



Les Δ^2 -céphalosporines : analyse d'une énigme

N. C. Cohen ¹

Introduction

C'est avec les observations décisives de Fleming qu'a commencé l'une des plus belles pages de l'histoire des grands succès thérapeutiques de notre temps. Avec la découverte de la pénicilline, la chimiothérapie venait de naître; cette nouvelle substance permettait de traiter, avec une efficacité étonnante, un grand nombre d'infections quasiment impossibles à enrayer.

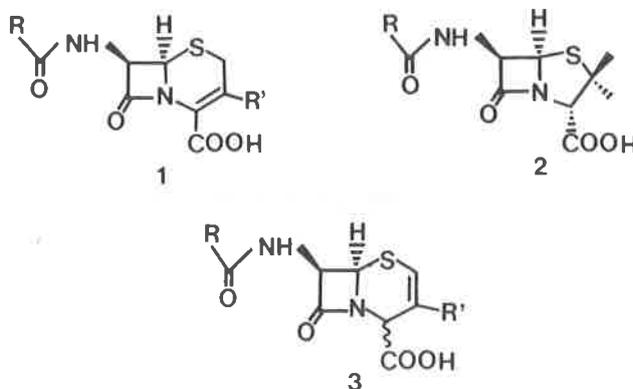
C'est dans la fébrilité nourrie par ces succès spectaculaires et aussi marquée par la Seconde Guerre Mondiale, qu'un effort industriel chimique sans précédent allait s'engager pour produire et améliorer les propriétés thérapeutiques de ce précieux produit.

Ce n'est que quelques années plus tard, avec la découverte des céphalosporines, qu'un deuxième grand progrès allait se réaliser. Cette découverte montrait que, malgré les dix années de travaux intensifs, tout n'avait pas été déjà découvert, et que les espoirs les plus optimistes pouvaient être formulés sur la thérapeutique des maladies infectieuses. Les horizons de la chimiothérapie s'élargissaient considérablement, parce que les nouvelles molécules isolées présentaient un spectre d'activité antibactérienne beaucoup plus large que celui des pénicillines et, d'autre part, contrairement à ce que l'on avait pensé initialement, les molécules trouvées avaient une structure chimique différente de celle des pénicillines; en les nommant les céphalosporines, c'est une nouvelle page de la chimiothérapie qui allait s'écrire.

Les céphalosporines

L'analyse de cette nouvelle famille chimique montrait qu'elle avait une structure (formule 1) différente de celle des pénicillines (formule 2); elle indiquait de quelle manière la nature s'accordait une certaine liberté; autorisant par là même la modification du squelette des pénicillines pour rechercher des nouveaux antibiotiques.

Les céphalosporines possèdent un cycle à six chaînons avec une double liaison. Cette insaturation peut être située dans ce cycle en position 2 ou en 3, les séries correspondantes sont alors désignées Δ^2 (formule 3) ou Δ^3 -céphalosporines (formule 1) * ci-contre.



Une observation surprenante

On avait constaté que les Δ^3 -céphalosporines présentaient de nouvelles et intéressantes propriétés antibiotiques et que les Δ^2 -céphalosporines étaient dépourvues de toute action antibactérienne. En vérité, cette observation était très surprenante car si on analyse les formules chimiques des différentes familles mentionnées ci-dessus, on constate que les différences structurales sont beaucoup plus grandes entre les deux séries actives (formules 1 et 2) que entre les deux familles isomères 1 et 3 (qui ne diffèrent que par la position de la double liaison).

Recherche d'une explication

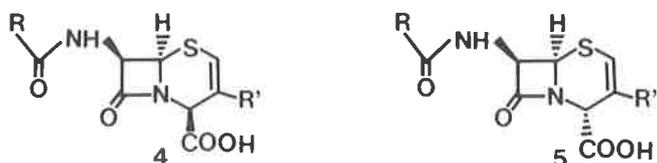
Les chercheurs avaient tout de suite essayé d'expliquer cette anomalie; son histoire mérite d'être rapportée ici parce que

* La numérotation courante commence avec l'atome de soufre. Cependant selon les normes IUPAC (Edition 1979), le bicyclo de 1 est un 5-thia-1-aza-bicyclo [4, 2, 0] oct-2-ène alors que celui de 3 est un bicyclo [4, 2, 0] oct-3-ène.

¹ Centre de Recherches Roussel-Uclaf, 102, route de Noisy, 93230 Romainville.

l'énigme des Δ^2 -céphalosporines n'est pas encore totalement élucidée aujourd'hui, et sa résolution pourrait réserver quelques surprises.

A l'époque, les travaux de Dorothy Hodgkin sur la pénicilline étaient bien connus, ils avaient démontré la structure de cette molécule, et la configuration « α » de la fonction acide (formule 2). En revanche, en ce qui concerne la structure chimique des céphalosporines, tout avait été établi sauf la configuration du carbone porteur de la fonction carboxylique dans les Δ^2 -céphalosporines qui restait encore à préciser (formule 3).



Les deux possibilités représentées dans les formules 4 et 5 étaient donc également envisageables. Par anticipation et selon un raisonnement tout à fait logique, les chercheurs du groupe Eli-Lilly avaient pensé expliquer l'inactivité des Δ^2 -céphalosporines sur la base d'une « mauvaise » configuration de la fonction acide (formule 4) par simple analogie avec les pénicillines. En voulant démontrer cette hypothèse, ces chercheurs se sont aperçus, au terme d'une démonstration chimique très laborieuse (1), que la formule exacte était 5, c'est-à-dire que la fonction acide avait exactement la même configuration que dans les pénicillines ! Le raisonnement ne pouvait pas tenir et l'absence d'effets antibiotiques des Δ^2 -céphalosporines devenait encore plus inexplicable. Dans l'attente de preuves plus convaincantes, cette activité a été attribuée à une propriété chimique bien souvent invoquée dans ce domaine : la faible réactivité chimique du β -lactame sous l'action des agents nucléophiles. Nous n'avons pas le temps d'évoquer tous les aspects de cette relation, rappelons simplement qu'il s'agit d'une hypothèse qui propose de relier l'activité antibiotique avec la réactivité chimique de ce cycle. Cette idée a rapidement séduit tous les chimistes engagés dans ce domaine, notamment Woodward; elle trouve son origine dans une deuxième hypothèse qui nous vient de la biologie moléculaire, et suggérant que l'effet antibiotique des pénicillines serait directement relié à l'aptitude de ces substances à acyler le site actif de certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse du mur cellulaire protecteur du noyau de la bactérie (2, 3, 4). Cette hypothèse a servi de point de repère à tous les nombreux travaux effectués dans ce domaine mais, devant la masse considérable des résultats accumulés, elle a été parfois invoquée un peu trop à la hâte; ne servant dans ces conditions que comme seul recours pour rationaliser provisoirement des paradoxes difficiles à justifier d'une autre manière.

Quelques années plus tard, Sweet et Dahl ont repris ce problème; il a été abordé une nouvelle fois sous l'angle de la géométrie moléculaire (5). Mais, cette fois se plaçant au-delà des hybridations,

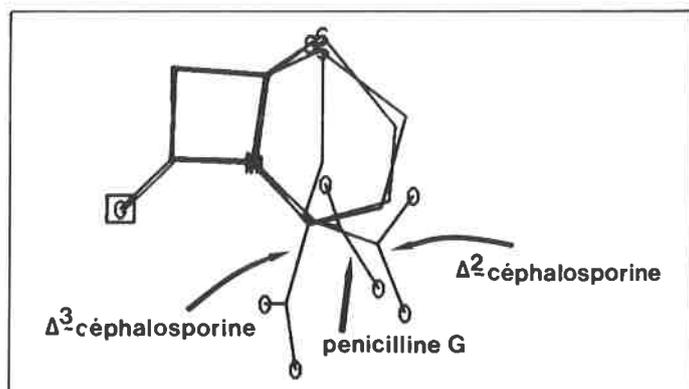


Figure 1. Pas d'analogies dans la géométrie moléculaire des structures actives (à partir des coordonnées de rayons X)

des configurations et même des formules chimiques de ces composés, ces chercheurs ont pensé pouvoir révéler de véritables similitudes au niveau tridimensionnel : compte tenu de la haute stéréospécificité des effets biologiques observés on devait pouvoir montrer des similitudes géométriques très nettes entre structures actives (molécules 1 et 2) qui devraient être très différentes des Δ^2 -céphalosporines (structures 5). C'est en cherchant à démontrer cette idée que Sweet et Dahl se sont aperçus que des similitudes tridimensionnelles se révélaient, malheureusement, plus entre pénicillines (actives) et Δ^2 -céphalosporines (inactives), plutôt que entre les seules structures actives (figure 1).

Confrontés à la même déception que celle éprouvée quinze ans auparavant par les chercheurs de Eli-Lilly, Sweet et Dahl se sont rattachés à la même « bouée de sauvetage » que leurs prédécesseurs en suggérant, en définitive, que les effets antibiotiques dans ces séries de molécules ne sont pas basés sur des processus de reconnaissance ou de discrimination moléculaire très précis.

En renonçant à une interprétation tridimensionnelle globale, ces auteurs se sont attachés à une caractéristique géométrique très locale et relative à la pyramidalité de l'atome d'azote du β -lactame et ont ainsi été amenés à apporter des arguments nouveaux à l'hypothèse soutenue par Woodward. L'atome d'azote du β -lactame, qui avait été trouvé franchement pyramidal dans les pénicillines, s'était révélé dans ce travail beaucoup moins pyramidal dans les Δ^3 -céphalosporines et totalement plan dans les Δ^2 -céphalosporines (voir tableau 1).

Ces résultats pouvaient offrir les éléments suffisants pour relier de manière logique la réactivité chimique de ces molécules avec leurs actions antibiotiques puisque, du moins en théorie, la résonance amide au niveau du β -lactame n'est contrariée que seulement dans les structures actives : pénicillines et Δ^3 -céphalosporines. Dans le premier cas, c'est la forte pyramidalité de l'atome d'azote qui est à l'origine de cet effet; dans le second, c'est la délocalisation engendrée par la sollicitation due au fragment ène-amine.

En même temps que l'on renonçait à faire appel à des critères stéréochimiques subtils, on réduisait, du même coup, toute la richesse des données tridimensionnelles à cette seule mesure de pyramidalité sur l'atome d'azote, paramètre qui se révélera par la suite comme étant inexploitable de façon isolée. Une compréhension globale n'ayant pas vu le jour, c'est ainsi que, de fil en aiguille, on s'est progressivement trouvé dans une impasse avec une somme de résultats apparaissant comme contradictoires.

Pour une analyse critique fine du rôle de la réactivité chimique dans les diverses structures antibiotiques, le lecteur est renvoyé aux récentes et excellentes contributions de Frère, Ghuysen *et al.* (6) qui viennent de montrer que ce n'est pas là que se trouve la clé de ce problème. Nous n'évoquerons ici que les résultats obtenus dans la série des carbapénèmes qui visualisent bien les contradictions au niveau de l'interprétation de faits expérimentaux non discutés.

Tableau 1. Pyramidalité de l'atome d'azote du β -lactame exprimée, soit par la hauteur h de la pyramide formée par cet atome et ses trois substituants, soit par la somme Σ des trois angles de valences autour de cet atome

| Bêta-lactame | h^* (Å) | Σ (degrés) |
|--------------------------------------|-----------|-------------------|
| Pénicilline G | 0,4 | 336,7 |
| Δ^3 -céphalosporine | 0,2 | 350,6 |
| Δ^2 -céphalosporine | 0,06 | 359,3 |

* Ces valeurs sont à comparer avec celles du carbone tétraédrique (0,4-0,5 Å).

Le cas des carbapénèmes

Il s'agit de structures qui ont été bien travaillées ces dernières années notamment chez Merck avec la découverte de la thiénamycine (7) **6a** et par les équipes de Woodward où ce sont surtout les analogues non substitués qui ont été étudiés (8, 9).



| | R ₁ | R ₂ |
|---|-----------------------------|---|
| a | $\text{S} \sim \text{NH}_2$ | $\begin{matrix} \text{CH} < \text{CH}_3 \\ & \\ \text{OH} & \end{matrix}$ |
| b | H | H |

Là où les deux équipes sont entièrement d'accord c'est sur les propriétés biologiques de ces substances : les structures **6** sont bien douées de propriétés antibiotiques alors que les isomères correspondants **7** sont tout à fait dénués d'action antibactérienne.

Pour les chercheurs de Merck, l'inactivité de **7a** s'expliquerait par la faible réactivité chimique du β -lactame dans ce type de structures (10). En revanche, Woodward expliquait l'inactivité de **7b** par une très grande réactivité chimique de cette même famille chimique (8) (selon lui, le produit aurait pu être un très bon antibiotique, mais sa trop grande réactivité le rendrait trop vulnérable et, ainsi, facilement destructible par n'importe quel nucléophile présent dans le milieu biologique). Des études plus approfondies, effectuées par la même équipe (9), ont finalement montré que la réactivité chimique de cette molécule est en fait « normale », c'est-à-dire tout à fait comparable à celle observée dans les autres antibiotiques connus...

Ces derniers résultats ont semé le trouble chez ceux qui les avaient obtenus non seulement parce que la théorie habituelle n'était plus en mesure d'expliquer les effets biologiques observés, mais, en plus, parce qu'une deuxième contradiction venait se greffer sur la première : la pyramidalité de l'atome d'azote aurait dû refléter, selon les hypothèses admises, l'existence notable d'effets antibiotiques dans les structures du type **7b**.

Nous allons montrer dans le paragraphe qui suit comment il serait possible d'interpréter tous ces résultats à la lumière d'une seule hypothèse de travail.

Discrimination tridimensionnelle entre structures actives et inactives

Nous avons déjà mentionné, plus haut, plusieurs tentatives envisagées selon la géométrie moléculaire et qui n'avaient pas abouti. Il est, toutefois, encore possible d'envisager une interprétation sur la base du principe de reconnaissance et de discrimination tridimensionnelle de ces molécules.

Depuis longtemps, on avait remarqué que les modèles moléculaires ne permettaient pas de suggérer une solution au paradoxe des Δ^2 -céphalosporines (1). Mais, depuis les résultats obtenus par Sweet et Dahl (5), qui donc, parmi les chimistes, a véritablement pris la peine de poursuivre le raisonnement jusqu'au bout et de mesurer, sur modèles, les implications géométriques correspondantes ? Il est

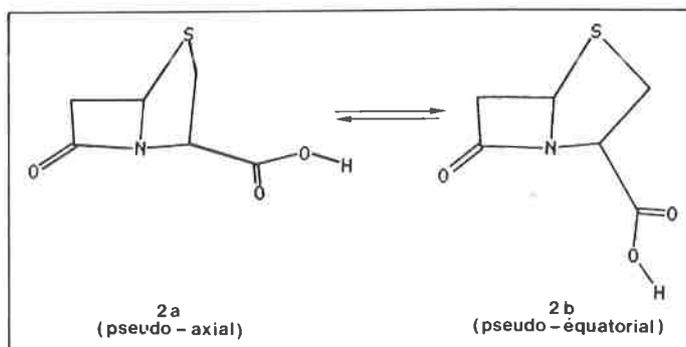


Figure 2. Pseudo-rotation du bicyclic des pénicillines

vrai que les limites mécaniques des modèles du commerce ne facilitent pas toujours les choses; il faut notamment un peu d'imagination pour renoncer au β -lactame standard, pour utiliser des doubles liaisons de cycles à quatre chaînons avec un carbone sp^2 du même type pour simuler l'azote des céphalosporines. Rajoutez à cela l'usage de dominos électriques, de bracelets caoutchouc sans oublier les nécessaires pincements pour maintenir les cycles dans une forme bien précise. Si nous complétons enfin cette description par l'incertitude sur la validité des formes manipulées du point de vue énergétique et la non reproductibilité de certaines constructions, il y a là de quoi décourager les bonnes volontés. Mais, avec un peu de patience et surtout si les difficultés peuvent être surmontées grâce à l'aide efficace de simulateurs de molécules (11, 12) qui permettent de faire, sur ordinateur, des calculs de géométries moléculaires, on peut dégager des hypothèses de travail susceptibles de résoudre l'énigme posée par les Δ^2 -céphalosporines (13).

La clé de l'interprétation que nous proposons se trouve dans une propriété dynamique importante du système cyclique des pénicillines où existe le phénomène de pseudo-rotation permettant à la molécule de modifier très facilement l'orientation de ses substituants. Les énergies mises en jeu dans ce processus sont très faibles (inférieures à la kilocalorie). Il ne s'agit pas du tout d'une nouveauté pour ces molécules et le phénomène a souvent été mis en évidence. En **2a** (figure 2), la fonction carboxylique se trouve dans une orientation pseudo-axiale alors qu'en **2b** elle est pseudo-équatoriale.

Si nous complétons la superposition illustrée dans la figure 1 par la fluctuation engendrée par ce phénomène de pseudorotation on obtient le diagramme de la figure 3 où l'on peut se rendre compte

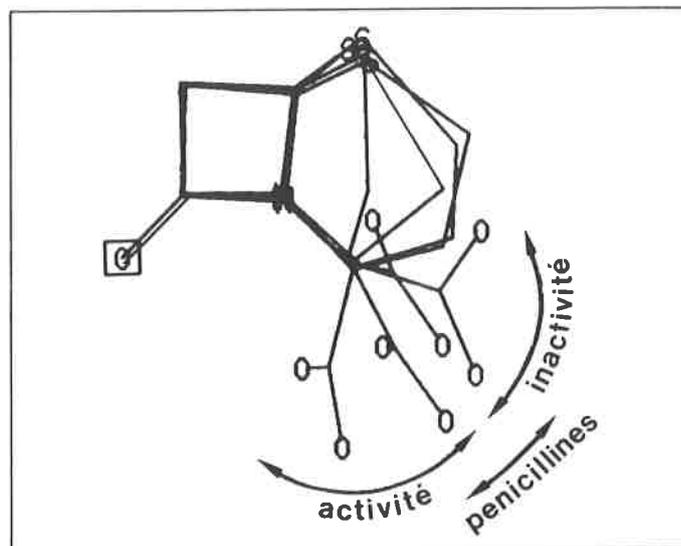


Figure 3. Superposition de structures Δ^3 -céphalosporines 1 Δ^2 -céphalosporines 5 et pénicillines 2 en tenant compte de la pseudo-rotation possible dans ce dernier type de molécules

de cette flexibilité, en même temps qu'apparaît une solution possible aux problèmes précédemment évoqués : comme on peut le voir sur le dessin, la forme pseudo-équatoriale 2b (figure 2) pourrait être la forme biologiquement active de ces molécules puisque dans cette perspective il devient possible de séparer les molécules actives de celle qui est inactive.

Cette analyse offre donc une solution possible au paradoxe des Δ^2 -céphalosporines en révélant une zone de présence très stricte de la fonction carboxylique pour que la structure considérée puisse présenter les effets antibiotiques souhaités. A la lumière des mêmes régions, favorables et défavorables à l'activité, il est également possible d'interpréter les résultats évoqués plus haut au sujet des carbapénèmes 6 et 7, puisque, là encore, seules les fonctions acides des structures actives se localisent correctement dans la région adéquate.

Le lecteur est invité à voir un autre article (14) où le modèle schématisé dans la figure 4 est présenté d'une façon plus précise, et où il est également montré comment il serait possible de restituer des activités antibiotiques aux Δ^2 -céphalosporines.

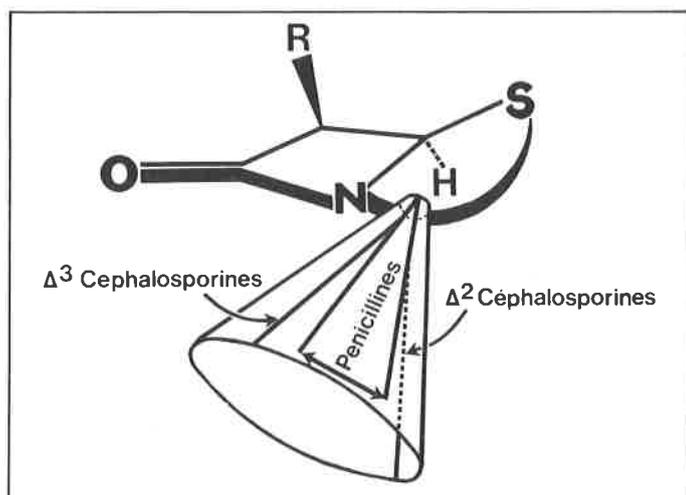


Figure 4. Orientation de la fonction carboxylique dans les structures 1, 2 et 5

Il est notamment suggéré que des structures du type 4, qui présentent des caractéristiques géométriques favorables, pourraient révéler des activités antibactériennes intéressantes. Il est amusant de noter au passage le renversement de la perspective : au tout début les Δ^2 -céphalosporines, qui avaient la fonction acide dans la configuration α , avaient été interprétés comme « bonnes » et les structures épimères β comme « mauvaises »; le modèle qui est proposé ici suggérerait maintenant le contraire.

Des résultats récents (15) apportent encore une information supplémentaire en faveur de ce modèle; on vient, en effet, de préparer les deux formes épimères 8 et 9 pour lesquelles on a observé que c'était la configuration 9 qui était favorable à l'activité antibiotique. La figure 5 montre comment, dans ce type de structure, se profile très nettement la géométrie moléculaire considérée dans notre modèle comme étant la forme active nécessaire dans ce type d'activités.

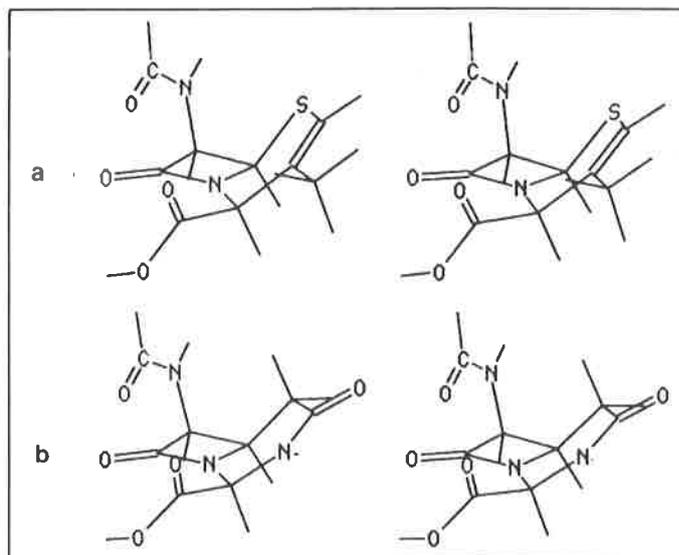


Figure 5. Vues stéréoscopiques des structures 4 et 9

Il reste encore beaucoup de points qui sont obscurs dans la compréhension des corrélations structure-activité dans ce domaine, comme, par exemple, le rôle de la chaîne et l'inversion de stéréochimie révélée par la chaîne de la thiénamycine. Il faudra certainement explorer un certain nombre de variations structurales convenables avant d'avoir une solution satisfaisante à ces nouvelles questions.

La recherche actuelle dans ce domaine est maintenant sérieusement engagée dans la direction des monolactames au détriment de celle sur les céphalosporines. Mais nous pouvons nous demander si les possibilités de ces molécules ont été entièrement explorées, et si les Δ^2 -céphalosporines, considérées jusqu'ici comme dénuées de tout intérêt thérapeutique, ne devraient pas nous réserver de bonnes surprises.

Bibliographie

- (1) E. Van Heyningen, L. K. Ahern, *J. Med. Chem.*, 1968, **11**, 933.
- (2) J. L. Strominger, D. J. Tipper, *Amer. J. Med.*, 1965, **39**, 708.
- (3) R. R. Yocum, D. J. Waxman, J. R. Rasmussen, J. L. Strominger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1979, **76**, 2730.
- (4) J. M. Ghuysen, J. M. Frère, M. Leyh-Bouille, J. Coyette, J. Dusart, M. Nguyen-Disteche, *Annu. Rev. Biochem.*, 1979, **48**, 73.
- (5) R. M. Sweet, L. F. Dahl, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 5489.
- (6) J. M. Frère, J. A. Kelly, D. Klein, J. M. Ghuysen, *Biochem. J.*, 1982, **203**, 223.
- (7) G. Albers-Schönberg, B. H. Arison, O. D. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, E. A. Kaczka, R. E. Rhodes, J. S. Kahan, F. M. Kahan, R. W. Ratcliffe, E. Walton, L. J. Ruswinkle, R. B. Morin, B. G. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 6491.
- (8) R. B. Woodward, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, 1980, **289**, 239.
- (9) H. R. Pfaendler, J. Gosteli, R. B. Woodward, G. Rihs, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 4526.
- (10) D. H. Shih, R. W. Ratcliffe, *J. Med. Chem.*, 1981, **24**, 639.
- (11) N. C. Cohen, *Tetrahedron*, 1971, **27**, 789.
- (12) N. C. Cohen, P. Colin, G. Lemoine, *Tetrahedron*, 1981, **37**, 1711.
- (13) N. C. Cohen, Document interne Roussel-Uclaf CC-S007-PR (1972).
- (14) N. C. Cohen, *J. Med. Chem.*, sous presse (parution probable début 1983).
- (15) C. L. Branch, M. J. Pearson, *Tetrahedron Letters*, 1982, **23**, 3003.