393 % calculé: C 72,85; H 4,01; N 2,93; O 20,11; % trouvé: C 72,56; H 4,19; N 2,89; O 20,13. UV: λ_{max} : 238 m μ ϵ : 43700. RMN acétone D6 δ 7,1(1H,s,CH-2); 7,5(12H,m,aro);8,1(6H,m,aro).

1,2 PREPARATION DES AMIDES D'APRES (13)

Un mélange contenant: 2 g de nitrile, 15 ml d'acide acétique, 2 ml d'eau et 0,5 g d'acétate de zinc est laissé à reflux toute la nuit. Le mélange est alors versé dans 100 ml d'eau sous agitation violente. Les cristaux sont filtrés et recristallisés dans le toluène.

<u>PRODUIT DE DEPART</u>	<u>AMIDE OBTENUE</u>
I	Benzoyl-2 phényl-2 acétamide (VII) PF: 162-4°C (Litt 162-4°C) 75% rdt.
II	Benzoyl-2 (Méthoxy-4 phényl)-2 acétamide SVIII) PF: 157°C (Litt 159°C) 40% rdt

1,3' REACTION DE VII AVEC P₂S₅

Un mélange comprenant: 1 g de VII, 1g de P₂S₅ et 10 ml de pyridine est chauffé à reflux pendant trente minutes. La pyridine est évaporée et le résidu est cristallisé dans du toluène; on obtient 1 g de I.

1,4 PREPARATION DES "THIOAMIDES"

Un appareil de KIPP est chargé de 2 Kg de FeS et de un litre d'acide sulfurique 4 M. On le fait débiter dans l'appareil suivant: Le gaz passe dans un tube de garde garni de Al_2S_3 fait selon (24). Il arrive dans un tube de piège de grande hauteur. Une soupape de sécurité tarée à 0,5 bar est mise en dérivation. Le piège est plongé dans de l'azote liquide par paliers durant deux heures au total de façon à piéger H_2S sous forme solide (PF: $-85,5^\circ C$) régulièrement sur toute la paroi interne du piège. Le piège est alors mis en communication avec deux tubes concentriques. Dans le tube intérieur on a introduit 10 g de nitrile plus 0,2 g de diéthylamine et, entre les deux tubes, de l'éthanol. L'azote liquide est enlevé du piège et H_2S solide se liquéfie. A ce moment on plonge les deux tubes concentriques par paliers dans l'azote liquide de façon à piéger sous forme solide H_2S qui distille du piège (PE: $-60,7^\circ C$ 1 atm); on en distille 60 ml. Quand la distillation est terminée on ôte l'azote liquide. Dès que l'éthanol est fondu (PF: $-117^\circ C$) le tube intérieur est mis dans une bombe après avoir été essuyé, puis la bombe est fermée et le tube laissé dans la bombe pendant trois heures à $30^\circ C$ (température critique $100^\circ C$, pression critique 100 atm). Après ce temps la bombe est mise lentement à la pression atmosphérique (H_2S est brûlé à la sortie). Le tube est récupéré, le résidu est recristallisé dans du toluène, la cristallisation ayant lieu au congélateur.

NITRILE DE DEPARTTHIOAMIDE OBTENUE

VI 10g (28 mmoles)

Benzoxy-2 (Benzoxy-4 phényl)-2 thioacétamide
(IX) PF: $149-150^\circ C$ 8g (20 mmoles) 73% rdt.
Analyse pour $C_{22}H_{17}N O_4S$ PM:391,5 % calculé
C 67,50; H 4,37; N 3,58; O 16,34; S 8,19;
% trouvé C 67,57; H 4,34; N 3,39; O 16,24;
S 8,28. RMN acétone D6 δ 6,6(1H,-,CH-2);7,5(10H,m,aro);8(4H,m,aro);9(2H,s,NH₂).

II 10 g (26 mmoles)

Benzoxy-2 (Méthoxy-4 phényl)-2 thioacétamide (X) PF: 106-7°C 7g (23 mmoles) 88% rdt.
Analyse pour $C_{16}H_{15}NO_3S$ PM: 301,4 % calculé C 63,76; H 5,02; N 4,64; O 15,93; S 10,64 % trouvé C 63,57; H 5,05; N 4,61; O 16,01; S 10,80. RMN acétone D6 δ 3,71(3H,s,OMe); 6,57(1H,s,CH-2); 7(1H,d,aro); 7,1(1H,d,aro); 7,7(5H,m,aro); 8,3(1H,d,aro); 8,4(1H,d,aro); 9,04(2H,s,NH₂).

III 5g (13 mmoles)

Benzoxy-2 (Méthoxy-3 benzoxy-4 phényl)-2 thioacétamide (XI) PF: 172°C 2g (5 mmoles) Analyse pour $C_{23}H_{19}NO_5S$ PM: 421 37% rdt. % calculé C 65,70; H 4,31; N 3,33; O 19,03; S 7,63; % trouvé C 65,61; H 4,98; N 3,40; O 17,66; S 6,66. (ce produit est très instable)

IV 15 g (50 mmoles)

Benzoxy-2 (Diméthoxy-3,4 phényl)-2 thioacétamide (XII) PF: 117°C 10 g (30 mmoles) 60% rdt. Analyse pour $C_{17}H_{17}NO_5S$ PM: 331,4 % calculé C 61,61; H 5,17; N 4,22; O 19,31; S 9,67; % trouvé C 61,79; H 5,33; N 4,36; O 19,28; S 9,87. RMN acétone D6 δ 3,75 (3H,s,OMe); 3,8(3H,s,OMe); 6,6(1H,s,CH-2); 7(5H,m,aro); 8,1(1H,d,aro); 8,2(1H,d,aro); 9(2H,s,NH₂).

V

Produit trop instable pour être isolé (XIII)

I 10g (48 mmoles)

Benzoxy-2 phényl-2 thioacétamide (XIV) PF: 141°C (Litt 142°C) 12 g (49 mmoles) 100% rdt. RMN acétone D6 δ 6,7(1H,s,CH-2); 7,5(8H,m,aro); 8,1(1H,d,aro); 8,2(1H,d,aro); 9(2H,s,NH₂).

1,5 PREPARATION DES "THIAZOLES CETONIQUES"

Dans des conditions aussi anhydres que possible, un mélange contenant un équivalent de chlorhydrate de thiamine, deux équivalents de triéthylamine et trois équivalents d'aldéhyde dans 50 ml de méthanol est chauffé à reflux pendant 24 heures. Au bout de ce temps la thiamine a disparu entièrement (dosage au thiochrome(XXXV) négatif). Le mélange est neutralisé par HCl à 10%, évaporé à sec et repris par du méthanol plus 10 g de silice. Le mélange est évaporé à sec et la silice est introduite en haut d'une colonne de silice équilibrée dans CHCl_3 -9 éthanol-1. La sortie du produit est suivie en UV. Les fractions qui le contiennent sont réunies et évaporées. Le "thiazole" obtenu est cristallisé dans du toluène.

ALDEHYDE DE DEPARTTHIAZOLE CETONIQUE OBTENU

XLII 5g (37 mmoles)	(Méthoxy-4 phényl), (Méthyl-4 (Hydroxy-2 éthyl)-5 thiazolyl-2) cétone (XXII) PF: 67°C (Litt 67-8°C) 1g (4,5 mmoles) 11% rdt. UV λ_{max} : 232 & 332 m μ ϵ_{max} : 4000 & 9300. RMN acétone D6 δ 2,3(3H,s,CH ₃ -4); 3(2H,t,CH ₂ -5); 3,8(2H,t,CH ₂ -5); 3,9(3H,s,OMe); 4,1(1H,s,OH); 7,1(2H,d,aro); 8,7(2H,d,aro).
XLIII 4g (32 mmoles)	(Hydroxy-4 phényl), (Méthyl-4 (Hydroxy-2 éthyl)-5 thiazolyl-2) cétone (XXIV) PF:176°C 2% rdt 150 mg (0,5 mmoles). Analyse pour C ₁₃ H ₁₃ N O ₃ S PM: 263 % calculé C 59,31; H 4,98; N 5,32; O 18,23; S 12,17; % trouvé C 58,53; H 5,09; N 5,38; O 18,38; S 12,02. UV λ_{max} : 236 & 333 m μ ϵ_{max} : 7300 & 17400. RMN acétone D6 δ 2,4(3H,s,CH ₃ -4); 3(2H,t,CH ₂ -5); 3,8(2H,t,CH ₂ -5); 4,1(1H,s,OH); 7(2H,d,aro); 8,6(2H,d,aro); 9,6(1H,s,OH phénol).

XLIV 13 g
(85,5 mmoles)

(Hydroxy-4 méthoxy-3 phényl), (Méthyl-4
(Hydroxy-2 éthyl)-5 thiazolyl-2) cétone
(XXVI) 300 mg (1 mmole) 1% rdt PF: 139°C.
Analyse pour $C_{14}H_{15}N O_4S$ PM: 293 % calculé
C 57,32; H 5,15; N 4,77; O 21,81; S 10,93; %
trouvé C 57,20; H 5,10; N 4,82; O 21,59; S
10,63. UV λ_{max} : 244 & 347 m μ ϵ_{max} : 9500 &
16600. RMN acétone D6 δ 2,6(3H,s,CH₃-4); 3,1(
2H,t,CH₂-5); 3,9(2H,t,CH₂-5); 4(3H,s,OMe); 4,1(
1H,s,OH); 7(1h,d,aro); 8,2(1H,s,aro); 8,5(1H,d,
aro); 9,1(1H,s,OH phénol).

1,6 REDUCTION DES " THIAZOLES CETONIQUES "

Un mélange contenant la cétone à réduire, un excès de quatre fois de borohydrure et 50 ml de méthanol est agité pendant une heure. L'excès de borohydrure est alors détruit par addition d'acide formique. Le mélange est alors évaporé à sec, repris par un mélange CHCl₃-méthanol 9-1 et chromatographié sur une colonne de silice équilibrée dans le même mélange. Les fractions contenant le produit recherché sont rassemblées et le solvant est évaporé. Le résidu est cristallisé dans un mélange acétate d'éthyle-hexane 9-1. Les cristaux sont alors filtrés et séchés sous vide.

THIAZOLE CETONIQUE

THIAZOLE OBTENU

XXII 1 g (3,6 mmoles) ((Méthoxy-4 phényl) Hydroxyméthyl)-2 méthyl-4
(Hydroxy-2 éthyl)-5 thiazole (XXIII) 700 mg
(2,5 mmoles) 70% rdt PF: 91-92°C (Litt 92°C).
RMN acétone D6 δ 2,1(3H,s,CH₃-4); 2,8(2H,t,CH₂-5);
3,6(2H,t,CH₂-5); 3,7(3H,s,OMe); 4,2(1H,s,OH)
; 5,8(1H,s,CH-2); 6,8(2H,d,aro); 7,4(2H,d,aro) .
UV λ_{max} : 230 & 252 m μ ϵ_{max} : 9000 & 8200.

XXIV 300 mg (1,1
mmoles)

((Hydroxy-4 phényl) Hydroxyméthyl)-2 méthyl-4
(Hydroxy-2 éthyl)-5 thiazole (XXV)

300 mg (1,1 mmoles) 99% rdt PF: 159°C.

Analyse pour $C_{13}H_{15}N O_3S$ PM: 265 % calculé

C 58,85; H 5,70; N 5,28; O 18,09; S 12,08;

% trouvé C 57,55; H 5,61; N 5,28; O 18,40;

S 11,86. UV λ_{max} : 223 & 272 ϵ_{max} : 9300 & 8500.

Spectre de masse :

M/e: 265 219 218 217 216 144 143 113 112

%: 11 35 44 36 29 51 29 21 19

M/e: 93 85 71 65 59 53 45 43

%: 14 30 14 22 17 19 22 100.

RMN acétone D6 δ 2,2 (3H, s, CH_3 -4); 2,8 (2H, t, CH_2 -5); 3,6 (2H, t, CH_2 -5); 4,1 (1H, s, OH); 5,8 (1H, s, CH-2); 6,8 (2H, d, aro); 7,4 (2H, d, aro); 8,5 (1H, s, OH phénol).

XXVI 100 mg
(0,34 mmole)

((Hydroxy-4 méthoxy-3 phényl) Hydroxyméthyl)-2
méthyl-4 (Hydroxy-2 éthyl)-5 thiazole (XXVII)

50 mg (0,17 mmole) 50% rdt. PF: 162°C.

Analyse pour $C_{14}H_{17}N O_4S$ PM: 295 % calculé

C 56,93; H 5,80; N 4,74; O 21,67; S 10,85;

% trouvé C 56,65; H 5,72; N 4,97; O 21,91; S

10,78. UV λ_{max} : 232 & 270 $m\mu$ ϵ_{max} : 7200 & 6800.

Spectre de masse:

M/e: 295 266 151 144 143 137 113 112

%: 50 22 36 100 50 30 40 30

M/e: 93 85 65 54 45

%: 33 23 46 36 33

RMN acétone D6 δ 2,2 (3H, s, CH_3 -4); 2,8 (2H, t, CH_2 -5); 3,6 (2H, t, CH_2 -5); 3,8 (3H, s, OMe); 4,2 (1H, s, OH); 5,8 (1H, s, CH-2); 6,7 (1H, d, aro); 6,9 (1H, d, aro); 7,2 (1H, s, aro); 7,9 (1H, s, phénol).

1,7 ESSAIS DE CONDENSATION DES THIOAMIDES IX,X,XI,XII & XIII SUR LES HALO CETONES XXXII,XXXIII & XXXIV.

La thioamide est dissoute dans un solvant auquel on ajoute la halo cétone, puis, après un temps donné, le solvant est évaporé, le résidu est traité la nuit par du méthylate 0,5 M, puis après neutralisation on recherche par CCM. la présence du thiazole attendu.

On observe tout d'abord que sans halo cétone les thioamides IX,X,XI,XII & XIII se décomposent en présence de base (triéthylamine, pyridine) pour donner le bromhydrate ou chlorhydrate correspondant.

Toutes les combinaisons de solvant et de halo cétone ont donné des résultats négatifs pour les thioamides IX,X,XI,XII & XIII. Les solvants suivants ont été essayés: halo cétone, benzène, toluène, CCl_4 , CHCl_3 , éthanol. A froid les produits de départ sont stables et ne subissent pas de transformation.

Avec la thioamide XIV les résultats ont été positifs dans les conditions suivantes:

solvant éthanol avec XXXII

solvant benzène avec XXXIV.

1,8 CONDENSATION DES "GLYOXALS"

La condensation du phényl glyoxal avec NaSH, XXXII et XXXV selon (4) permet d'obtenir le produit XXXVI avec un rendement de 38%. La même condensation effectuée avec du dihydroxy-3,4 phényl glyoxal n'a pas lieu. Le seul produit isolé est du soufre colloïdal.

1,9 SYNTHESE DU DIMETHYL-2,4 (ACETOXY-2 ETHYL)-5 THIAZOLE (XVII)

Une solution de 0,75 g de thioacétamide (10 mmoles), 3 g de XXXIV (13 mmoles), 10 g de tamis moléculaire et 40 ml de toluène anhydre est portée à reflux 4 heures à l'abri de la lumière. Le milieu réactionnel est filtré et le toluène est évaporé. A la gomme ainsi obtenue on ajoute 25 ml d'une solution saturée d'acide picrique dans l'alcool. Le picrate qui précipite est filtré et recristallisé dans l'alcool. On obtient 2 g de picrate de XVII PF: 113°C 47% rdt.

Analyse pour $C_{15}H_{16}N_4O_9S$ PM:428 % calculé C 42,06; H 3,76; N 13,08; O 33,61; S 7,48; % trouvé C 41,86; H 3,81; N 13,43; O 33,42; S 7,54. RMN acétone D6 δ 1,8 (3H, s, CH_3-5); 2,4 (3H, s, CH_3-4); 2,9 (3H, s, CH_3-2); 3,2 (2H, t, CH_2-5); 4,2 (2H, t, CH_2-5); 8,7 (2H, s, aro); 13,5 (1H, s, $\ddagger NH$).

1,10 SYNTHESE DU DIMETHYL-2,4 (HYDROXY-2 ETHYL)-5 THIAZOLE (XVIII)

Le picrate de XVII 1 g (2,3 mmoles) est dissous dans 50 ml de tampon pH6. Le thiazole est extrait par 5 fois 50 ml de CH_2Cl_2 . La solution est évaporée et l'huile obtenue est dissoute dans 20 ml de soude 0,1 N. Le mélange est porté à reflux pendant 2 heures. La solution ainsi obtenue est extraite par 5 fois 20 ml de CH_2Cl_2 . La solution est évaporée. Le résidu est dissous dans 25 ml d'une solution saturée d'acide picrique dans l'alcool. On obtient 0,6 g de picrate de XVIII 67% rdt PF:123°C (Litt(18) 120°C). RMN CF_3COOH δ 2,6 (3H, s, CH_3-4); 3,1 (3H, s, CH_3-2); 3,4 (2H, t, CH_2-5); 4,6 (2H, t, CH_2-5).

1,11 SYNTHESE DE L' AMINO-2 METHYL-4 (HYDROXY-2 ETHYL)-5 THIAZOLE (XIX)

Cette synthèse a été faite selon (17) en partant de thiourée et de XXXII. On a obtenu 80% rdt PF de XIX 2 HCl: 152-4°C (Litt 153)

1,12 DEMETHYLATION SELON (26)

0,5 g de XXII sont dissous dans 15 ml de CH_2Cl_2 anhydre. On y ajoute 3 g de BBr_3 dissous dans 15 ml de CH_2Cl_2 . Le milieu réactionnel est agité 20 heures à température ambiante, puis on ajoute goutte à goutte 30 ml d'eau. On ajoute 20 g de silice et on évapore à sec. La silice est déposée en haut d'une colonne de silice équilibrée dans $CHCl_3$ - méthanol 9-1. On obtient ainsi 200 mg de XXIV.

1,13 SYNTHESE DU (TETRAHYDROPYRANYL-2 OXY-2 ETHYL)-5 METHYL-4 THIAZOLE (XX)

Une solution contenant 3 g de XV (21 mmoles), 25 mg d'acide paratoluènesulfonique dans 20 ml de dihydro-2,3 pyranne est chauffée à reflux pendant 30 secondes. On ajoute 500 mg de K_2CO_3 . La solution

est alors agitée pendant 15 minutes, filtrée et évaporée à sec. L'huile obtenue est dissoute dans du toluène et l'eau est entraînée azéotropiquement. Le toluène est alors évaporé et l'on obtient une huile pure en CCM solvant acétate d'éthyle. On obtient 4,1 g (18 mmoles) 86% rdt. Analyse pour $C_{11}H_{17}N O_2S$ PM:227 % calculé C 58,12; H 7,57; S 14,08; % trouvé C 58,51; H 7,61; S 13,45. RMN CCl_4 δ 1,5 (6H,m,THP); 2,3 (3H,s, CH_3 -4); 3 (2H,t, CH_2 -5); 3,7 (4H,m, CH_2 -5+THP); 4,5 (1H,s,CH-THP); 8,5 (1H,s,H-2). UV λ_{max} : 250 m μ ϵ_{max} : 4000.

1,14 SYNTHESE DU (BENZYLOXY-2 ETHYL)-5 METHYL-4 THIAZOLE (XXXI)

Une solution de XV 1,43 g (10 mmoles) dans 20 ml de tétrahydrofurane (THF) est versée dans une suspension de NaH dans 20 ml de THF anhydre. L'agitation est continuée 20 minutes. On ajoute 15 mmoles de bromure de benzyle et on laisse 24 heures sous agitation à température ambiante. On ajoute 5 ml de méthanol, on filtre et on distille sous vide (PE: 140°C, 0,5 mm de Hg). On obtient 1,75 g de XXXI 75 % rdt. analyse pour $C_{13}H_{15}N O S$ PM:233 % calculé C 66,93; H 6,48; N 6,01 O 7,54; S 13,72; % trouvé C 66,60; H 6,60; N 5,03; O 7,54; S 14,49. RMN $CDCl_3$ δ 2,3 (3H,s, CH_3 -4); 3 (2H,t, CH_2 -5); 3,6 (2H,t, CH_2 -5); 4,5 (2H,s, CH_2 -benzyl); 7,3 (5H,s,aro); 8,5 (1H,s,H-2).

1,15 SYNTHESE DU (TRIPHENYLMETHOXY-2 ETHYL)-5 METHYL-4 THIAZOLE (XXX)

Une solution de XV 14,3 g (100 mmoles), et de chlorure de trityle 35 g (125 mmoles), dans 250 ml de pyridine anhydre est agitée 24 heures. Le chlorhydrate de pyridinium est filtré, la pyridine évaporée à sec. Le résidu est recristallisé dans du toluène avec filtrage à chaud pour enlever le reste de chlorhydrate de pyridinium. On ajoute un volume d'hexane avant de cristalliser au congélateur. On a obtenu 25 g de produit recristallisé PF: 124-5°C, les eaux-mères concentrées donnent 20 g PF: 124°C 95% rdt. Analyse pour $C_{25}H_{23}N O S$ PM: 385 % calculé C 77,89; H 6,02; N 3,63; O 4,14; S 8,30 % trouvé C 77,17; H 6,12; N 3,61; O 4,41; S 8,23. RMN $CDCl_3$ δ 2,3 (3H,s, CH_3 -4); 3 (2H,t, CH_2 -5); 3,3 (2H,t, CH_2 -5); 7,5 (1H,m, trityl); 8,5 (1H,s,H-2).

1,16 SYNTHESE DES TRIMETHYLSILYL ALDEHYDES

Dans un ballon on introduit successivement 10 mmoles de l'aldéhyde, 50 ml de THF anhydre, la quantité théorique de triméthylchlorosilane (TMCS) avec un excès de 5 mmoles, deux équivalents de triéthylamine calculés sur le TMCS. On porte à reflux pendant 4h, on filtre la solution, on évapore le solvant et on distille sous grand vide.

ALDEHYDE DE DEPARTTRIMETHYLSILYL ALDEHYDE OBTENU

XLIII 10 g
(82 mmoles)

Triméthylsiloxo-4 benzaldéhyde (XXXVIII)
11 g PE: 58°C 0,01 mm Hg (56 mmoles) 68% rdt.
Analyse pour $C_{10}H_{14}O_2Si$ PM: 198 % calculé
C 61,81; H 7,26; Si 14,50; % trouvé C 61,82;
H 7,15; Si 13,81. RMN CCl_4 δ 0,2(9H,s, CH_3-Si)
6,8(2H,d,aro); 7,7(2H,d,aro); 9,8(1H,s,CHO).

XLIV 10 g
(66 mmoles)

Triméthylsiloxo-4 méthoxy-3 benzaldéhyde
(XXXIX) 12 g PE: 80°C 0,01 mm Hg (53 mmoles)
81% rdt. Analyse pour $C_{11}H_{16}O_3Si$ PM: 224 % calculé
C 58,89; H 7,19; Si 12,52; % trouvé C
58,60; H 7,01; Si 12,41. RMN CCl_4 δ 0,2(9h,s,
 CH_3-Si); 3,8(3H,s,OMe); 7(1H,d,aro); 7,4(2H,m,
aro); 10,1(1H,s,CHO).

XLV 10 g
(77 mmoles)

Ditriméthylsiloxo-3,4 benzaldéhyde (XL) 12 g
(42 mmoles) PE: 90°C 0,01 mm Hg 55% rdt.
Analyse pour $C_{13}H_{22}O_3Si$ PM: 282 % calculé
C 55,27; H 7,87; Si 19,88; % trouvé C 55,43;
H 7,63; Si 19,61. RMN CCl_4 δ 0,2(18H,s, CH_3-Si)
7(1H,d,aro); 7,4(2H,m,aro); 9,9(1H,s,CHO).

1,17 PREPARATION DU TRIPHENYLMETHOXY-4 BENZALDEHYDE (XLI)

Dans 20 ml de THF on dissout sous azote 10 mmoles (1,22 g) de XLIII, puis on agite une heure à température ambiante. On ajoute alors 10 mmoles (2,75 g) de chlorure de trityle dissous dans 10 ml de THF

anhydre, on agite toute la nuit. On filtre et on évapore le solvant. La gomme obtenue est dissoute dans un mélange toluène-hexane 1-1. Après cristallisation au congélateur les cristaux sont recristallisés dans le même mélange. On obtient 1 g (3mmoles) PF: 138°C 33% rdt. Analyse pour $C_{26}H_{20}O_2$ PM: 364 % calculé C 85,69; H 5,23; O 8,78; % trouvé C 85,41; H 5,57; O 9,00. RMN $CDCl_3$ δ 6,8(2H,d,aro); 7,2(17H,aro) 9,6(1H,s,CHO).

1,18 CONDENSATION DU THIAZOLE LITHIE EN 2 SUR LES ALDEHYDES

Les produits sont séchés au dessiccateur sur P_2O_5 , le THF est distillé sous argon et sur KOH. Il est transvasé sous pression d'argon, stocké sous argon sur tamis ou sur Na.

La réaction a lieu dans un ballon à double enveloppe (sous agitation magnétique) muni d'une ampoule à brome isobare à double enveloppe. Dans la double enveloppe circule du méthanol à $-40^\circ C$. L'appareil est sous balayage d'argon. Le butyl Li est standardisé selon (28), mesuré par transvasement sous pression dans une éprouvette, puis transvasé dans le ballon sous pression d'argon. Dans le ballon on introduit 10 mmoles de XX (2,9 g), ou 3,85 g de XXX dissous dans 100 ml de THF anhydre, puis 11 mmoles de butyl Li. Une heure après on introduit l'aldéhyde (10 mmoles) puis 100 ml d'eau et on fait buller CO_2 jusqu'à pH 6-7. ON filtre le précipité de HCO_3Li .

1,18,1 Utilisation de XXX:

On évapore à sec, le résidu est repris par de l'acétone bouillante, on filtre, on ajoute de l'eau jusqu'au trouble et on laisse cristalliser la nuit au réfrigérateur.

ALÉHYDE DE DEPART

THIAZOLE OBTENU

Diméthoxy-3,4 benzaldéhyde (XXXVII) 10 mmoles (1,7 g)	((Diméthoxy-3,4 phényl) hydroxyméthyl)-2 méthyl-4 (Triphénylméthoxy-2 éthyl)-5 thiazole (XLVI) 4 g (7,25 mmoles) PF: 136°C 72% rdt. Analyse pour $C_{34}H_{33}N O_4S$ PM: 551 % calculé C 74,02; H 6,03; N 2,54; O 11,60; S 5,81; % trouvé C 73,93; H 6,03; N 2,59; O 11,79; S 5,77. RMN $CDCl_3$ δ 2,2(3H,s, CH_3 -4); 2,8(2H,t, CH_2 -5); 3,3(2H,t, CH_2 -5); 3,7(3H,s,OMe); 3,8(3H,s,OMe); 5,9(1H,s, CH -2); 6,9(3H,m,aro); 7,2(15H,m,tri-
---	---

- XXXVIII 10 mmoles
(1,98 g) ((Hydroxy-4 phényl) hydroxyméthyl)-2 méthyl-4
(Triphénylméthoxy-2 éthyl)-5 thiazole (XLVII)
1,6 g (3,15 mmoles) PF: 210°C 31% rdt. Analyse
pour $C_{32}H_{29}N O_3S$ PM: 507 % calculé C 75,71; H
5,76; N 2,76; O 9,45; S 6,32; % trouvé C 75,54
H 5,77; N 2,69; O 9,45; S 6,09. RMN $CDCl_2$ δ
2,2 (3H, s, CH_3 -4); 2,7 (2H, t, CH_2 -5); 3,3 (2H, t, CH_2 -
5); 6 (1H, s, CH-2); 7 (4H, m, aro); 7,2 (15H, m, trityl).
- XXXIX 10 mmoles
(2,24 g) ((Hydroxy-4 méthoxy-3 phényl) hydroxyméthyl)-
2 méthyl-4 (Triphénylméthoxy-2 éthyl)-5
thiazole (XLVIII) 0,8 g (1,5 mmoles) PF: 154°C
15% rdt. Analyse pour $C_{33}H_{31}N O_4S$ PM: 537 %
calculé C 73,72; H 5,81; N 2,60; O 11,90; S
5,96; % trouvé C 73,86; H 5,81; N 2,41; O
11,72; S 5,88. RMN $CDCl_3$ δ 2,3 (3H, s, CH_3 -4);
2,7 (2H, t, CH_2 -5); 3,3 (2H, t, CH_2 -5); 3,5 (3H, s, OMe);
5,9 (1H, s, CH-2); 6,9 (3H, m, aro); 7,2 (15H, m, trityl).
- XL 10 mmoles Pas de réaction.

DEPROTECTION DES "TRITYL THIAZOLES"

Une solution du thiazole à déprotéger dans dix fois son poids de THF et dix fois son poids de HCl 4 N, est agité 20 heures à température ambiante. On ajoute alors suffisamment d'ammoniaque concentré pour neutraliser HCl. On évapore le THF et l'excès d'ammoniaque. La phase aqueuse est extraite cinq fois à l'acétate d'éthyle. Le résidu est dissous dans le minimum d'alcool bouillant auquel on ajoute dix fois son volume d'acétate d'éthyle. La cristallisation a lieu au congélateur. Les cristaux sont filtrés et séchés.

THIAZOLE PROTEGE

THIAZOLE OBTENU

- XLVI 10 g
(18 mmoles) ((Diméthoxy-3,4 phényl)méthanol)-2 méthyl-4
(Hydroxy-2 éthyl)-5 thiazole (XXVIII) 5 g
(16 mmoles) huile jaune pâle 90% rdt.

Analyse pour $C_{15}H_{19}NO_4S$ PM: 309 % calculé C 58,23; H 6,19; N 4,53; O 20,68; S 10,36; % trouvé C 58,80; H 6,16; N 4,53; O 20,05; S 10,36. RMN DMSO D6 δ 2,25(3H,s,CH₃-4); 2,8(2H,t,CH₂-5); 3,6(2H,t,CH₂-5); 3,9(6H,s,OMe); 5,7(1H s,CH-2); 6,9(3H,m,aro).

XLVII 1 g
(2 mmoles)

XXV 400 mg (1,5 mmoles) 75% rdt PF: 153°C (PF de mélange avec XXV préparé par la thiamine 158°C). Analyse pour $C_{13}H_{15}NO_3S$ PM: 265 % calculé C 58,85; H 5,70; N 5,28; O 18,09; S 12,08; % trouvé C 58,31; H 5,66; N 5,11; O 18,18; S 11,41. RMN identique à celle de XXV par la thiamine.

XLVIII 2 g
(3,7 mmoles)

XXVII 500 mg 46% rdt PF: 163-4°C (PF de mélange avec XXVII préparé par la thiamine 163°C). Analyse pour $C_{14}H_{17}NO_4S$ PM: 295 % calculé C 56,93; H 5,80; N 4,74; O 21,67; S 10,85; % trouvé c 56,70; H 5,85; N 4,66; S 10,58. RMN identique à celle de XXVII par la thiamine.

1,18,2 Utilisation de XX

Le résidu est repris par 25 ml d'acide acétique-eau 8-2. Le mélange est porté à reflux 15 minutes, puis le solvant est évaporé à sec. Le résidu est repris par 25 ml de méthylate de Na 0,5 N et est agité 24 heures à température ambiante, neutralisé et évaporé. Le résidu est chromatographié sur une colonne de silice dans CHCl₃-méthanol 9-1. Les fractions contenant le produit recherché sont rassemblées et évaporées. On obtient le produit brut qui est cristallisé dans acétate d'éthyle-hexane 1-9.

ALDEHYDE DE DEPART

THIAZOLE OBTENU

XLII 3g (10 mmoles)

XXIII 700 mg (2,5 mmoles) 20% rdt PF: 90-92°C (PF de mélange avec XII fait à partir de la

thiamine 91°C). Analyse pour $C_{14}H_{17}N O_4S$
 PM: 295 % calculé C 60,19; H 6,13; N 5,01; O
 17,18; S 11,48; % trouvé C 59,89; H 6,01; N
 4,89; O 17,22; S 11,65. RMN identique à celle
 de XXII fait par la thiamine.

**Acétaldéhyde
 excès**

(Hydroxy-1 éthyl)-2 méthyl-4(Hydroxy-2 éthyl)-
 5 thiazole (XVI) PF: 85°C (Litt (27) 85-6°C)
 200 mg 10% rdt PM: 187. RMN acétone D6 δ 1,4 (
 3H,d,CH₃-2); 2,2 (3H,s,CH₃-4); 2,8 (2H,t,CH₂-5);
 3,7 (2H,t,CH₂-5); 4,1H,s,OH-5); 4,8 (1H,q,CH-2);
 5,2 (1H,s,OH-2). UV λ_{max} : 255 m μ ϵ_{max} : 5900.

2 ETUDE DE LA THIAMINE DANS LES EXTRAITS BACTERIENS

2,1 Souches bactériennes utilisées

Nous avons utilisé trois mutants de Eschérichia.coli, E.coli (70-17) auxotrophe pour la "pyramine" XXXVI, E.coli (26-43) auxotrophe pour le thiazole XV et E.coli 83-1 auxotrophe pour le shikimate.

2,2 Cultures et incubations

Les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave vingt minutes à 120°C. Le glucose (glc) est stérilisé séparément et est ajouté stérilement avant l'inoculation. L'inoculation se fait avec 1/100 du volume du milieu par une suspension à peine trouble de cellules dans de l'eau salée à 0,9%. Les concentrations en cellules sont estimées par mesure de la diffusion à 760 m μ et report sur une courbe étalon. Deux types de milieu ont été utilisés: le milieu de DAVIS ET MINGIOLI (19), où le tampon est un tampon phosphate, et celui de HERSHEY (20), où le tampon est du tris. Ces milieux sont pourvus des produits nécessaires à la croissance des mutants utilisés. Pour les cellules qui seront traitées à l'adénosine selon (21), la culture de la nuit est réalisée en glc limitant à 0,05%, ce qui limite la concentration en cellules à 0,3 mg /ml environ. Le traitement à l'adénosine selon (21) se fait dans les conditions initiales suivantes: bactéries 0,035 mg/ml, glc 0,5%, adénosine 0,3 mg/ml. L'incubation dure 2 H 30 minutes sous agitation puis les cellules sont centrifugées et éventuellement lavées.

Pour les mutants (70-17) & (26-43) qui seront développés sur thiamine limitante, la culture de la nuit est réalisée en glc limitant à 0,02% et en thiamine limitante à 7 ng/ml. Le matin on rajoute du glc pour atteindre 0,5%, et on laisse incuber 2 heures 30 minutes. Les cellules sont alors centrifugées à 1000 G et éventuellement lavées.

Pour les incubations, les cellules centrifugées sont reprises par du milieu minimum à 0,5% en glc et les incubations ont lieu en présence des produits à tester dans des erlens à 37°C avec ou sans agitation; puis transférées dans des tubes à centrifuger et centrifugées quand le temps de l'incubation est écoulé.

2,3 EXTRACTION DE LA VITAMINE B1

L'extraction de la vitamine B1 a lieu par resuspension du culot bactérien dans 5 ml de tampon acétate 0,02 M pH 4,6 puis par 15 minutes au bain marie à 100°C. Si le milieu "tris" est employé, l'extraction a lieu dans ce milieu après acidification à pH 4,6 par de l'acide acétique. L'hydrolyse des phosphates de thiamine a lieu pendant 4 heures 30 minutes en présence de "Mylase SR" à 10 mg/ml. Après ce temps les débris cellulaires sont centrifugés à 50 000 G pendant 15 minutes et la vitamine B1 est dosée dans le surnageant.

2,4 DOSAGES DE LA VITAMINE B1

Les dosages de la vitamine B1 sont soit bactériologiques par Lactobacillus.fermenti selon (22), soit au "thiochrome" après purification sur une colonne de CG 50 H⁺ (8x0,5 cm). On lave par 20 ml d'eau et on élue la vitamine B1 par 25 ml de HCl 0,25 N.

2,4,1 Dosage de la thiamine seule

Dans un tube à essai, on introduit successivement : un volume de la solution à doser (éluat de la colonne de CG 50 H⁺) que l'on complète à 2,5 ml, 0,1 ml de Hg Cl₂ à 1%, et, après agitation 0,5 ml de soude 7,5 N, puis 1 ml d'acétate de Na 4 M, puis 5 ml d'isobutanol saturé d'eau. Le tube est agité une minute, puis après décantation, la phase isobutanol est prélevée et sa fluorescence mesurée avec un spectrofluorimètre (excitation: 366 mμ, émission: 420 mμ).

2,4,2 Dosage de HET seule

Dans un tube à essai, on introduit successivement un volume de la solution à doser avec ou sans un volume de solution étalon de HET (étalonnage interne), et on complète à 2,5 ml. On introduit le tube dans un bain-marie à 25°C. On ajoute alors 1 ml de soude 7,5 N, puis, 15 secondes après, 0,1 ml de Hg Cl₂ à 0,02%; après 5 minutes on ajoute 0,1 ml de ferricyanure à 0,5%, puis après deux minutes, 0,1 ml de H₂O₂ à 110 volumes, puis l'acétate de Na 4 M et l'isobutanol. Le tube est alors traité comme pour la thiamine.

2,5 BIOAUTOGRAPHIES

Pour les bioautographies, les cellules de mutant choisi sont cultivées la nuit avec une quantité limitante du métabolite que l'on veut révéler de façon à ce que les cellules cessent leur croissance vers 0,3 mg/ml. Les cellules sont centrifugées et lavées par de l'eau salée stérile et suspendues à 50°C dans un milieu minimum contenant 2% d'agar et 15 mg% de chlorure de triphényl-2,4,5 tétrazolium (XLIX) à une concentration finale en cellules de 1 mg%. L'agar est coulé sur des plaques de verre et reporté sur les plaques de chromatographie. Lors de l'incubation, la croissance des cellules (qui a lieu uniquement aux endroits où se trouvent des produits qui le permettent) rend le milieu réducteur, et le leucocolorant XLIX est réduit en L coloré en rouge. Les produits actifs se révèlent en rouge sur fond transparent.

2,6 EXPERIENCES RADIO-ACTIVES

Lors des expériences radio-actives, après dosage des deux formes, celles-ci sont entraînées par une masse connue de thiamine et de HET synthétique. La vitamine B1 est clivée selon (36) par du bisulfite. La solution aqueuse ainsi obtenue est neutralisée et extraite par du CH_2Cl_2 (10 fois). Le résidu obtenu par évaporation du solvant est chromatographié sur une colonne de silice avec CHCl_3 -méthanol 100-3. La séparation des "thiazoles" XV et XVI effectuée, ceux-ci sont rechromatographiés sur silice avec acétone-hexane 60-10. Leur radio-activité est mesurée, la quantité de produit étant calculée par mesure de leur absorption UV.

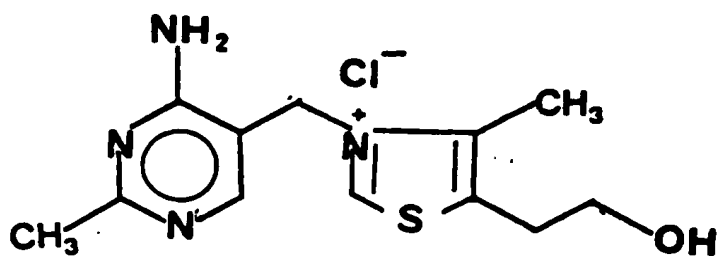
2,7 SOLVANTS DE CHROMATOGRAPHIE DES THIAZOLES

Trois solvants ont été utilisés pour chromatographier ces thiazoles sur silice: CHCl_3 -méthanol 9-1; CHCl_3 -méthanol-hexane 7-1-2; acétate d'éthyle-méthanol 9-1.

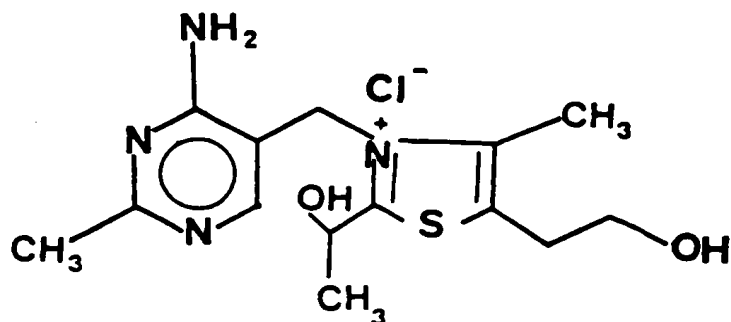
BIBLIOGRAPHIE

- 1 B.ESTRAMAREIX et M.THERISOD, *Biochim. Biophys. Acta* (1972), 273, 275
- 2 A.HANTZSCH, *Ann. der Chem.* (1889), 250, 257
- 3 J.KISS, R.D'SOUZA et H.SPIEGELBERG, *Helv. Chim. Acta* (1968), 51, 331
- 4 Y.OKA, E.IMAMIYA et H.HIRANO, *Chem. Pharm. Bull.* (1970), 18, 527
- 5 Y.OKA, E.IMAMIYA et H.HIRANO, *Chem. Pharm. Bull.* (1967), 15, 448
- 6 J.CROUSIER et J.METZGER, *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1967), 11, 4134
- 7 H.ERLENMEYER et M.ERNE, *Helv. Chim. Acta* (1949), 32, 2205
- 8 R.BRESLOW, *J.A.C.S.* (1958), 80, 3719
- 9 C.RABAUT, *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1912), 11, 390
- 10 N.CAMPBELL et J.Mac KAIL, *J.C.S.* (1948), 1251
- 11 H.GREENE et R.ROBINSON, *J.C.S.* (1922), 121, 2195
- 12 K.KINDLER et W.PESCHKE, *Archiv. der Pharm.* (1933), 271, 433
- 13 J.ALDY et C.RABAUT, *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1915), 19, 45
- 14 E.R.BUCHMAN, *J.A.C.S.* (1936), 58, 1804
- 15 A.LIPP, *Chem. Ber.* (1889), 22, 1205
- 16 W.HUBERT, *J.A.C.S.* (1943), 65, 2222
- 17 H.KAWASAKI, *J. Pharm. Soc. Japan* (1956), 76, 702
- 18 K.MIYATAKE et T.YOSHIKAWA, *J. Pharm. Soc. Japan* (1955), 75, 1054
- 19 B.D.DAVIS et E.S.MINGIOLI, *J. Bact.* (1950), 60, 17
- 20 A.D.HERSHEY, *Virology* (1955), 1, 108
- 21 P.C.NEWELL et R.G.TUCKER, *Biochem. J.* (1966), 106, 275
- 22 F.M.MACIAS, *Applied Microbio.* (1957), 5, 249
- 23 M.MORITA, T.KANAYA et T.MINESITA, *The J. of Vit.* (1969), 15, 116
- 24 L.DOERMER, *Z. Physik. Chem. Unterricht*, (1929), 42, 70
- 25 F.FRANCIS et O.C.R.DAVIS, *J.A.C.S.* (1958), 80, 5893
- 26 J.F.W.McOMIE, M.L.WATTS et D.F.WEST, *Tetrahedron* (1968), 24, 2289
- 27 L.O.KRAMPITZ, *J.A.C.S.* (1958), 80, 5893
- 28 S.C.WASTON et J.F.EASTHAN, *J. Organometal. Chem.* (1967), 9, 165
- 29 G.L.CARSON et G.M.BROWN, *J. Biol. Chem.* (1961), 236, 2099
- 30 P.C.NEWELL et R.G.TUCKER, *Biochem. J.* (1966), 100, 512
- 31 A.FUJITA, S.P.COLOWICK et N.O.KAPLAN, *Methods in Enz.* (1955), 2, 677
- 32 M.FUJIWARA et K.MATSUI, *Analyt. Chem.* (1953), 55, 205

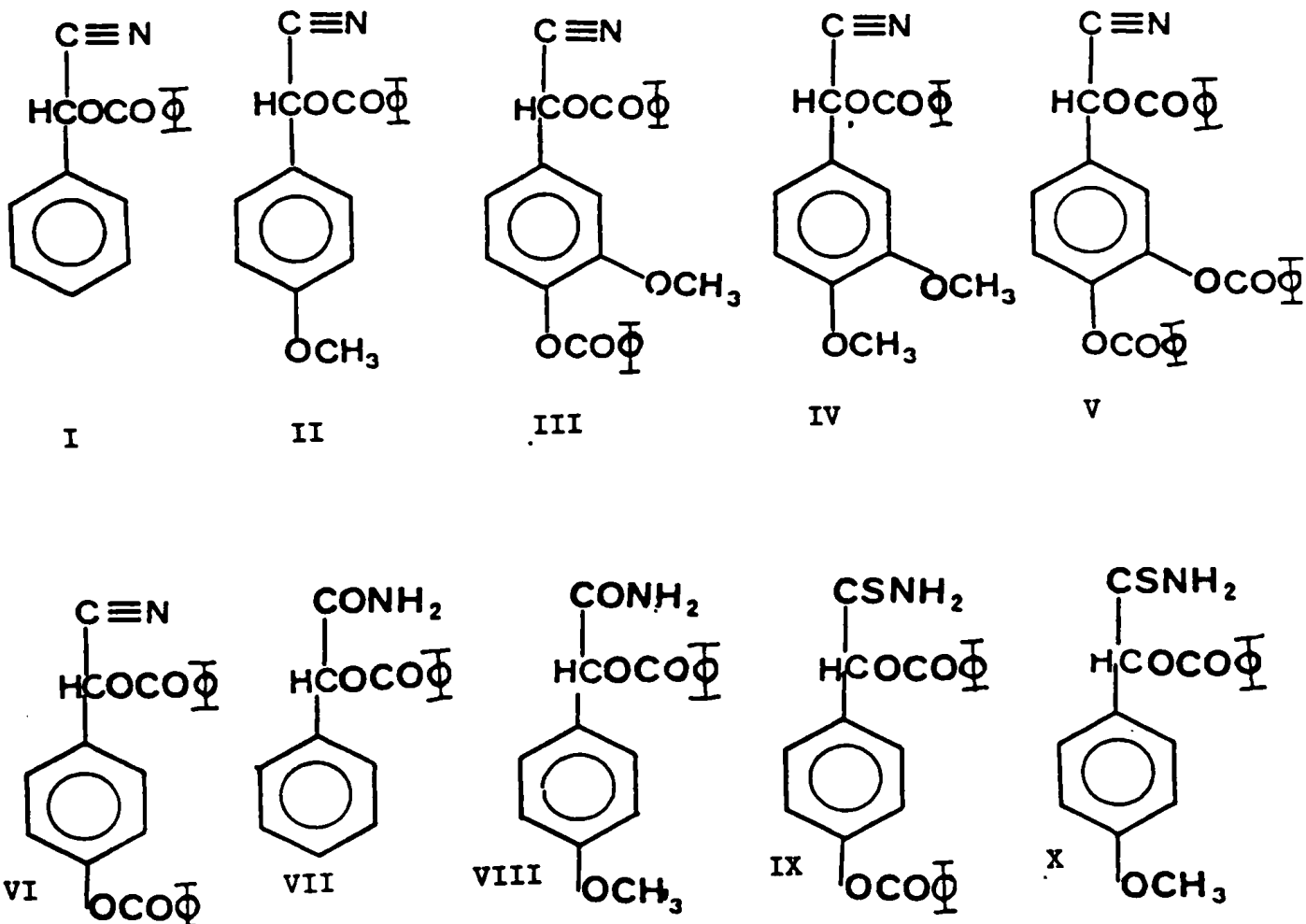
- 33 J.M.CANCEDO et C.CANCEDO, Biochimie (1973), 55, 205
- 34 E.BELLION, D.H.KIRKLEY et J.R.FAUST, Biochem. Biophys. Acta (1976),
437, 229
- 35 R.L.AIRTH et G.D.FOERSTER, Anal. Biochem. (1962), 3, 383
- 36 R.R.WILLIAMS, R.R.WATERMAN, J.C.KERESZTEZY et E.R.BUCHMAN, J.A.C.S.
(1935), 57, 536
- 37 E.BELLION et D.H.KIRKLEY, Biochem. Biophys. Acta (1977), 497, 323
- 38 J.DIETRICH et V.HENNING, Eur. J. Biochem. (1970), 14, 258

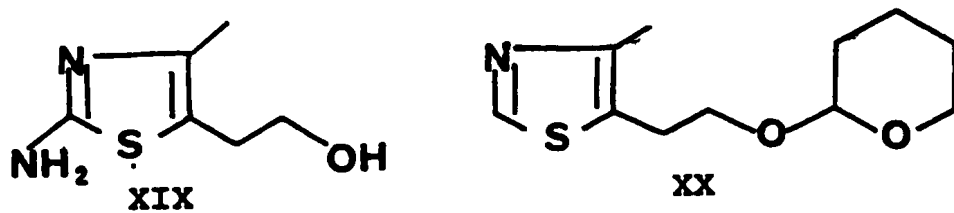
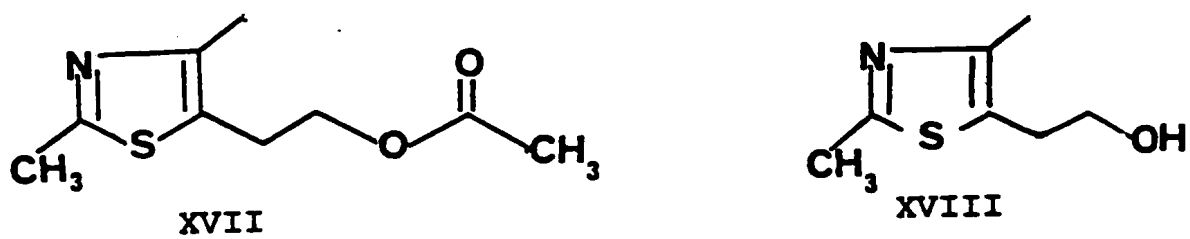
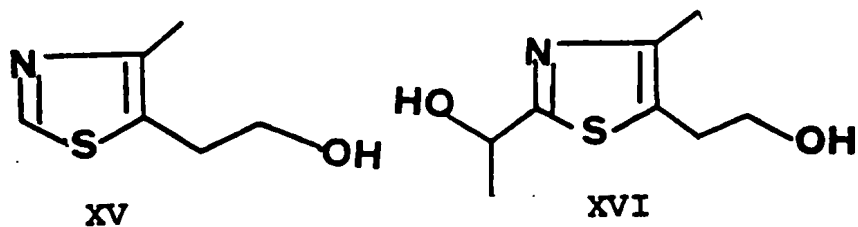
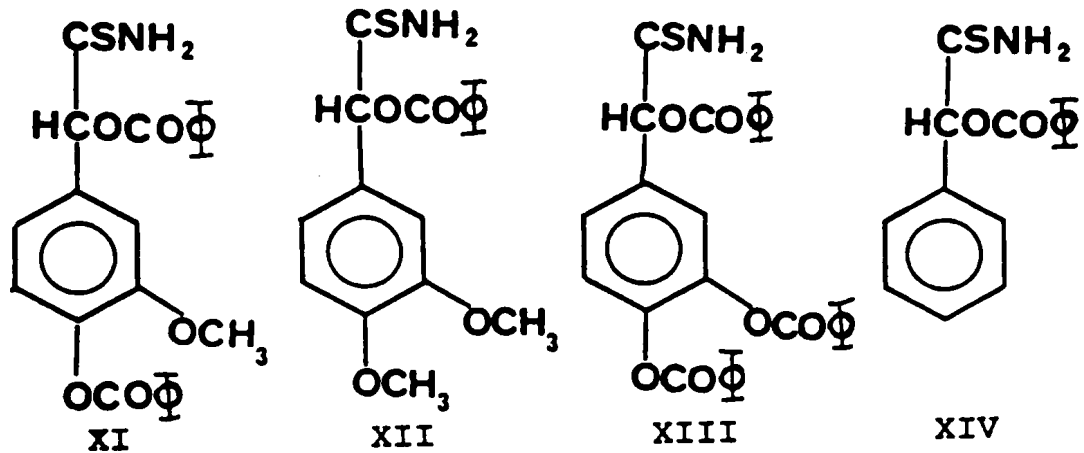


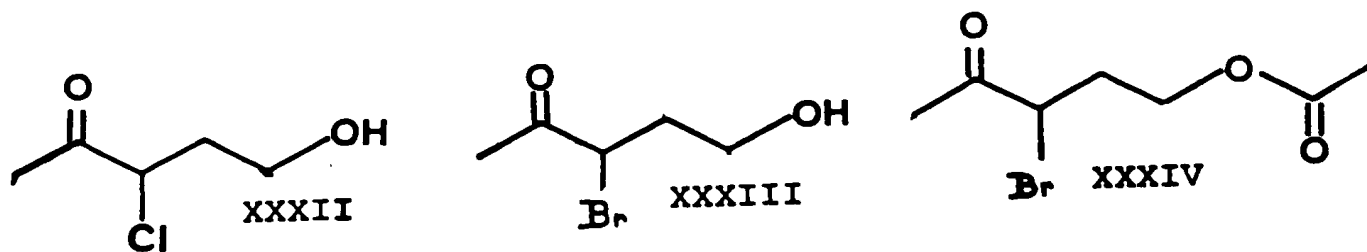
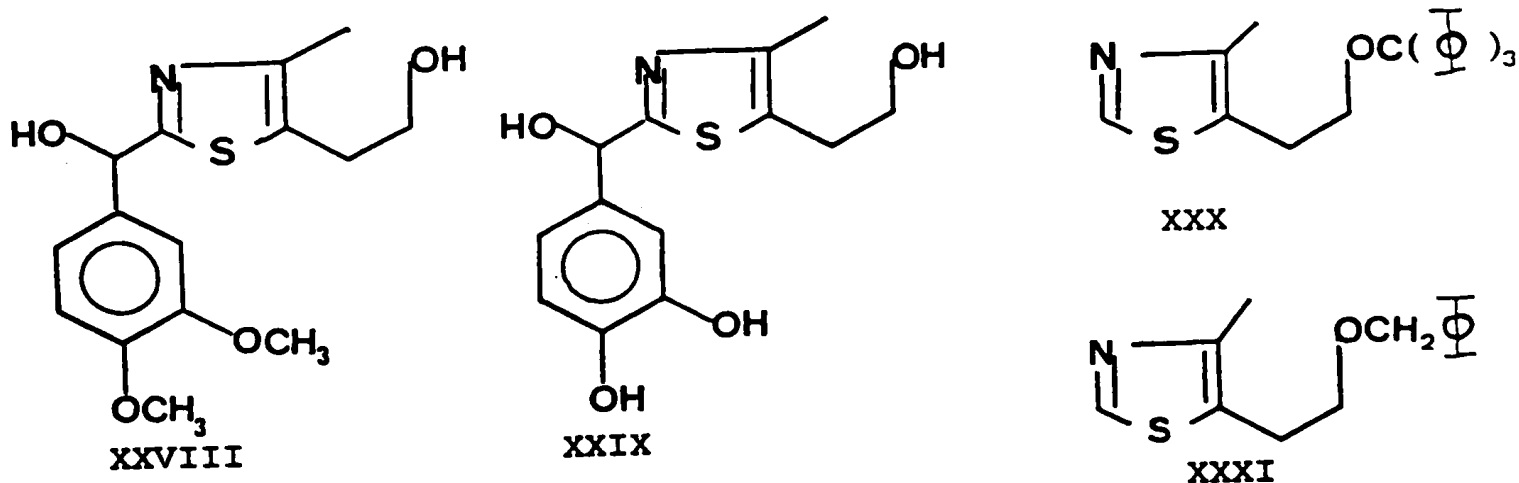
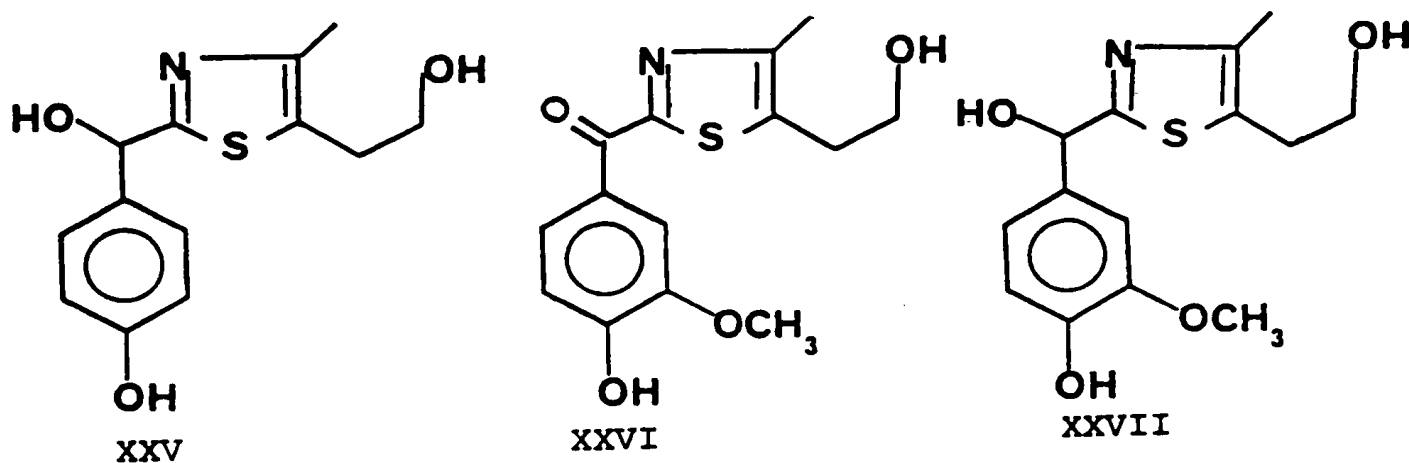
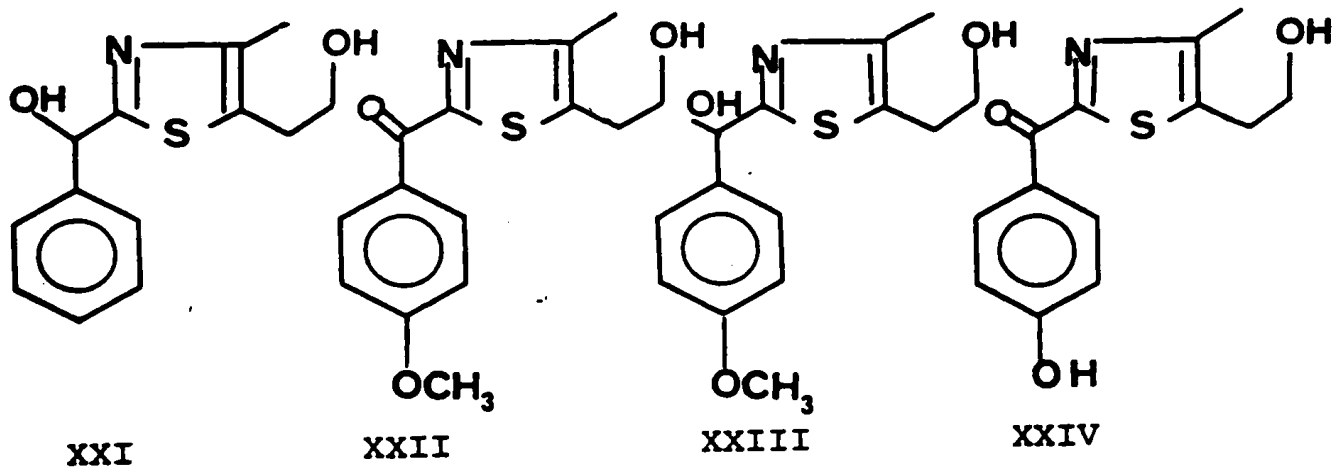
((Amino-4 méthyl-2 pyrimidiny-5) méthyl)-3(Hydroxy-2 éthyl)-5 méthyl-4 thiazolium (Thiamine)

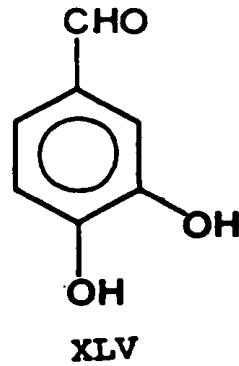
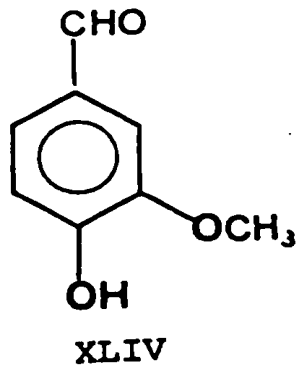
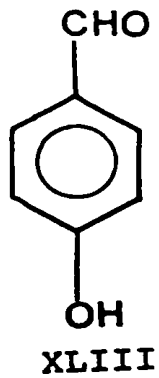
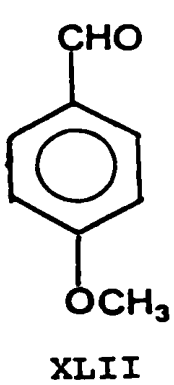
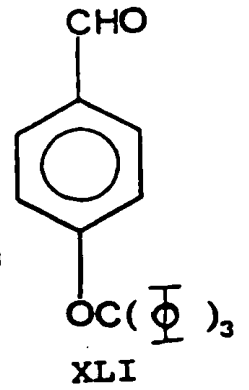
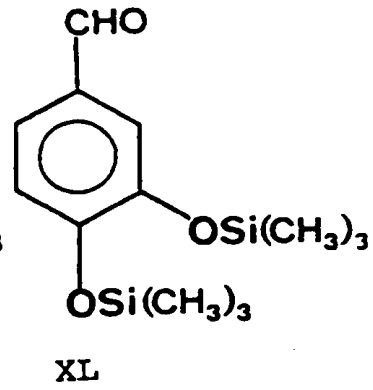
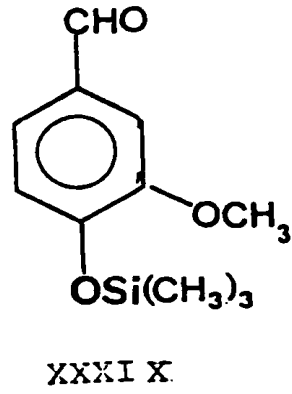
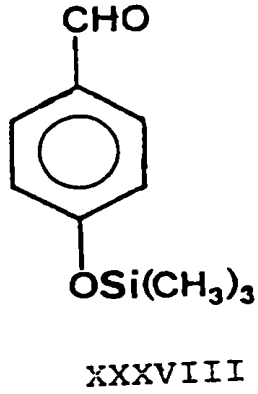
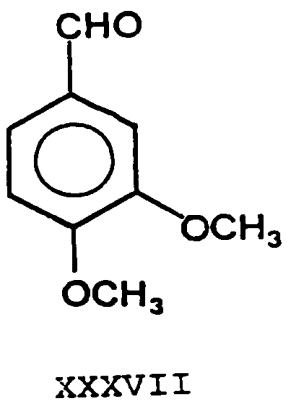
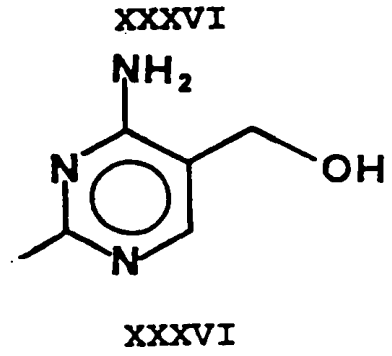
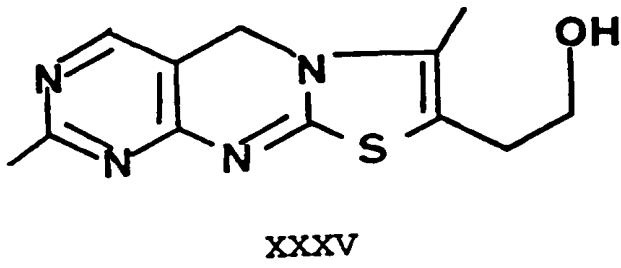
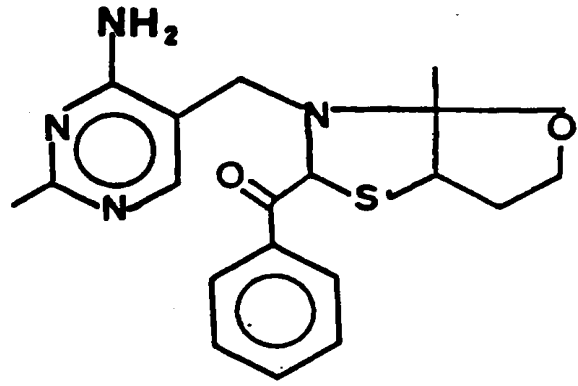
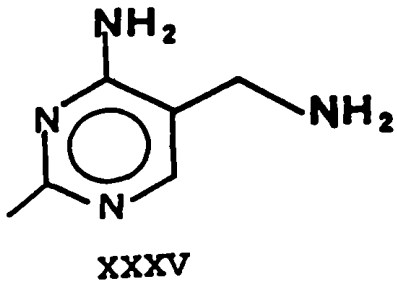


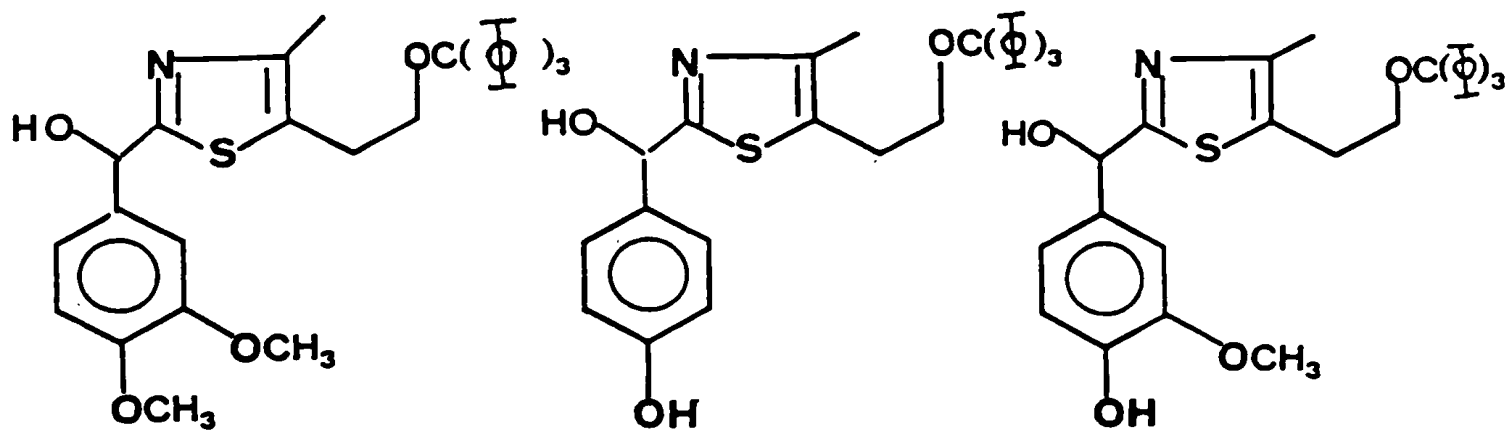
DL((Amino-4 méthyl-2 pyrimidiny-5) méthyl)-3(Hydroxy-1 éthyl)-2(Hydroxy-2 éthyl)-5 méthyl-4 thiazolium (HET)











XLVI

XLVII

XLVIII

