

Chapitre 2

Chapitre 2 - Objectifs et Stratégie

1. Objectifs

Comme nous venons de le voir, les protéases à sérine, et plus particulièrement les enzymes bactériennes, constituent des cibles importantes en chimie médicinale. La progression constante du phénomène de résistance impose et justifie la recherche de nouveaux agents antibactériens.

Dans ce contexte, tous les travaux dédiés aux antibiotiques de type pénicilline ont démontré que les azétidin-2-ones (β -lactames) pouvaient encore être exploitées comme structures de base pour le développement de nouveaux inhibiteurs, moyennant des aménagements structuraux appropriés. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés, dans le cadre d'une convention de recherche P.A.I "Protein structure and function in the post-genomic, proteomic area" (Workpackage 3 : Active site serine penicilloyl transferases), à la conception et à la synthèse de β -lactames susceptibles d'inactiver les D,D-peptidases et/ou les β -lactamases.

Notre projet considère une approche radicalement opposée à tout ce qui a été fait jusqu'à présent dans le but de créer de nouveaux antibiotiques en augmentant la tension de cycle, comme dans l'exemple des pénèmes.

En effet, en nous basant sur l'hypothèse qu'il existe d'autres façons pour obtenir un composé réactif que d'inclure le noyau β -lactame dans une structure bicyclique très tendue (ou de l'activer par des effets électrocapteurs), nous avons imaginé une famille de molécules où l'adaptabilité conformationnelle (décrite au chapitre 1) pourrait être à l'origine de l'activité antibiotique. Cette flexibilité structurale devrait permettre aux composés de s'adapter non seulement aux contraintes environnementales du site catalytique, mais également aux changements conformationnels se produisant lorsque l'inhibiteur interagit avec l'enzyme pour conduire à l'intermédiaire acyl-enzyme.

La structure générale des β -lactames envisagés est présentée figure 25. Il s'agit de β -lactames bicycliques pontés où les positions N1 et C3 sont connectées par des cycles de taille variables (à partir de n et m = 1), incluant éventuellement des fonctions "activantes" de type

carbonyle et/ou une double liaison C=C. Les substituants **R**₁, **R**₂, **X**, **Y** et **Z** constituent des éléments de variation structurale qui permettront d'étudier l'influence des facteurs stérique, électronique et conformationnel sur la réactivité de la fonction β -lactame. Ces substituants constituent également des sites de reconnaissance potentiels par les enzymes-cibles pour l'établissement des complexes de Michaelis, étape préliminaire avant tout processing dans le site catalytique. Nous évaluerons nos dérivés de façon théorique grâce à des modèles d'hydrolyses chimique et enzymatique, et tenterons de confirmer expérimentalement les résultats calculés.

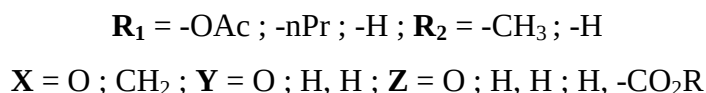
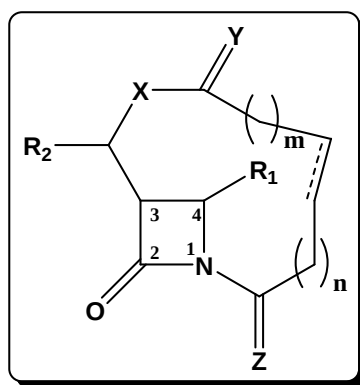


figure 25 : Structure générale des β -lactames bicycliques pontés (N1-C3).

Traditionnellement, les β -lactames bicycliques sont de types bicycles fusionnés où les positions N1 et C4 participent à des cycles (ou hétérocycles) à cinq chaînons (pénames, pénèmes, carbapénèmes, oxapénèmes) ou à six chaînons (céphèmes, oxacéphèmes).

Dans la littérature, les structures bicycliques pontées en N1-C3 sont anecdotiques et nous n'avons relevé que deux exemples pertinents. En effet la synthèse de composés "anti-Bredt"¹, qui illustre bien l'importance donnée à la tension de cycle, a été décrite par Williams et Lee à la fin des années 80 (schéma 12) (Williams, R. M. 1989 et 1986).

¹ Relatif à la règle de Bredt affirmant l'impossibilité d'existence d'une oléfine en tête de pont.

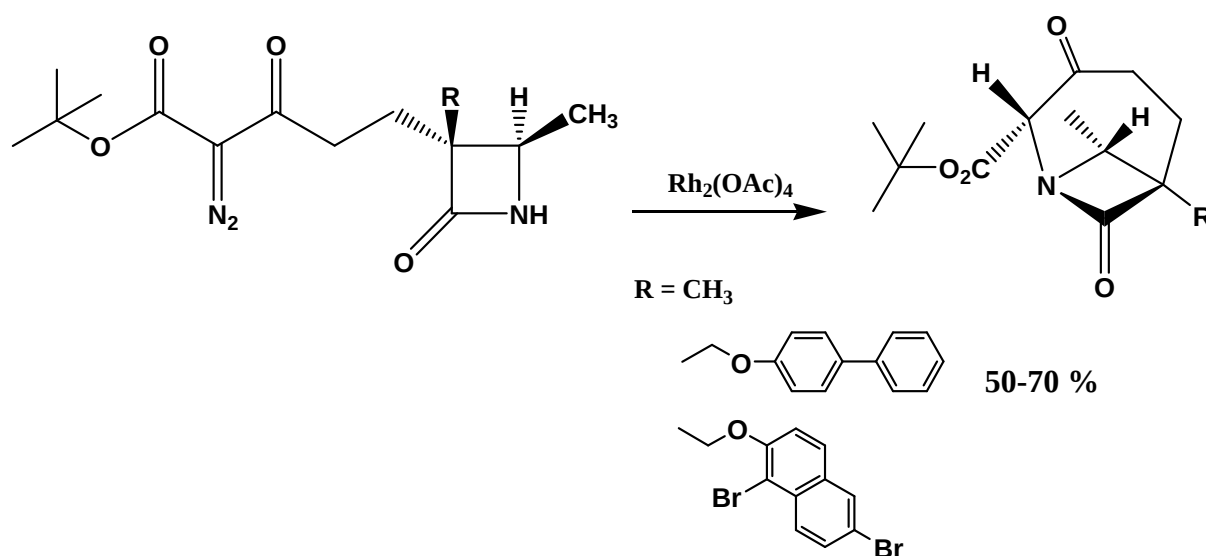


schéma 12 : Synthèse de β -lactames bicycliques pontés (N1-C3) selon Williams et Lee.

Il a cependant été établi que la faible stabilité de ces substances en milieu aqueux, du fait de contraintes angulaires élevées, est responsable de leur pauvre activité antibiotique et aucune étude concernant ces dérivés n'a été publiée depuis.

Récemment, une synthèse basée sur un concept identique a été rapportée par une équipe d'Aventis pharma à partir de γ -lactames² (Aszodi, J. 2004). L'étape clé de la cyclisation est la même que celle utilisée par Williams et Lee et consiste à insérer un carbène métallique dans la liaison NH du cycle lactamique (schéma 13).

² Le cycle γ -lactame est plus stable que le β -lactame vis-à-vis de l'hydrolyse alcaline (Imming, P. 2000). Hall et El-Shekeil estiment les γ -lactames pontés plus stables chimiquement que les β -lactames correspondants (Hall, H. K. 1983).

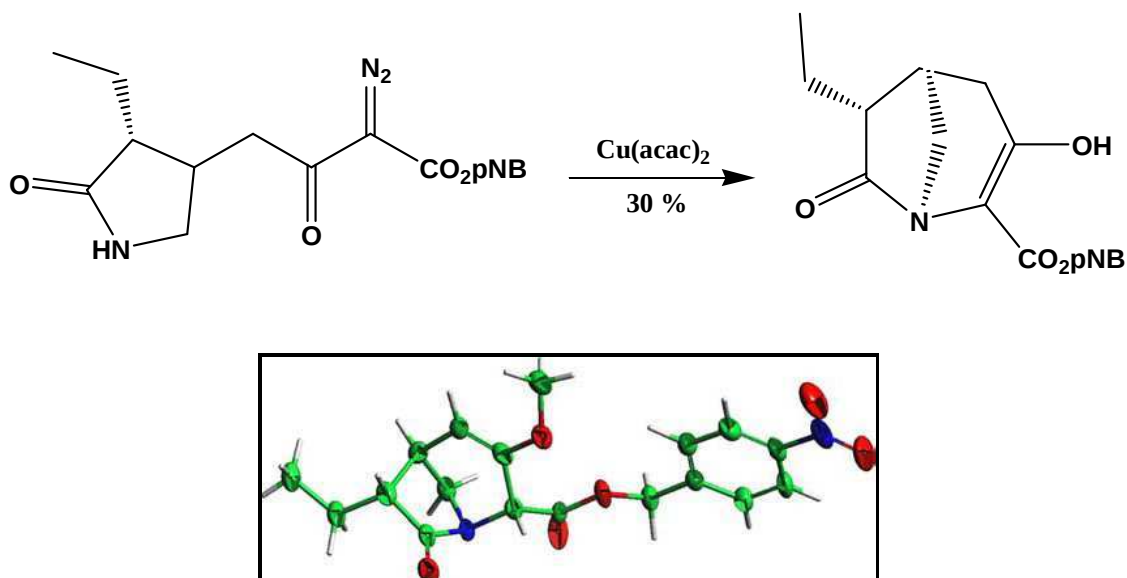


schéma 13 : Synthèse d'un γ -lactame bicyclique ponté (N1-C4)
selon l'équipe d'Aventis pharma.

Les évaluations chimique et biologique effectuées ont montré que la faible activité antibiotique de ce type de composés était probablement due, à la fois à leur instabilité et à des interactions stériques défavorables avec les enzymes cibles. Les auteurs proposent pour remédier à ces problèmes, d'introduire un hétéroatome (N ou O) en α du carbonyle du γ -lactame pour stabiliser ces structures sous forme urée ou carbamate et/ou dans le pont à la place d'un méthylène pour diminuer l'encombrement stérique.

Les β -lactames que nous voulons synthétiser se distinguent donc des composés présentés dans ces deux exemples, par la taille du cycle pontant (macrocycles à partir de 11 chaînons) qui devrait fournir en plus de l'adaptabilité conformationnelle recherchée, une plus grande stabilité par réduction des contraintes angulaires.

2. Stratégie de synthèse

La stratégie imaginée pour la synthèse de tels composés fait intervenir la fonctionnalisation des positions N1 et C3 d'un synthon β -lactamique commercial, au moyen de chaînes oléfiniques qui permettront de former le cycle pontant par métathèse des oléfines (RCM : Ring Closing Metathesis) (schéma 14).

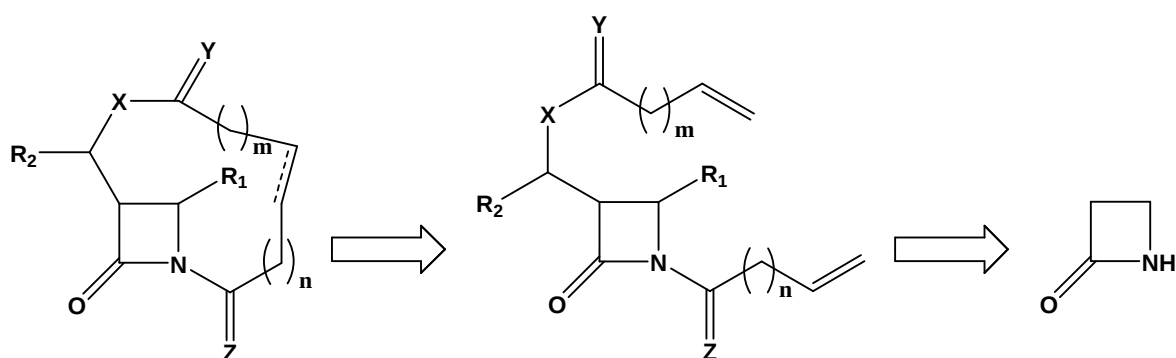


schéma 14 : Schéma rétrosynthétique général.

L'objectif principal de cette voie de synthèse est de générer rapidement un grand nombre de dérivés bicycliques variant de façon homogène. Une étude méthodologique et théorique de la formation des β -lactames bicycliques pontés (N1-C3) par RCM sera également effectuée pour déterminer l'efficacité de la méthode et tenter de rationaliser les données expérimentales.

3. Evaluation de la réactivité théorique, chimique et biochimique des composés synthétisés

L'évaluation théorique de la réactivité intrinsèque de nos molécules, réalisée grâce à la collaboration du Dr G. Dive (U.Lg, Centre d'ingénierie des protéines), s'inscrit dans une démarche cohérente de validation de l'hypothèse de départ (adaptabilité conformationnelle) et

du design proposé. La susceptibilité de nos composés envers l'hydrolyse chimique et/ou enzymatique sera ainsi évaluée au niveau *ab initio*. La réactivité chimique sera étudiée grâce à deux modèles, neutre et anionique. La réactivité enzymatique fera intervenir un modèle mimant le site catalytique des protéases à sérine.

L'intérêt de la cyclisation et l'influence des facteurs stérique, électronique et conformationnel seront analysés pour déterminer les critères régissant le comportement de nos β -lactames bicycliques pontés vis-à-vis des nucléophiles chimiques ou biologiques.

Le suivi par RMN-¹H de l'hydrolyse à pH 8 de certains composés sera effectué pour mesurer leur stabilité et confirmer les résultats obtenus avec les modèles d'hydrolyse chimique.

L'activité biologique de nos composés sera testée *in vitro* sur des protéases à sérine bactériennes, une β -lactamase de classe A (TEM-1), une D,D-peptidase modèle (R39)³, et trois PBPs résistantes (PBP2a, PBP5fm, PBP2x), et sur une enzyme mammalienne, l'élastase pancréatique de porc (PPE). Les données expérimentales seront comparées à celles déterminées par le calcul.

³ R39 est une PBP de classe C (de sous classe C1 de bas poids moléculaire) possédant la constante d'acylation la plus élevée pour la pénicilline G ($300 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Comme les β -lactamases de classe A, R39 possède un site actif capable d'accomoder la plupart des antibiotiques à noyau β -lactame (Sauvage, E. 2005).