

# Tables rondes Roussel-Uclaf

## 10<sup>e</sup> anniversaire 1969-1979

*Nous publions, ci-dessous, les deux conférences scientifiques présentées, sous la présidence de M. Pierre Aigrain, Secrétaire d'État auprès du Premier Ministre, lors du 10<sup>e</sup> anniversaire des Tables rondes Roussel Uclaf, le 9 novembre 1979 \*.*

## La chimie au service de la médecine

par le Professeur P. Talalay

*(The Johns Hopkins University Baltimore)*



La chimie se trouve aujourd'hui au centre de la vie moderne, et sert de fondement au bien-être culturel, économique et physique de l'être humain. C'est cependant à travers ses relations privilégiées et déjà anciennes avec la médecine que la chimie est sans aucun doute parvenue à son efficacité maximale dans sa contribution au bien-être de l'homme. Mon titre « La chimie au service de la médecine » rend justice à toute l'importance de cette association qui existe depuis les premiers jours de l'alchimie. La médecine a mis la chimie au défi de résoudre certains de ses

problèmes les plus compliqués : isoler, élucider la structure et synthétiser des produits naturels de grande complexité. Par sa capacité à réaliser une variété à peu près infinie de synthèses, la chimie a fourni à son tour à la médecine une multitude de composés dotés de propriétés pharmacologiques nouvelles et intéressantes. Tout au long de l'histoire, les progrès accomplis dans une des disciplines ont stimulé ceux de l'autre et s'en sont enrichis à leur tour.

C'est donc la moindre des choses que nous rendions hommage en cette occasion particulière au Maître incontesté de la synthèse organique, le Professeur Robert Woodward de l'Université de Harvard, dont le décès récent a privé la chimie et par conséquent la médecine, d'un de ses plus brillants chercheurs.

La pratique maintenant courante, qui consiste à traiter une maladie avec des composés chimiques synthétisés délibérément dans ce but spécifique, a été conçue par Paul Ehrlich (1854-1915), qui forgea le terme « chimiothérapie » et en formula les principes directeurs. Ehrlich préconisa l'usage d'infections soigneusement standardisées pour mesurer l'efficacité chimiothérapeutique. Il se rendit clairement compte de la nécessité d'obtenir une toxicité sélective pour l'agent infectieux tout en épargnant les cellules de l'hôte, et introduisit le concept d'index chimiothérapeutique comme mesure de cette propriété. Il reconnut que le développe-

\* *L'actualité chimique remercie vivement la société Roussel-Uclaf de lui avoir permis la publication de ces deux conférences.*

**L'actualité chimique**  
*présente à ses lecteurs*  
*ses meilleurs vœux*  
*pour l'année 1981*

ment de la résistance aux agents chimiothérapeutiques est un caractère acquis et stable de l'agent infectieux, et non une propriété de l'hôte. L'opinion de Ehrlich fut rejetée avec mépris par nombre de ses contemporains, l'amenant à écrire : « l'approche purement chimique en médecine ne rencontre actuellement ni compréhension, ni reconnaissance parmi un grand nombre de mes collègues ».

Heureusement, les convictions visionnaires de Ehrlich prévalurent. Des efforts gigantesques furent soutenus par la conviction que des substances chimiques peuvent être découvertes, et peut être même prévues pour agir en tant qu'agents toxiques spécifiques contre un type donné d'agent pathogène (qu'il s'agisse d'une bactérie, d'un protozoaire, d'un insecte, d'un ver parasite, d'un virus ou même d'une cellule cancéreuse) sans causer de dommage majeur aux cellules de l'hôte. Selon cette conception, la chimiothérapie consiste, au fond, à obtenir une toxicité sélective ou différentielle vis-à-vis d'une unité vivante en présence d'une autre. Les connaissances biochimiques acquises durant la première moitié de ce siècle révélèrent l'unité des processus biochimiques et soulignèrent la parenté de la chimie de toutes les créatures vivantes. Ceci n'était guère encourageant pour ceux qui cherchaient la possibilité de parvenir à une toxicité sélective. Si les réactions biosynthétiques et bioénergétiques étaient en fait très

semblables dans toute matière vivante, la possibilité d'interférer sélectivement avec elles dans une espèce sans affecter vraiment l'autre était sévèrement limitée. Heureusement, ce pessimisme ne fut plus justifié par les progrès ultérieurs qui attirèrent l'attention sur la diversité d'évolution des systèmes vivants.

Il existe en principe au moins trois façons d'obtenir la toxicité sélective nécessaire à toute réussite chimiothérapeutique :

1. Accumulation sélective de l'agent chimiothérapeutique au niveau de la cible (une enzyme, un récepteur ou autre macromolécule, un agent infectieux ou une cellule anormale),
2. Inhibition ou inactivation d'un mécanisme cible présent dans l'agent infectieux ou la cellule anormale, mais absent des cellules de l'hôte. L'inhibition par de nombreux antibiotiques de réactions enzymatiques impliquées dans la biosynthèse des parois bactériennes est un exemple de ce phénomène.
3. Exploitation de différences subtiles d'évolution entre enzymes « iso fonctionnelles » de l'hôte et de l'agent infectieux, visant à la destruction sélective de ce dernier sans endommager significativement le premier. La toxicité sélective reposant sur des différences biochimiques est à la base de l'action de nombreux agents chimiothérapeutiques importants. J'ai choisi d'illustrer ce principe à l'aide de quelques exemples sélectionnés.

## Schistosomiase et dérivés organiques de l'antimoine trivalent

La première preuve concrète que la diversité d'évolution pouvait être une alliée de la chimiothérapie est venue d'une source totalement inattendue : l'analyse du mécanisme d'action chimiothérapeutique du tartrate de potassium et d'antimoine (émétique tartrique) et d'autres dérivés organiques de l'antimoine trivalent sur la schistosomiase. Cette maladie, encore appelée bilharziose, est de type parasitaire ; elle est causée surtout par trois espèces de vers plats qui se logent dans le système veineux, soit du mésentère (*Schistosoma mansoni* ou *S. Japonicum*), soit de la vessie (*S. haematobium*). Ces maladies endémiques majeures affectent environ 5 à 10 % de la population mondiale. Leur cycle vital complet nécessite la participation d'escargots d'eau douce et deux formes de larves nageant librement. Les vers adultes mâles et femelles vivent par paires durant des années, fermement attachés à la garniture endothéliale des veines, et produisent des œufs dont la plupart migrent passivement vers le foie où ils causent leurs dommages majeurs. Il est connu depuis 1918 que les dérivés organiques de l'antimoine trivalent, quoique relativement toxiques sont des agents très efficaces contre la schistosomiase. Mais le mécanisme d'action de ces composés resta obscur jusqu'aux recherches désormais classiques d'Ernest Bueding. Dans les années 1950, Bueding et ses collègues établirent que les schistosomes adultes tirent une très grande partie de leur énergie de la glycolyse, et peuvent survivre (quoique sans produire d'œufs) en conditions anaérobies. Une série d'expériences élégantes montra que les dérivés organiques de l'antimoine trivalent inhibent la glycolyse des schistosomes entiers ainsi que celle d'homogénats de ces organismes, en fonction de la concentration.

Dans les homogénats de schistosome, les dérivés de l'antimoine inhibaient la formation de lactate, non seulement à partir du glucose, mais aussi du phosphate de glucose-6 et du phosphate de fructose-6. Aucune inhibition n'était observée lorsque le diphosphate de fructose-1,6, l'intermédiaire suivant dans la chaîne de glycolyse, servait de substrat. Il en fut déduit que la réaction catalysée par la phosphofructokinase était la cible directe des dérivés organiques de l'antimoine trivalent (figure 1). De plus, le traitement de l'hôte par des doses infra-curatives de dérivés organiques de l'antimoine trivalent amenait à une accumulation de phosphates d'hexoses-6 et à une déplétion en diphosphate de fructose-1,6 chez les vers.

La variation dans le temps de la teneur de ces intermédiaires était en relation étroite avec l'action chimiothérapeutique.

La plus intéressante découverte (et surprenante à l'époque) fut que la phosphofructokinase du schistosome était environ 50 à 75 fois

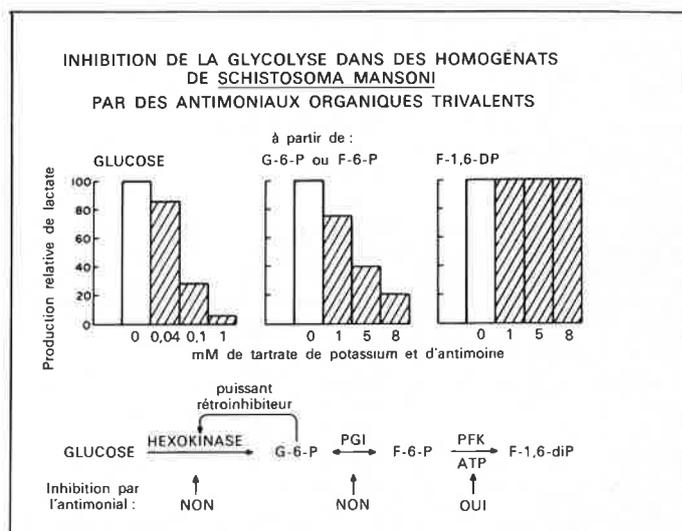


Figure 1. Effet du tartrate de potassium et d'antimoine sur la glycolyse dans des homogénats de *Schistosoma mansoni*. La production de lactate à partir de phosphate de glucose 6 (G-6-P) ou de phosphate de fructose 6 (F-6-P) est abaissée en fonction de la concentration, mais ce n'est pas le cas à partir du diphosphate de fructose 1,6 (F-1,6DF). Des trois premières enzymes de la glycolyse, seule la phosphofructokinase (PFK) est inhibée directement par les dérivés d'antimoine, mais pas l'hexokinase, ni la phosphoglucose isomérase (PGI). Quoiqu'il en soit, le G-6-P qui s'accumule du fait de l'inhibition de PFK par l'antimonieux est un puissant rétroinhibiteur de l'hexokinase (d'après Mansour et Bueding, 1954 ; Bueding et Mansour, 1957).

plus sensible à l'inhibition directe par les dérivés organiques de l'antimoine trivalent que son équivalent chez les Mammifères. Les travaux qui ont suivi ont établi clairement que plusieurs autres facteurs contribuent à l'activité chimiothérapeutique et à la toxicité sélective des antimonieux :

1. Les parasites sont dotés de mécanismes efficaces d'accumulation des antimonieux dont la concentration effective est par conséquent notablement augmentée à l'intérieur du parasite.
2. Le phosphate de glucose-6 qui s'accumule à la suite du

traitement par les antimonieux (du fait que la phosphoglucose isomérase équilibre rapidement les deux phosphates des hexoses-6) est un puissant rétroinhibiteur de la réaction catalysée par l'hexokinase, qui est le stade limitant dans la glycolyse par les schistosomes (figures 1 et 3). La baisse de la teneur en diphosphate de fructose-1,6 peut aussi diminuer la vitesse de la glycolyse, au moins dans un premier temps, parce que l'aldolase a une constante de Michaelis relativement élevée vis-à-vis de ce substrat.

La découverte que la phosphofructokinase des schistosomes était beaucoup plus sensible à l'inhibition par des dérivés antimonieux que l'enzyme correspondante de l'hôte fut une étape importante dans le développement de la chimiothérapie, parce qu'elle laissait supposer la possibilité d'exploiter la biochimie comparée pour

créer des médicaments. Ceci fut bien compris par Ernest Bueding, qui écrit en 1954 :

« Les différences dans la nature des enzymes catalysant la même réaction pourraient être intéressantes pour développer des agents chimiothérapeutiques, parce qu'elles offrent la possibilité de sélectionner des inhibiteurs spécifiques de l'enzyme du parasite, sans affecter celle de l'hôte ».

Cette prédiction, qui attira d'abord le scepticisme général au lieu de l'attention qu'elle méritait, devint d'une importance capitale dans le cadre du développement d'une série d'inhibiteurs de la dihydrofolate réductase, importants d'un point de vue thérapeutique.

## Acide folique et inhibiteurs de la dihydrofolate réductase

L'élucidation, en 1946, de la structure de l'acide folique (ou ptéroylglutamique) par des chercheurs des laboratoires de Lederle de l'« American Cyanamid Company » fut le point culminant de la recherche approfondie d'un facteur de croissance pour les poulets et pour *Lactobacillus casei*. Ce principe nutritionnel était identique à un composé présent dans la levure et dans le foie, capable de guérir une anémie macrocytaire (distincte de l'anémie perniciose chez l'homme et chez d'autres primates). La connaissance de la structure de l'acide folique (figure 2) fut un préliminaire essentiel à une série de développements importants en biochimie, en pharmacologie et en médecine :

1. Elle fournit le premier aperçu concernant le rôle de l'acide para-aminobenzoïque dans les processus de la vie. Quoique D. D. Woods ait trouvé, dès 1940, que l'acide para-aminobenzoïque était un antagoniste de l'action antibactérienne des sulfamides, la connaissance de la structure de l'acide folique était une condition préalable à l'identification de l'étape précise, dans la biosynthèse de l'acide folique, qui était inhibée par les sulfamides (G. M. Brown),
2. Elle rendit possible l'élucidation du rôle des coenzymes foliques dans l'activation d'unités monocarbonées lors de la biosynthèse des purines, des pyrimidines et de certains acides aminés.
3. Elle conduisit à s'apercevoir que les coenzymes foliques n'étaient actives que sous leurs formes complètement réduites (tétrahydrofoliques) et d'établir l'importance de la dihydrofolate réductase pour l'entretien de la synthèse de l'acide thymidylique à partir d'acide uridylique, puisque cette réaction s'accompagne de l'oxydation du tétrahydrofolate.

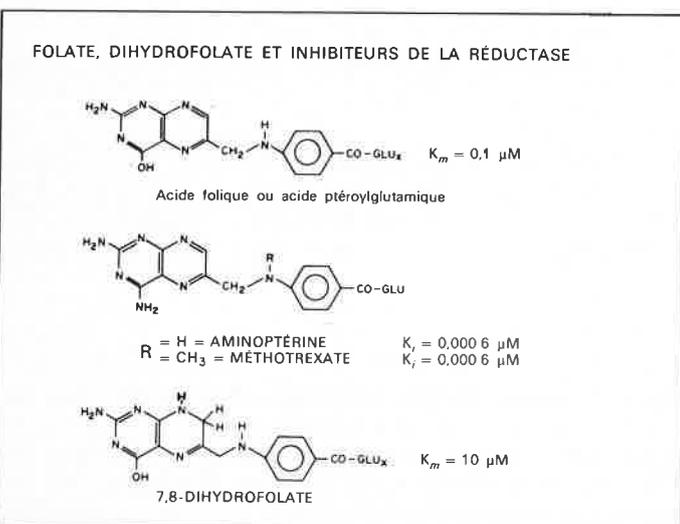


Figure 2. Structures de l'acide folique, du dihydrofolate et des antagonistes : aminoptérine et méthotrexate. Les constantes de Michaelis ( $K_m$ ) et les constantes d'inhibition ( $K_i$ ) sont données pour la dihydrofolate réductase de *Escherichia coli*. GLU = L-glutamate.

4. Enfin, elle stimula la synthèse d'une série d'antagonistes des folates. Ainsi, le remplacement d'un groupe hydroxyle en position 4 du cycle ptéridine par un groupe aminé (aminoptérine) fournit de puissants antagonistes de la nouvelle vitamine (figure 2).

En 1948, Sidney Farber du « Children's Medical Center » de l'Université de Harvard signala que l'administration de l'un de ces antagonistes des folates, l'aminoptérine, avait donné lieu à des rémissions temporaires mais précieuses dans cinq cas sur seize de leucémie lymphoïde aiguë. Cette découverte était tout à fait remarquable, parce qu'avant cette date, cette maladie avait toujours été rapidement fatale. Farber avait eu l'idée d'administrer cet antagoniste aux enfants leucémiques parce qu'il avait remarqué que l'injection de conjugués de l'acide folique semblait accélérer le cours de la maladie. Peu de temps après, le méthotrexate (figure 2) remplaça l'aminoptérine en raison de ses propriétés pharmacologiques plus favorables. Durant plus de 30 ans, le méthotrexate est resté un important agent chimiothérapeutique, non seulement comme un élément indispensable de la médication très efficace des leucémies infantiles, mais aussi comme agent dans le traitement des chorio-épithéliomes, des lymphomes de Burkitt, et d'autres lésions malignes. Néanmoins, ces grandes molécules antagonistes des folates sont des médicaments violemment toxiques, qui dépriment gravement la moelle de l'os et tuent les cellules à croissance rapide du tractus intestinal.

Alors que ces recherches progressaient, George H. Hitchings et son associée Gertrude B. Elion, travaillant aux « Laboratoires de la Burroughs Wellcome Company » à Tuckahoe, New York, avaient commencé d'examiner les possibilités de synthétiser des antagonistes de la thymine. Comme on savait très peu de choses sur la biochimie des acides nucléiques et de leurs composants nucléotides, ces chercheurs étudièrent les effets de tels analogues sur la croissance de *Lactobacillus casei*.

Le choix de cet organisme fut heureux dans la mesure où il n'est pas habituel de rencontrer des microorganismes ayant besoin d'acide folique exogène pour leur croissance. En suivant les principes des remplacements isostériques pour créer des antagonistes métaboliques, Hitchings et Elion remplacèrent les deux groupes hydroxyles de la thymine par des groupes aminés (figure 3). Beaucoup des 2,4-diaminopyrimidines résultantes, portant aussi des substituants en position 5 et 6, étaient des inhibiteurs très puissants de *L. casei*, et l'efficacité de l'inhibition

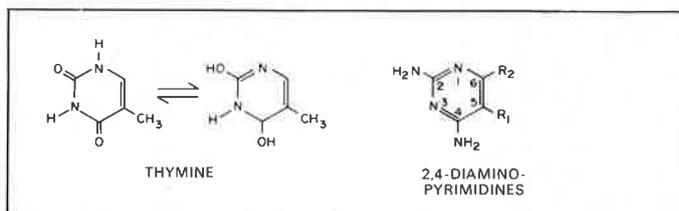


Figure 3. Relations structurales entre la thymine et ses antagonistes isostériques, les 2,4-diaminopyrimidines substituées.

variait fortement avec la nature des substituants (figure 3). Mieux, il était très intéressant de noter que cette inhibition de la croissance était inversée plus efficacement par l'addition dans le milieu de culture de folate plutôt que de thymine, suggérant que ces 2,4-diaminopyrimidines étaient en fait des antagonistes directs de cette vitamine plutôt que de la thymine.

Pendant ce temps, Charles Nichol et Arnold Welch avaient montré que l'aminoptérine et le méthotrexate antagonisaient l'action de l'acide folique par inhibition de la réaction catalysée par la dihydrofolate réductase, bloquant ainsi la réutilisation du dihydrofolate pour ses fonctions coenzymatiques. Il fut montré par la suite que les 2,4-diaminopyrimidines substituées sont aussi des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase, mais, au contraire du méthotrexate, la plupart de ces petites molécules antifoliques ont une toxicité très faible vis-à-vis des cellules des mammifères. C'est maintenant un fait historique que Hitchings, Elion et leurs collègues synthétisèrent un nombre relativement restreint de 2,4-diaminopyrimidines substituées en positions 5 et 6, et qu'ils trouvèrent parmi elles des agents puissants et utiles pour le traitement d'affections causées par des bactéries, des protozoaires (y compris la coccidiose des poulets et la malaria chez l'homme), ainsi que la toxoplasme. La pyriméthamine (5-parachlorophényl-6-éthyl-2,4-diaminopyrimidine) est un agent hautement efficace de lutte et de prophylaxie de la malaria, surtout lorsqu'il est combiné à l'usage de sulfamides (figure 4). Il y a un intéressant corollaire à la découverte de l'activité antipaludéenne de la pyriméthamine. La recherche d'antipaludéens de synthèse pendant la seconde guerre mondiale amena Curd et Rose (1942), des laboratoires des « Imperial Chemical Industries » de Manchester à découvrir un biguanide actif, le chloroguanide (figure 5). Cet agent était totalement inactif *in vitro* contre le parasite de la malaria, et il revint à Crowther et Levi (1953) de démontrer que le chloroguanide subissait une activation métabolique dans l'orga-

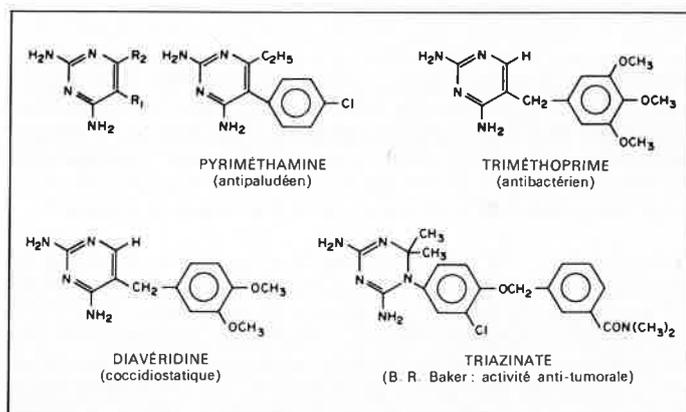


Figure 4. Quelques exemples de 2,4-diaminopyrimidines substituées, pharmacologiquement actives.

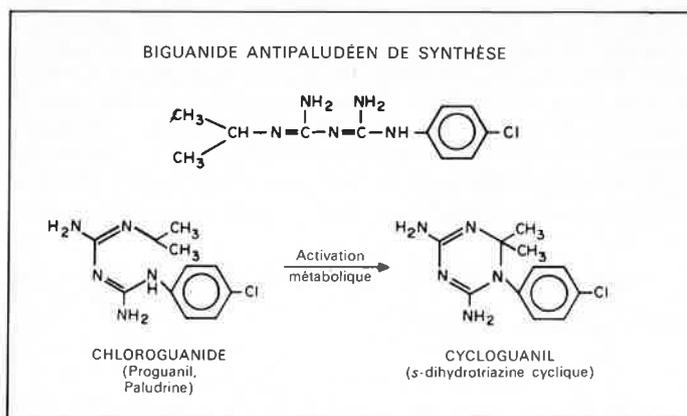


Figure 5. Structures du biguanide antipaludéen de synthèse, du chloroguanide et sa cyclisation métabolique aboutissant au cycloguanil.

nisme, conduisant à une dihydrotriazine (cycloguanil) qui était efficace contre le parasite de la malaria *in vitro*. La reconnaissance de l'extrême similitude de structure entre la pyriméthamine et le cycloguanil amena à la prédiction juste que la pyriméthamine aurait une activité paludéenne et que le cycloguanil serait un inhibiteur de la dihydrofolate réductase.

La triméthoprime, une autre 2,4-diaminopyrimidine substituée (figure 4), est aussi un antipaludéen efficace, mais son utilité thérapeutique principale réside dans le traitement de diverses

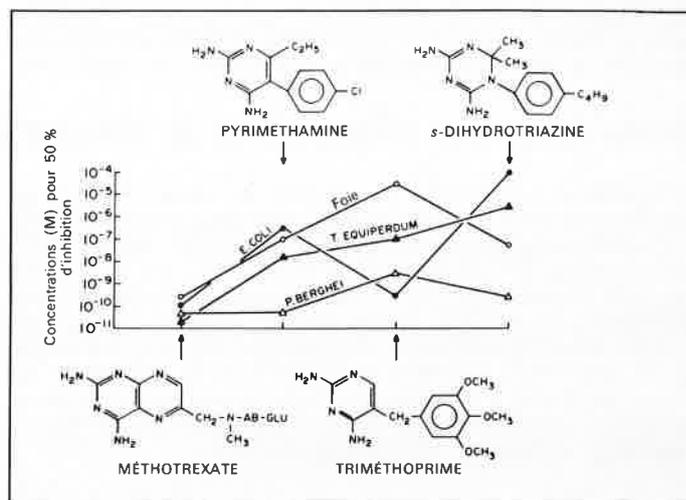


Figure 6. Inhibition de dihydrofolates réductases isolées de *Escherichia coli*, *Plasmodium berghei*, *Trypanosoma equiperdum*, et de foie humain, par le méthotrexate et deux diaminopyrimidines (pyriméthamine et triméthoprime), ainsi qu'une diaminodihydrotriazine substituée. Les concentrations d'inhibiteur, requises pour une inhibition à 50 %, sont représentées en échelle logarithmique (d'après Hitchings).

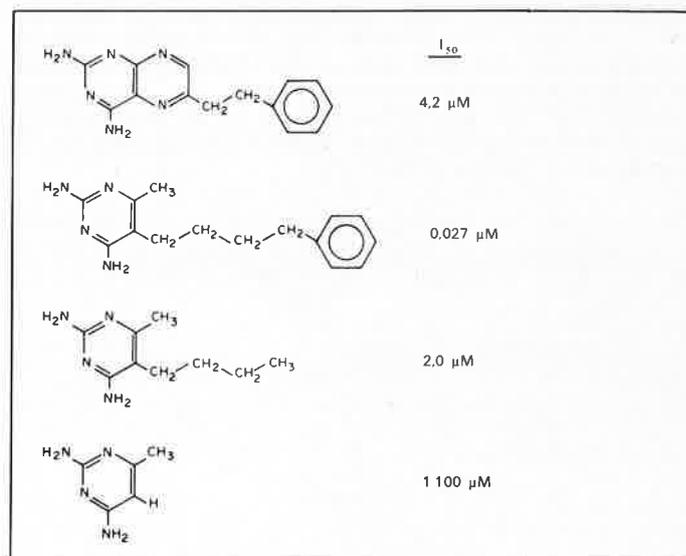


Figure 7. Importance des interactions hydrophobes dans les pouvoirs inhibiteurs d'une 2,4-diaminopyrimidine substituée et de diverses 6-méthyl-2,4-diaminopyrimidines substituées en 5 vis-à-vis de la dihydrofolate réductase purifiée du foie de pigeon. Les concentrations nécessaires pour 50 % d'inhibition de l'enzyme en présence de 6  $\mu\text{M}$  de dihydrofolate sont représentées. Il faut remarquer que les composés dépourvus du cycle ptéridine complet sont de bien meilleurs inhibiteurs, à condition qu'une chaîne latérale hydrophobe soit présente. Le pouvoir inhibiteur dépend fortement de la nature de la chaîne latérale hydrophobe.

infections bactériennes dues à des bacilles gram-négatifs. Cette action est aussi notablement renforcée par les sulfamides. De plus, les associations triméthoprime-sulfamide apparaissent les seules efficaces pour traiter les infections à *Pneumocystis carinii*, complications gênantes des traitements immunodépresseurs. L'association de triméthoprime et des sulfamides est hautement synergétique et de tels mélanges sont d'un usage clinique très répandu. Les avantages principaux de ces associations sont :

1. Diminution de la dose de chaque composant dans le mélange, favorisant, par là même, une apparition réduite des réactions secondaires toxiques.
2. Les mélanges sont plutôt bactéricides que bactériostatiques.
3. La probabilité de développer une résistance est réduite.
4. Le spectre de micro-organismes sensibles est élargi.

Quoique tous les antagonistes des folates, grandes et petites molécules, soient en fait des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase, les raisons du haut degré de spécificité des 2,4-diaminopyrimidines en tant qu'agents anti-infectieux, et celles de leur toxicité sélective n'étaient pas clairement apparentes. Burchall et Hitchings (1965) rapportèrent que les dihydrofolates réductases d'espèces diverses présentaient des sensibilités notamment diffé-

rentes à l'inhibition par ces composés. Des inhibiteurs spécifiques révélèrent des différences allant jusqu'à 5 ordres de magnitude dans les constantes d'inhibition d'enzymes isofonctionnelles isolées de sources variées, par diverses petites molécules antifoliques. Ces différences expliquèrent la toxicité relativement faible de certaines 2,4-diaminopyrimidines pour des cellules animales, en même temps que la sensibilité de diverses bactéries et des parasites de la malaria (figure 6). Au contraire, les grandes molécules antifoliques, comme le méthotrexate, montraient des différences relativement faibles dans leur pouvoir inhibiteur sur diverses dihydrofolate réductases isofonctionnelles.

Beaucoup des 2,4-diaminopyrimidines substituées, qui étaient des inhibiteurs puissants des dihydrofolate réductases, n'ont que peu de ressemblance structurale directe avec la molécule d'acide folique. La forte inhibition des dihydrofolate réductases par ces analogues semble dépendre de leur capacité à établir des interactions hydrophobes avec des régions distinctes du site de liaison de l'acide folique. Cette propriété fondamentale fut très clairement établie par les études extraordinairement fécondes du regretté B. R. Baker (1967), qui soulignèrent la grande contribution des forces hydrophobes dans la fixation d'inhibiteurs puissants (figure 7).

## Les progrès de la chimiothérapie des infections virales de type herpétique

Les maladies virales sont malheureusement restées inébranlables devant les assauts de la chimiothérapie. Il n'est donc pas étonnant que la très récente découverte de l'acycloguanosine (acyclovir), un composé de structure nouvelle qui est un très puissant agent chimiothérapeutique non toxique des infections virales de type herpétique, ait beaucoup attiré l'attention (Elion et Schaeffer 1979). Le mécanisme d'action de l'acycloguanosine est basé sur plusieurs aspects originaux de la biochimie comparée des enzymes isofonctionnelles.

Les virus herpétiques forment une famille de virus à ADN double brin de morphologie caractéristique, et sont les agents d'une quantité d'infections importantes chez l'homme, gênantes et parfois sévères. Les principaux responsables d'infections herpétiques chez l'homme sont : Herpes simplex (types I et II, respectivement labial et génital); le groupe des virus varicelle-zona; les infections par les cytomegalo virus qui constituent un problème particulièrement grave chez les patients subissant un traitement immunosuppresseur, et le virus d'Epstein-Barr, qui est l'agent de la mononucléose infectieuse, et pourrait aussi jouer un rôle dans le lymphome de Burkitt et le carcinome nasopharyngien.

Les infections latentes dues à herpes simplex touchent au moins la moitié de la population des États-Unis. L'herpes simplex génital est la seconde maladie vénérienne de par son incidence aux États-Unis (100 000 cas par an). L'encéphalite à herpes simplex est une maladie endémique très grave (5 000 cas par an à mortalité élevée 33%). La moitié des survivants sont porteurs de séquelles définitives d'ordre neurologique et mental. Les kératites herpétiques très répandues (500 000 cas par an) sont une cause importante de cécité (20 000 cas). Au vu de ces problèmes, la découverte d'un agent chimiothérapeutique très sélectif et peu toxique est évidemment un événement d'importance majeure.

Vers la fin de 1977 et au début de 1978, Gertrude B. Elion et Howard J. Schaeffer, des Laboratoires « Burroughs Wellcome » de la Caroline du Nord, montrèrent que l'acycloguanosine, qui avait été préparée auparavant en tant qu'inhibiteur de l'adénosine désaminase, était un agent très actif contre l'herpès. L'acycloguanosine (acyclovir) est un analogue de la guanosine auquel il manque les carbones 2' et 3' de sa partie ribose (figure 8). Des études menées sur quelques proches analogues de structure proche établirent que l'inhibition des infections à herpes simplex dans les cellules rénales de Callitriche (*Cercopithecus oethiops*) dépendait de la nature de la base purique et de la présence de la chaîne latérale « acyclique » (figure 8).

L'acycloguanosine est efficace thérapeutiquement au laboratoire

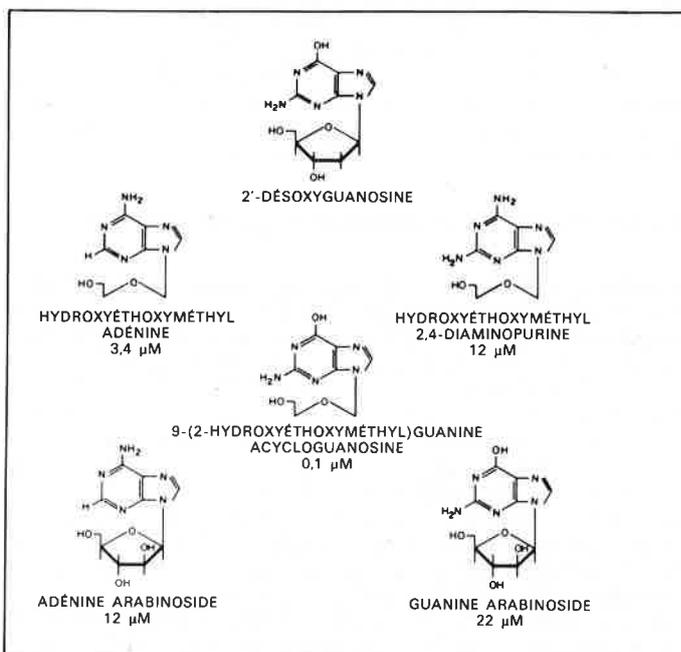


Figure 8. Comparaison des pouvoirs inhibiteurs de l'acycloguanosine et des analogues correspondants de l'adénine et de la 2,4-diaminopurine, ainsi que de la 2'-désoxyguanosine, l'adénosine arabinoside et guanosine arabinoside, sur les infections virales à herpes simplex dans des cellules rénales de *Cercopithecus oethiops*. Les inhibitions sont exprimées comme les concentrations ( $DE_{50}$ ) requises pour réduire de 50% la formation de plages de lyse.

pour le traitement des infections cutanées et cornéennes à herpes simplex, de l'encéphalite herpétique, ainsi que des infections du type varicelle-zona et celles provoquées par le virus des inclusions cytomégaliennes mais sans effet sur toute une variété d'autres virus à ADN ou ARN. Les essais cliniques en sont à leurs débuts et semblent très prometteurs.

Le mécanisme d'action de l'acycloguanosine et sa toxicité sélective sont d'un haut intérêt (figure 9). L'acycloguanosine et ses mono-, di- et triphosphates ne s'accumulent à de hautes concentrations que dans les cellules infectées par les virus herpétiques. La

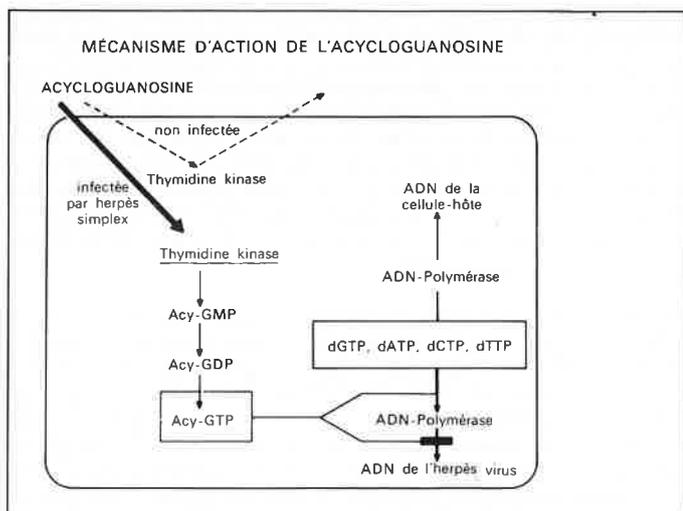


Figure 9. Mécanisme de l'action de l'acycloguanosine sur des cellules infectées par herpes simplex. La thymidine kinase et l'ADN-polymérase spécifiées par le virus sont soulignées.

désoxynucléoside (thymidine) kinase, normalement présente dans les cellules non infectées, ne peut pas phosphoryler l'acycloguanosine, tandis que l'infection par les virus herpétiques s'accompagne de la production de grandes quantités d'une désoxy nucléoside kinase isofonctionnelle qui phosphoryle efficacement l'acycloguanosine menant ainsi à la formation du monophosphate d'acycloguanosine (Acyclo GMP) qui est à son tour converti

(probablement par des enzymes de la cellule hôte) en diphosphate d'acycloguanosine (Acyclo-GDP) puis en triphosphate d'acycloguanosine (Acyclo-GTP) (figure 9). C'est par conséquent l'induction d'une désoxynucléoside kinase codée par l'ADN viral qui est responsable de la formation et de l'accumulation intracellulaires des phosphates d'acycloguanosine.

L'Acyclo-GTP est un puissant inhibiteur de l'ADN polymérase du virus herpétique, qui est chargé de la réplication de l'ADN viral. On a calculé que l'ADN polymérase spécifique du virus est environ 30 fois plus sensible à l'action inhibitrice de l'Acyclo-GTP que l'ADN polymérase isofonctionnelle des cellules hôtes. En outre, la polymérase induite par le virus peut utiliser l'Acyclo-GTP comme substrat dans de faibles proportions, mais l'incorporation de ce nucléotide analogue mène à la terminaison de la chaîne d'ADN, à cause de l'absence du groupe hydroxyle en position 3'.

La toxicité sélective de l'acycloguanosine dans les infections herpétiques doit donc être attribuée à la synthèse de deux enzymes isofonctionnelles en réponse à l'attaque virale et, à la différence des propriétés de ces enzymes, comparées à celles des cellules hôtes. La première enzyme est une désoxynucléoside kinase qui phosphoryle l'acycloguanosine, une réaction que l'enzyme de l'hôte ne peut réaliser. Cela constitue une synthèse létale, puisque l'Acyclo GMP résultante est ensuite phosphorylée en Acyclo GTP, qui est un puissant inhibiteur de la deuxième enzyme, une ADN polymérase également déterminée par le virus. Il faut environ 300  $\mu\text{M}$  d'acycloguanosine pour obtenir des effets cytotoxiques sur les cellules rénales de Callitriche. Étant donné que la  $\text{DE}_{50}$  pour les infections à herpes simplex est de 0,1  $\mu\text{M}$ , l'index thérapeutique en culture cellulaire est de l'ordre de 3 000, une observation confirmée par la toxicité remarquablement faible de ce composé *in vivo*.

## Inhibiteurs enzymatiques agissant sur le mécanisme d'action

Comme dernier exemple, j'ai choisi une approche assez récente en vue de l'obtention d'une toxicité sélective. Son principe est apparu fortuitement au cours d'études fondamentales sur le mécanisme de la biosynthèse des acides gras chez les micro-organismes. Il y a 10 ans, Konrad Bloch et ses collègues, à l'Université d'Harvard, entreprirent une analyse détaillée de la biosynthèse anaérobie des acides gras insaturés à longue chaîne chez *Escherichia coli*. Alors que chez les Eucaryotes ces acides gras sont formés directement par déshydrogénation d'acides gras saturés, au cours de réactions utilisant l'oxygène moléculaire, chez les bactéries les doubles liaisons sont introduites pendant l'élongation des chaînes, par déshydratation des thioesters décanoïques  $\beta$ -hydroxylés. L'intermédiaire  $\beta,\gamma$ -décénoïque qui en résulte est ensuite allongé pour donner finalement les acides gras insaturés à longue chaîne. Au cours des études portant sur la réaction de déshydratation, catalysée par la  $\beta$ -hydroxydécanyl thioester déshydratase. Bloch et ses collègues remarquèrent que cette enzyme pouvait à elle seule convertir les  $\beta$ -hydroxythioesters d'acides gras à 10 carbones en oléfines  $\alpha,\beta$ -*trans* ou  $\beta,\gamma$ -*cis* correspondantes (figure 10). La réduction enzymatique de la double liaison de l'oléfine  $\alpha,\beta$ -*trans*, suivie de l'élongation de la chaîne donne naissance aux acides gras saturés à longue chaîne, cependant que l'élongation des thioesters  $\beta,\gamma$ -*cis* décénoïques fournit les acides gras insaturés à longue chaîne. Quoique cette enzyme catalyse en théorie une séquence réversible d'hydratation-déshydratation, de nombreux faits suggèrent que l'enzyme est en fait une isomérase de position. Toutes les réactions transitent par une oléfine  $\alpha,\beta$ -*trans* liée à l'enzyme, et les groupements fonctionnels de base de l'enzyme sont capables d'ajouter ou de retrancher des protons sur les atomes de carbone  $\alpha$  et  $\gamma$  du thioester.

Bloch et ses collègues notèrent que l'analogue  $\beta,\gamma$ -acétylénique de l'oléfine (le thioester  $\gamma$ - ou 3 décénoïque) qui était présent en tant qu'impureté dans l'oléfine préparée par synthèse était un inhibiteur irréversible très puissant de l'enzyme, alors que les acétyléniques  $\alpha,\beta$  et  $\gamma,\delta$  ne l'étaient pas. Ces chercheurs postulèrent et démontrèrent directement que le thioester  $\beta,\gamma$ -décénoïque était converti par l'action normale de l'enzyme en un allénique

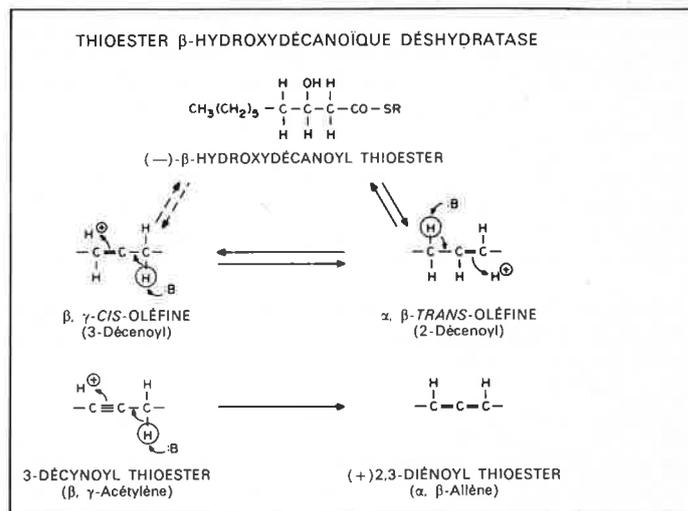


Figure 10. Au dessus : mécanisme de la réaction catalysée par le thioester  $\beta$ -hydroxydécanoïque déshydratase, montrant sa fonction d'isomérase de position, avec soustraction et addition de protons en positions 2 et 4, menant à un équilibre entre le thioester  $\beta$ -hydroxydécanoïque et les oléfines  $\alpha,\beta$ -*trans* et  $\beta,\gamma$ -*cis*.

En dessous : conversion du substrat suicide  $\beta,\gamma$ -acétylénique en l'allène  $\alpha,\beta$  correspondant par un mécanisme similaire. —SR = —S — CH<sub>2</sub> — CH<sub>2</sub> — NH — CO — CH<sub>3</sub>

conjugué extrêmement réactif vis-à-vis d'un groupe nucléophile de l'enzyme, menant ainsi à la destruction de son activité catalytique. Des expériences directes avec les deux allènes isomères préparés par synthèse établirent que seul l'un d'entre eux était un inhibiteur irréversible efficace de l'enzyme. Des expériences modèles avec ces

allènes et divers nucléophiles ont suggéré que le groupe réactif de l'enzyme qui initie l'attaque nucléophile sur l'allène pourrait être un groupe histidine.

Ces expériences amenèrent de manière inattendue à formuler un nouveau principe guidant la création d'agents chimiothérapeutiques extrêmement sélectifs. Ainsi, « en catalysant la transformation d'un analogue relativement peu réactif du substrat en un produit très réactif envers son site catalytique, l'enzyme cause sa propre destruction ». La spécificité de l'inhibition provient du fait que le composé de départ n'est pas un réactif non discriminatif mais contient des groupes fonctionnels à l'état latent, qui sont démasqués par l'action spécifique de l'enzyme cible, réalisant par là-même un marquage d'affinité du site voulu. Quelques synonymes ont été proposés pour désigner les inhibiteurs de ce type, connus maintenant comme substrats-suicide, inhibiteurs irréversibles activés par l'enzyme, inhibiteurs enzymatiques agissant sur le mécanisme ou inhibiteurs de constante catalytique.

Nous avons eu récemment l'occasion d'étudier des inactivateurs suicide de la  $\Delta^5$ -3-cétostéroïde isomérase, une enzyme-clé de la biosynthèse des androgènes qui fut un centre d'intense intérêt pour notre laboratoire durant les 25 dernières années. La  $\Delta^5$ -3-cétostéroïde isomérase de *Pseudomonas testosteroni* est un catalyseur extraordinairement efficace de la transformation de divers 3-cétostéroïdes  $\beta,\gamma$ -insaturés en leurs isomères  $\alpha,\beta$ -insaturés. De nombreuses données suggèrent que cette réaction se produit par transfert intramoléculaire cis-cis diaxial d'un proton de la position 4 $\beta$ - à la position 6 $\beta$ . Les expériences de cinétique, spectroscopiques et d'échange isotopique laissent toutes supposer un mécanisme impliquant un intermédiaire énolique et la participation à la réaction de groupes acides et basiques de l'enzyme (figure 11).

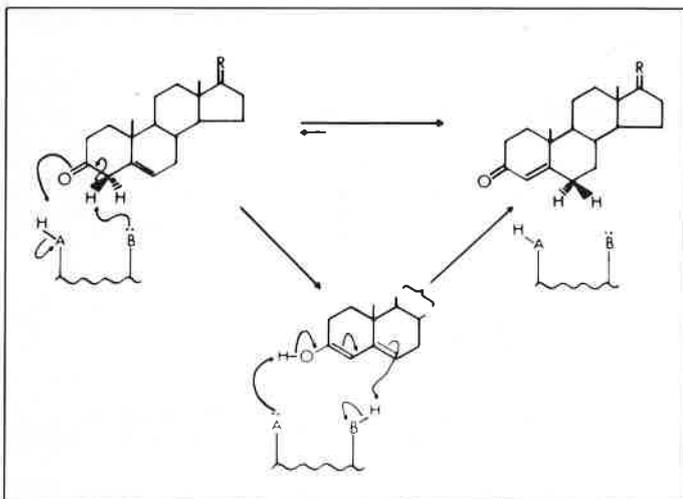


Figure 11. Mécanisme de l'isomérisation des  $\Delta^5$ -céto-3-stéroïdes en  $\Delta^4$ -céto-3-stéroïdes en passant par un  $\Delta^{3,5}$ -diénole, montrant le transfert intramoléculaire de proton de la position 4 $\beta$ - à 6 $\beta$ . Rôle des groupes acides (AH) et basiques (B) de l'enzyme.

Cette enzyme est l'une des très rares enzymes transformant les stéroïdes qui soit disponible sous forme cristalline (on a deux types de cristaux : monocliniques et hexagonaux) et dont on connait la séquence primaire des acides aminés. Elle est composée de sous-unités identiques comportant chacune 125 acides aminés. Sa structure est actuellement étudiée très activement en cristallographie aux rayons X par E. M. Westbrook et P. B. Sigler à l'Université de Chicago.

S'étant rendu compte des similitudes entre les réactions catalysées par la  $\Delta^5$ -3-cétostéroïde isomérase et la  $\beta$ -hydrodésaturation, mon collègue Cecil H. Robinson fit la supposition que les 3-céto A:B sécostéroïdes portant une fonction acétylénique, dont la position correspondait à la double liaison  $\Delta^5$  des substrats

stéroïdes de cette enzyme, pouvaient être transformés par la faculté que possède l'enzyme d'enlever un proton sur le carbone 4, en allène  $\alpha,\beta$ -insaturés extrêmement réactifs et sensibles à une attaque nucléophile par l'enzyme. La synthèse d'une série de sécostéroïdes acétyléniques (et de leurs alléniques correspondants), du type montré sur la figure 12, fut réalisée par Robinson et ses collègues, et les expériences qui suivirent confirmèrent pleinement la prédiction que ces composés seraient des substrats suicide.

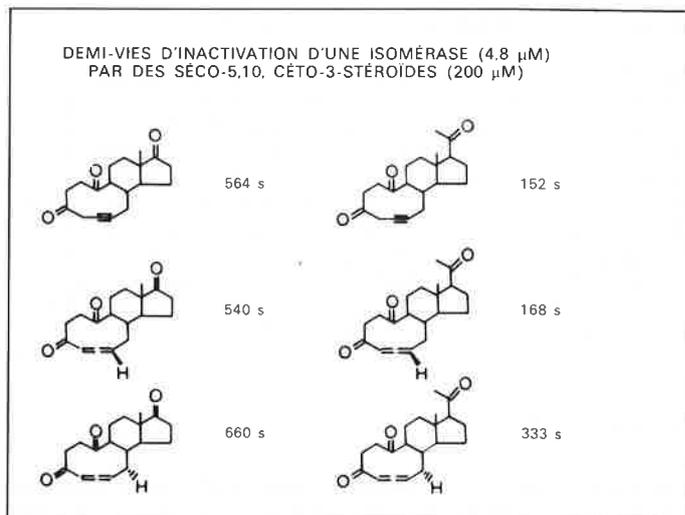


Figure 12. Demi-vies d'inactivation d'une isomérase (4,8  $\mu$ M) par des séco-5,10-céto-3-stéroïdes (200  $\mu$ M). Structures des inactivateurs séco-5,10-céto-3-stéroïdes de la  $\Delta^5$ -céto-3-stéroïde isomérase. Les substrats suicide acétyléniques sont représentés en haut et les allènes 6 $\beta$ - et 6 $\alpha$  correspondants en dessous. A gauche, les dérivés de l'œstryne et de l'œstradiène. A droite, les dérivés de pregnyne et de pregnadiène. Les demi-vies d'inactivation par les différents composés sont indiquées en secondes (Covey et Robinson, 1976).

Les sécostéroïdes sont convertis par la  $\Delta^5$ -3-cétostéroïde isomérase de *P. testosteroni* en allènes qui inactivent irréversiblement et rapidement l'enzyme selon une loi de pseudo-premier ordre (figure 13).

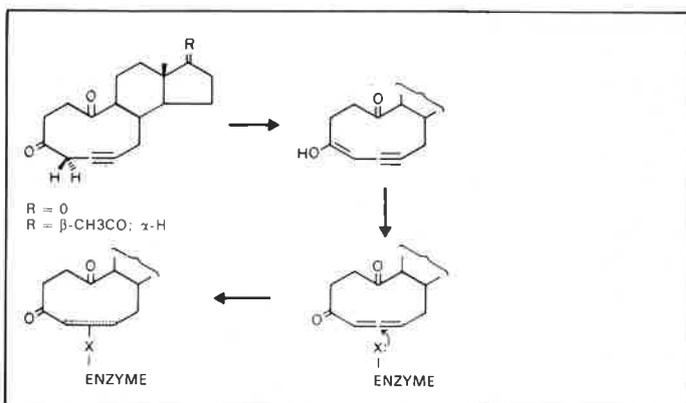


Figure 13. Mécanisme de conversion de séco-5, 10-céto-3-stéroïdes acétyléniques en les allènes correspondants par la  $\Delta^5$ -céto-3-stéroïde isomérase, et réaction consécutive avec un groupe nucléophile (X) de l'enzyme, ainsi inactivée irréversiblement.

L'enzyme transforme l'acétylénique dans les deux allènes 6 $\alpha$  et 6 $\beta$ - qui sont en équilibre l'un avec l'autre, probablement par l'intermédiaire de l'acétylénique. En tous cas, Corey et Robinson (1976) ont apporté la preuve que l'allène 6 $\beta$  est probablement l'inactivateur final.

Le Docteur Trevor Penning a montré dans mon laboratoire que le stéroïde se fixe sur l'enzyme dans un rapport stœchiométrique d'une molécule par sous-unité, et que la liaison est labile en milieu acide ou basique. Des études ultérieures ont montré que le stéroïde probablement lié sous la forme énolique de la  $\beta$ -dicétoïne, par analogie avec quelques-unes des réactions modèles étudiées par Robinson. De plus, le résidu nucléophile de l'enzyme responsable de l'attaque du stéroïde est soit le groupe hydroxyle du reste sérine 58, soit le groupe phénol de la tyrosine 55, la liaison finale étant très vraisemblablement un éther d'énol.

Les dernières années ont vu augmenter considérablement l'intérêt de développer des inactivateurs suicide pour diverses enzymes autres que des isomérases. Nous ne pouvons que faire mention, trop brièvement, de la passion que ce sujet a soulevée, mais heureusement plusieurs revues récentes et des comptes rendus de symposium sont disponibles (Abeles, 1976 : Walsh, 1977; Rando, 1975; symposiums édités par Seiler, Jung et Koch-Weser, 1979; et par Kalman, 1979). Un succès particulier a couronné la création d'analogues d'acides aminés portant des doubles ou des triples liaisons ou des halogènes en  $\alpha$ , visant à inhiber les transaminases et décarboxylases comportant des phosphates de pyridoxal. L'usa-

ge de ces inhibiteurs est en train de fournir un moyen important d'investigation de la biosynthèse et dégradation de divers neurotransmetteurs, et des outils pour perturber leurs fonctions.

Dans certains cas, la conscience de l'existence du principe d'inhibition basée sur les propriétés de l'enzyme a mené à l'identification de produits naturels qui sont des substrats suicide (par exemple la gabaculine pour la GABA décarboxylase, et l'acide clavulanique pour des  $\beta$ -lactamases). L'action antibactérienne des  $\beta$ -halo-D-alanines a été expliquée par leur fonction d'inhibiteurs suicide de la D-aminoacide transaminase. Les inhibiteurs naturels des  $\beta$ -lactamases promettent de protéger les  $\beta$ -lactames (pénicillines et céphalosporines) contre l'action destructive de ces enzymes. L' $\alpha$ -difluoro méthylornithine, un inhibiteur basé sur le mécanisme d'action de l'ornithine décarboxylase, pourrait permettre d'élucider les mécanismes du contrôle de la croissance et de la différenciation, et de contrôler une croissance anormale. Le nombre des substrats suicide de réactions transformant les stéroïdes est aussi en augmentation, laissant espérer que le blocage sélectif de la biosynthèse des hormones stéroïdes peut réussir, avec pour résultat la limitation de la croissance anormale de la prostate et des glandes mammaires.

## Conclusion

Depuis la naissance de la pharmacologie, on a toujours ardemment désiré pouvoir développer des méthodes rationnelles et programmées pour la création de médicaments qui puissent servir à des besoins spécifiques; on a ardemment désiré que l'empirisme, qui engendre gaspillage et frustration, disparaisse un jour.

Les quelques exemples que j'ai choisis pour illustrer les résultats obtenus dans le domaine de la création des médicaments montrent que les prédictions de Paul Ehrlich ont toutes été justifiées, prédictions qui concernaient l'immense potentiel des produits chimiques synthétiques pour le traitement des maladies.

Ceux qui sont sceptiques quant à la possibilité de la création rationnelle des médicaments, seront rassurés, je l'espère, par les sages paroles de Francis Bacon qui écrivait en substance (Novum Organum, 1620) :

« On doit toujours faire des expériences. Car il n'y a pas de

commune mesure entre ce que l'on perd en n'essayant pas et ce que l'on perd en ne réussissant pas; car en n'essayant pas nous rejetons la possibilité d'un bénéfice immense; en ne réussissant pas nous ne faisons que provoquer la perte d'un petit peu de travail humain. »

Quand la lutte de l'homme contre la maladie sera commentée par les historiens, la chimie émergera inévitablement comme le héros de batailles majeures.

## Remerciements

L'auteur exprime sa gratitude envers ses collègues E. Bueding, P. S. Lietman et C. H. Robinson, avec lesquels il a eu de précieuses discussions. Son travail a bénéficié de l'aide généreuse du U.S. Public Health Service (AM 07422 et GM 16492).

## Bibliographie

- R. H. Abeles and A. L. Maycock, *Accts. Chem. Res.*, 1976, **9**, 313-319.  
B. R. Baker, Design of active-site directed irreversible enzyme inhibitors, Wiley, New York, 1967.  
F. H. Batzold and C. H. Robinson, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 2576-2578; *J. Org. Chem.*, 1976, **41**, 313-317.  
K. Bloch, *Accts. Chem. Res.*, 1969, **2**, 193-202. In *The enzymes*, P. D. Boyer, ed., 3rd Ed., Vol. 5, 1971, 441-464.  
E. Bueding and J. M. Mansour, *Brit. J. Pharmacol.*, 1957, **12**, 159-165.  
J. J. Burchall and G. H. Hitchings, *Mol. Pharmacol.*, 1965, **1**, 126-136.  
D. F. Covey and C. H. Robinson, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 5038-5040.  
G. B. Elion, P. A. Furman, J. A. Fyfe, P. de Miranda, L. Beauchamp and H. J. Schaeffer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, **74**, 5716-5720.  
S. Farber, L. K. Diamond, R. D. Mercer, R. F. Sylvester, Jr. and J. A. Wolff, *New Engl. J. Med.*, 1948, **238**, 787-793.  
G. H. Hitchings, *Cancer Research*, 1969, **29**, 1895-1903.  
G. H. Hitchings, G. B. Elion, H. Vander Werff and E. A. Falco, *J. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 765-766.  
G. H. Hitchings, G. B. Elion, E. A. Falco, P. B. Russell, M. B. Sherwood and H. Vander Werff, *J. Biol. Chem.*, 1950, **183**, 1-9.  
T. I. Kalman, Editor, Drug action and design: mechanism-based enzyme inhibitors, 1979, Elsevier/North Holland, Amsterdam, New York, Oxford.  
T. E. Mansour and E. Bueding, *Brit. J. Pharmacol.*, 1954, **9**, 459-462.  
R. Rando, *Accts. Chem. Res.*, 1975, **8**, 281-288.  
H. J. Schaeffer, L. Beauchamp, P. de Miranda, G. B. Elion, D. J. Bauer and P. Collins, *Nature*, 1978, **272**, 583-585.  
N. Seiler, M. J. Jung and J. Koch-Weser, Editors, Enzyme-activated irreversible inhibitors, 1979, Elsevier/North Holland, Amsterdam, New York, Oxford.  
P. Talalay and A. M. Benson, In *The enzymes*, P. D. Boyer, ed., 3rd Ed., Vol. 6, 591-618.  
C. Walsh, *Horizons in biochemistry and biophysics*, 1977, **3**, 36-81.