

Table des matières

Chapitre 1 - Protéases à sérine bactériennes et β-lactames	1
1. Les protéases à sérine	1
2. Les transpeptidases de la paroi bactérienne	3
3. La résistance bactérienne	5
3.1. Les β -lactamases	6
3.2. Les PBPs résistantes	12
4. Les antibiotiques à noyau β -lactame	13
4.1. Les pénames	14
4.2. Les céphèmes	17
4.3. Les pénèmes	22
4.4. Les carbapénèmes	23
4.5. Les monobactames	26
5. Réactivité des β -lactames	30
5.1. Modèle de réactivité, une approche intuitive	30
5.2. Déficiences du modèle de réactivité	31
5.2.1. Réactivité du cycle à 4 chaînons et des β -lactames bicycliques	31
5.2.2. Distorsion de la géométrie et résonance	32
5.3. Structure 3-D et activité antibiotique	36
6. Conclusion	41
Chapitre 2 - Objectifs et Stratégie	43
1. Objectifs	43
2. Stratégie de synthèse	47
3. Evaluation de la réactivité théorique, chimique et biochimique des composés synthétisés	47
Chapitre 3 - Accès aux précurseurs de β-lactames bicycliques pontés	49
1. Synthèse à partir d'azétidin-2-one	49
1.1. Première voie de synthèse des précurseurs	49
1.1.1. N-alkylation du β -lactame	50
1.1.2. C3-alkylation du β -lactame	54
1.2. Seconde voie de synthèse des précurseurs	54

1.2.1. Protection de la fonction lactame	55
1.2.2. C3-alkylation du β -lactame N-silylé	56
1.2.3. Déprotection de la fonction lactame.....	60
1.2.4. N-acylation de la fonction lactame.....	61
2. Création de synthon de départ : Synthèse à partir de l'acétoxy azétidinone	65
2.1. Substitution en C4 du groupement acétate par allylation indanique	68
2.1.1. Introduction	68
2.1.2. L'allylation de dérivés carbonylés	69
2.1.3. L'allylation des aldimines	70
2.1.4. Application de l'allylation indanique à la synthèse de composés	71
β -lactamiques	71
2.2. Substitution du groupement acétate par un hydrogène	76
2.2.1. Introduction	76
2.2.2. La réduction aux hydrures.....	76
2.2.3. La réduction radicalaire.....	77
2.2.4. Aspect mécanistique.....	81
3. Synthèses à partir de l'acétoxy-azétidinone et de ses dérivés.....	85
3.1. Synthèse de composés bis-acylés.....	86
3.2. Synthèse de composés bis-alkylés.....	93
3.3. Synthèse de composés mixtes	99
3.3.1. Les dérivés mixtes carbonylés.....	99
3.3.2. Les dérivés mixtes silylés.....	100
3.4. Synthèse de composés possédant une fonction acide carboxylique masquée.....	102
 Chapitre 4. Accès aux β-lactames bicycliques (N1-C3) pontés	 113
1. La métathèse des oléfines.....	113
1.1. La métathèse des oléfines et ses applications.....	116
1.2. Les catalyseurs	117
1.2.1. Les catalyseurs au Molybdène et au Tungstène	117
1.2.2. Les catalyseurs au Ruthénium.....	119
1.3. La métathèse des hétérocycles azotés	122
1.4. Les hétérocycles bicycliques pontés.....	125
1.5. Les composés macrocycliques	126
1.6. Les β -lactames bicycliques	128
2. Application de la RCM à la synthèse de β-lactames bicycliques pontés (N1-C3)..	135
2.1. Cyclisation des précurseurs N-acylés.....	138
2.1.1. Les dérivés bis-acylés.....	138
2.1.2. Evaluation théorique de la formation des β -lactames bicycliques 066-068	139
2.1.3. Les dérivés O-silylés	142
2.2. Cyclisation des précurseurs N-alkylés	143
2.2.1. Synthèse des β -lactames bicycliques pontés (N1-C3) à 13 chaînons.....	143
2.2.2. Synthèse de β -lactames bicycliques pontés (N1-C3) à 12 chaînons	146
2.2.3. Evaluation théorique de la formation des bicycles à 12 et 13 chaînons.....	148
3. Hydrogénation des β-lactames bicycliques pontés (N1-C3).....	153

Chapitre 5 - Evaluations Théorique et Biochimique 163

1. Evaluation théorique de la réactivité.....	163
1.1. Mécanisme de l'hydrolyse des β -lactames.....	163
1.2. Effets de solvant sur l'hydrolyse.....	164
1.3. Choix de la méthode et du niveau de calcul.....	166
1.4. Résultats	169
1.4.1. Réactivité vis-à-vis d'un nucléophile anionique (-OH)	169
1.4.2. Réactivité vis-à-vis d'un nucléophile neutre (H ₂ O-H ₂ O).....	183
1.4.3. Utilisation d'un modèle de cavité enzymatique	191
2. Evaluation in vitro de l'activité biochimique.....	201
3. Evaluation de l'activité biochimique vis-à-vis de l'élastase pancréatique de porc	206

Chapitre 6 - Conclusions et perspectives 219

1. Conclusions	219
2. Perspectives.....	222

Chapitre 7- Partie expérimentale 229

Bibliographie..... 397

Chapitre 1

Chapitre 1 - Protéases à sérine bactériennes et β -lactames

1. Les protéases à sérine

Les protéases à sérine sont des enzymes ubiquitaires (eucaryotes, procaryotes, archaeobactéries, virus) dont la fonction est de cliver les protéines en peptides (schéma 1) (Hedstrom, L. 2002).

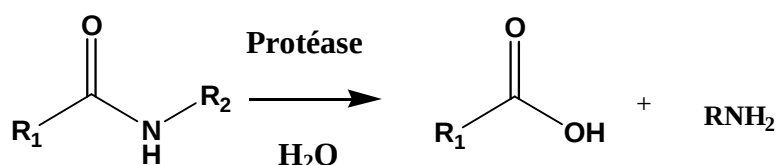


schéma 1 : Fonction des protéases à sérine.

On les nomme ainsi parce qu'on distingue dans le site actif de ces enzymes une sérine, essentielle à la catalyse, qui va jouer le rôle d'agent nucléophile. Cette classe de protéases se caractérise par la présence d'une triade catalytique composée de résidus conservés, par exemple Asp-His-Ser dans le cas des enzymes appartenant à la superfamille des chymotrypsines.

D'un point de vue mécanistique, un transfert de charge assisté par l'Histidine 57 permet d'exalter la nucléophilie de la sérine 195. L'intermédiaire tétraédrique formé est stabilisé par les NH des liaisons amides des résidus Ser 195 et Gly 193. Ces derniers forment la cavité à oxyanion. Ensuite la réaction évolue vers la formation d'un complexe covalent de type acyl-enzyme, finalement hydrolysé pour régénérer l'enzyme libre (schéma 2).

Les protéases à sérine accomplissent cette action très efficacement puisque la vitesse d'hydrolyse est de l'ordre de 10^{10} fois supérieure à celle de la réaction non catalysée.

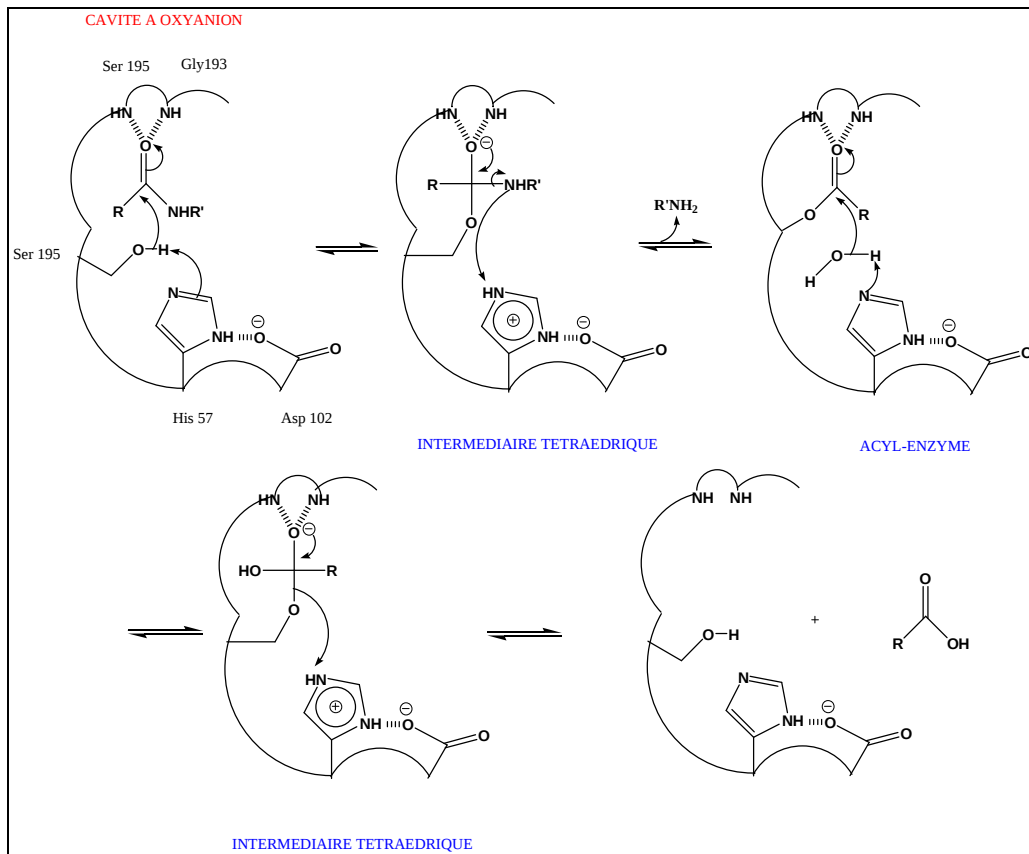


schéma 2 : Mécanisme général des protéases à sérine.

Chez l'homme, les enzymes de type chymotrypsine sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que la digestion (trypsine), la reproduction (acroséine), la réponse immunitaire (élastase neutrophile) ou encore l'activation séquentielle menant à la coagulation du sang, la fixation du complément et la fibrinolyse (thrombine, plasmine). De façon tout aussi essentielle, les protéases à sérine sont présentes dans les bactéries où elles participent soit à la biosynthèse de la paroi, soit à la défense de l'organisme. L'omniprésence de ces protéines leur donne une importance considérable et justifie qu'elles soient devenues des cibles thérapeutiques.

2. Les transpeptidases de la paroi bactérienne

Les transpeptidases (D-alanyl-D-alanine-peptidases) sont des protéines situées dans la membrane interne des bactéries. Ce sont des enzymes dont les fonctions sont la biosynthèse et la réparation de la paroi bactérienne. Celle-ci confère à la bactérie la résistance mécanique nécessaire à sa survie car l'organisme ne possède pas la capacité de réguler les variations de pression osmotique du milieu extérieur (Mascaretti, O. A., 2003 ; Fisher, J. F. 2005).

Elle est formée par la réticulation de chaînes linéaires polysaccharidiques reliées entre elles par des "ponts peptidiques". Une unité de peptidoglycane correspond à un hétérodimère de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique. Ce dernier est modifié par un pentapeptide dont la composition peut varier selon les espèces. Seuls les deux résidus terminaux D-ala-D-ala sont conservés.

Les D, D-peptidases catalysent l'aminolyse, grâce à une sérine du site actif, du motif N-acyl-D-alanyl-D-alanine et effectuent ainsi le lien avec une autre unité peptidoglycane (schéma 3).

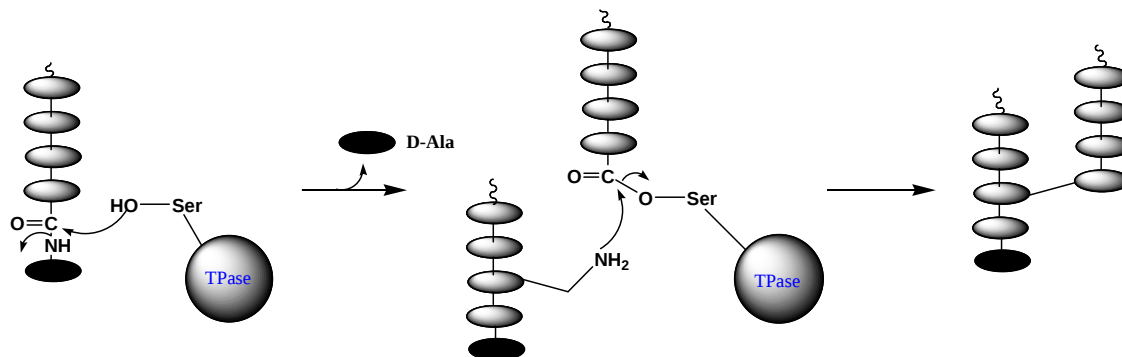
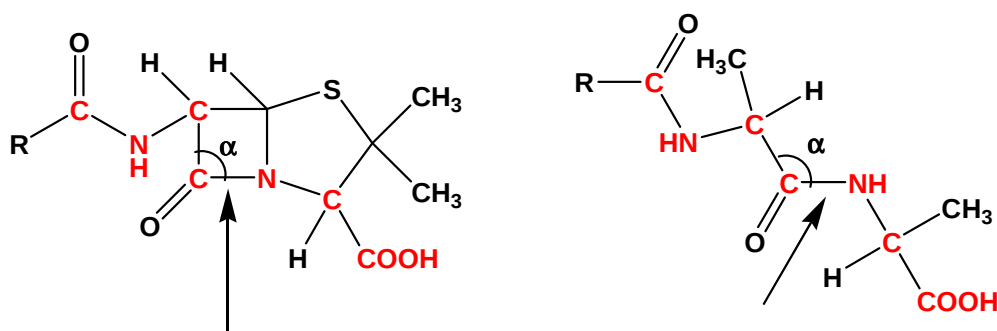


schéma 3 : Réticulation du peptidoglycane catalysée par les transpeptidases

(Walsh, C. 2000).

Les antibiotiques de type β -lactame, du fait d'analogies structurales avec le substrat, inhibent de façon efficace l'activité de ces enzymes qu'on regroupe sous le terme général de PBPs (Penicillin Binding Proteins) (figure 1).



la flèche indique la liaison peptidique clivée

figure 1 : Comparaison inhibiteur/substrat.

L'introduction des antibiotiques de type β -lactame dans notre pharmacopée représente l'une des avancées les plus importantes faites dans le domaine de la santé, depuis plus d'un demi-siècle. Grâce à leur grande efficacité, leur faible coût et leur sélectivité (peu d'effets secondaires), ces molécules constituent aujourd'hui encore des armes puissantes pour lutter contre la menace bactérienne.

Leur sélectivité provient du fait qu'aucun équivalent, fonctionnel ou structural, des enzymes-cibles n'existe dans les cellules humaines. Ainsi, ils vont réagir de manière spécifique pour former un complexe acyl-enzyme, covalent et stable dont l'hydrolyse lente est responsable de l'inactivation de la protéine (schéma 4).

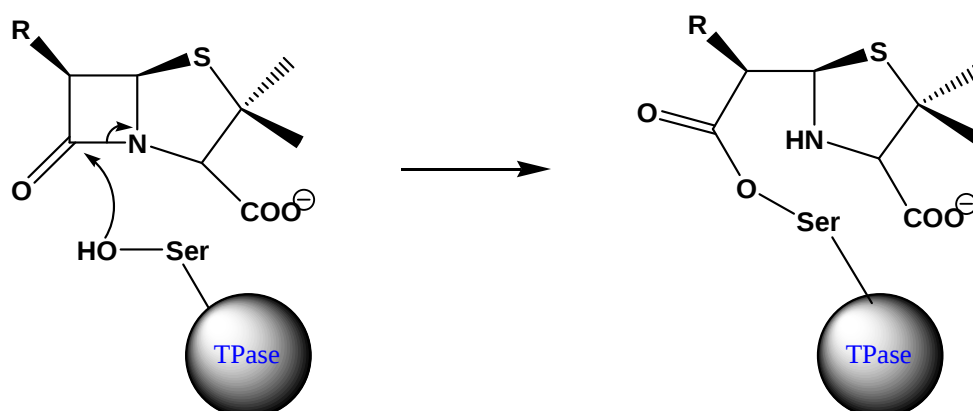


schéma 4 : mode d'action des β -lactames.

Le taux de réticulation de la paroi s'en trouve diminué, la fragilisant et rendant la bactérie plus sensible aux variations de pression osmotique, et dès lors à la lyse cellulaire.

3. La résistance bactérienne

En 1940, quelques temps avant les premières utilisations médicales de la pénicilline, E. P. Abraham et E. Chain identifiaient une enzyme bactérienne capable d'hydrolyser le noyau β -lactame des antibiotiques et notaient la possibilité pour celle-ci, de diminuer l'efficacité des futurs traitements à base de pénicilline. Cependant, il fut jugé improbable que le développement d'une résistance puisse atteindre les proportions auxquelles nous sommes actuellement confrontés. La fréquence d'apparition de mutants résistants était alors estimée à 10^{-9} (ou moins) /génération et les connaissances de l'époque ne permettaient pas de suspecter que les gènes impliqués pouvaient être incorporés dans des éléments de réplication autonomes et transférables tels que les plasmides. On sait aujourd'hui que les bactéries sont capables d'échanger et de collecter l'information (matériel génétique), avec une extraordinaire facilité, même entre espèces différentes (Knowles, J. R. 1985 ; Walsh, C. 2000 ; Davies, J. 1994 ; Neu, H. C. 1992).

Pour contrer l'action des antibiotiques, les bactéries ont ainsi mis en place des systèmes de défense. Comme pour la plupart des agents antimicrobiens, les β -lactames sont rendus inactifs par le biais de trois mécanismes primaires de résistance, dont les deux premiers font intervenir des protéases à sérine :

- 1) Le premier mécanisme est la production d'enzymes qui dégradent ou modifient l'antibiotique avant qu'il n'atteigne sa cible. A ce titre, les β -lactamases ont pour substrat les molécules à noyau β -lactame et sont largement disséminées à travers les bactéries Gram (+) et Gram (-).
- 2) Le second mécanisme est l'altération de la cible. C'est le cas de transpeptidases modifiées (PBP2a, PBP2x, PBP5fm) qui représentent aujourd'hui une des causes majeures de résistance des organismes pathogènes devenus problématiques (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*).
- 3) Le dernier mécanisme consiste à empêcher l'antibiotique d'accéder à sa cible au moyen d'une diminution de la perméabilité membranaire ou de pompe d'efflux. Cette dernière option

est responsable via les pompes MexA,B-OprM, de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.1. Les β -lactamases

On distingue sur base de similarité de séquences, 4 classes de β -lactamases : A, B, C et D. Trois d'entre elles contiennent des protéases à sérine (A, C et D) alors que la classe B concerne des métalloprotéases zinc-dépendantes (Matagne, A. 1998). Les différences entre A, C et D se situent dans la nature des résidus basiques intervenant dans les étapes d'acylation et de déacylation.

Les métalloprotéases sont quant à elles totalement distinctes des enzymes à sérine dans leurs séquences, leurs formes et leurs mécanismes catalytiques.

Les β -lactamases de classes A, C et D et le domaine transpeptidase des PBP (Penicillin Binding Proteins) appartiennent à la superfamille des enzymes à sérine qui reconnaissent la pénicilline (ASPRE). On retrouve dans la structure primaire de ces protéines, trois motifs [SXXK, S(Y)XN(V) et KT(S)G], une topologie semblable et un même mécanisme d'hydrolyse des β -lactames. Ces trois caractéristiques supportent l'hypothèse que ces enzymes dérivent d'un ancêtre commun (figure 2) (Chesnel, L. 2002).

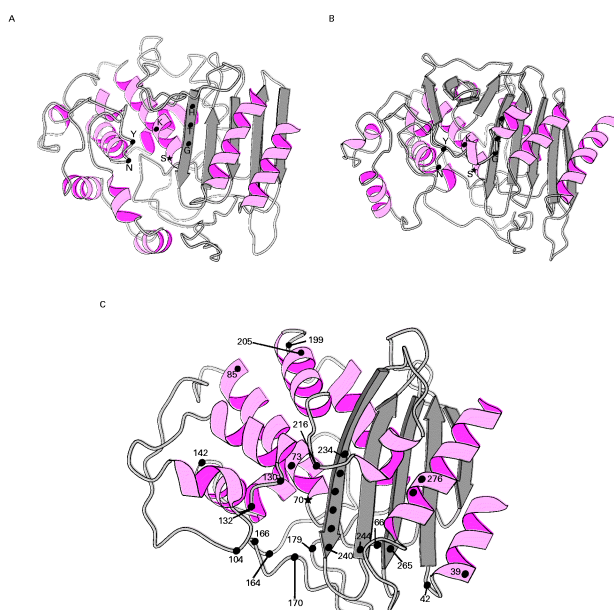


figure 2 : Structure tertiaire de la D,D-peptidase S. R61 (A), la β -lactamase de classe C de *E. cloacae* (B) et la β -lactamase de classe A, TEM (C) (Matagne, A. 1998).

Une fois exprimées, ces enzymes sont secrétées dans le périplasme (Gram-), liées à la membrane, ou excrétées dans le milieu extérieur (Gram+). Elles catalysent l'ouverture du cycle β -lactame transformant ainsi l'inhibiteur en composé inactif (schéma 5).

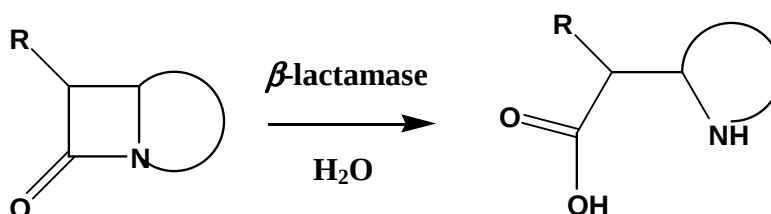


schéma 5 : action des β -lactamases.

Si l'on sait depuis les années 70 que les protéases à sérine comme l' α -chymotrypsine, l'élastase, ou encore la papaïne, enzyme à cystéine, forment un intermédiaire acyl(-thio)-enzyme au cours de leur cycle catalytique, ce n'est qu'au début des années 80 que l'hypothèse a pu être vérifiée pour les β -lactamases.

En 1980, Fisher et Knowles ont démontré que l'hydrolyse d'un substrat lent comme la céfoxitine par la β -lactamase RTEM-2 passe par la formation d'un complexe intermédiaire lié de façon covalente à l'enzyme et qui a les caractéristiques spectroscopiques d'un lien ester (Fisher, J. 1980).

Dés lors, comme pour les protéases à sérine, le mécanisme de la β -lactamase a pu être décrit par un modèle à trois étapes où [ES] représente un complexe enzyme-substrat non covalent et [ES*], l'intermédiaire acyl-enzyme (schéma 6).

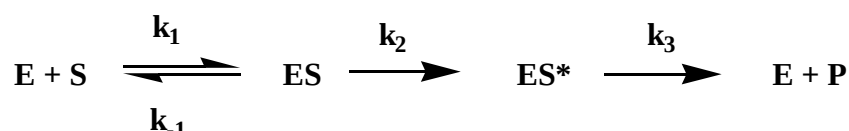


schéma 6 : équation enzymatique de l'hydrolyse des β -lactames catalysée par les β -lactamases de classe A, C et D.

Ce qui différencie les β -lactamases des D, D-peptidases face aux antibiotiques, c'est la valeur de la constante de vitesse d'hydrolyse de $[ES^*]$ (k_3). En effet, pour les D, D-peptidases, celle-ci dépasse difficilement $0,001 \text{ s}^{-1}$ (Matagne, A. 1998). L'hydrolyse lente provoque l'accumulation de l'intermédiaire ($t_{1/2} > 10$ minutes) et est ainsi responsable de l'inhibition (Frère, J. M. 1992).

En revanche, des travaux réalisés par Frère, Matagne et Waley ont montré que le k_3 des β -lactamases de *B. Licheniformis* et *Streptomyces albus G* était supérieur à 10^4 s^{-1} ce qui explique la redoutable efficacité de ce mécanisme de résistance (Matagne, A. 1998).

Les informations structurales fournies par des études cristallographiques ont mis en évidence qu'au moins quatre résidus du site actif des β -lactamases de classe A intervenaient dans la catalyse: Ser70, Lys73, Lys234 et Glu166 associé à une molécule d'eau (W1) (Herzberg, O. 1987).

Des expériences de mutagenèse dirigée menées sur cette enzyme impliquent de façon formelle le couple Glu166/W1 dans l'étape de déacylation, W1 jouant le rôle de relais dans le transfert de charge aboutissant à l'hydrolyse (Strydnaka, N. C. J. 1992 ; Adachi, H. 1991 ; Escobar, W. A. 1991 ; Guillaume, G. 1997).

Si cette hypothèse est communément admise, pour l'étape d'acylation, deux écoles s'opposent encore.

L'identité du résidu activant la sérine 70 est sujet à controverse: Glu166 ou Lys73 (schéma 7)?

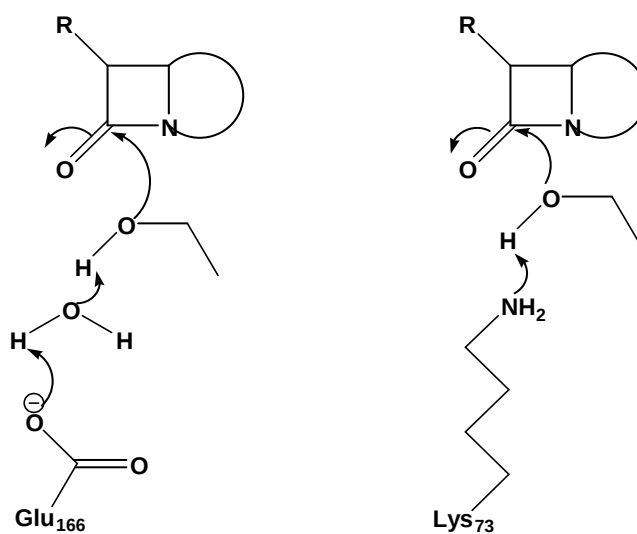


schéma 7 : Les deux voies possibles de l'acylation.

Selon Strydnaka et ses collaborateurs, l'hydrolyse du noyau β -lactame fait intervenir un résidu différent pour chaque étape (Strydnaka, N.C.J. 1992). C'est la Lys 73, qui comme l'Hist 57 dans les protéases à sérine type chymotrypsine, joue le rôle d'activateur. Pour cela, le groupement basique de la chaîne latérale doit être sous forme NH_2 . Or, le pKa de l'acide aminé ne devrait pas le permettre.

D'après certains auteurs, une diminution du pKa de la lysine (5-6 unités de pH) pourrait résulter d'un important réseau de liaisons hydrogène formé avec les résidus Ser70, Asn132 et le carbonyle de la Ser130. Pourrait également entrer en jeu, une zone fortement électropositive créée par le dipôle de l'hélice- $\alpha 2$, le groupe alkylammonium de la Lys234, et probablement d'autres résidus basiques localisés près du site actif (Herzberg, O. 1987 ; Strydnaka, N. C. J. 1992). Cependant de nombreux éléments viennent s'opposer à cette hypothèse.

En effet, Gibson et ses collaborateurs ont montré que l'accumulation de l'acyl-enzyme pour des mutants Glu166Xaa pouvait provenir d'une diminution simultanée des paramètres cinétiques liés aux deux étapes, acylation et déacylation (Gibson, R. M. 1990).

Guillaume et son équipe ont également montré que si la mutation Glu166Asn transformait la β -lactamase TEM-1 en PBP (k_3 pour la benzylpénicilline diminué de 10^9), le k_2/K_s était aussi modifié d'un facteur 10^3 (Guillaume, G. 1997).

L'étude de Matagne et collaborateurs en 1993, vient encore affaiblir cette hypothèse. Ils ont pu observer des constantes d'acylation très faibles avec des antibiotiques portant un groupement méthoxy sur la face α (céfoxitine, moxalactame...). Ceci est attribué au déplacement de la molécule d'eau W1 par la fonction méthoxy. Si la lysine intervenait dans la formation de l'acyl-enzyme, le réseau de liaisons hydrogène entre celle-ci et la ser 70 n'étant pas perturbé, la catalyse devrait se faire avec la même efficacité (Matagne, A. 1993).

Damblon et collaborateurs ont réalisé la titration par RMN de la Lys73 et ont pu infirmer la diminution de pKa nécessaire à l'activation de la Ser70 (Damblon, C. 1996).

Enfin une étude cristallographique a permis d'établir que le Glu166 était sous forme acide carboxylique à pH 8, lorsque la sérine est liée de façon covalente à un inhibiteur (Minasov, G. 2002).

Ainsi, les nombreuses études rapportées semblent privilégier l'hypothèse selon laquelle le Glu166 interviendrait dans les deux étapes, et appuyer la voie mécanistique proposée par Lamotte-Brasseur et collaborateurs en 1991 (Lamotte-Brasseur, J. 1991).

Les β -lactamases de classe C, initialement nommées céphalosporinases du fait de leur

préférence pour ce type de substrats, sont présentes à quelques exceptions près, dans la plupart des bactéries Gram (-). Globalement, la structure tertiaire des enzymes de cette classe ressemble à celle de la classe A. Les résidus du site actif diffèrent néanmoins. Ainsi, à la Ser70, la Lys73, la Lys315 et la Ser130 des protéases de classe A correspondent la Ser64, la Lys67, la Lys315 et la Tyr150. Les premières structures cristallographiques suggéraient un mécanisme symétrique dans lequel le rôle de la base activant la Ser64 nucléophile était tenu par la Tyr150. Celle-ci assistait ensuite l'ouverture du β -lactame, et donc l'effondrement de l'intermédiaire tétraédrique, en transférant le proton à l'azote du cycle à quatre chaînons. Ce même résidu intervenait ensuite dans l'étape de déacylation en activant une molécule d'eau conservée. Cependant, ce mécanisme est aujourd'hui remis en cause car certaines données de la littérature viennent contredire une implication aussi directe de la Tyr150 (la Tyr serait sous forme neutre dans l'enzyme native et ne pourrait assumer son rôle de base) (Fisher, J. F. 2005).

Les aspects structuraux et mécanistiques des β -lactamases de classe D, n'ont fait l'objet d'études que depuis peu. Ceci est lié en partie à leur apparition récente dans certaines souches pathogènes d'intérêt, mais aussi dans une plus grande mesure, à la difficulté de les manipuler dans des tests *in vitro*. La quantité de CO₂ présente lors des expériences menées sur ces enzymes, a été identifiée comme étant un paramètre critique à l'origine des problèmes de reproductibilité. Il a été prouvé depuis que le CO₂ jouait un rôle d'activateur dans l'hydrolyse des antibiotiques à noyaux β -lactame par les protéases de cette classe. Le mécanisme impliquerait dans les deux étapes, activation de la sérine (acylation) et de la molécule d'eau (déacylation), une Lysine N-carboxylée formée par réaction (réversible) du CO₂ présent et du ϵ -NH₂ de l'acide aminé (lien carbamate) (Fisher, J. F. 2005).

L'évolution des PBPs en β -lactamases a été imposée par la sélection naturelle. Cependant depuis la découverte de la benzylpénicilline par Fleming en 1928, l'usage intensif d'antibiotiques a amplifié de façon dramatique le développement de ce mécanisme de résistance.

Au-delà de la transmission des gènes grâce à des éléments mobiles qui ont permis l'expansion du phénotype résistant, les mutations ponctuelles ont généré, en réponse à la pression exercée par de nouvelles molécules, des enzymes aux spectres d'action plus étendus. Ainsi sont apparues au début des années 80, peu de temps après les premières utilisations d'antibiotiques à large spectre, de nouvelles β -lactamases : AmpC (céphalosporinase), ESBL (Extended

Spectrum β -lactamase), carbapénémases (Wilke, M. S. 2005 ; Poole, K. 2004).

Les ESBLs dérivent principalement des classes A et D et sont généralement inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases classiques. Elles sont présentes dans les bactéries Gram (-) et en particulier chez les membres des *Enterobacteriaceae* (*E. coli* et *K. pneumoniae*). Elles sont résistantes aux pénicillines, aux céphalosporines de première et seconde génération aussi bien qu'à celles de troisième, les oxyimino-céphalosporines (céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone). Les monobactames (aztréoname) font également partie des molécules inactives. Au contraire, elles sont sensibles aux céphamycines (céfoxitine, céfotétan), aux céphalosporines de quatrième génération (céfépime, ceftipime) et aux carbapénèmes (imipénème, méropénème, panipénème). La présence d'AmpC (en plus d'ESBL) ou la perte de porines dans ces organismes peut aboutir selon les cas à une augmentation de la résistance vis-à-vis des céphamycines, des céphalosporines de quatrième génération et/ou des carbapénèmes.

Les AmpC, céphalosporinases de classe C, quant à elles, ne sont pour l'instant sensibles qu'aux céphalosporines de quatrième génération et aux carbapénèmes. Pourtant, des cas de résistance concernant la première famille, ont déjà été observés cliniquement, et la perte d'une porine peut également conduire à une augmentation de la résistance envers les carbapénèmes dans les organismes producteurs de ces enzymes. Contrairement aux protéases de classe A et aux ESBLs, leur activité n'est pas bloquée par des inhibiteurs de β -lactamases classiques.

Des activités carbapénémases ont déjà été observées dans les classes de β -lactamases A, B et D. Le phénomène reste rare et les enzymes peuvent-être inactivées. Cependant, il a été isolé chez *Aeromonas veronii*, une nouvelle enzyme, AVS-1, capable d'hydrolyser l'imipénème, et insensible aux composés habituels du type acide clavulanique.

Les β -lactamases représentent le mécanisme de résistance le plus répandu dans le monde bactérien et leur évolution illustre la grande plasticité dont ces organismes font preuve pour survivre. Cette adaptabilité s'exprime également dans la diversité des mécanismes mis en jeu pour contrer l'action létale des antibiotiques. Ainsi des organismes, dont beaucoup sont impliqués dans les maladies nosocomiales, ont développé une résistance assistée par d'autres protéases à sérine, les transpeptidases elles-mêmes.

3.2. Les PBPs résistantes

Les PBPs sont divisées en deux groupes, celles de bas poids moléculaire (BPMs) et celles de haut poids moléculaire (HPMs). Les BPMs, solubles, n'ont pour l'instant pas été impliquées dans des phénomènes de résistance.

Au contraire, les HPMs sont au cœur d'une forme de résistance qui s'exprime par la modification des cibles (PBPs) elles-mêmes. Les organismes concernés (*S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecium*, *N. gonorrhoeae*...) sont parmi les plus virulents et les plus problématiques (Wilke, M. S. 2005 ; Poole, K. 2004).

La résistance de *S. pneumoniae* a débuté en 1977 en Afrique du Sud mais s'est rapidement propagée à travers le monde. Le mécanisme implique, entre autre, le développement de PBPs mutantes possédant une affinité réduite pour les antibiotiques à noyau β -lactame.

Par exemple le phénotype PRSP, Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae*, regroupe les organismes exprimant des variants d'une enzyme, PBP2x, qui ont été intensivement étudiés.

La souche sp328 héberge le mutant Thr338Ala, le plus représenté cliniquement, pour lequel la résistance est attribuée à la perte d'une molécule d'eau du site actif, affaiblissant le réseau de liaisons hydrogène qui stabilise l'intermédiaire acyl-enzyme. Un plus haut niveau de résistance peut être atteint avec une mutation supplémentaire, Met339Phe. Dans ce variant, la sérine nucléophile 337 est réorientée et les vitesses de réaction sont diminuées de 4 à 10 fois. Dans les mutants Ser389Leu et Asn514His de cette même souche, les interactions avec l'antibiotique sont stériquement défavorisées, réduisant de cette manière les taux d'acylation.

Des mécanismes alternatifs ont été trouvés dans d'autres souches. Ainsi, dans la souche sp5259, la mutation Gln552Glu introduit une charge négative à l'entrée du site actif qui comme dans PBP5fm (*E. faecium*) défavorise l'interaction avec les β -lactames chargés négativement. D'autres mutations peuvent altérer la structure, comme dans PBP2a (*S. aureus*), de telle sorte que le réarrangement requis pour l'acylation soit énergétiquement défavorisé.

Il faut cependant noter que PBP2x n'est pas la seule enzyme impliquée dans le phénotype PRSP. *S. pneumoniae* possède cinq HPMs, 1a, 1b et 2a de classe A (bifonctionnelles : transpeptidase et glycosylase) et 2x, 2b de classe B (monofonctionnelles). Chacune d'entre elles peut être mutée en variant de faible affinité et plusieurs combinaisons peuvent ainsi être générées au sein d'une bactérie lui conférant une résistance plus ou moins importante (Sanbongi, Y. 2004).

Staphylococcus aureus constitue un autre exemple d'organisme possédant des PBPs modifiées (PBP2a). En 1941, toutes les souches de cette espèce étaient considérées comme sensibles à la Pénicilline G. Mais en 1944, les premières β -lactamases sont apparues. L'industrie pharmaceutique répliqua avec l'introduction de la méticilline qui fut suivie peu de temps après de l'émergence du phénotype MRSA (Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

Depuis l'utilisation des premiers antibiotiques, les bactéries ne cessent de s'adapter au stress imposé par l'Homme. Au travers des mutations, de l'échange et de la collecte d'informations génétiques, elles renforcent leur défense afin de survivre.

Voilà pourquoi la recherche de molécules actives continue dans ce domaine de la santé. Aujourd'hui des agents thérapeutiques possédant une activité anti-MRSA, anti-PRSP, anti-entérocoques, voire les trois, voient le jour. De nouvelles céphalosporines, de nouveaux céphèmes et carbapénèmes, stables vis-à-vis des β -lactamases et à haute affinité envers les PBPs résistantes, sont développés. Ces composés permettent pour l'instant de garder une longueur d'avance mais tôt ou tard leur efficacité sera remise en question.

4. Les antibiotiques à noyau β -lactame

Les antibiotiques à noyau β -lactame constituent la plus importante classe de médicaments utilisée aujourd'hui dans le traitement des maladies infectieuses d'origine bactériennes (65 % du marché des antibiotiques) (Elander, R. P. 2003).

Avant 1940, celles-ci représentaient la plus grande cause de mortalité. Mais depuis l'avènement de l'antibiotique, peu de personnes les considèrent encore comme une menace au même titre que les infections virales ou les maladies cardiovasculaires.

Or l'apparition et l'évolution du phénomène de résistance nous rapprochent d'une crise majeure. La pression de sélection naturelle s'est inversée depuis la première utilisation de la pénicilline, et celle-ci, exercée par les bactéries, stimule la recherche de nouveaux composés toujours plus actifs (Niccolai, D. 1997 ; Dürckheimer, W. 1985).

4.1. Les pénames

La pénicilline G (*P. notatum*) fut découverte par hasard, par A. Fleming en 1928 (figure 3). Néanmoins, c'est la démonstration de son efficacité antibactérienne et de sa faible toxicité par Florey et Chain en 1940 qui marqua réellement le début d'une ère nouvelle pour la santé publique.

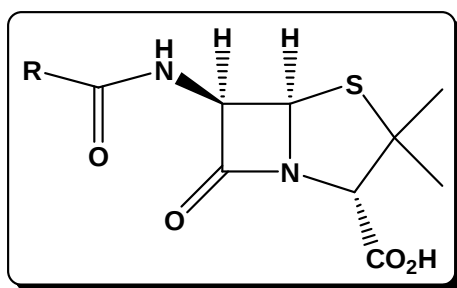


Figure 3 : les pénicillines (Benzylpénicilline ou Pénicilline G : R = PhCH₂).

Peu de temps après, beaucoup d'autres antibiotiques non β -lactamiques comme la streptomycine (1943), le chloramphenicol (1947) ou l'érythromycine (1952), furent successivement découverts grâce au screening systématique effectués sur les organismes (moisissures, bactéries...) présents dans les sols. Une seconde impulsion provint de l'isolement d'un intermédiaire dans la voie de biosynthèse de la pénicilline, l'acide 6-amino-pénicillanique, également présent dans la voie de synthèse chimique décrite par Sheehan en 1957 (figure 4) (Sheehan, J. C. 1957).

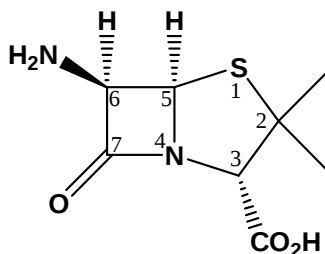


Figure 4 : l'acide 6-amino-pénicillanique (6-APA).

Cette molécule biologiquement inactive, constitue le noyau de base des pénicillines développées ensuite par héli-synthèse. La méthode consiste à acyler la fonction amine libre en position 6 du noyau lactame pour donner ainsi accès à une large gamme de molécules potentiellement plus actives que la Pénicilline G.

L'ampicilline est par exemple née de cette héli-synthèse. Puis, des modifications chimiques ont permis d'élargir le spectre d'action, d'améliorer l'absorption, d'obtenir un effet bactéricide plus rapide ou encore de diminuer les effets secondaires.

Pourtant certaines de ces molécules se sont révélées inefficaces contre les organismes produisant des β -lactamases, et sont encore aujourd'hui utilisées en association avec un inhibiteur de ces enzymes de défense (figure 5). C'est le cas de l'Augmentin® qui réunit Amoxicilline et acide Clavulanique. D'autres compositions pharmaceutiques sont à base de Sulbactame.

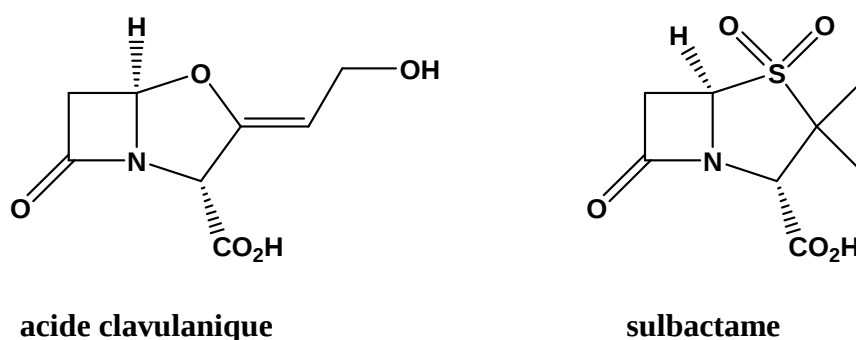
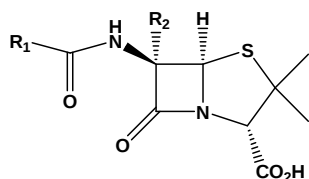


figure 5 : exemples d'inhibiteurs de β -lactamases.

La stabilité des pénames vis-à-vis des β -lactamases s'est vite révélée être le défi majeur et la recherche de composés capables de résister aux assauts de ces enzymes a abouti avec plus ou moins de succès. Ainsi l'introduction d'un groupement méthoxy en position 6 a fourni la Temocilline, efficace contre les *Enterobacteriaceae* produisant des β -lactamases.

Des modifications similaires ont permis d'obtenir des molécules dont les spectres d'activité antibactérienne se sont étendus au point d'être comparables à ceux des céphalosporines de 3^{ème} génération. C'est le cas du composé BRL 36 650 contenant un groupement formylamino en position 6 déposé par Beecham (tableau 1).



R_1	R_2	Nom générique/code
	H	Ampicilline (1962)
	H	Amoxicilline (1971)
	OCH ₃	Temocilline (1982)
	NHCHO	BRL 36 650 (1984)

tableau 1 : les pénicillines.

Néanmoins, malgré les améliorations obtenues, les pénicillines se sont trouvées vite dépassées par l'évolution de la résistance. Aujourd'hui, elles sont encore utilisées dans le traitement préventif d'infections, le plus souvent en association avec un inhibiteur de β -lactamase (augmentin®), mais ne sont plus au coeur des programmes de recherche.

4.2. Les céphèmes

La céphalosporine C (*C. acremonium*) isolée en 1945 par Brotzu, a vu sa structure élucidée au début des années 60. Sa grande stabilité vis-à-vis des β -lactamases a rapidement suscité l'intérêt, mais ses faibles propriétés pharmacologiques n'ont jamais permis son développement en tant que médicament (figure 6). La production d'acide 7-amino-céphalosporinique (7-ACA) qui s'ensuivit fut comme pour la pénicilline le point de départ vers une diversité de composés plus puissants (Page, M. G. P. 2004).

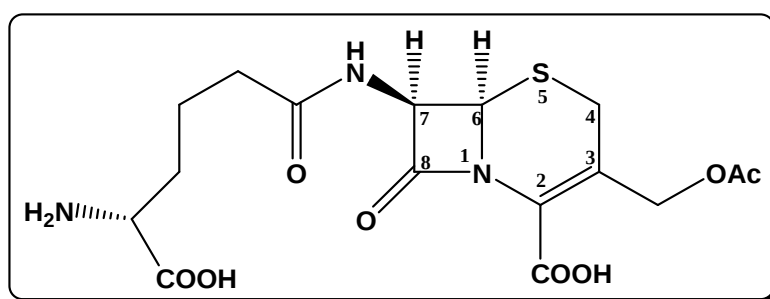
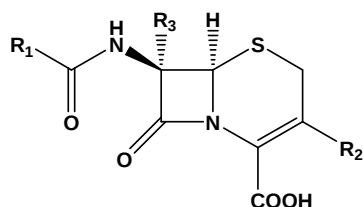


figure 6 : la céphalosporine C.

Ainsi la propriété la plus remarquable de la première céphalosporine obtenue par hémisynthèse, la cephalothine, fut son haut niveau d'activité contre des staphylocoques résistants aux pénicillines. Par la suite, d'autres développements ont abouti à des molécules comme la cephalexine (KeflexTM) ou le cefaclor, efficace par voie orale. Cependant l'activité de cette première génération de produits contre des souches Gram (-) telles que *Proteus*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Serratia*, *Hemophilus* ou encore *Pseudomonas* restait insuffisante.

La seconde génération de céphalosporines, cefazoline (Ancef[®]), cefuroxime axetil (CeftinTM, Zinacef[®]), cefoxitine (Mefoxin[®]) a élargi le spectre à certaines souches de bactéries Gram (-), mais c'est la 3^{ème} génération dont le premier représentant est la cefotaxime (Claforan[®]) qui a apporté l'amélioration décisive. En effet, alors que l'activité contre les bactéries Gram (+) est comparable à celle des 1^{ère} générations de céphalosporines, l'activité contre les

souches Gram (-) est de dix à cent fois plus élevée. De plus, la cefotaxime est la première céphalosporine à posséder une activité clinique significative contre *Pseudomonas* (tableau 2).



R ₁	R ₂	R ₃	Nom générique
	-CH ₂ OAc	H	Cephalosporine C (1945)
	-CH ₂ OAc	H	Cephalothine (1962)
	-CH ₃	H	Cephalexine (1967)
	-Cl	H	Cefaclor (1974)
		H	Cefazoline (1970)
	-CH ₂ OCONH ₂	H	Cefuroxime (1975)
	-CH ₂ OCONH ₂	OCH ₃	Cefoxitine (1972)
	-CH ₂ OAc	H	Cefotaxime (1975)

tableau 2 : Les céphalosporines.

Malgré leur succès commercial, les céphalosporines de 3^{ème} génération sont peu nombreuses à pouvoir être administrées par voie orale (cefixime, cefdinir, ceftibuten). De plus, leur faible caractère lipophile rend leur absorption, au niveau du tractus intestinal, difficile. Un des facteurs contributifs est le faible pKa de la fonction acide carboxylique en position C4 du noyau céphème. La stratégie utilisée pour remédier à ce problème est de masquer la charge portée par l'acide, à l'aide d'un groupement lipophile qui pourra être clivé spontanément ou enzymatiquement lors de son absorption. Ainsi des composés estérifiés ont été mis sur le marché (cefpodoxime proxetil [Vantin®]), et récemment (décembre 2004), le composé Cefprozime alapivoxil a fait l'objet d'une demande d'approbation au Japon (figure 7).

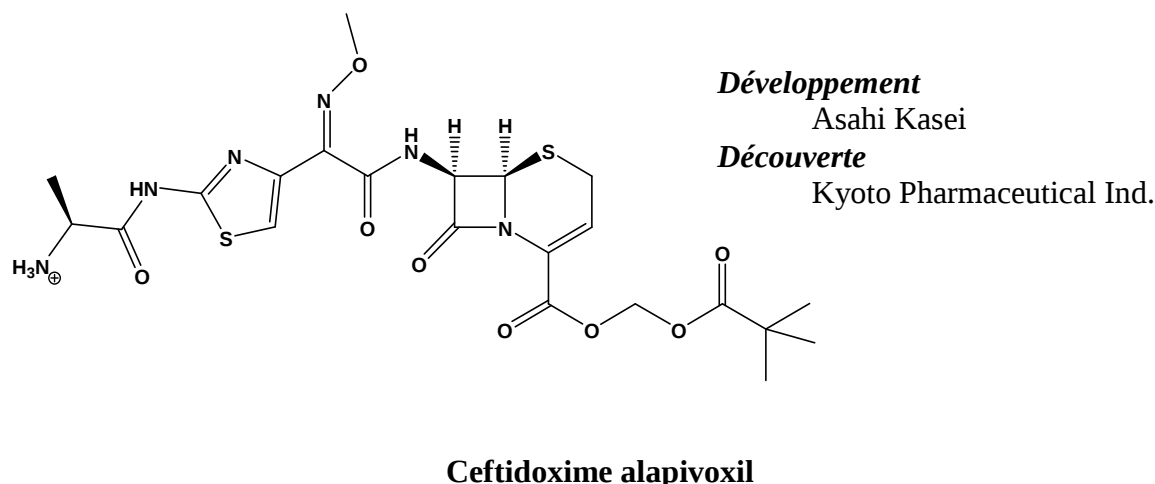


figure 7 : Céphalosporine de 3^{ème} génération active par voie orale.

Avec la 4^{ème} génération, la gamme des bactéries Gram (-) sensibles aux agents antibactériens s'est étendue du fait d'une meilleure stabilité vis-à-vis des β -lactamases mais aussi probablement grâce à une capacité moindre à induire une résistance. Le cefepime (Maxipime®) et le cefpirome (Cefrom®) sont des exemples de cette catégorie de céphalosporines (figure 8).

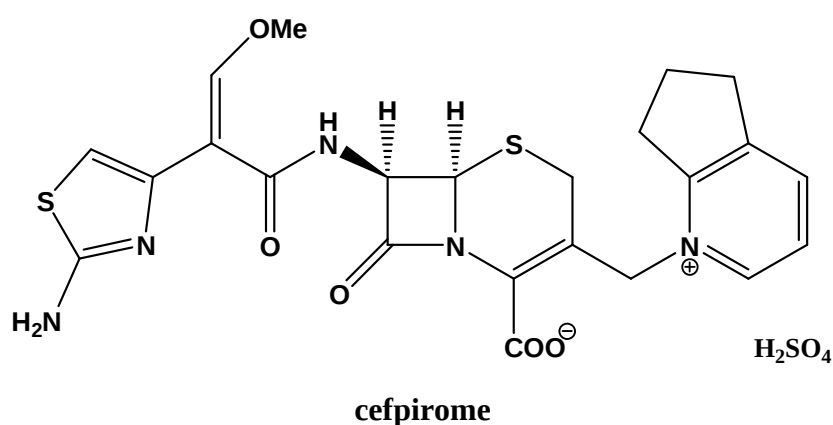
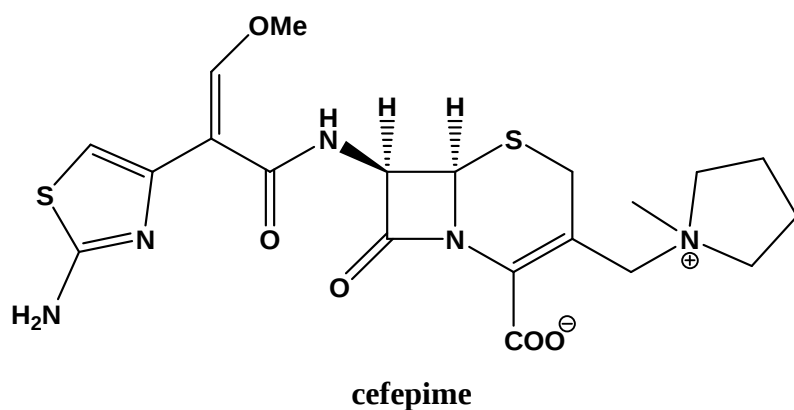
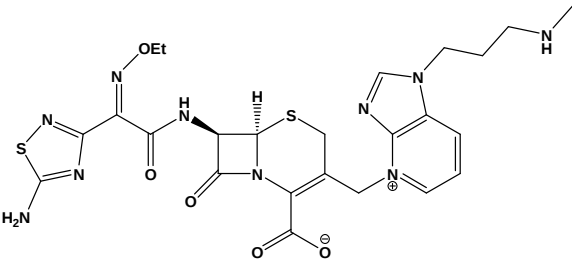
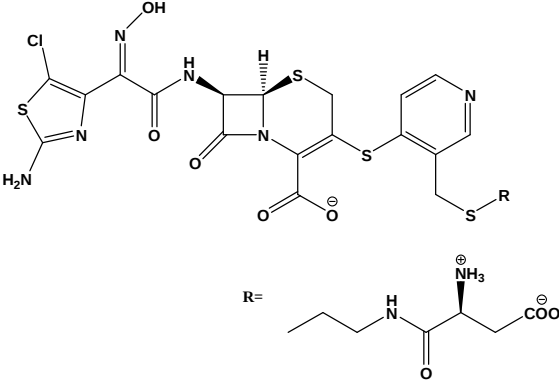
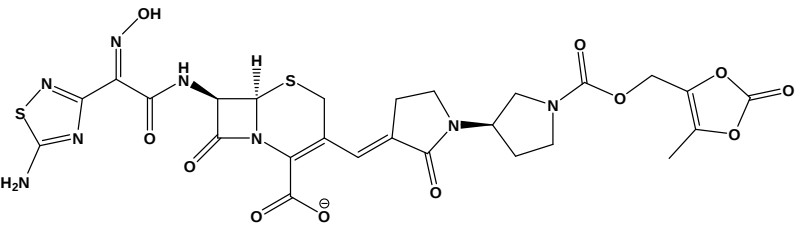
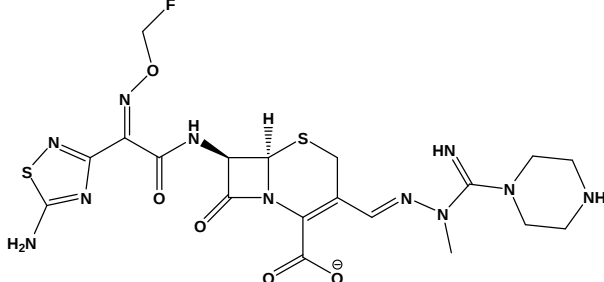


figure 8 : Céphalosporine de 4^{ème} génération

Comme la cefuroxime (2^{nde} génération), cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime et ceftizoxime (3^{ème} génération), le cefepime est capable de pénétrer le système nerveux central et est ainsi utile dans le traitement contre *B. meningitis*.

Enfin, les céphalosporines anti-MRSA développées depuis le milieu des années 90, constituent un nouveau groupe de molécules qui exhibent un plus large spectre d'activité contre les bactéries Gram (+) et pour la première fois, contre les staphylocoques résistants à la méticilline. Actuellement plusieurs de ces composés sont en phase de développement clinique (tableau 3) (Page, M. G. P. 2004 ; Bryskier, A. 2005 ; Bush, K. 2004 ; Appelbaum, P. C. 2005).

Structure/code	Développement Découverte Statut
 S-3578	Développement : Shionogi Découverte : Shionogi Statut : Phase I (novembre 2003)
 RWJ-442831	Développement : RW Johnson Pharmaceutical Research Institute Découverte : Microcide Pharmaceuticals, Inc. (MC-02479) Statut : Phase I (septembre 2003)
 Ceftobiprole BAL-9141/5788, Ro 63-9141	Développement : Basilea Pharmaceutica Découverte : Hoffmann-La Roche (Ro-63-9141) Statut : Phase III (mars 2004)
 CB-181963	Développement : Cubist Découverte : Sandoz (CAB-175) Statut : Phase I stoppée (février 2004)

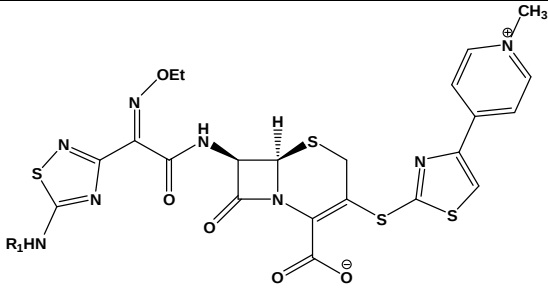
 TAK-599, R₁ = PO(OH)₂	Développement : Peninsula Pharmaceuticals, Inc. Découverte : Takeda Chemical Industries Statut : Phase I (2005)
---	---

tableau 3 : Les céphalosporines de 4^{ème} génération
active contre les bactéries Gram (+).

4.3. Les pénèmes

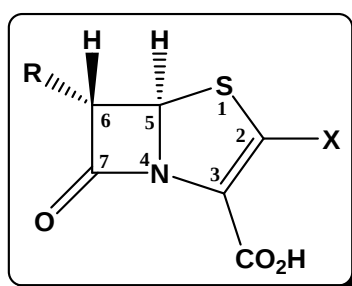


figure 9 : Les pénèmes.

Les pénèmes constituent la seule classe d'antibiotiques à noyau β -lactame d'origine entièrement synthétique (figure 9). C'est Woodward qui a décrit pour la première fois la synthèse de ces composés qui peuvent être considérés comme des hybrides entre les pénicillines et les céphalosporines (Woodward, R. B. 1980). Malgré leur bonne activité antibactérienne, la plupart de ces molécules se sont révélées inutilisables du fait de leur trop grande instabilité chimique. Cette famille conserve pourtant un intérêt puisque quelques molécules comme le sulopénème, le ritipénème ou le faropénème daloxate, pro-drogue du faropénème sodique, actuellement en phase clinique III, ont montré des activités remarquables contre les souches de bactéries résistantes Gram (+) (figure 10).

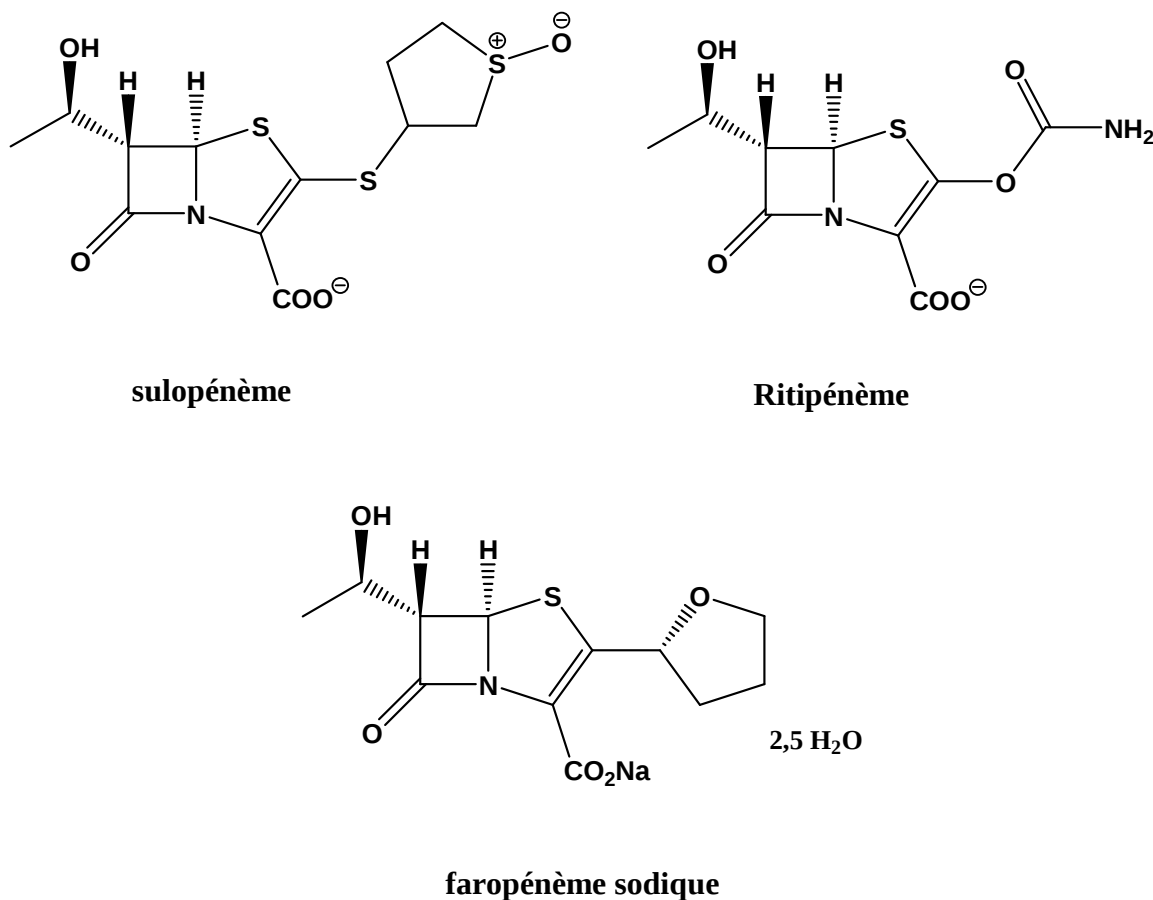


figure 10 : Les pénèmes.

4.4. Les carbapénèmes

La thiénamycine, produite par *S. cattleya*, a été découverte à la fin des années 70. Bien que possédant une activité antibactérienne puissante, c'est l'imipénème, un dérivé plus stable chimiquement, qui fut utilisé contre les infections sérieuses. Malgré sa stabilité à la fois chimique et enzymatique (stable envers les β -lactamases du fait de sa chaîne hydroxyéthyle), il est rapidement inactivé par la déhydropeptidase (DHP) présente dans les reins des mammifères. Son utilisation requiert donc, à la manière des premières pénicillines, l'administration conjointe d'un inhibiteur de DHP (cilastatine) qui réduit ainsi l'accumulation rénale de l'antibiotique néphrotoxique (figure 11).

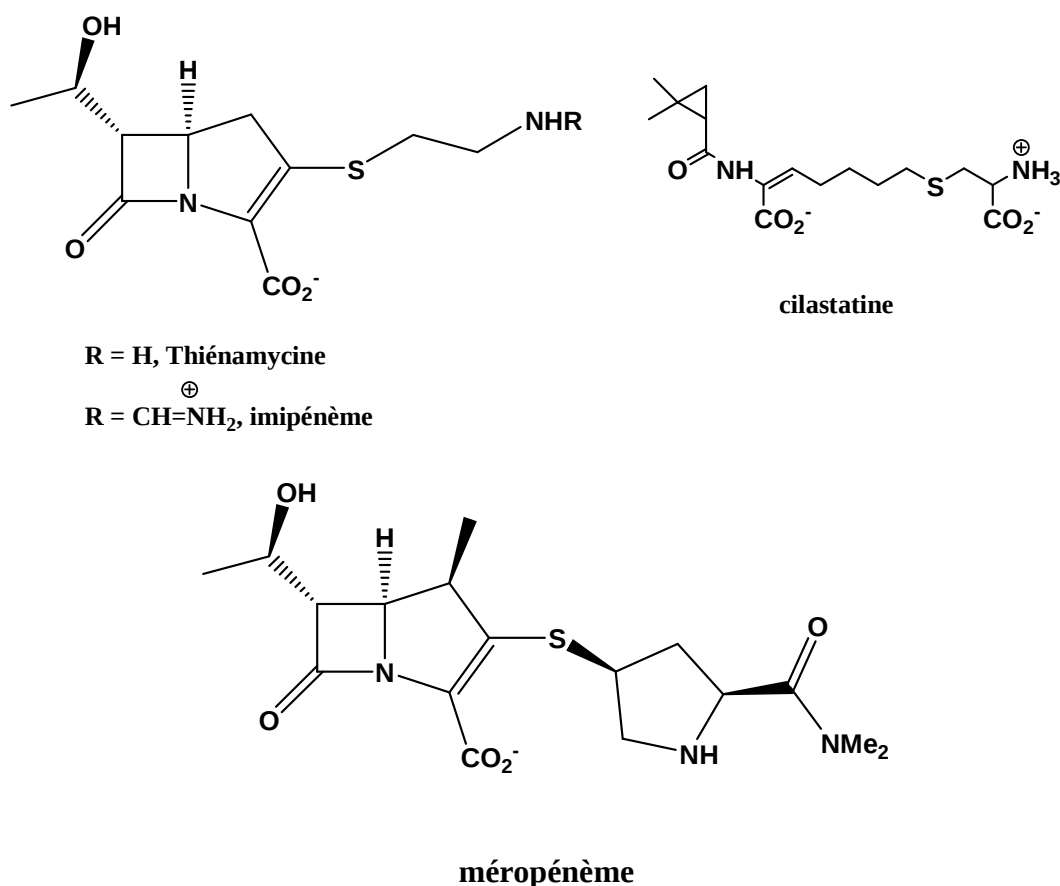


figure 11 : Les carbapénèmes.

L'introduction d'un méthyle en position 1- β fournit le méropénème et permet de s'affranchir de la cilastatine. De plus, il est possible d'injecter le composé en une seule dose avant une intervention chirurgicale alors que l'imipénème nécessite un mode d'administration plus graduel à cause, entre autre, de sa plus faible solubilité.

Bien que les carbapénèmes soient des composés d'origine naturelle, la production des intermédiaires clés à grande échelle par fermentation n'est pas encore commercialement viable et très tôt, l'intérêt s'est concentré vers des approches entièrement synthétiques notamment chez Merck Sharp & Dohme (Salzmann, T. N. 1980 ; Shih, D. H. 1984).

La découverte de nouvelles structures a pour objectif l'élargissement du spectre d'action (Bryskier, A. 2005 ; Andreotti, D. 2000 ; Edwards, J. R. 2000). Par exemple, certains carbapénèmes comme d'autres β -lactames sont inefficaces contre les souches MRSA

(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) du fait de leur faible affinité pour la PBP2a. L'addition d'un groupement lipophile à une extrémité de la molécule peut pallier ce manque. Grâce à cette approche, deux molécules ont vu le jour chez Merck :

L-696256 et son analogue plus soluble L-742728. Néanmoins, des réactions immuno-toxiques ont été observées au cours des évaluations cliniques et ces composés ont été abandonnés. Le CS-023 (RO-4908463), en phase clinique II (dernière mise à jour, juin 2006), mis au point initialement par Sankyo et développé par Roche, se montre pour l'instant prometteur puisque de très bonnes activités contre des souches résistantes comme les MRSA et PRSP ont été observées (figure 12).

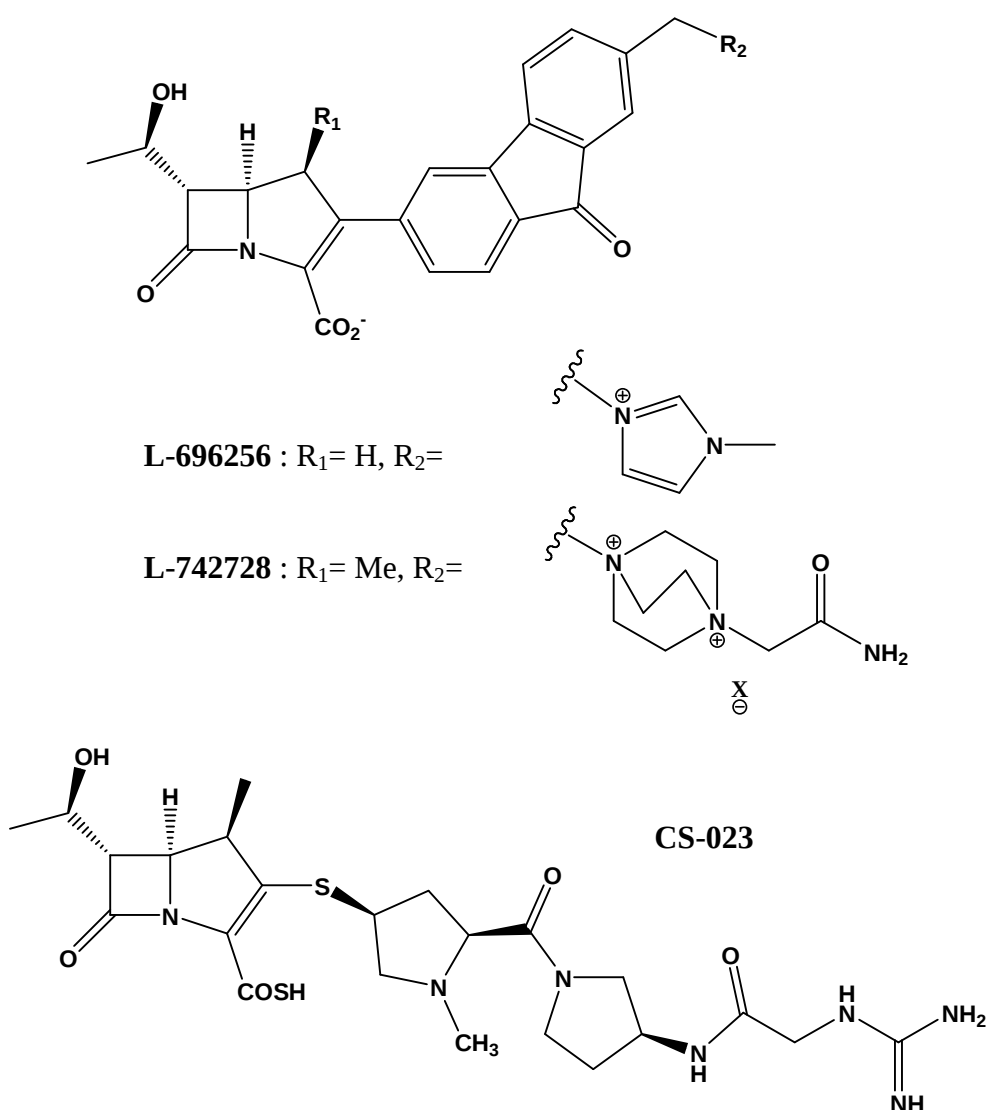


figure 12 : Carbapénèmes anti-MRSA développés par Merck et Roche.

De son côté, Glaxo Wellcome a rapporté la synthèse de carbapénèmes particuliers, les trinèmes dont le représentant le plus cité est le sanfetrinème (Singh, K. V. 1996). Toutefois, il semble que le projet ait été interrompu (figure 13).

Les carbapénèmes sont aujourd'hui considérés comme la classe d'antibiotiques à noyau β -lactame la plus puissante et la plus stable vis-à-vis de l'hydrolyse par les β -lactamases. Mais depuis une dizaine d'années, une résistance, due à la production de métallo- β -lactamases (classe B) ou de carbapénémases, est apparue. Ces enzymes sont capables de reconnaître la chaîne hydroxy-éthyle qui protège habituellement ces molécules des protéases plus traditionnelles. A l'heure actuelle, le défi consiste donc à synthétiser des composés possédant un large spectre d'action et une stabilité accrue envers les β -lactamases.

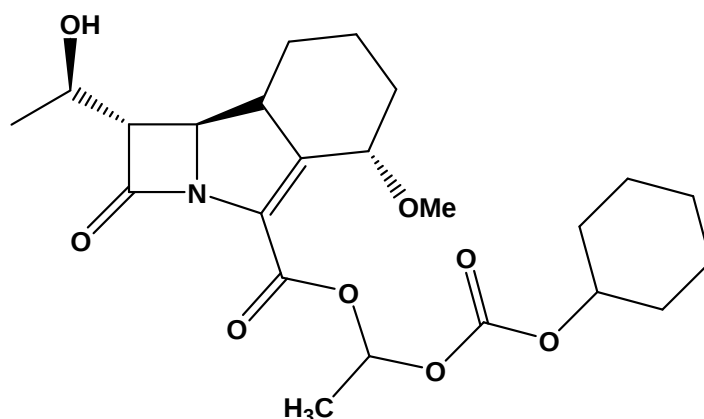


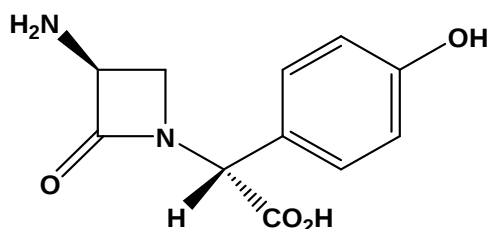
figure 13 : Sanfetrinème cilexetil développé par Glaxo Wellcome.

4.5. Les monobactames

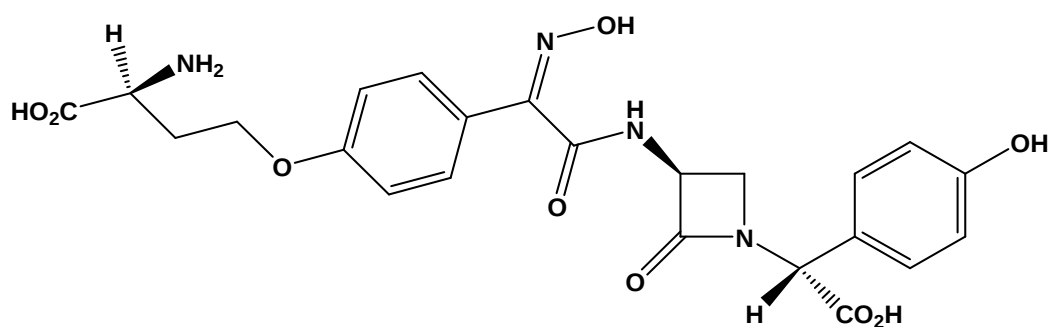
Au milieu des années 70, il fut décrit dans la littérature, un nouveau genre de β -lactames, possédant potentiellement une activité antibactérienne et ayant pour caractéristique d'être monocyclique.

C'est l'exemple des nocardicines (*N. uniformis*), dérivées de l'acide 3-aminonocardinique (3-ANA). Bien que cette famille de composés ne présente pas véritablement d'intérêt

thérapeutique, la nocardicine A exhibe une activité modérée contre les souches Gram (-) et *Pseudomonas* (figure 14).



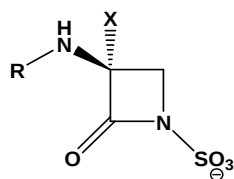
Acide 3-aminocardinique



Nocardicine A

figure 14 : Exemple de nocardicine.

Des β -lactames monocycliques ayant une réelle activité antibiotique furent décrits pour la première fois au début des années 80. Deux équipes, l'une de Takeda Chemical industries et l'autre du Squibb Institute décrivent indépendamment cette nouvelle classe de produits naturels (Sykes, R. B. 1981 ; Imada, A. 1981). Comme caractéristiques particulières, les monobactames, possèdent un cycle β -lactame non substitué en position 4, un groupe acylamido en position 3, et une fonction acide sulfonique sur l'azote du β -lactame. Dans la plupart des composés trouvés, la chaîne acyle consiste en un di, tri ou oligopeptide bien que des dérivés mono-acétylés aient été isolés. Les monobactames naturels possèdent quasiment tous un groupement méthoxy- en position 3 probablement à l'origine de leur grande stabilité envers les β -lactamases (tableau 4).



R	X	Nom générique/code
CH ₃ CO	OCH ₃	SQ 26 180
	OCH ₃	Sulfazécine/ SQ 26 445
	OCH ₃	Isosulfazécine
	H	SQ 26 700
	OCH ₃	SQ 26 875

tableau 4 : Les monobactames naturels.

Contrairement aux pénicillines, céphalosporines ou aux nocardines, ces molécules sont en fait des produits du métabolisme des bactéries. La sulfazécine a par exemple été isolée à partir de diverses souches telles que *Gluconobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Agrobacterium radiobacter*, *Flexibacter sp.*, et *Chromobacterium violaceum*.

Comme la nocardine, les monobactames possèdent une faible activité antibiotique contre les souches Gram (-) et *Pseudomonas* mais exhibent une très forte activité envers les Gram (+).

Pour améliorer ses capacités d'agent antibactérien, la chaîne acylamido mais aussi le squelette de la molécule elle-même ont fait l'objet de nombreuses modifications.

Dans ce but, l'acide 3-amino-monobactamique (3-AMA) a été synthétisé car sa production par fermentation s'est révélée difficile (figure 15) (Cimarusti, C. M. 1982).

Les monobactames non-substitués en position 4 du cycle ont pu être obtenus par conversion de l'acide 7-aminodesacetoxycephalosporanique et de la pénicilline G.

En revanche, les composés substitués en C-4 n'ont pu être obtenus de cette façon et sont donc issus de la synthèse totale.

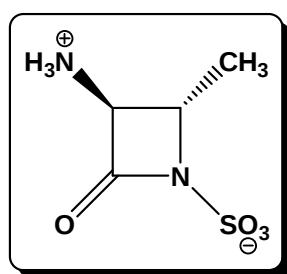


figure 15 : L'acide 3-amino-monobactamique (3-AMA).

Les variations structurales au niveau de la fonction acylamido ont abouti à l'Aztréoname, molécule possédant une forte activité contre les bactéries Gram (-) et *Pseudomonas*, comparable à celle des céphalosporines de 3^{ème} génération, mais faible contre les bactéries Gram (+) (figure 16).

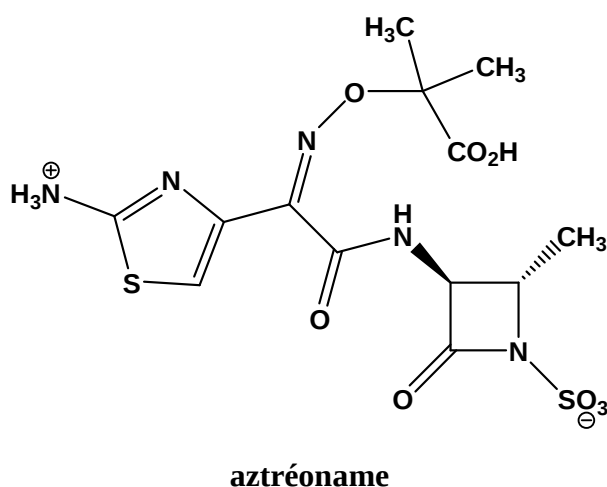


figure 16 : Exemple d'un monobactame d'origine synthétique.

5. Réactivité des β -lactames

5.1. Modèle de réactivité, une approche intuitive

Pendant longtemps, l'activité biologique des β -lactames a été attribuée à leur réactivité chimique. Celle-ci fût expliquée par le biais de facteurs géométriques. Ainsi, peu de temps après l'introduction de la pénicilline dans notre pharmacopée, il fût suggéré que l'activité antibiotique était essentiellement due à trois caractéristiques :

(1) la tension inhérente du noyau β -lactame, suffisamment rare dans la nature pour être considérée comme l'origine de la réactivité, (2) la réduction de la résonance de l'amide, due à la conformation particulière de la molécule qui empêche la délocalisation de la paire libre de l'azote, et (3) la fusion d'un second cycle qui augmente les contraintes angulaires de ces systèmes bicycliques (schéma 8) (Strominger, J. L. 1967 ; Woodward, R. B. 1949).

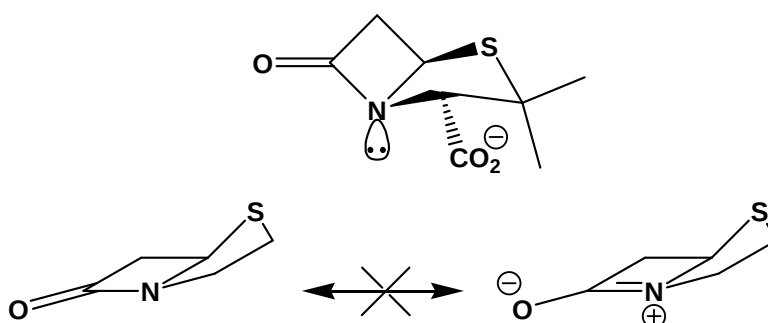


schéma 8 : Pyramidalisation de l'azote et inhibition de la résonance.

En effet, il a été montré qu'une réaction, quelle qu'elle soit, procède 10^{20} fois plus vite si elle implique un cycle à quatre chaînons et son ouverture, que le système acyclique correspondant. De plus, il a été estimé que la délocalisation stabilise les amides d'environ 18 kcal/mol et donc, qu'une réaction impliquant la perte de la résonance à l'état de transition procède 10^{13} fois plus vite si la délocalisation est inhibée. Ainsi, une réaction ayant pour résultat

l'ouverture d'un β -lactame devrait se dérouler 10^{33} fois plus rapidement qu'avec son analogue acyclique.

Pourtant, si les pénicillines, et céphalosporines, sont plus réactives que les amides classiques vis à vis des nucléophiles, les différences ne sont pas flagrantes et ne reflètent pas les contributions théoriques de ces deux facteurs (Page, M. I. 1984 et 1987).

5.2. Déficiences du modèle de réactivité

5.2.1. Réactivité du cycle à 4 chaînons et des β -lactames bicycliques

Une façon simple d'évaluer la réactivité de composés consiste à étudier leur sensibilité envers l'hydrolyse basique. Les comportements de divers β -lactames bicycliques, monocycliques, et amides acycliques vis-à-vis de l'hydrolyse alcaline ont donc été analysés. Il en ressort plusieurs informations qui soulignent les déficiences du modèle de réactivité communément admis (Proctor, P. 1982).

La tension intrinsèque du cycle β -lactame ne constitue pas un gage de réactivité. Page et ses collaborateurs ont ainsi montré qu'il existe des cas où l'amide acyclique correspondante est aussi réactive (figure 17).

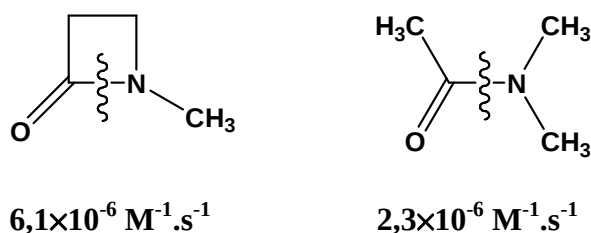


figure 17 : Constantes de vitesse d'hydrolyse (k_{OH} en $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) d'un β -lactame et de son équivalent acyclique (Page, M. I. 2000).

Ils ont également mis en évidence la relation qui existe entre le logarithme de la constante de vitesse d'hydrolyse (k_{OH} en $M^{-1}.s^{-1}$) et la basicité de l'amine formée. En effet, il semble que, contrairement aux amides acycliques, les vitesses d'hydrolyse des β -lactames soient fortement dépendantes du pKa des acides conjugués des amines résultantes. Cette influence diminue néanmoins, de façon importante, pour les amines dont le pKa est supérieur à 6. La conséquence directe de cette observation est que la différence de réactivité entre un amide et le β -lactame correspondant sera d'autant plus grande que le pKa de l'amine est faible, c'est-à-dire inférieur à 6. Un tel composé cyclique pourra être alors de 30 à 500 fois plus réactif vis-à-vis de l'hydrolyse que son équivalent linéaire.

Enfin, ils ont montré que la fusion d'un second cycle au β -lactame augmente la réactivité d'un facteur 100. Bien que ce gain soit substantiel, les auteurs soulignent que la réactivité équivaut à peine à celle attendue, lors de l'ouverture d'un cycle à quatre chaînons ou d'un système dans lequel la résonance de l'amide est inhibée.

5.2.2. Distorsion de la géométrie et résonance

Au début des années 80, sur base de l'hypothèse associant la pyramidalité de l'azote du β -lactame et la réactivité via l'inhibition de la résonance, des composés bicycliques ont été synthétisés. Selon Sweet et Dahl, la distorsion de la coplanarité peut être exprimée par la hauteur h d'une pyramide dont l'atome d'azote constitue le sommet et ses trois substituants, la base (figure 18) (Sweet et Dahl, 1970).

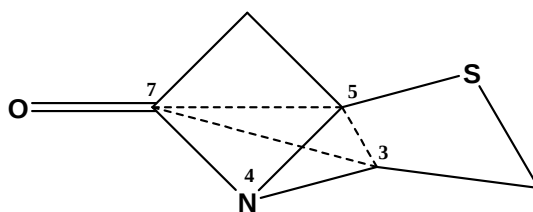


figure 18 : Définition de la pyramidalité de l'azote dans le noyau pénème.

La première caractéristique de ces molécules a été de posséder une structure très tendue, et la seconde, un atome d'azote très éloigné du plan défini par les atomes 3, 5 et 7. Une analyse de la réactivité chimique et du caractère pyramidal de ces molécules révèle, une fois encore, les lacunes du modèle utilisé pour rationaliser l'activité biologique des antibiotiques à noyaux β -lactames (figure 19) (Pfaendler, H. R. 1981).

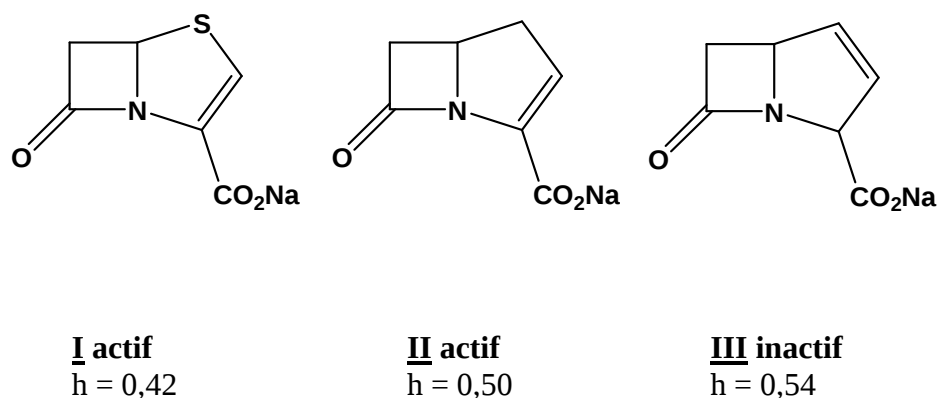


figure 19 : Paradoxe entre le degré de pyramidalisation de l'azote, la réactivité chimique et l'activité biologique.

En effet, la réactivité vis-à-vis de l'hydrolyse basique du composé inactif **III** a été jugée comparable à celle des deux autres. De plus, l'étude cristallographique des esters des trois β -lactames a montré que la déviation de l'azote par rapport au plan de référence, explicitée par la hauteur h (Å), était plus prononcée dans **III** que dans **I** et **II**, et que cette pyramidalité pour les trois molécules était de toute façon supérieure à celle des pénicillines (PenG, h = 0,40) et céphalosporines (céphaloridine, h = 0,24).

L'inhibition de la résonance de l'amide due à la déformation du cycle dans les β -lactames bicycliques n'a jamais été prouvée. En effet, celle-ci devrait faire ressembler l'amide à la forme canonique **A** représentée dans le schéma 9 au détriment de la forme chargée **B** (Page, M. I. 1987).

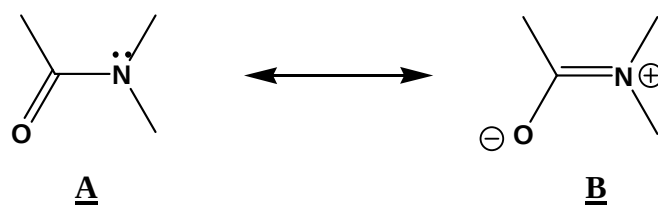


schéma 9 : Résonance de l'amide, formes canoniques.

Une conséquence de l'accroissement de la densité de charge négative sur l'azote est l'augmentation de la basicité. Il est connu que la torsion des liaisons dans les systèmes amides peut avoir cet effet. Par exemple la 6,6-diméthyl-1-azabicyclo-[2.2.2]-octan-2-one (quinuclidin-2-one), dont la paire libre est présumée orthogonale au système π du carbonyle affiche un pKa de 5,3 alors qu'en générale, les amides sont très faiblement basiques, le pKa de leur acide conjugué étant proche de 0 (figure 20).

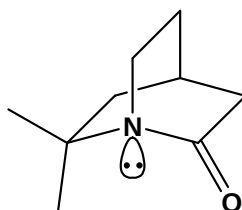


figure 20 : 6,6-diméthyl-1-azabicyclo[2.2.2]octan-2-one.

S'il n'était plus possible d'écrire de forme mésomère de la pénicilline du fait de la position de l'azote par rapport au plan du cycle, celle-ci devrait aussi faire preuve d'une basicité accrue. Or, il semble que ce soit l'inverse car en présence d'acide chlorhydrique 12 M, la protonation de l'azote n'est pas détectée ; le pKa doit être inférieur à -5 pour l'observer.

Une autre indication d'un caractère basique augmenté, pourrait être une constante d'équilibre de coordination d'un métal entre l'acide carboxylique et l'azote du β -lactame plus

importante. Néanmoins, avec le Ni (II), le Zn (II), le Co (II) et le Cu (II), elle est comparable ($100\text{-}200\text{ M}^{-1}$) à celle attendue entre un amide classique et un groupe carboxyle (figure 21).

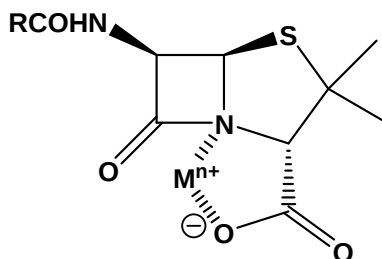


figure 21 : Coordination d'un métal entre le groupe carboxyle et l'azote d'une pénicilline.

La dépendance angulaire des interactions orbitales a fait l'objet de nombreuses études. Il a été montré que des interactions stabilisantes peuvent se produire même lorsque les orbitales p sont perpendiculaires. L'énergie de rotation autour de la liaison C-N dans les amides, d'environ 20 kcal/mol, indique toutefois une dépendance significative de la résonance vis-à-vis des angles de torsion. L'exemple de la quinuclidin-2-one illustre l'influence de la variation des angles dièdres dans ces systèmes.

Pourtant, le maintien de la résonance dans certaines molécules pontées, lorsque l'azote adjacent au système p ou π est pyramidal, a été démontré. En effet, la géométrie des bicyclo-[3.3.1]-nonanes permet une stabilisation partielle des carbocations dans les réactions de solvolysse (figure 22).

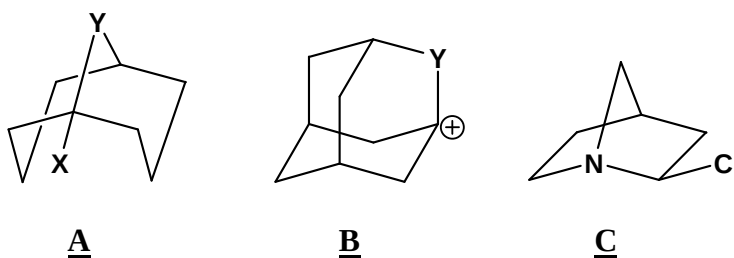


figure 22 : Maintien de la résonance dans des structures déformées.

Ainsi, le composé **A** ($Y = -NCH_3$) affiche une réactivité supérieure à l'analogue carboné ($Y = -CH_2$) d'un facteur 10^7 . La molécule **B** ($Y = -NCH_3$), dont la géométrie impose l'orthogonalité entre le doublet libre de l'azote et l'orbitale p vacante, est 356 fois plus réactive que l'équivalent carboné ($Y = -CH_2$). La réactivité du système bicyclo-[2.2.1]-heptane **C** semble, quant à elle, diminuée d'un facteur 20. Néanmoins, la résonance résiduelle contribue une fois encore à la stabilisation du carbocation, car un azote en α de celui-ci devrait conduire par effet inductif à une baisse de la réactivité d'un facteur 10^5 (Page, M. I. 1987 et références citées).

Ces observations suggèrent qu'une faible distorsion de la géométrie de l'amide n'implique pas nécessairement la diminution ou la perte de la résonance. Les vieux dogmes se sont trouvés un peu plus fragilisés par l'apparition des monobactames (β -lactames monocycliques). Ces molécules, qui peuvent être aussi réactives que les pénicillines et céphalosporines, contredisaient par leur structure deux hypothèses : d'une part, qu'il est nécessaire pour avoir une liaison amide réactive que le β -lactame fasse partie d'un système bicyclique contraint, et d'autre part, que l'azote doit être pyramidal, puisque ces composés sont parfaitement plans.

Par contre, dans ces molécules, la liaison C-N est activée par effet électrocapteur du groupement sulfonate qui diminue le pK_a de l'amine correspondante et en fait un meilleur groupe partant (Cimarusti, C. M. 1983).

5.3. Structure 3-D et activité antibiotique

La compréhension des relations structure-activité est une condition essentielle pour l'élaboration rationnelle de nouvelles molécules. Dans cette perspective, des analogues structuraux de composés biologiquement actifs ont été synthétisés.

Il a ainsi été observé que les dérivés Δ^2 - des céphalosporines, qui ne diffèrent que par la position de la double liaison, sont totalement dépourvus d'activité biologique. Pourtant, les différences structurales existant entre les céphalosporines et les pénicillines sont bien plus grandes (figure 23).

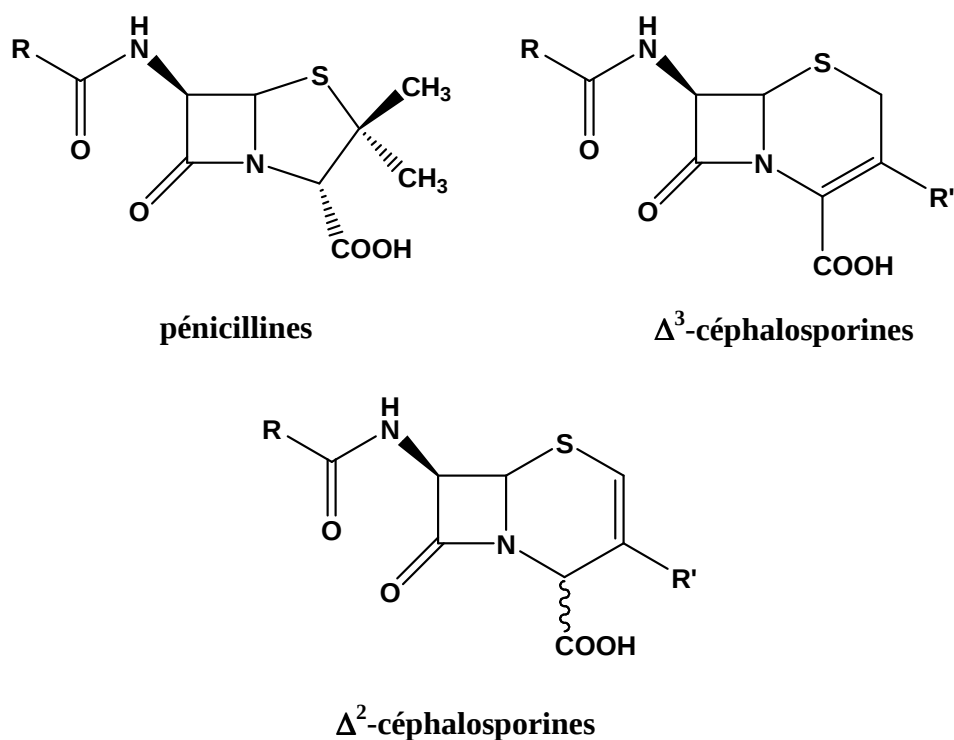


figure 23 : Structures actives ou inactives des antibiotiques.

La différence d'activité fut initialement attribuée à une conformation inadéquate du groupement acide carboxylique. Cependant les études cristallographiques révélèrent que les composés actifs ne présentaient pas de similitudes structurales évidentes, et que au contraire, la Δ^2 -céphalosporine ressemblait davantage à la Pen G qu'à son analogue Δ^3 -. On conclut de ces observations que les contraintes conformationnelles nécessaires à la reconnaissance de l'antibiotique par l'enzyme n'étaient pas si restrictives.

L'inactivité des Δ^2 -céphalosporines, fut donc expliquée par une réactivité chimique plus faible. Ces molécules sont en effet caractérisées par un azote quasi-plan (phénoxyméthyl Δ^2 -céphalosporine : $h = 0,06 \text{ \AA}$) et par l'absence de résonance de l'énamine (schéma 10).

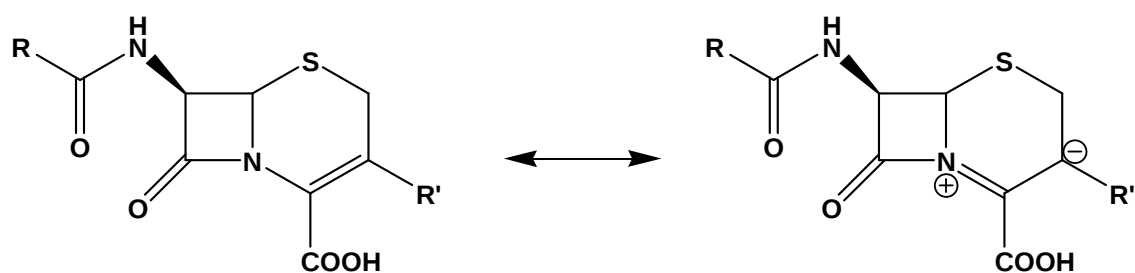


schéma 10 : Résonance de l'énamine dans les Δ^3 -céphalosporines
(effet absent dans les Δ^2 -céphalosporines).

Cette hypothèse est néanmoins contredite par la comparaison des constantes de vitesse d'hydrolyse en milieu basique puisqu'il a été observé que les Δ^3 -céphalosporines sont seulement deux à trois fois plus réactives (figure 24) (Proctor et Page, observations non publiées).

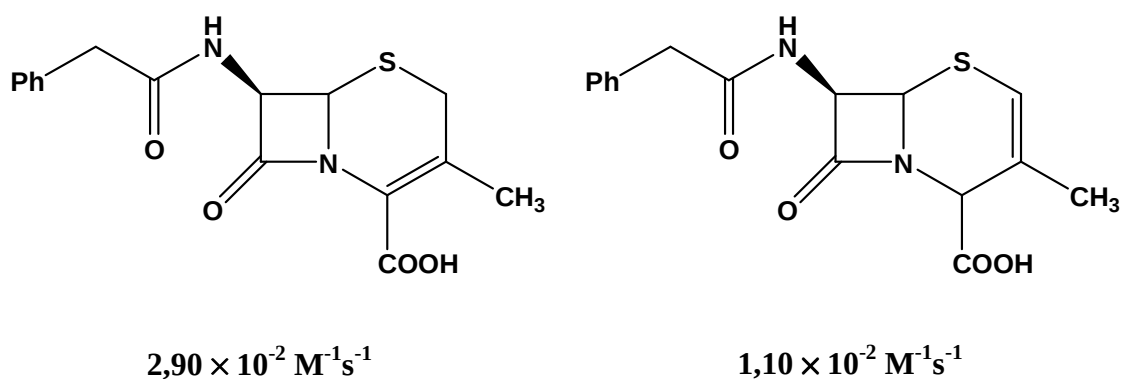


figure 24 : Différences de réactivité entre Δ^2 - et Δ^3 -céphalosporines
envers l'hydrolyse alcaline.

Les divers exemples et paradoxes mentionnés précédemment traduisent bien l'impossibilité de restreindre l'activité antibiotique d'un β -lactame à sa seule réactivité chimique. Le faire, c'est oublier qu'avant de réagir, le composé doit atteindre sa cible, c'est-à-dire dans la plupart

des cas, traverser des membranes. C'est également mettre de côté les contraintes conformationnelles du récepteur biologique (PBPs) et les interactions à l'intérieur de celui-ci.

La comparaison des structures 3-D des pénicillines et Δ^2 - et Δ^3 -céphalosporines n'a pas permis de révéler de prime abord, les caractéristiques géométriques permettant de rationaliser l'activité ou l'inactivité antibactérienne de ces molécules. La clé qui permet d'interpréter ces différences est la flexibilité conformationnelle du noyau pénème. En effet celui-ci, grâce à des mouvements pseudo-rotatoires du cycle thiazolidine, est capable de modifier non seulement sa forme, mais aussi l'orientation de ses substituants (schéma 11) (Cohen, N. C. 1983).

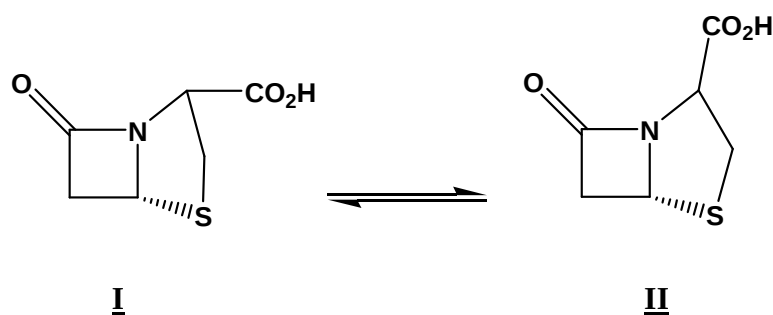


schéma 11 : Pseudo-rotation du noyau pénème.

Ainsi, dans la conformation **I**, le groupement acide carboxylique est en position pseudo-axiale (plus stable), et en position pseudo-équatoriale dans la conformation **II** (moins stable). Les deux formes ont été observées expérimentalement dans des études cristallographiques sur les pénicillines. De petites variations d'énergies ($\sim 0,7$ kcal/mol) accompagnent le passage de l'une à l'autre, permettant à la fonction acide de fluctuer facilement entre ces deux positions. Des structures plus rigides comme les pénèmes et les carbapénèmes, dépourvues d'effets pseudo-rotatoires, doivent elles, répondre strictement aux critères géométriques de l'enzyme pour pouvoir interagir.

Une étude comparative des structures 3-D de molécules actives et inactives a permis à Cohen de mettre en évidence l'importance de la distance entre le carbone de l'acide carboxylique et l'oxygène de la fonction lactame, et ainsi, de rationaliser les différences d'activité observées (tableau 5).

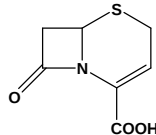
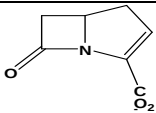
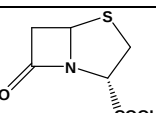
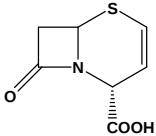
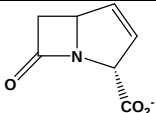
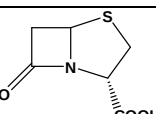
composé	Conformation du COOH	activité	Distance (Å)
 Δ³-céphalosporines	pseudo-équatoriale	+	3,198
 Δ²-thiénamycines		+	3,568
 pénicillines		+	3,899
 Δ²-céphalosporines	pseudo-axiale	-	4,111
 Δ¹-thiénamycines		-	4,276
 pénicillines		-	4,263

tableau 5 : Relation entre la conformation du –COOH
et l'activité antibiotique des β -lactames.

Il a été postulé à la vue de ces résultats, que la géométrie des composés inactifs est différente de celles des molécules actives. La première se rapproche structuralement de la conformation

I (pseudo-axiale) du noyau pénème, qui constituerait de cette manière une forme inactive des pénicillines, et est caractérisée par une distance de plus de 4,1 Å entre l'oxygène de la fonction lactame et le carbone de la fonction acide. Dans les β -lactames affichant une activité biologique, et ressemblant à la conformation **II** du noyau pénème, cette distance est plus courte et comprise entre 3,0 et 3,9 Å (c : distance de Cohen). Cette approche a permis d'expliquer de façon rationnelle, l'inactivité des analogues structuraux tels que les Δ^2 -céphalosporines ou les Δ^1 -thiénamycines.

Si ce facteur est encore utilisé aujourd'hui dans l'industrie pour l'élaboration de nouvelles substances, il faut cependant souligner le faible nombre de molécules utilisées pour l'étude de relation structure-activité (9). Une étude plus complète (114 β -lactames issus de la CSD) a ainsi mis en évidence les limites de ce paramètre, à savoir qu'il existe des composés actifs pour lesquels $c > 3,9$ Å (acide clavulanique), et en a défini un autre résultant de l'analyse conjointe de h et de c et donnant, selon les auteurs, de meilleures corrélations entre la structure et l'activité biologique (Nangia, A. 1996).

Le pouvoir antibiotique d'une molécule est fortement dépendant de sa structure 3-D. Le composé doit, s'il veut interagir efficacement avec sa cible, posséder la conformation adéquate ou la possibilité de modifier sa forme et l'orientation de ses substituants.

6. Conclusion

Depuis les années 40 et l'utilisation des premiers agents antibactériens les microorganismes ont développé et/ou acquis, au travers d'échanges et de mutations, la capacité de survivre. Cette résistance, objet de toutes les inquiétudes, évolue continuellement. La diversité des mécanismes impliqués et la possibilité de les cumuler, confèrent aux bactéries l'arsenal nécessaire pour lutter contre une grande variété d'antibiotiques.

En particulier, la production de protéases à sérine (β -lactamases) capables d'hydrolyser rapidement les composés β -lactames pour les rendre inactifs ou la modification des cibles de ces molécules (PBPs résistantes), constituent aujourd'hui, les formes de résistance les plus répandues et les plus problématiques.

Dès les premiers signes, l'homme a recherché de nouvelles structures susceptibles d'enrayer la progression de ce phénomène. L'hémisynthèse, le screening des sols et des organismes ont permis de mettre à jour rapidement les grandes familles d'antibiotiques connues actuellement.

La mise au point de nouveaux composés a nécessité de comprendre les raisons de l'activité biologique de ces molécules. Cette dernière fut attribuée de manière intuitive à la réactivité chimique des β -lactames. L'activation du cycle à quatre chaînons, peu commun dans la nature, était alors expliquée par la tension angulaire, la fusion d'un second cycle ou l'inhibition de la résonance de l'amide par pyramidalisation de l'azote. Mais ces hypothèses furent toutes contredites expérimentalement. Il est clair que l'aspect chimique joue un rôle important dans l'activité des antibiotiques, néanmoins, celle-ci ne peut se réduire à de tels critères.

L'évolution des connaissances permet, à l'heure actuelle, de mieux appréhender les relations structure-activité (antibiotiques, enzymes) et les interactions (enzyme-substrat, récepteur-agoniste) dans des systèmes complexes. Dans le domaine des β -lactames comme dans d'autres, l'activité biologique requiert des considérations géométriques strictes. Seule une molécule présentant la bonne conformation pourra interagir avec sa cible de façon efficace, via le maximum d'interactions stabilisantes. Dans le cas qui nous intéresse, certains composés possèdent une propriété qui leur confère une adaptabilité conformationnelle. En effet, le noyau thiazolidine des pénicillines est capable d'osciller entre deux conformations, actives et inactives, dans lesquelles l'orientation des substituants est modifiée. Cette caractéristique fournit une explication rationnelle à l'inactivité de certains analogues structuraux, qui pourtant présentent une réactivité chimique non négligeable, mais qui sont figés dans des conformations inadéquates.

Aujourd'hui malgré l'état de nos connaissances et l'urgence de la situation, de moins en moins de nouveaux médicaments antibiotiques sont mis sur le marché. La plupart des molécules sont des dérivés d'antibiotiques déjà connus, possédant pour un temps, un plus large spectre d'action, une plus grande efficacité et/ou des propriétés pharmacologiques améliorées...

Une meilleure hygiène et l'utilisation à bon escient des antibiotiques peuvent permettre de ralentir l'évolution du phénomène de résistance, mais le compte à rebours est enclenché et le besoin d'innovation est réel.