

## Des enzymes sur commande ? \*

par le Dr J. F. Stoddart

(Département de chimie, Université de Sheffield et Laboratoire ICI Corporate, Runcorn)

*Les chercheurs s'efforcent, depuis plusieurs décades, de pénétrer les secrets qui permettent aux enzymes de jouer leur rôle de catalyseurs naturels. Il est maintenant raisonnable de prétendre que ce n'est plus un mystère. A la suite des premières tentatives, pour imiter l'essentiel des molécules enzymatiques naturelles, il est à présent devenu possible de concevoir et de fabriquer une nouvelle génération de molécules analogues, de création uniquement humaine, en s'appuyant sur la découverte d'une classe de composés chimiques, les éthers cycliques.*

Depuis plus d'un siècle, les enzymes ont fait l'admiration des chimistes, et ont captivé leur imagination. La façon élégante dont ces catalyseurs, qui se sont développés naturellement, jouent un rôle de médiateur dans la myriade d'événements chimiques qui contribuent à l'adaptation, à la croissance et plus généralement au fonctionnement même de tous les organismes vivants, leur inspire étonnement et respect. Ils constatent que les enzymes réussissent à catalyser, à des vitesses impressionnantes, des réactions qu'eux-mêmes trouvent difficiles, voire impossibles à faire. Ils savent bien, aussi, que les enzymes développent leur remarquable pouvoir catalytique en milieu aqueux, à des températures extraordinairement modérées, en ne mettant en œuvre qu'un nombre incroyablement petit de groupes structuraux, qui servent à la fois d'éléments de fixation et de catalyse à l'égard de sites appropriés sur lesquels s'exerce l'action catalytique élective. La sélectivité des enzymes est si grande que la transformation induite peut fort bien porter sur un seul groupe d'atomes ayant une fonction particulière, dans un substrat moléculaire où d'autres groupes ont d'autres fonctions. Au contraire, quand les chimistes désirent une transformation aussi spécifique, ils doivent invariablement prévoir la protection des groupes à ne pas altérer, ce qui donne lieu à de longues suites de manipulations. En ce sens, les enzymes se montrent spécifiques à cent pour cent.

Elles sont aussi stéréosélectives à cent pour cent pour catalyser les réactions qui aboutissent à des stéréoisomères, c'est-à-dire à des molécules identiques à l'orientation près, et non superposables. La faculté de reconnaître l'asymétrie des substrats et de créer des produits asymétriques découle directement de la structure asymétrique des enzymes. Séparer les stéréoisomères

d'une molécule est pour le chimiste une tâche pénible et les transformations qu'il sait pratiquer sur une molécule asymétrique ne conservent cette asymétrie qu'au mieux pour 90 % de la masse.

Enfin, les enzymes savent se montrer extrêmement spécifiques à l'égard d'une substance donnée mélangée à la multitude des autres qui existent en même temps dans une cellule vivante. Tout au contraire, en face d'un mélange le chimiste doit d'abord procéder à l'isolement et à la caractérisation d'une substance particulière avant d'en étudier la réactivité.

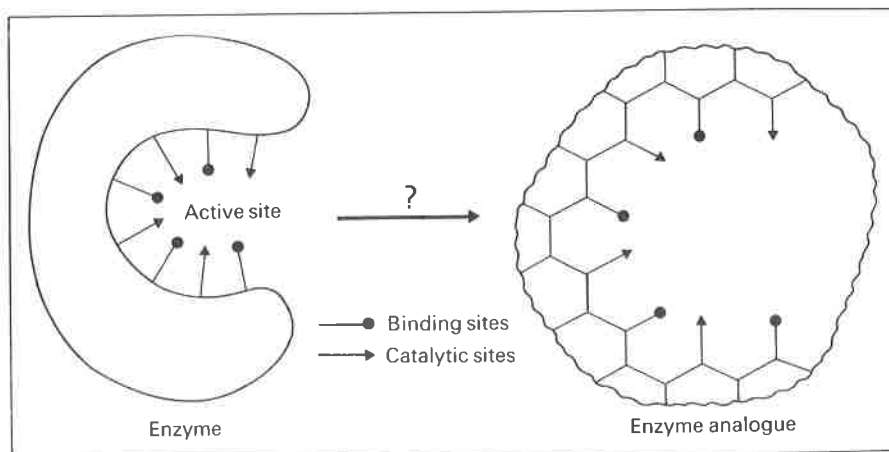
En bref, on peut dire que les enzymes se montrent à la fois efficaces, sélectives et spécifiques à l'égard des réactions chimiques qu'elles catalysent.

### Enzymes de synthèse

Invariablement, les enzymes naturelles sont de macromolécules composées de protéines en totalité ou pour la majeure partie. Beaucoup d'entre elles peuvent être isolées de leur milieu naturel et montrent in vitro, une activité comparable à celle in vivo. Il arrive que le chimiste sache les contraindre à catalyser des réactions inhabituelles. Mais, leur synthèse en laboratoire, à partir de molécules simples, représente presque sans exception une tâche difficile et qui demande un temps considérable.

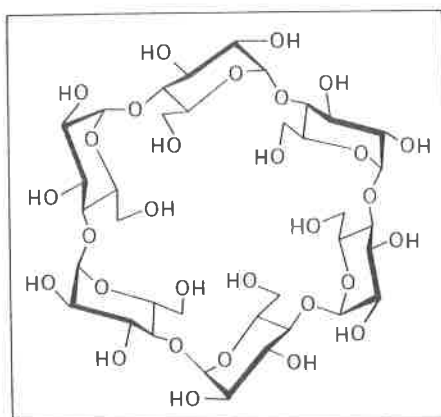
Jusqu'à présent, la synthèse des enzymes naturelles ressort de la recherche académique et n'offre que peu de promesses, sur le plan pratique, dans un avenir proche. En 1978, après de nombreuses années d'une recherche ardue, le groupe de feu G. W. Kenner a réussi, à l'Université de Liverpool, la synthèse d'une lysozyme modifiée, à partir des 129 acides aminés qui la constituent. La forme naturelle de la lysozyme, qui existe, par exemple, dans le blanc d'œuf, est une enzyme antibiotique agissant sur les molécules de polysaccharides qui entrent dans la constitution des membranes cellulaires des bactéries. Hélas, avec son poids moléculaire de 14 400 cette enzyme est l'une des plus simples, et l'une des cibles les plus immédiates de la synthèse. C'est pourquoi on peut, actuellement, estimer que le développement de nouveaux procédés de fermentation associés aux progrès qui peuvent être attendus de l'ingénierie génétique restent les espoirs pratiques les plus solides pour fabriquer des quantités commerciales de certaines enzymes dans un avenir proche.

\* De Spectrum 170.



Est-il possible de reproduire le site actif d'une enzyme dans un type de molécule plus petit, comme celui qui est schématisé à droite ? Un analogue de ce type serait la structure la plus efficace qu'on puisse viser.

a) site actif ; b) enzyme ; c) sites de fixation ; d) sites de catalyse ; e) analogue d'enzyme.



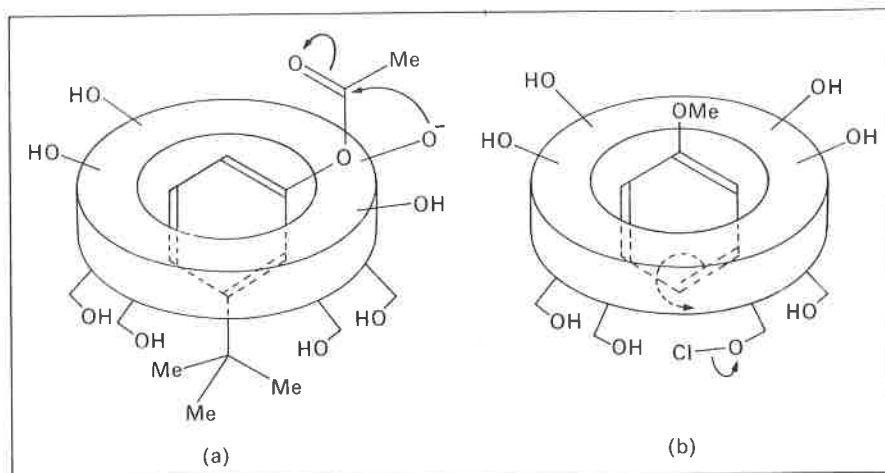
Structure de l' $\alpha$ -cyclodextrine qui contient six noyaux de glucose.

Où en sommes-nous donc ? Si l'on veut faire preuve d'optimisme, il faut prendre conscience d'au moins trois réalités. La première est que le nombre des enzymes qu'on peut espérer produire en masse est relativement restreint. La seconde est que les enzymes, en tant que composés chimiques, voient leur applications sévèrement limitées par l'une de leurs propriétés essentielles, à savoir par leur spécificité à transformer une seule espèce de molécule cible, ou, au mieux, une petite gamme de molécules cibles. La troisième est qu'il existe de nombreuses réactions chimiques dont l'enzyme de catalyse nous est encore inconnue. Cependant, en partant du fait que les enzymes accomplissent des actes chimiques importants, par des moyens que nous comprenons de mieux en mieux, ne serait-il pas possible de créer, en laboratoire, de nouveaux catalyseurs qui commenceraient à rivaliser en spécificité et en efficacité avec les enzymes naturelles ? Pour ma part, je le crois possible.

## Des modèles d'enzymes

L'idée d'imiter l'action des enzymes par un modèle moléculaire approprié n'est pas

nouvelle. Les chimistes se sont demandés, depuis longtemps, s'il était possible d'imiter aux moyens de petites molécules contenant une cavité, l'action des sites actifs des enzymes, c'est-à-dire de ces parties de la macromolécule qui accomplissent presque tout le travail. Les systèmes modèles, qui ont été les plus étudiés jusqu'à présent, sont les cyclodextrines. Les cyclodextrines sont des composés naturels issus de l'action de l'amylase, produite par le *Bacillus macerans*, sur l'amidon. L'exemple le plus connu est l' $\alpha$ -cyclodextrine qui contient six glucoses. L'étude de sa structure a montré une forme en anneau avec une cavité centrale essentiellement hydrophobe et un périmètre hydrophile. Cette cavité est assez grande pour loger un noyau benzénique. Par cet ensemble de caractéristiques, l' $\alpha$ -cyclodextrine acquiert la propriété de former des complexes (molécule à molécule) avec de nombreuses substances organiques, ces complexes étant solubles dans l'eau. Techniquement, on parle de complexes d'inclusion 1 : 1.



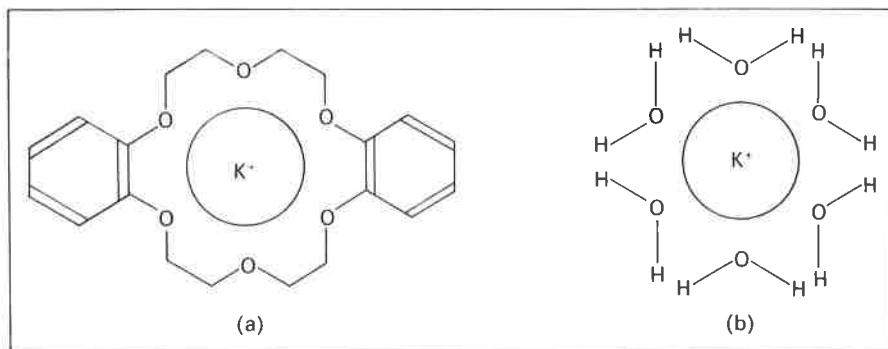
a) Hydrolyse catalytique de l'acétate de *mé*ta-tributylphényle en présence d' $\alpha$ -cyclodextrine ; b) sélectivité de position dans la chloration en *para* de l'anisole en présence d' $\alpha$ -cyclodextrine.

Dans plusieurs cas, comme l'ont montré M. L. Bender et R. Breslow aux États-Unis, des réactions complexes peuvent se produire entre une molécule du substrat et les groupes hydroxyle de la périphérie de la molécule d' $\alpha$ -cyclodextrine. En présence d' $\alpha$ -cyclodextrine, l'hydrolyse de l'acétate de *mé*ta-tributylphényle est accélérée environ 260 fois, à un pH de 10,6. De même, la chloration en *para* de l'anisole par l'acide hypochloreux est 5,3 fois plus rapide et se fait très sélectivement quand l'anisole est lié à 72 % avec l' $\alpha$ -cyclodextrine. Cependant, dans ces deux exemples, l'action catalytique de l' $\alpha$ -cyclodextrine mène à un accroissement des vitesses de réaction qui paraît assez ridicule comparés à ceux que procurent les enzymes naturelles. Je suis sûr que l'absence de structure dans le complexe 1 : 1 est la principale cause de ces performances médiocres : clairement, les anneaux benzéniques des molécules du substrat sont libres de tourner et de se balancer à l'intérieur de la cavité hydrophobe de l' $\alpha$ -cyclodextrine.

Bien que les sites actifs des enzymes soient, eux aussi, pour la plupart hydrophobes, ils contiennent invariablement quelques atomes tels que oxygène, azote et soufre, ainsi que des groupes chargés qui sont capables de former, avec les molécules de substrat, des liaisons hydrogène et des liaisons électrostatiques. Ces deux types de liaisons comptent parmi les plus fortes des liaisons non covalentes. Elles sont aussi plus directionnelles que des liaisons hydrophobes, et se prêtent mieux à la formation de structures complexes. Nous allons maintenant examiner comment les liaisons hydrogène et électrostatiques s'utilisent, en pratique, pour édifier des molécules de grande complexité.

## Éthers cycliques

Le développement d'analogues d'enzymes, entièrement de synthèse, mettant en œuvre des cavités hydrophiles, a débuté avec la synthèse de l'éther cyclique dibenzo 18-6,

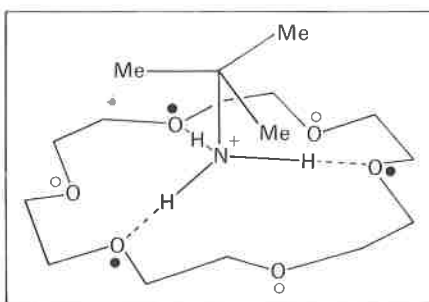


**Ion potassium solubilisé par combinaison avec l'éther cyclique dibenzo 18-6 en a) et avec l'eau en b).**

faite non intentionnellement, en 1967, aux laboratoires Wilmington de Du Pont, aux États-Unis. Le chercheur, à l'origine de cette importante découverte, C. J. Pedersen, observa que ces cycles à 18 sommets, avec leurs 6 atomes d'oxygène, possédaient la propriété assez remarquable de rendre solubles dans le benzène et d'autres solvants organiques certains sels, comme par exemple le chlorure de potassium. En examinant un modèle moléculaire de dibenzo-18-éther-6 cyclique, il acquit la conviction qu'il pouvait entourer l'ion potassium en lui procurant un environnement comparable à celui que rencontre un ion de potassium dans une solution aqueuse. Une importante gamme d'éthers cycliques ont maintenant été synthétisés, et quelques-uns d'entre eux ont été essayés comme modèles pouvant tenir le rôle des antibiotiques naturels qui agissent, pense-t-on, par transport d'ions (par exemple, la valinomycine, la nonactine et la nonen-sine).

Mais ceci n'est qu'une partie de l'aventure. Parmi les éthers cycliques, ceux à 18 sommets dont 6 d'oxygène possèdent l'importante propriété de se lier avec des cations ammonium à dérivé alkyl primaire. On obtient ainsi un complexe organique dans lequel une molécule ionique se trouve liée d'une façon très structurée. En 1973, D. J. Cram, aux États-Unis, proposa la théorie selon laquelle de tels complexes, molécule à molécule, se formaient par liaison de chacun des trois atomes d'hydrogène du cation monoalkylammonium avec les atomes d'oxygène du dérivé 18-6 avec saut de un à chaque fois dans la structure. Nous nous sommes efforcés de déterminer la structure de ces complexes en solution, et nous avons découvert que dans ces complexes les cycles à 18 sommets prenaient une configuration très symétrique, trois atomes d'oxygène en position « *cis* » se liant avec le cation ammonium substitué, les trois autres « *trans* », étant libres. Cette découverte corrobore la prédiction de Cram. Nous pouvons même ajouter, à présent, que les atomes d'hydrogène des cations monoalkylammonium réagissent toujours avec les atomes *cis* d'oxygène des éthers cycliques 18-6, et jamais avec les *trans*.

Des liaisons semblables se produisent à



**Modèle de liaison en trois points entre un cation tributylammonium avec un éther cyclique type 18-6. Les points noirs indiquent les atomes d'oxygène *cis*, qui pointent vers le haut, et les cercles évidés les atomes d'oxygène *trans*, qui pointent vers le bas.**

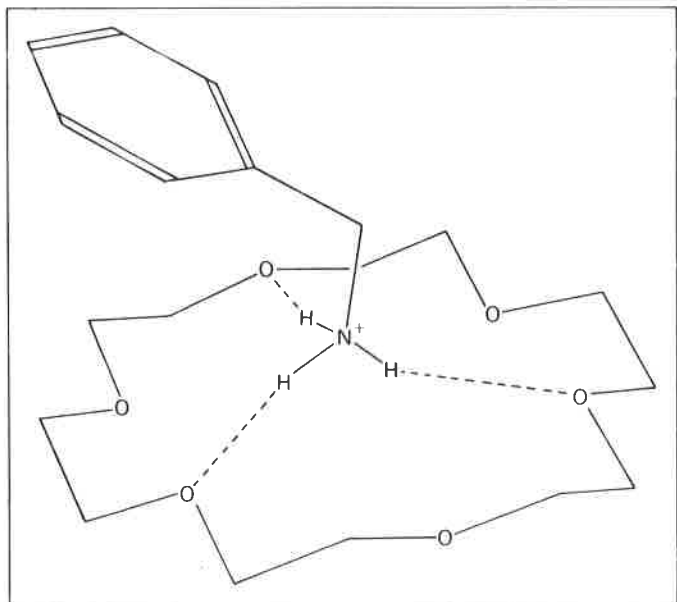
l'état solide, quand ces complexes d'inclusion peuvent se cristalliser. La structure cristalline du complexe formé entre l'éther cyclique 18-6 et le thiocyanate de benzylammonium, qui a été découverte récemment par I. O. Sutherland et son groupe, à l'Université de Liverpool (par diffraction des rayons X), est un arrangement qui apporte un support à la théorie précédente. Tout concourt à montrer qu'il ne se forme des liaisons hydrogène fortes qu'avec les atomes d'oxygène d'une orientation convenable. La conséquence est que l'on dispose d'un moyen pour faire varier les solidités et les structures des complexes d'inclusions des éthers cycliques, et qu'avec quelque pratique, il deviendra éventuellement possible d'édifier la structure désirée.

On observe souvent, dans l'histoire des sciences, que d'importantes découvertes restent longtemps en sommeil avant de connaître de nouveaux développements. Les éthers cycliques ne font pas exception. En 1959, Geoffrey Wilkinson (maintenant Sir Geoffrey Wilkinson) avait observé, à l'Imperial College de Londres, que certains éthers cycliques du type 12-4 formaient « des solutions de couleur bleue, modérément stables avec le potassium et l'alliage sodium-potassium ». Nous nous sommes souvenus de cette découverte, en 1976, quand la Division des produits pharmaceutiques de l'ICI nous a soumis le problème de trouver une molécule réceptrice du type

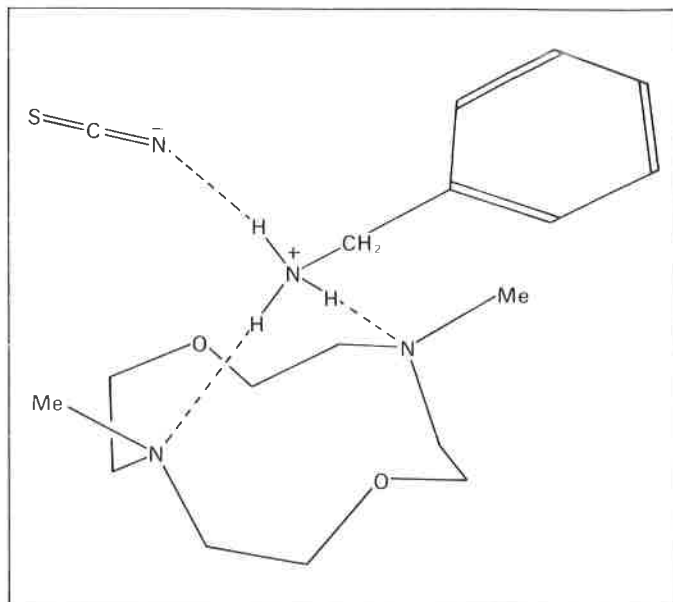
éther cyclique capable de se combiner d'une façon structurale avec des sels d'ammonium dialkylés dérivés d'amines qui sont importantes en physiologie (par exemple, l'adrénaline), ou en pharmacie (par exemple l'Indéral, qui est un médicament cardiovasculaire). Nous avons trouvé, en particulier, qu'un dérivé de type 12-4 contenant deux atomes d'azote et deux d'oxygène était un support extrêmement efficace non seulement pour les sels d'ammonium secondaires, mais aussi pour les primaires. Par la radiocristallographie, D. J. Williams, à l'Imperial College, a pu montrer que dans le complexe formé avec le thiocyanate de benzylammonium, les deux atomes d'hydrogène disponibles dans ce cation se liaient chacun avec un atome d'azote du cycle, le troisième atome d'hydrogène étant libre de se lier avec l'atome d'azote de l'anion thiocyanate. Nos propres recherches, à Sheffield, nous avaient mené, de façon indépendante, à proposer pour ce complexe en solution un modèle à deux points de liaison, avec les structures qui correspondent. On voit donc, qu'au prix d'efforts de synthèses relativement modestes, il est possible de construire autour de cations organiques des environnements de complexes très structurés.

Nous savons que les enzymes naturelles sont des molécules non symétriques. J'ai mentionné, jusqu'à présent, des cycles d'éthers qui étaient, eux, symétriques. Comment peut-on introduire l'asymétrie dans de tels composés ? A Sheffield, et plus récemment à Runcorn, en collaboration avec W. Hewertson du Laboratoire Central d'ICI, nous avons répondu à cette question en faisant appel aux procédés mêmes dont se sert la nature lorsqu'elle fait porter l'asymétrie sur certains carbones des molécules hydrocarbonées. Par exemple, nous avons incorporé l'anhydride double du mannitol dans un dérivé cyclique du type 30-10. D. J. Williams a reconnu, par cristallographie, que cette molécule présente un périmètre hydrophobe et en une cavité hydrophile qui accepte seulement l'un des deux cations stéréoisomères dans le perchlorate d' $\alpha$ -phényléthyl ammonium, ainsi qu'une molécule d'eau lorsque le complexe d'inclusion se cristallise. L'un des atomes d'hydrogène du cation ammonium se lie avec la molécule d'eau; les deux autres, ainsi que les deux atomes d'hydrogène de la molécule d'eau, entrent dans une liaison à fourche qui implique quatre paires d'atomes d'oxygène appartenant aux atomes en cycle qui forment la cavité.

Cette découverte est extrêmement intéressante pour plusieurs raisons. Sur les 10 atomes d'oxygène de la molécule réceptrice, huit sont convenablement orientés pour former des liaisons hydrogène. La bifurcation qui se produit est telle que le plus grand nombre de liaisons se forme sur un cation ammonium substitué de façon asymétrique, en présence d'une molécule neutre. Nous nous apprêtons à exploiter cela. Ce que nous cherchons à savoir, c'est si le cycle a trente sommets, dont 10 d'oxy-



Structure du cristal du complexe 1 : 1 qui se forme entre le cation benzylammonium et l'éther cyclique 18-6.



Structure du cristal du complexe 1 : 1 qui se forme entre le thiocyanate de benzylammonium et l'éther cyclique 18-6.

gène, est capable de catalyser la réaction entre le cation et la molécule neutre qui se trouvent piégés ensemble dans sa cavité relativement rigide. S'il en était ainsi, le développement des analogues d'enzymes se trouverait avancé d'une étape significative.

## Le futur

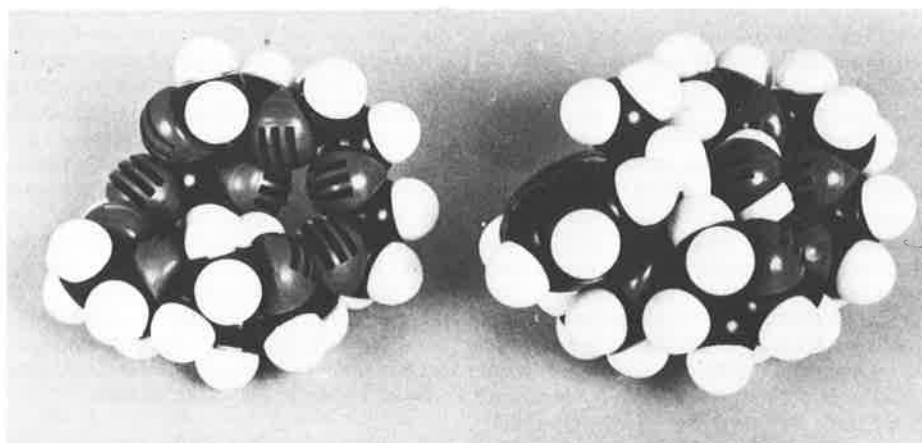
Les progrès dans la synthèse des analogues d'enzymes se sont grandement accélérés depuis que Lord Todd, Président de la Royal Society, avait prédit, en 1976, qu'il était « très possible de produire, à grande échelle, des molécules totalement synthétiques, comparables aux enzymes dans leur action, et conçues pour exécuter des réactions spécifiques ». Mais deux d'entre nous, qui se sont engagés dans la conception et le développement des analogues d'enzymes, ne sont pas sans connaître des critiques, sur la scène internationale. En Grande-Bretagne, M. L. Sinnott de l'Université de Bristol exprime sa conviction que « la nature protéinique des enzymes est une caractéristique qui compte ». Il poursuit en déclarant : « Reproduire les propriétés catalytiques particulières aux enzymes au moyen de petites molécules, ou bien de polymères synthétiques dont la constitution est essentiellement aléatoire, est probablement infaisable. Mais la prolifération de tels efforts entraîne à réfléchir sur la nécessité du réalisme dont devrait mieux se soucier la communauté scientifique. La déraison coûteuse que constitue l'attitude actuelle devrait apparaître dans

cet exemple, comme dans de nombreux autres ».

Il y a de l'imprudence à être aussi catégorique. Je voudrais simplement indiquer que la solution des problèmes scientifiques les plus grands s'est toujours déroulée au milieu de controverses.

La compréhension des actes chimiques que nous savons ramener à des considérations de mécanique et d'arrangements dans

l'espace, jointe à la maîtrise de la synthèse chimique, qui va en s'améliorant font que le but, qui a tenu si longtemps les chimistes en échec, nous semble maintenant à notre portée. Après tout, quand nous recherchons un catalyseur à la fois sélectif et spécifique, nous ne prétendons changer que des paramètres de cinétique, non de thermodynamique. La thermodynamique est peut-être considérée comme la science de l'impossible, la cinétique est certainement la science du possible.



A gauche, modèle stéréochimique d'un éther cyclique du type 30-10. Les atomes d'hydrogène sont blancs, ceux de carbone noirs, ceux d'oxygène gris. On a marqué par des fentes les atomes d'oxygène qui pointent vers la cavité centrale et en font une cage à propriétés hydrophile dans laquelle viennent s'insérer une molécule organique et une d'eau en donnant naissance à un complexe 1 : 1 : 1, comme montré dans le modèle de droite.