

La synthèse totale, un outil indispensable pour comprendre l'ulcère de Buruli

Anne-Caroline Chany, Cédric Tresse, Virginie Casarotto et Nicolas Blanchard

Résumé

L'ulcère de Buruli est une infection tropicale de la peau due à une mycobactérie appelée *Mycobacterium ulcerans*. La description clinique de cette infection, déclarée comme négligée par l'Organisation mondiale de la santé, remonte à 1948, mais la découverte de l'unique agent pathogène, une toxine appelée mycolactone A/B, ne date que de 1999. Cet article retrace les principales découvertes associées à cette maladie et montre ce que peut apporter la synthèse totale de produits naturels et de leurs dérivés pour la compréhension de mécanismes d'action *in vitro* et *in vivo*.

Mots-clés

Synthèse totale, mycolactone, ulcère de Buruli, mécanisme d'action.

Abstract

Total synthesis, an essential tool to understand Buruli ulcer

Buruli ulcer is a tropical skin disease due to a mycobacteria called *Mycobacterium ulcerans*. The first clinical description of this infection can be traced back to 1948 but it's only in 1999 that the sole pathogenic agent of this disease was discovered and named mycolactone A/B. This article traces the main discoveries associated with this disease and shows the importance of natural products total syntheses for the understanding of the *in vivo* and *in vitro* mechanisms of action.

Keywords

Total synthesis, mycolactone, Buruli ulcer, mechanism of action.

En 1948, Peter MacCallum, Jean C. Tolhurst, Glen Buckle et Hubert A. Sissons du Département de pathologie de l'Université de Melbourne (Australie) et de l'hôpital Alfred de Melbourne décrivent pour la première fois de manière clinique une maladie nécrotique de la peau totalement nouvelle, à travers les cas de six patients de la région de Bairnsdale, une ville située à 280 km à l'est de Melbourne [1-2] (figure 1).

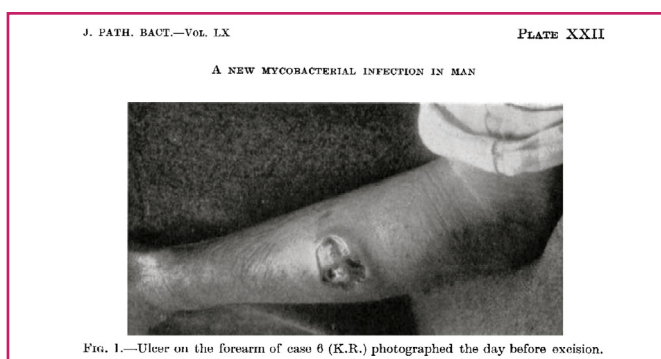


Figure 1 - Ulcère de Buruli sur l'avant-bras d'un patient de 26 ans, illustrant la publication d'origine de MacCallum *et coll.* [1].
© 1948 The Pathological Society of Great Britain and Ireland.

Leurs ulcérations présentent toutes des caractéristiques tout à fait atypiques et même si le premier diagnostic penche pour des cas de tuberculose, l'abondance des bacilles observés dans les lésions ainsi que les caractéristiques histologiques et bactériologiques réfutent cette hypothèse rapidement [1] (figure 2).

Les auteurs démontrent également que la bactérie responsable de ces nécroses est très difficile à cultiver. Après le

criblage de nombreux milieux, atmosphères et températures de culture, il est montré que les colonies de bactéries croissent de manière optimale à une température de 30 à 33 °C, avec toutefois des temps de génération compris entre 36 et 80 heures, inhabituellement longs par rapport à d'autres mycobactéries. Le micro-organisme responsable de ces ulcères n'est pas nommé dans la publication d'origine : « *We do not, at present, propose a name for the organism* » concluent les auteurs. Le nom de *Mycobacterium ulcerans* sera proposé pour la première fois en 1950 [3].

L'ulcère de Buruli

Distribution géographique et prévalence

D'autres continents que l'Océanie sont également touchés par ces ulcérations très caractéristiques : l'Afrique notamment, où de très nombreux cas sont décrits dans les années 1950-60, principalement au Congo belge et en Ouganda [4], même si des signalements peu précis remontant aux années 1860 sont également suspectés d'être des cas d'infection à *Mycobacterium ulcerans*. Progressivement apparaît le terme d'ulcère de Buruli, nommé d'après une région semi-aride du district de Mengo appelée Buruli (Ouganda) [5]. Il est à noter que de nombreux autres noms ont été donnés à cette infection, notamment « juwe okoro » ou « bile okoro » dans le district de Madi (Ouganda), que l'on peut traduire par « la plaie qui ne guérit jamais » [6]. L'appellation « ulcère de Buruli » est maintenant largement acceptée et est notamment utilisée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour son programme « Global

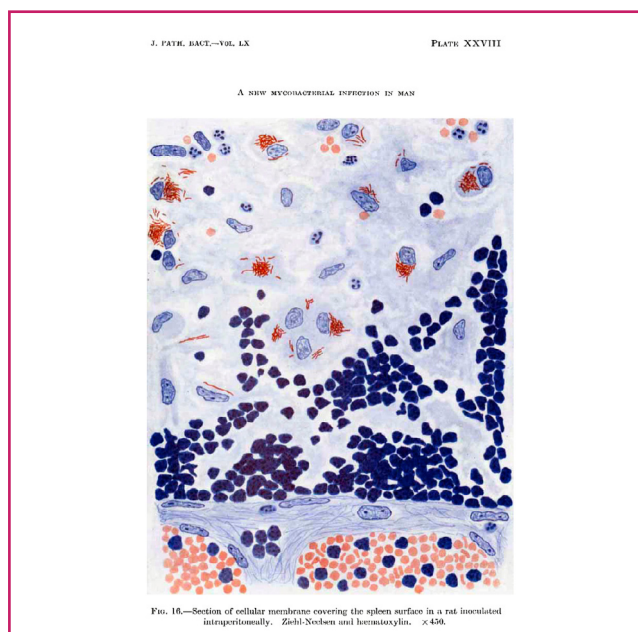


Figure 2 - Vue d'artiste de membrane cellulaire de rate d'un rat infecté par *Mycobacterium ulcerans*, illustrant la publication d'origine de MacCallum et coll. [1].

© 1948 The Pathological Society of Great Britain and Ireland.

Buruli Ulcer Initiative » lancé en 1998. Ce dernier vise à coordonner les efforts internationaux de recherche, à mobiliser des ressources, et contribue à améliorer la visibilité de cette infection auprès du grand public et des décideurs politiques [7].

La prévalence de l'ulcère de Buruli n'est pas clairement établie en raison des difficultés pour obtenir des données régulières de la part des pays touchés. Le plus grand nombre de cas est toutefois signalé en Afrique de l'Ouest, la Côte d'Ivoire totalisant plus de la moitié des cas connus. Dans certaines zones rurales du Ghana, cette infection devient même la seconde maladie mycobactérienne après la tuberculose [2].

Présentation clinique et diagnostic

Cette infection peut se présenter sous deux formes cliniques : non ulcéreuse et ulcéreuse [2]. La première débute par l'apparition de papules (d'un diamètre inférieur à 1 cm), puis de nodules atteignant les tissus sous-cutanés (d'un diamètre inférieur à 2 cm). Des plaques peuvent également être observées ou encore un œdème diffus au niveau des membres inférieurs, supérieurs ou du visage. Ces différents stades ne sont associés à aucune fièvre ni douleur, retardant ainsi la prise en charge thérapeutique. En l'absence de cette dernière, une évolution vers des formes ulcéreuses est observée avec des atteintes potentielles des os. Ces ulcérations se localisent à 85 % sur les jambes ou les bras et peuvent entraîner de graves contractures à long terme si une articulation est touchée. Ainsi, même si la mortalité reste basse dans les infections à *Mycobacterium ulcerans*, le taux de morbidité est important.

La détection rapide de ces infections est un enjeu majeur pour les zones endémiques telles que l'Afrique subsaharienne, l'Australie ou encore le Japon [2]. Cependant, l'identification non ambiguë de cas d'ulcère de Buruli n'est pas chose aisée dans certains pays, en raison des nombreuses autres infections mycobactériennes non tuberculeuses et

aussi du niveau de qualification des personnels médicaux et des infrastructures de régions rurales d'Afrique. À l'heure actuelle, l'OMS préconise que les cas diagnostiqués de manière clinique ou suspectés soient confirmés par des laboratoires de référence nationaux ou internationaux qui analysent les échantillons de biopsie ou de culture par amplification en chaîne par polymérase (PCR : « polymerase chain reaction ») pour détecter une séquence d'insertion du génome de *Mycobacterium ulcerans* (IS2404) de 1 274 paires de bases, présente uniquement dans cette mycobactérie. La sensibilité de cette technique est supérieure à 96 % et constitue donc la méthode de référence [8].

Traitement des infections à *Mycobacterium ulcerans*

Le traitement médical des infections à *Mycobacterium ulcerans* a connu deux périodes bien distinctes [2]. De leur identification clinique en 1948 jusqu'en 2003, le recours à la chirurgie, avec des greffes de peau pour les cas de nécroses les plus avancés, constituait la prise en charge standard. De longues hospitalisations étaient alors nécessaires (trois mois en moyenne), ce qui posait des problèmes importants pour les pays du continent africain ayant déjà des capacités hospitalières limitées. De plus, le taux de récurrence était estimé entre 16 et 28 %. L'avancée majeure dans le traitement de l'ulcère de Buruli se produit en 2004 avec l'introduction de l'antibiothérapie, qui a permis de diminuer le recours à la chirurgie et a fait chuter drastiquement le taux de récurrence, estimé maintenant entre 0 et 2 %. De nombreuses combinaisons de médicaments ont bien entendu été étudiées et la préconisation actuelle de l'OMS est l'utilisation de deux anti-tuberculeux (rifampicine et streptomycine) pendant huit semaines [9]. Un point très important du traitement est le soin apporté aux lésions, notamment lorsque celles-ci sont situées sur des articulations telles que le coude, le genou ou la cheville, afin d'éviter des conséquences dramatiques à long terme, telles que des contractures, conduisant à des handicaps majeurs.

Le réservoir de *Mycobacterium ulcerans*

Le mode de transmission de *Mycobacterium ulcerans* reste un mystère pour la communauté scientifique. De nombreuses hypothèses ont été avancées et il est établi que cette mycobactérie est présente dans l'environnement, notamment aquatique [2]. Il est possible de la détecter dans les biofilms présents sur des plantes aquatiques de rivières à faible débit, ou des plans d'eau stagnante, mais aussi dans des espèces de poissons, de batraciens et d'insectes aquatiques. Les populations les plus touchées en Afrique sont en effet entourées de plans d'eau et la contamination pourrait avoir lieu *via* des microcoupures sur les membres, facilitant ainsi l'infection lors de travaux agricoles ou de baignades.

La mycolactone A/B, exotoxine de *Mycobacterium ulcerans*

L'un des aspects les plus intrigants des infections à *Mycobacterium ulcerans* est l'existence d'une toxine produite par la mycobactérie et qui est responsable de l'ensemble des symptômes observés, de la nécrose des tissus mous à l'absence de réponse immunitaire, comme nous le verrons plus loin. Cette toxine a été découverte en 1999 par Pamela Small [10] et sa structure complète a pu être élucidée grâce à des études RMN multidimensionnelles combinées à

la synthèse totale des différents stéréoisomères, menée par le groupe de Yoshito Kishi [11]. Cette toxine a été nommée mycolactone en raison de son origine mycobactérienne et de sa structure de type macrolide (figure 3).

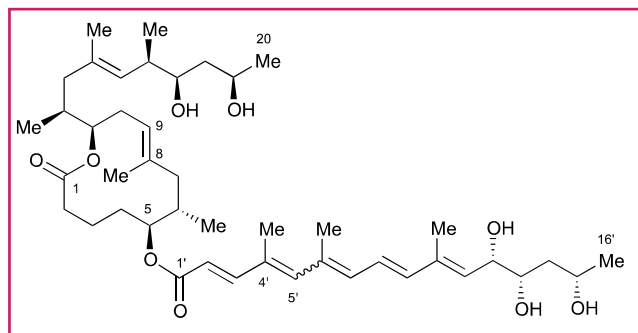


Figure 3 - Structure de la mycolactone A/B découverte par Small en 1999.

En effet, la mycolactone est composée d'un motif macro-lactonique à douze chaînons possédant une insaturation carbone-carbone en C8-C9 (C8-undécénolide), d'un fragment nord C12-C20 constitué de quatre centres stéréogènes et d'un fragment sud C1'-C16' comprenant un motif pentaénoïque et trois centres stéréogènes. À l'état naturel, la mycolactone existe sous forme de deux isomères géométriques en C4'-C5', l'isomère Z étant majoritaire (60 %) en raison de l'existence d'une très forte interaction allylique. Ces deux isomères sont séparables mais reviennent spontanément à l'état d'équilibre $Z-\Delta^{4',5'}/E-\Delta^{4',5'} = 60:40$.

La découverte de la mycolactone a été une réelle révolution dans le domaine des polycétides bioactifs, car cette molécule constitue le premier exemple connu de facteur de virulence du genre *Mycobacterium* [12]. Rapidement, les études concernant la biosynthèse de ce remarquable composé se multiplient et le génome complet de *Mycobacterium ulcerans* est publié en 2004 [13]. Par ailleurs, de nouveaux membres de la famille des mycolactones sont découverts à intervalles réguliers comme le montre la figure 4. Il existe à l'heure actuelle neuf mycolactones naturelles qui ne diffèrent que par la nature de la chaîne inférieure (nombre d'atomes, nombre de doubles liaisons, substitution des insaturations, nombre et configuration des fonctions hydroxyles) et par leur activité biologique, la mycolactone A/B étant la plus cytotoxique pour l'Homme [2]. Ces composés ont été isolés de souches très différentes de mycobactéries (*M. ulcerans*, *M. ulcerans* subsp. *shinshuense*/ecovar *Liflandii*, *M. marinum* M., collectivement appelées MPM pour « mycolactone producing mycobacteria »). Cinq mycolactones peuvent infecter l'Homme, telle la mycolactone A/B comme nous venons de le voir, mais aussi les mycolactones C et D découvertes en 2003, ou S1 et S2 caractérisées en 2012. Deux mycolactones découvertes en 2008 et 2010, E et E-métabolite mineur, sont connues pour être des pathogènes de grenouilles. Enfin, les mycolactones F et *dia*-F infectent les poissons avec une sélectivité surprenante puisque la seule variation de configuration absolue des centres stéréogènes 11' et 13' entraîne l'infection sélective de poissons d'eau de mer ou d'eau douce. Enfin, la mycolactone G, obtenue par modification du génome de *Mycobacterium ulcerans*, possède une chaîne inférieure de 14 atomes et un groupe formyle en C8'. Toutes ces mycolactones existent sous la forme d'un mélange d'isomères géométriques au niveau de la chaîne polyinsaturée C1'-Cn'.

Nom	Isolé de	Structure de R
Mycolactone A/B	Pathogène humain (<i>M. ulcerans</i>)	
Mycolactone C	Pathogène humain (<i>M. ulcerans</i>)	
Mycolactone D	Pathogène humain (<i>M. ulcerans</i>)	
Mycolactone S1	Pathogène humain (<i>M. ulcerans</i> subsp. <i>shinshuense</i>)	
Mycolactone S2	Pathogène humain (<i>M. ulcerans</i> subsp. <i>shinshuense</i>)	
Mycolactone E	Pathogène de grenouille (<i>M. ulcerans</i> ecovar <i>Liflandii</i>)	
Mycolactone E (métabolite mineur)	Pathogène de grenouille (<i>M. ulcerans</i> ecovar <i>Liflandii</i>)	
Mycolactone F	Pathogène de poisson d'eau de mer (<i>M. marinum</i> M)	
Mycolactone dia-F	Pathogène de poisson d'eau douce (<i>M. marinum</i> M)	
Mycolactone G	<i>M. marinum</i> DL045 cloné avec MUP_053	

Figure 4 - Noms, origines et structures des neuf mycolactones connues à ce jour.

Biologie des infections à *Mycobacterium ulcerans*

Les infections à *Mycobacterium ulcerans* sont dues à la présence de la mycolactone A/B, une toxine macrolidique produite par la mycobactérie et diffusant au-delà du site d'infection [2]. Le mécanisme d'action de la mycolactone A/B n'est pas précisément connu bien que de très récents travaux aient permis de découvrir la première cible protéique de cette toxine, comme nous le verrons plus loin. L'infection conduit à deux principaux effets biologiques qui ont été décrits pour la première fois il y a plus de trente ans : un effet cytopathique, qui consiste en un réarrangement du cytosquelette conduisant à un arrondissement des cellules puis à leur détachement du support – cet effet est exprimé en pourcentage par rapport à des cellules témoins non traitées –, et un effet immunosuppresseur [2]. Ces effets ont été étudiés *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires (fibroblastes murins L929, cellules adipeuses, kératinocytes...) et aussi *in vivo* sur de petits animaux.

L'injection de mycolactone A/B à des souris de laboratoire induit la formation d'ulcères après quelques jours, lésions tout à fait identiques à celles observées lors d'une infection classique par *Mycobacterium ulcerans*. De plus, un réarrangement rapide du cytosquelette de cellules L929 est observé dès 25 pg/mL de mycolactone A/B selon la première étude de Small [10]. À une concentration de 1 ng/mL (1,3 nM), l'arrondissement de 90 à 100 % des cellules est observé

après 24 h, suivi du détachement du support puis de l'apoptose (processus de mort cellulaire programmée permettant d'éliminer les cellules endommagées ou dysfonctionnelles) après 48 h (20 à 35 %). Des données plus précises ont été rapportées en 2013 à l'aide de mycolactone A/B entièrement synthétique ; la CL_{50} (concentration en composé actif nécessaire pour inhiber 50 % d'un processus biologique donné) a été mesurée à 5 nM et la CL_{50} (concentration létale médiane) à 12 nM [14]. Par ailleurs, en présence de mycolactone A/B, le cycle cellulaire est bloqué en phase G_0/G_1 de manière réversible : *Mycobacterium ulcerans* a un effet cytostatique, les cellules entrant en phase de quiescence. La mitose n'a pas lieu et la synthèse d'ADN et des protéines est inhibée.

Le caractère immunosuppresseur de la mycolactone A/B a, quant à lui, été montré pour la première fois en 1998 et cette découverte a suscité de très nombreux travaux de recherche [2]. Par exemple, la viabilité des cellules dendritiques est fortement compromise par la mycolactone A/B : ces initiateurs et régulateurs clés de la réponse immunitaire ne sont plus capables de produire les signaux chimiotactiques nécessaires à l'immunité, et ce même à des concentrations non cytotoxiques de mycolactone A/B. L'activité des lymphocytes T, une catégorie de lymphocytes responsables de la réponse immunitaire cellulaire spécifique, est également profondément affectée par la présence de mycolactone A/B. Cette dernière agit en effet en tant qu'immunosuppresseur actif de la production d'interleukine-2 (IL-2) et d'interféron- γ (IFN- γ) par les cellules T.

Ainsi, la biologie des mycolactones est extrêmement riche et a intéressé de nombreux groupes de recherche depuis la découverte de cette nouvelle infection mycobactérienne humaine en 1948. De remarquables contributions ont également été publiées en chimie moléculaire, comme développé ci-après.

La synthèse chimique en tant qu'outil mécanistique

Peu après la découverte de la mycolactone A/B, le laboratoire de Y. Kishi (Harvard) publie une série d'articles décrivant d'élégantes synthèses totales de l'ensemble des mycolactones naturelles à des fins de détermination et/ou de confirmation de structures [11]. Deux autres synthèses totales de la mycolactone A/B ont été publiées par E.-I. Negishi (2006-2013, Purdue) [15] et par K.-H. Altmann (2006-2013, ETH Zurich) [16], cette dernière ayant conduit à la publication en 2013 d'une courte étude de relations structure-activité de toxines modifiées.

Pour notre part, fascinés par la structure de la mycolactone A/B et par ses propriétés biologiques tout à fait inhabituelles pour un macrolide polycétidique, nous souhaitons explorer ses pharmacophores et également trouver sa cible cellulaire qui restait totalement inconnue lorsque ces travaux ont été initiés en 2006, malgré les efforts de nombreux laboratoires (figure 5). La découverte de cette cible est bien entendu un élément essentiel de la compréhension du mécanisme d'action de la mycolactone A/B et a des implications importantes sur différents plans tels que le diagnostic ou la mise au point de nouveaux traitements ciblés, spécifiques de l'ulcère de Buruli. Dès lors, la synthèse totale d'analogues de la mycolactone A/B constituait un outil incontournable pour répondre à ces questions, en collaboration avec des biochimistes (Université de Haute-Alsace) et des immunologistes (Institut Pasteur de Paris). Une voie de synthèse modulable devait être mise au point, permettant d'explorer aisément de nombreuses variations structurales. Trois motifs ont été plus

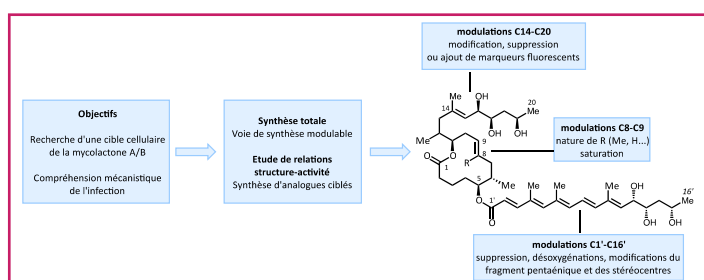


Figure 5 - La recherche d'une cible cellulaire de la mycolactone A/B et la compréhension mécanistique de l'infection grâce à la synthèse chimique d'analogues ciblés.

spécifiquement ciblés : les fragments C8-C9, C14-C20 et C1'-C16' [17].

D'un point de vue synthétique, l'aldéhyde α -substitué énantiomériquement pur **1**, obtenu en trois étapes à partir de l'ester de Roche commercial, peut être allylé de manière totalement diastéréosélective grâce aux réactifs d'allylation de Brown, à l'échelle de la dizaine de grammes (figure 6, éq. 1). Les deux alcools homoallyliques, **2-syn** et **2-anti**, sont ainsi obtenus avec de bons rendements. Le diastéréomère **2-syn** est ensuite transformé en quatre étapes en acide carboxylique ω -iodé **3**, qui est à son tour vinylé dans les conditions de Cossy [18], à l'aide d'un réactif de Grignard et d'une quantité catalytique de chlorure de fer(III) (figure 6, éq. 2). Une réaction d'estérification de l'acide **4** avec l'alcool homoallylique **2-anti** conduit enfin au précurseur de métathèse cyclisante **5**. Le 8-undécénolide souhaité **6** est ensuite obtenu avec un bon rendement et sous la forme d'un unique isomère *E* en présence de 10 mol % de catalyseur de Grubbs de seconde génération. Trois étapes d'aménagement fonctionnel, dont une réaction de couplage de Negishi avec le fragment C14-C20 dans les conditions de Kishi, permettent d'accéder au fragment C1-C20 **7** des C8-desméthyl mycolactones.

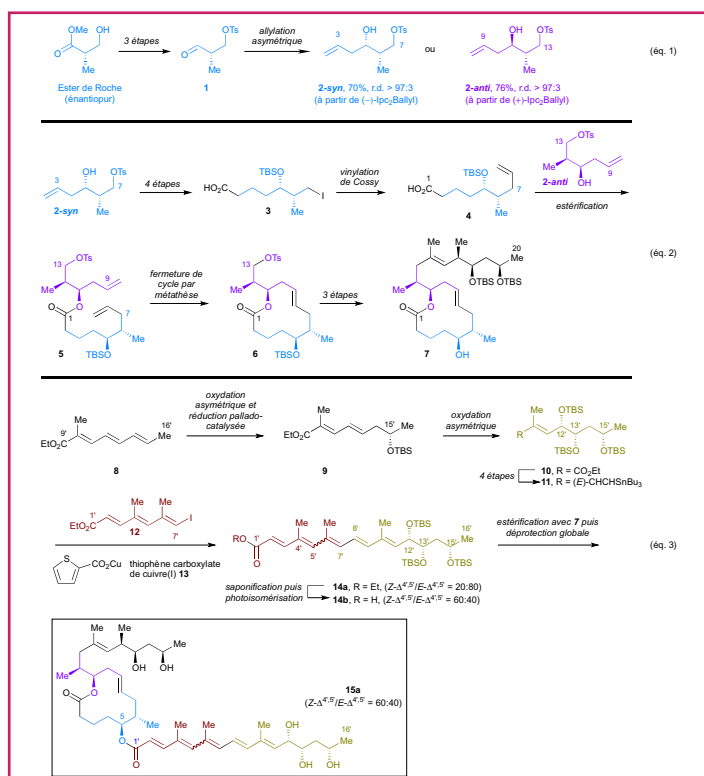


Figure 6 - Schéma général de synthèse des analogues de la C8-desméthyl mycolactone A/B.

Nous nous sommes ensuite penchés sur la synthèse du fragment C1'-C16' des mycolactones qui semble être en grande partie responsable de l'activité biologique des toxines (figure 6, éq. 3). En effet, comme nous l'avons évoqué plus haut, les neuf mycolactones naturelles connues à ce jour ne diffèrent que par la nature de la chaîne inférieure et présentent des différences de cytotoxicité tout à fait remarquables. Il était donc important de mettre au point une voie de synthèse modulaire de ce fragment C1'-C16' de la mycolactone A/B nous permettant de préparer différents variants pour évaluer leurs activités biologiques.

Cette synthèse débute par l'introduction des trois centres stéréogènes en positions C12', C13' et C15', en utilisant deux types d'étapes clés : des réactions d'oxydation asymétrique et catalytique d'alcènes et des réductions pallado-catalysées. Cette stéréotriade C12', C13', C15' étant fixée, une elongation de la chaîne carbonée peut avoir lieu conduisant au diénylstannane **11**. Ce dernier est ensuite couplé avec l'iodo triénoate **12** en présence de thiophénecarboxylate de cuivre(I) (**13**, CuTC), un sel peu onéreux et stable à l'air développé par Liebeskind [19], conduisant à l'ester pentaénique **14a**. Après saponification et photoisomérisation en présence d'une lampe à économie d'énergie (12 mW/cm²), l'acide carboxylique désiré **14b** est obtenu, à l'équilibre thermodynamique au niveau de la double liaison C4'-C5' (Z-Δ^{4,5'}:E-Δ^{4,5'} = 60:40). Une dernière réaction d'estérification de l'acide **14b** avec le fragment C1-C20 **7** suivie d'une déprotection globale des cinq éthers silylés permet finalement d'obtenir la C8-desméthyl mycolactone A/B **15a**.

Cette stratégie de synthèse a été utilisée pour la préparation d'une trentaine d'analogues de la mycolactone A/B, dont les effets biologiques ont été évalués par nos collègues biochimistes et immunologistes, comme nous le verrons dans le prochain paragraphe. Plusieurs familles d'analogues ont ainsi été préparées en modifiant les motifs cibles (figure 5, « modulations en C8-C9, C14-C20 et C1'-C16' »). Ces différentes familles permettent d'étudier l'influence respective des différents fragments sur l'activité biologique (figure 7). La première famille, « variation des centres C12', C13' et C15' de la chaîne sud », comprend les C8-desméthyl mycolactones **15a-d** de structure variable au niveau de la stéréotriade C12', C13', C15'. La seconde famille, « suppression des chaînes nord et/ou sud », est constituée notamment des analogues **16 à 19**, tronqués au niveau de la chaîne inférieure C1'-C16' (**16**), de la chaîne supérieure C14-C20 (**18**) ou des deux chaînes simultanément (**17**). Enfin, la troisième famille, « analogues fluorescents », est constituée d'hybrides

fluorescents des mycolactones, tels que **20**, dont la synthèse se base sur la figure 6 en faisant intervenir une étape clé de cycloaddition [3+2] assistée au cuivre entre un alcyne et un azoture.

L'évaluation biologique de ces différentes familles a été effectuée par le Laboratoire de Biochimie de l'Université de Haute-Alsace, permettant d'accéder aux premières données de relation structure-activité des toxines de type mycolactone (figure 8) [2, 17]. Ainsi, le pourcentage d'arrondissement cellulaire de fibroblastes murins L929 a été mesuré en présence de différentes concentrations d'analogues des trois familles. Il a pu être montré que les dérivés **17** et **19** n'avaient aucune activité cytopathique à 10 μM après 48 h. La suppression du fragment C1'-C16' (**16**) ou du fragment C14-C20 (**18**) conduit à une perte importante de cytopathicité puisque seuls 30 et 50 % respectivement d'arrondissement cellulaire sont alors observés, démontrant ainsi l'importance de ces motifs.

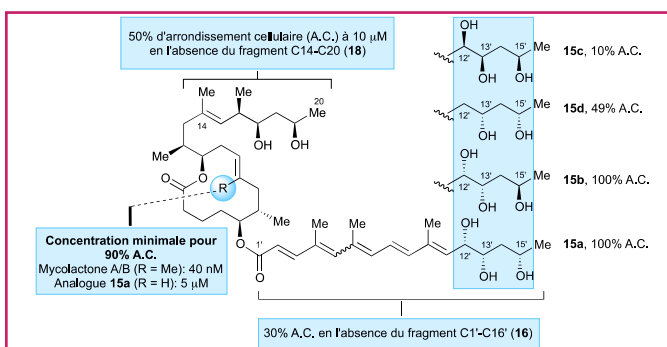


Figure 8 - Résumé des relations structure-activité obtenues sur une sélection d'analogues de la mycolactone A/B.

Enfin, l'impact des centres stéréogènes C12', C13' et C15' sur l'activité cytopathique a été étudié. L'analogue **15a**, le plus proche structuellement de la mycolactone A/B naturelle, conduit à 100 % d'arrondissement cellulaire à 10 μM. L'inversion de la configuration absolue du centre C15' (**15b**) ne diminue pas l'activité cytopathique ; en revanche, seulement 10 % d'arrondissement cellulaire sont observés lorsque les trois centres stéréogènes sont inversés simultanément (**15c**). Par ailleurs, la désoxygénation de la position C12' (**15d**) conduit à une chute d'activité cytopathique d'un facteur 2. Ces données montrent d'une part l'importance de la présence d'une fonction hydroxyle en position 12', et d'autre part que la configuration absolue en C15' n'est pas le paramètre le plus important pour l'activité cytopathique.

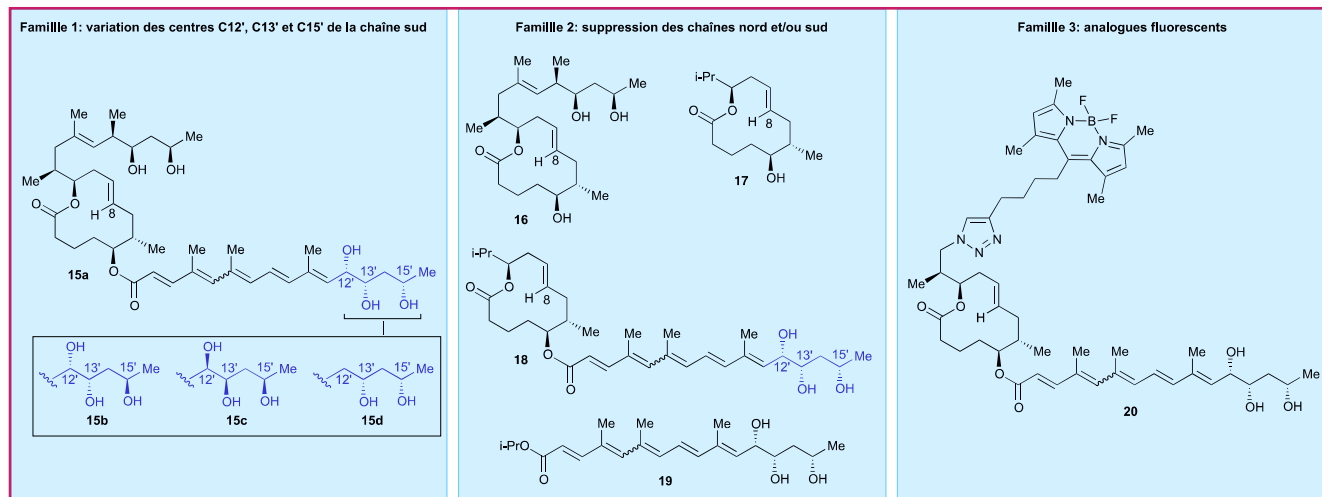


Figure 7 - Sélection d'analogues préparés au laboratoire et classés en trois familles.

La concentration minimale requise pour l'arrondissement de 90 % des cellules a également été mesurée : seuls 40 nM de mycolactone A/B naturelle sont nécessaires alors qu'il faut 5 µM de l'analogue C8-desméthyl **15a** pour obtenir le même résultat. Cette perte d'activité cytopathique d'un facteur 125 démontre clairement l'importance du groupement C8-méthyle pour ce type d'activité.

En parallèle de ces études de relations structure-activité, le dérivé fluorescent **20** a été utilisé dans des études de microscopie confocale visant à confirmer une cible protéique de la mycolactone A/B naturelle [2, 17]. En effet, des études de nos collègues du Département d'Immunologie de l'infection de l'Institut Pasteur semblaient montrer que la mycolactone A/B ciblait spécifiquement une famille de protéines du cytosquelette impliquées dans la polymérisation des monomères d'actine. Cette famille regroupe les protéines WASP (protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich) et N-WASP (neural-WASP). La préparation au laboratoire de dérivés fluorescents de la mycolactone A/B pouvait donc constituer un outil essentiel pour la confirmation de ces premières cibles connues dans cette infection. Dans un premier temps, il a été montré que l'analogue **20** possédait une activité cytopathique proche de **15a** (90 % d'arrondissement à 10 µM après 48 h) et n'induisait pas d'arrondissement cellulaire à la concentration de 0,5 µM utilisée en microscopie. Une diffusion passive et rapide à travers la membrane cellulaire a ensuite été observée ainsi qu'une accumulation dans le cytoplasme, en accord avec des résultats obtenus par Small [20]. Par la suite, ce composé **20** a pu être co-localisé avec des formes actives de la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) [21]. Il a ainsi pu être démontré que les interactions entre la mycolactone A/B (ou son analogue fluorescent **20**) avec WASP menaient à l'activation incontrôlée de l'assemblage des filaments d'actine par le complexe protéique ARP2/3, entraînant ainsi un défaut majeur d'adhésion cellulaire dans des cellules épithéliales. Des modèles *in vivo* chez la souris ont également été évalués et ont montré que le processus de dégradation de l'épiderme pouvait être interrompu par la co-administration d'un inhibiteur de N-WASP, la wiskostatine [21].

Conclusion

Nous espérons avoir montré dans cet article l'apport que pouvait constituer la synthèse de composés sur mesure à la résolution de problématiques complexes des sciences du vivant. En effet, intégrée dans un processus multidisciplinaire, la chimie de synthèse reste un outil incontournable pour l'exploration du mécanisme d'action de toxines complexes telles que la mycolactone A/B. Ces travaux ont permis de proposer les premières relations structure-activité d'analogues de type C8-desméthyl mycolactone A/B, ainsi que de confirmer l'existence d'une cible protéique de type WASP/N-WASP en collaboration avec l'Institut Pasteur. Nos recherches se poursuivent actuellement, basées sur ces multiples perspectives dans les domaines de la synthèse et de l'immunologie, afin d'améliorer notre compréhension mécanistique de cette terrible infection nécrosante de la peau.

Les auteurs remercient la Fondation Raoul Follereau, le CNRS, l'ANR, GlaxoSmithKline, l'Université de Haute-Alsace et l'Université de Strasbourg pour leur soutien financier.

Références

- [1] MacCallum P., Tolhurst J.C., Buckle G., Sissons H.A., A new mycobacterial infection in man, *J. Pathol. Bacteriol.*, **1948**, 60, p. 93.

- [2] Chany A.-C., Tresse C., Casarotto V., Blanchard N., History, biology and chemistry of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer disease), *Nat. Prod. Rep.*, **2013**, 30, p. 1527.
- [3] Fenner F., The significance of the incubation period in infectious diseases, *Med. J. Australia*, **1950**, 2, p. 813.
- [4] Connor D.H., Lunn H.F., Buruli ulcerations: Clinical study of 38 Ugandans with *Mycobacterium ulcerans* ulcerations, *Arch. Pathol.*, **1966**, 81, p. 183 et réf. citées.
- [5] Clancey J., Dodge R., Lunn H.F., Study of a mycobacterium causing skin ulceration in Uganda, *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, **1962**, 4, p. 585 et réf. citées.
- [6] Lunn H.F., Connor D.H., Wilks N.E., Barnley G.R., Kamunvi F., Clancey J.K., Bee J.D., Buruli (mycobacterial) ulceration in Uganda (a new focus of Buruli ulcer in Madi district, Uganda), *East African Med. J.*, **1965**, 42, p. 275. Pour une mise en perspective historique du nom de cette infection, voir : Radford A.J., What's in a name? Ulcerans disease: infections due to *Mycobacterium ulcerans*, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **2009**, 103, p. 979 et réf. citées.
- [7] www.who.int/buruli/en
- [8] Herberinger K.H. et al., Comparative study of the sensitivity of different diagnostic methods for the laboratory diagnosis of Buruli ulcer disease, *Clin. Infect. Dis.*, **2009**, 48, p. 1055 et réf. citées.
- [9] *Treatment of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer): Guidance for health workers*, World Health Organization, **2012**, www.who.int/iris/bitstream/10665/77771/1/9789241503402_eng.pdf, consulté le 06/06/13.
- [10] George K.M., Chatterjee D., Gunawardana G., Welty D., Hayman J., Lee R., Small P.L.C., Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence, *Science*, **1999**, 283, p. 854.
- [11] Kishi Y., Chemistry of mycolactones, the causative toxins of Buruli ulcer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, 108, p. 6703 et réf. citées.
- [12] Rohr J., A new role for polyketides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, p. 2847.
- [13] Stinear T.P. et al., Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101, p. 1345.
- [14] Scherr N., Gersbach P., Dangy J.-P., Bomio C., Li J., Altmann K.-H., Pluschke G., Structure-activity relationship studies on the macrolide exotoxin mycolactone of *Mycobacterium ulcerans*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2013**, 7, e2143.
- [15] Wang G.W., Yin N., Negishi E., Highly stereoselective total synthesis of fully hydroxy-protected mycolactones A and B and their stereoisomerization upon deprotection, *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, p. 4118.
- [16] Gersbach P., Jantsch A., Feyen F., Scherr N., Dangy J.-P., Pluschke G., Altmann K.-H., A ring-closing metathesis (RCM)-based approach to mycolactones A/B, *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, p. 13017.
- [17] Chany A.-C., Casarotto V., Schmitt M., Tarnus C., Guenin-Macé L., Demangel C., Mirguez O., Eustache J., Blanchard N., A diverted total synthesis of mycolactone analogues: an insight into Buruli ulcer toxins, *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, p. 14413.
- [18] Guérinot A., Reymond S., Cossy J., Iron-catalyzed cross-coupling of alkyl halides with alkenyl Grignard reagents, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, p. 6521.
- [19] Donnard M., Blanchard N., Copper-catalyzed C-C bond formation in natural product synthesis: elegant and efficient solutions to a key bond disconnection, *Copper-Mediated Cross-coupling Reactions*, G. Evano, N. Blanchard (eds), John Wiley & Sons, **2013**, Chap. 18, p. 683.
- [20] Snyder D.S., Small P.L.C., Uptake and cellular actions of mycolactone, a virulence determinant for *Mycobacterium ulcerans*, *Microb. Pathogenesis*, **2003**, 34, p. 91.
- [21] Guenin-Macé L. et al., Mycolactone activation of Wiskott-Aldrich syndrome proteins underpins Buruli ulcer formation, *J. Clin. Invest.*, **2013**, 123, p. 1501.



A.-C. Chany



C. Tresse



V. Casarotto



N. Blanchard

Anne-Caroline Chany est post-doctorante à l'Université d'Oxford¹.

Cédric Tresse et Virginie Casarotto sont respectivement doctorant et post-doctorante à l'Université de Haute-Alsace².

Nicolas Blanchard (auteur correspondant) est directeur de recherche CNRS à l'Université de Strasbourg³. Il a reçu la Médaille de bronze du CNRS en 2012.

¹ Department of Chemistry, Chemistry Research Laboratory, University of Oxford, Mansfield Road, Oxford OX1 3TA, Royaume-Uni.

² Université de Haute-Alsace, ENSCMU, 3 rue Werner, F-68093 Mulhouse Cedex.

³ Université de Strasbourg, ECPM, Laboratoire de Chimie moléculaire, CNRS UMR 7509, 25 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex 2. Courriel : n.blanchard@unistra.fr