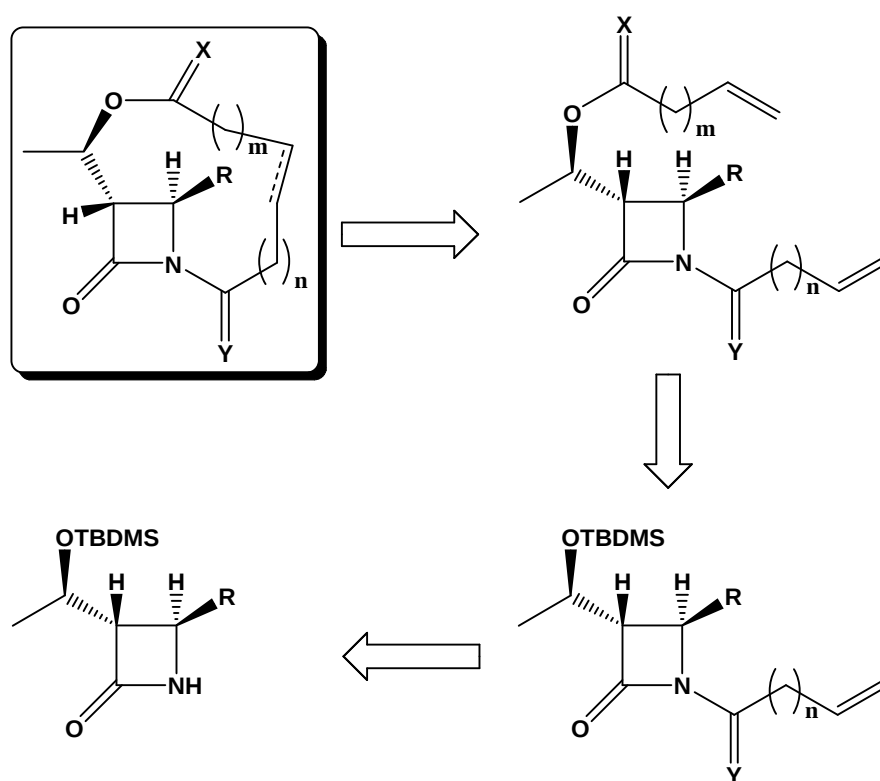


Chapitre 6

Chapitre 6 - Conclusions et perspectives

1. Conclusions

En conclusion, nous sommes parvenus au terme de ces quatre années à synthétiser, avec d'excellents rendements, plusieurs séries de β -lactames bicycliques pontés (N1-C3) dont la taille du cycle varie de 12 à 13 chaînons, à partir de l'acétoxy-azétidin-2-one commerciale et selon le schéma rétrosynthétique général suivant 104⁶ :



$$n = 1, 2 ; m = 2$$

$$R = -OAc, -nPr, -H$$

$$X = O ; H, H ; Y = O ; H, H ; H, CO_2pNB$$

schéma 104 : Voie rétrosynthétique d'accès aux β -lactames bicycliques pontés (N1-C3).

⁶ Le schéma inclut aussi les dérivés silylés qui, dans un souci de clarté, n'ont pas été repris.

Ce travail nous a permis d'étudier l'efficacité, avec de tels substrats, de la réaction de métathèse utilisée pour former le cycle pontant.

D'après les résultats, il apparaît de façon évidente que le succès de la RCM dépend de facteurs conformationnels liés à l'oléfine greffée sur l'azote du β -lactame. Ainsi, les composés N-pent-4-énoyle (**030-032**) et N-but-3-énoyle (**043**, **048**, **062** et **063**) se sont montrés les précurseurs les plus aptes à cycliser. En effet, à cause d'une réaction d'isomérisation compétitive, la métathèse des β -lactames N-pent-4-énoyle (**045** et **049**) et N-allyle (**047**), plus lente, s'est révélée moins (ou non) productive.

Les différentes observations expérimentales concernant la cyclisation des molécules **030-032**, **043**, **045**, **048** et **049** (influence de la taille du cycle, des fonctions ester/imide, stéréochimie de la double liaison) ont pu être confirmées de façon théorique au niveau de calcul *ab initio* grâce à la collaboration du Dr G. Dive.

Enfin, bien que toutes les combinaisons de longueurs des chaînes oléfiniques n'aient pas été testées, les résultats obtenus avec les dérivés **017** et **018** de l'azétidin-2-one non substituée semble indiquer que la métathèse pourrait être également limitée par la taille de l'oléfine en position C3 du β -lactame.

Malgré les quelques contraintes mentionnées, nous estimons que dans le cadre de notre projet, la RCM constitue la méthode la plus appropriée pour la formation des β -lactames bicycliques pontés (N1-C3). En effet, la métathèse nous donne la possibilité de considérer les précurseurs comme des substances potentiellement actives, et d'évaluer directement l'impact de la cyclisation sur la réactivité (et activité biologique) des composés. Au contraire, la stratégie telle qu'elle est utilisée par Williams et Lee, et Aszodi et ses collaborateurs, qui consiste à insérer un carbène métallique dans la liaison NH du β -lactame, nous semble inconcevable si on tient compte de la taille du cycle à former et ne permet pas de comparer les intermédiaires et les produits finaux. La RCM s'inscrit donc pleinement dans une démarche qui vise à comprendre les facteurs qui régissent la réactivité de nos molécules.

Ainsi, la seconde partie de notre projet a consisté à évaluer le comportement de nos composés vis-à-vis de nucléophiles chimique et biologique, de manière théorique et expérimentale.

De façon intéressante, les modèles théoriques anionique (^-OH) et neutre ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}$) ont défini un ordre de réactivité chimique selon lequel la réduction de la double liaison générée par

RCM augmente significativement la susceptibilité de nos β -lactames envers les nucléophiles. Cet ordre a d'ailleurs été confirmé par un suivi RMN- ^1H de l'hydrolyse en milieu basique des trois composés **030** (précurseur), **066** (molécule cyclisée) et **078** (molécule cyclisée et hydrogénée). Le modèle $\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ a également souligné l'importance de l'encombrement généré par le cycle pontant sur la face d'attaque du nucléophile.

Il est clairement apparu avec le modèle enzymatique que les phénomènes de réactivité chimique et d'activité biologique devaient être dissociés. En effet, l'ordre de réactivité établi s'est trouvé bouleversé et les facteurs stérique et conformationnel sont devenus des critères décisifs.

De plus, si nous n'avons pas constaté de diminution spectaculaire des barrières d'activation en augmentant la flexibilité de nos composés, nous avons pu mettre en évidence par le calcul, avec le produit **073** (cycle à 12 chaînons, bis-alkylé), l'effet certain de l'adaptabilité conformationnelle. Nous avons pu observer, dans ce cas précis, que la réduction de la taille du cycle n'avait pas entraîné, contrairement aux autres β -lactames, d'augmentation de l'énergie d'activation par rapport au composé **072** (cycle à 13 chaînons, bis-alkylé). L'adaptabilité conformationnelle que nous recherchons s'exprimerait donc davantage dans les cycles plus tendus.

Enfin, ce modèle de cavité enzymatique nous a permis de construire une échelle de réactivité relative qui place certains de nos β -lactames ouverts et cyclisés au même niveau théorique que le noyau péname. Néanmoins, les tests biologiques réalisés *in vitro* sur différentes protéases à sérine, bactériennes (β -lactamase TEM-1, PBP2a, PBP5fm, PBP2x, R39) et mammalienne (PPE), n'ont pas permis de relier les résultats expérimentaux à ceux obtenus par le calcul.

Ainsi, les composés ouverts se sont montrés les plus aptes à acyler le site actif des enzymes évaluées selon l'ordre défini par la nature du substituant en position C4 du β -lactame ($> =$ plus actif que : $-\text{OAc} > -\text{H} > -\text{nPr}$). En particulier le dérivé acétoxy **030** s'est révélé être un bon inhibiteur réversible de l'élastase.

Une activité a toutefois pu être détectée, pour certaines des molécules bicycliques synthétisées, dans le cas des protéases PBP2a, PBP2x et R39. Les observations confirment pour les deux dernières enzymes, l'impact de la cyclisation et de la réduction de la double liaison (formée par métathèse) établi avec les modèles de réactivité chimique.

Le manque d'activité biologique de nos β -lactames bicycliques pontés, semble au vu des résultats pouvoir s'expliquer par l'encombrement généré par la taille du cycle pontant ainsi

que par les interactions stériques défavorables qui leur sont associées et souligne finalement l'incapacité de nos dérivés à modifier leur conformation pour diminuer les contraintes au sein du site actif. Nos molécules pourraient également ne pas être adaptées, du fait de l'absence de groupement acide carboxylique, aux tests sur PBPs. Pourtant, le composé **030** acyle la carboxypeptidase R39, démontrant que la présence de cette fonction n'est pas indispensable.

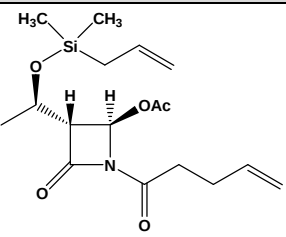
Sans être parvenu à synthétiser des β -lactames bicycliques pontés (N1-C3) inhibiteurs de protéases à sérine, nous avons prouvé qu'il existe d'autres façons pour activer un noyau β -lactame que de l'inclure dans une structure bicyclique très tendue. Grâce à l'utilisation de modèles théoriques performants, nous avons pu analyser les facteurs stérique, électronique et conformationnel régissant la réactivité de nos molécules. Les évaluations biologiques sur différentes protéases à sérine ont complété notre étude et les informations collectées pourront être mises à profit pour élaborer de nouvelles structures.

2. Perspectives

Au cours de ce travail, afin de conserver une certaine cohérence, quelques uns de nos résultats n'ont pas été intégrés dans la discussion.

Ainsi l'activité biologique de trois autres de nos molécules (**016**, **051**, **069**) a été testée sur les PBPs, PBP2a, PBP5fm, PBP2x et R39.

Les données obtenues en % d'activité résiduelle pour chaque enzyme en fonction du composé évalué sont présentées dans le tableau 46.

Structures	PBP2aHis6 (2.5 μ M)	PBP5fm (2.5 μ M)	PBP2x 5204wt (0.8 μ M)	R39 (0.8 μ M)
 051	84 $\pm$ 7	110 $\pm$ 8	101 $\pm$ 1	40 $\pm$ 5

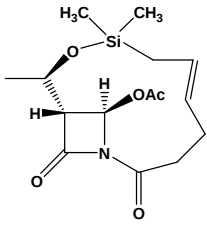
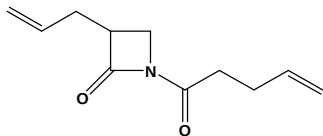
 069	83 ± 4	89 ± 4	103 ± 7	2 ± 1
 016	98 ± 12	104 ± 4	108 ± 4	73 ± 3

tableau 46 : Evaluation de l'activité inhibitrice des composés **016**, **051** et **069** sur des PBPs.

Si le dérivé **016** ne montre pas d'activité réellement intéressante, les β -lactames silylés nous interpellent davantage.

En effet, le composé ouvert **051**, contrairement au composé **030**, n'affiche pas d'activité envers les protéases PBP5fm et PBP2x et une plus faible réponse est observée vis-à-vis des enzymes PBP2a et R39. Ces résultats pourraient s'expliquer par une diminution de l'affinité des cibles due au changement de la fonction ester par un groupement silyl éther moins polaire. En revanche, la cyclisation (formation d'un cycle à 12 chaînons) paraît ici plus favorable. L'encombrement généré par le cycle pontant semble moins problématique puisque contrairement au composé **066**, l'activité du dérivé **069** vis-à-vis de PBP2a ne varie pas et une acylation de PBP5fm (pour la première fois) et R39 peut être détectée. Pour cette dernière enzyme, le % d'activité résiduelle est même inférieur à celui observé avec le β -lactame **030**.

Bien qu'encourageants, ces résultats doivent être considérés avec prudence car nous ne pouvons garantir l'intégrité des structures testées. En effet, nous avons pu constater l'instabilité de ces dérivés silylés et les activités évaluées pourraient être dues aux produits d'hydrolyses, les alcools correspondants⁷. Pour confirmer les données, des mesures complémentaires doivent être effectuées, comme par exemple, tester l'activité du composé

⁷ Après quelques semaines de stockage à 4 °C du β -lactame **051**, l'alcool correspondant **027** a été retrouvé propre.

027, l'alcool dérivé du β -lactame **051** et intermédiaire dans nos synthèses, et réaliser un suivi RMN de l'hydrolyse chimique des produits dans le tampon de mesure biologique.

Très récemment, nous avons pu cristalliser le composé bicyclique **066** dont la structure est présentée figure 64.

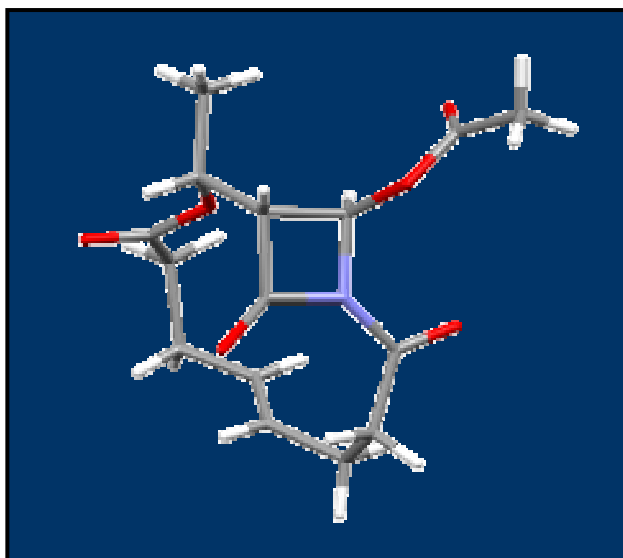


figure 64 : Structure du β -lactame **066** déterminée par diffraction des rayons X.

Cette structure représente une quatrième conformation (*cf* chapitres 4 et 5) de nos β -lactames bis-acylés et confirme l'influence marquée des dipôles des carbonyles sur la stabilité des conformères. Dans le conformère **IV**, les dipôles C=O (β -lactame) et C=O (imide) sont opposés.

Les premières évaluations théoriques au niveau de calcul RHF/MINI-1' et B3Lyp/6-31G(d) considèrent cette forme **IV** plus stable de 4,846 kcal/mol et 8,415 kcal/mol respectivement, par rapport au conformère **III**. Cette différence importante se marque significativement moins sur le composé ouvert **030**, avec un gain de 0,788 kcal/mol (MINI-1') et 3,879 kcal/mol (B3LYP). Ces deux formes ont donc un impact sur l'enthalpie de formation du cycle qui devient à présent de 1,296 kcal/mol au niveau RHF/MINI-1' et de 2,759 kcal/mol au niveau B3Lyp/6-31G(d).

Des études complémentaires sont actuellement effectuées pour évaluer l'influence de cette conformation "anti" des carbonyles de l'imide sur la réactivité intrinsèque de la molécule vis-à-vis de nucléophiles chimique et enzymatique.

Au regard des nombreux résultats obtenus, trois axes de développement de nos composés se dessinent.

Tout d'abord, dans le cadre de la recherche d'inhibiteurs potentiels de protéases à sérine bactériennes, il ressort que le critère limitant de nos β -lactames bicycliques pontés est avant tout l'encombrement de la face d'attaque du nucléophile. Une perspective de synthèse évidente pourrait donc être de générer des structures pour lesquelles le déploiement du macrocycle se ferait sur la face β à partir d'un noyau dont la configuration du carbone en position C3 est inversée (figure 65).

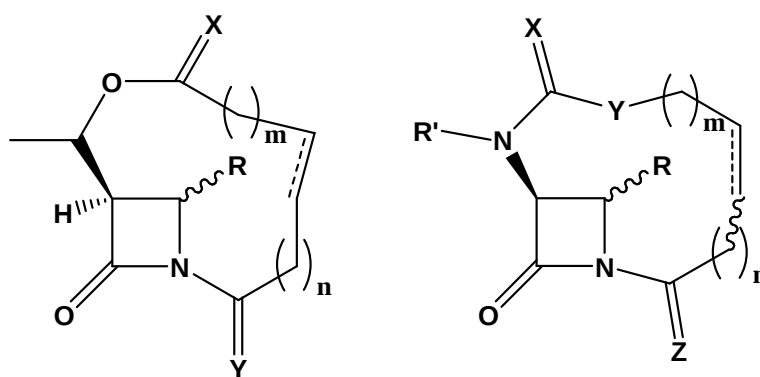


figure 65 : perspectives de synthèse.

Dans cette optique, des composés pourraient également être obtenus à partir d'un synthon 3-amino- β -lactamique. Cependant, d'après les modèles de Dreiding et du fait de la configuration syn des substituants en positions C3 et C4, l'encombrement du groupement R pourrait engendrer des contraintes conformationnelles importantes (pour $R \neq H$).

Ensuite, concernant les tests avec l'élastase, nos β -lactames monocycliques, et en particulier les dérivés 4-acétoxy ont démontré un fort potentiel en tant qu'inhibiteurs réversibles ; ces

résultats peuvent faire l'objet d'amélioration dans le but d'augmenter l'affinité vis-à-vis de l'enzyme. Une approche possible pourrait consister à faire varier la longueur et la lipophilie des chaînes acyles en position N1 et C3.

Enfin, nous avons eu l'occasion de tester, au cours de ce travail, l'activité de nos β -lactames monocycliques sur une toute autre cible, également protéase à sérine : la FAAH ou Fatty Acid Amide Hydrolase (groupe cannabinoïdes & endocannabinoïdes, Pr Lambert, unité de chimie pharmaceutique et de radiopharmacie, UCL). Le principal substrat de l'enzyme est un endocannabinoïde, l'anandamide présenté figure 66.

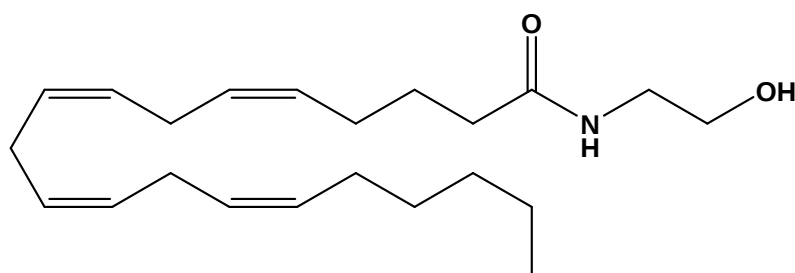


figure 66 : Structure de l'Anandamide.

Cette molécule possède des propriétés analgésique, anti-émétique, anti-proliférative et/ou pro-apoptotique. Dès lors, l'inhibition de la FAAH peut, en augmentant la durée de vie de l'anandamide, trouver des applications dans le domaine médical et en particulier dans celui de la lutte contre le cancer. Les résultats obtenus sont repris dans le tableau 47.

Composé	Concentration (μM)	% d'inhibition
030	100	98,6
	10	98,1
031	100	98,7
	10	96,3

032	100	98,4
	10	98,1
041	100	95,7
	10	75,2
042	100	98,7
	10	96,8
044	100	32,8
	10	4,5
046	100	85,3
	10	39,3
047	100	55,8
	10	10,1
017	100	97,7
	10	90,1
018	100	98,5
	10	97,3

tableau 47 : % d'inhibition de la FAAH en fonction du β -lactame testé et de sa concentration.

Les données rapportées montrent que nos composés sont, pour la plupart, de bons inhibiteurs de la FAAH. Il est difficile en comparant les structures testées d'expliquer les différences observées. Ces résultats prometteurs vont donc faire l'objet d'études plus approfondies et une collaboration avec le groupe du Pr Lambert se met d'ores et déjà en place.

