

# La chimie, un outil pour comprendre la nature

*Michel Rohmer est professeur à l'Institut de Chimie de Strasbourg (Université de Strasbourg/CNRS), membre de l'Académie des sciences et spécialiste de la chimie des micro-organismes ; il a en particulier étudié les molécules de la famille des isoprénoïdes, comme le présente ce chapitre.*

Le concept de molécule est fondamental pour le chimiste, qui s'intéresse à leur devenir lors des réactions chimiques qui ont lieu dans la cellule vivante. Dans ce cadre, la chimie est un outil pour comprendre la nature et son fonctionnement.

Dans le domaine de la chimie organique, le chimiste qui veut décrypter le fonctionnement d'une cellule vivante doit être capable de s'intéresser à la biologie végétale, à la microbiologie et à l'enzymologie afin de se poser les bonnes questions pour comprendre la nature et mieux savoir en utiliser les ressources potentielles.

Parmi les nombreuses molécules synthétisées dans la nature, les isoprénoïdes sont une famille riche et abondante, sur laquelle se sont penchés

les chimistes pour en comprendre la biosynthèse dans une cellule vivante et pour s'en inspirer dans la chimie qu'ils développent, notamment dans le domaine de la recherche de médicaments.

Entrons dans le milieu naturel, comprenons la chimie des isoprénoïdes, ainsi que son utilité dans la recherche de médicaments.

## 1 La chimie et la biosynthèse des isoprénoïdes

### 1.1. La famille des isoprénoïdes

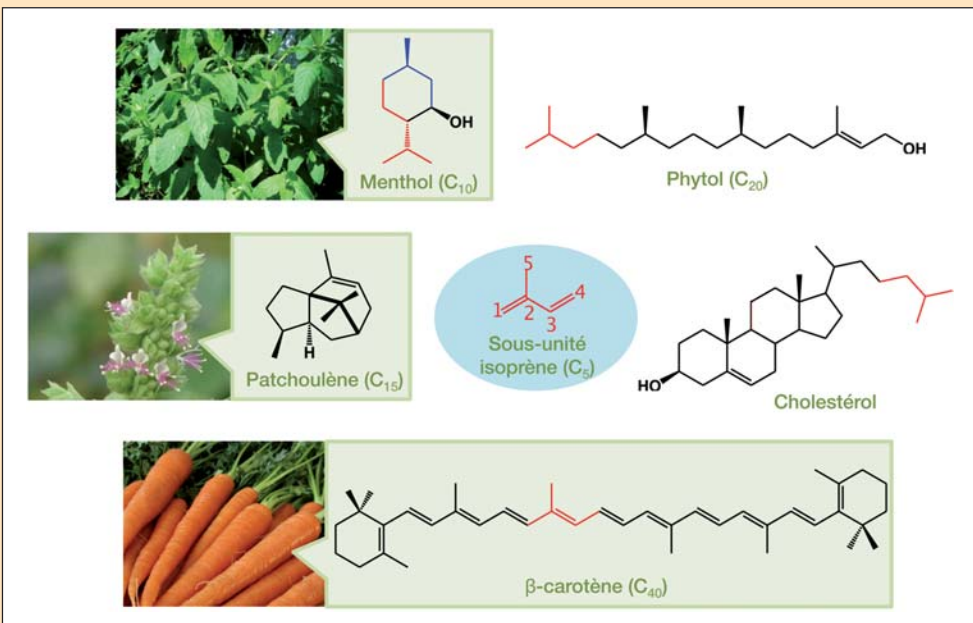
Les isoprénoïdes sont des molécules naturelles qui nous sont familières ; elles conduisent en effet à des

## DANS LA FAMILLE DES ISOPRÉNOÏDES...

Les isoprénoïdes, encore appelés terpénoïdes – et parfois inclus plus largement dans la famille des terpènes –, constituent la plus vaste famille connue de produits rencontrés dans la nature. Ils comportent dans leurs structures un motif commun dérivant d'unités à cinq atomes de carbone appelées *isoprène* (ou méthyl-2-buta-1,3-diène), unités qui sont assemblées de multiples façons pour former les squelettes de molécules aussi connues que le cholestérol, le menthol,... dont beaucoup sont essentielles à la vie végétale et animale (**Figure 1**).

Par exemple, les terpénoïdes des plantes sont largement utilisés depuis l'Antiquité en herboristerie traditionnelle pour leurs qualités aromatiques (terpénoïdes issus de l'eucalyptus, du gingembre, du cannabis, etc.). On peut citer par ailleurs les stéroïdes et stérols dans le monde animal.

Les isoprénoïdes sont classés selon leur nombre d'unités isopréniques : les monoterpénoïdes (2 unités isoprène :  $C_{10}$ ), les sesquiterpénoïdes (3 unités isoprène :  $C_{15}$ ), les diterpénoïdes (4 unités isoprène :  $C_{20}$ ), les sesterterpénoïdes (5 unités isoprène :  $C_{25}$ ), les triterpénoïdes (6 unités isoprène :  $C_{30}$ ), etc.



**Figure 1**

Structures de métabolites, dont certains sont essentiels à la vie, synthétisés dans la nature (végétaux, animaux, micro-organismes), de la famille des isoprénoïdes. Ils comportent un motif commun dérivé de l'isoprène (sous-unité en  $C_5$ ).

métabolites<sup>1</sup> essentiels tels que le *cholestérol*, que l'on re-

1. Les métabolites sont des molécules qui dans les organismes vivants assurent leur fonctionnement par des réactions biochimiques, où elles sont soit synthétisées (dans des réactions d'anabolisme), soit dégradées (réactions de catabolisme). C'est au cours de ces processus du métabolisme que les organismes assimilent, stockent et utilisent de l'énergie pour vivre.

trouve chez tous les mammifères, chez tous les vertébrés et bien sûr chez l'homme, le *β-carotène* qui est le pigment orange des carottes, le *phytol*, sous-élément du pigment vert de la chlorophylle associée à la photosynthèse, ou encore le *menthol*, composé aromatique que l'on trouve dans la menthe comme dans d'autres plantes (**Encart**

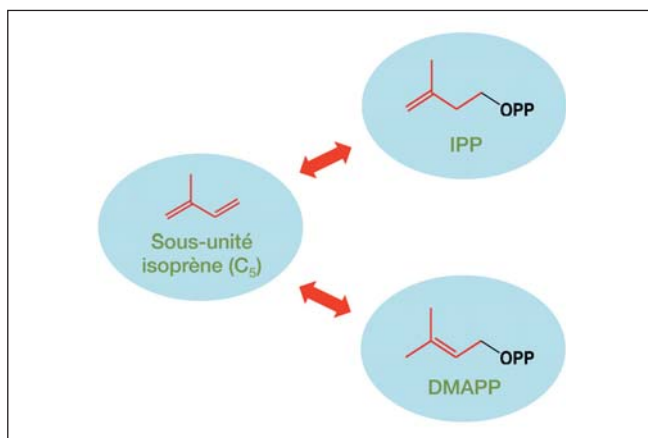


Figure 2

Équivalents biologiques de l'unité isoprène (C<sub>5</sub>) : diphosphate d'isopentényle (IPP) et diphosphate de diméthylallyle (DMAPP), formellement dérivés de l'isoprène. Dans la nature, les isoprénoïdes sont synthétisés à partir de ces deux précurseurs.

« Dans la famille des isoprénoïdes... »).

Quel est le point commun à toutes ces molécules ? Elles sont toutes issues d'un assemblage de sous-unités à cinq atomes de carbone (une sous-unité par molécule est représentée en rouge sur la Figure 1), et leur squelette carboné est un multiple de cette sous-unité en C<sub>5</sub>, appelée **isoprène**. Ainsi, le menthol comporte deux sous-unités de ce type (une en rouge et une en bleu), le phytol en comporte quatre, le cholestérol en comporte six (avec quelques modifications), et le β-carotène en comporte huit.

### 1.2. Étude de la biosynthèse de l'unité isoprénique (C<sub>5</sub>)

Dans la nature, l'unité isoprénique se trouve en fait sous une des deux formes, diphosphate d'isopentényle (IPP) ou diphosphate de diméthylallyle (DMAPP), qui sont considérées comme des « équivalents

biologiques » de l'isoprène, car c'est à partir de ces deux formes que sont synthétisés les isoprénoïdes dans la nature (Figure 2).

Comment les organismes synthétisent-ils donc ces unités isopréniques ?

#### 1.2.1. Un peu d'histoire sur l'étude de la biosynthèse des unités isopréniques : la voie du mévalonate

La biosynthèse des unités isopréniques a été étudiée et est connue depuis longtemps (1945-1955). Une voie de biosynthèse avait été en particulier mise en évidence dans des tissus de foie de porc et de rat, dans la formation du cholestérol dans le foie, et de l'ergostérol chez la levure. Dans la synthèse du cholestérol, une molécule avait été identifiée comme étant un intermédiaire-clé de la synthèse de la sous-unité en C<sub>5</sub>, il s'agit du **mévalonate (MVA, Figure 3)** qui, dans cette voie de biosynthèse, conduit aux deux

équivalents biologiques que nous venons de voir précédemment, diphosphate d'isopentényle (IPP) et diphosphate de diméthylallyle (DMAPP). Cette voie de biosynthèse ayant été également observée dans le foie d'animaux, dans la levure et dans le cytoplasme des cellules de plantes, il avait été conclu trop rapidement qu'elle devait être la voie unique de biosynthèse des isoprénoïdes dans tous les organismes vivants, non seulement chez les animaux et les champignons mais aussi chez les végétaux et bactéries. Cette généralisation ac-

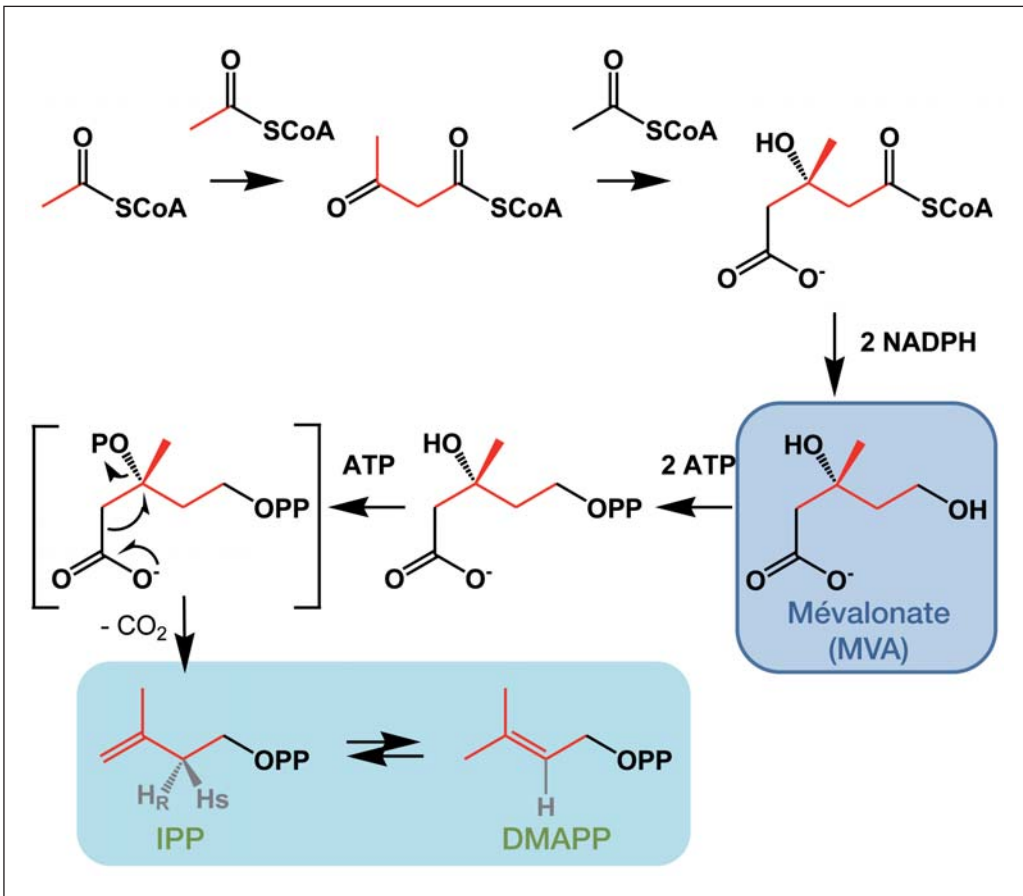
ceptée pendant une quarantaine d'années s'est avérée fautive, comme nous allons le voir dans les travaux de recherche qui vont être décrits à présent.

Les hopanoïdes sont des lipides bactériens. Ils sont constitués d'un squelette isoprénoïde en C<sub>30</sub> relié par une liaison carbone-carbone à une chaîne polyhydroxylée et sont particulièrement abondants dans la bactérie *Zymomonas mobilis* (Figure 4).

Une étude commencée à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse avait pour objet de déterminer

Figure 3

Biosynthèse de l'unité isoprène [C<sub>5</sub>] par la voie du mévalonate (MVA).



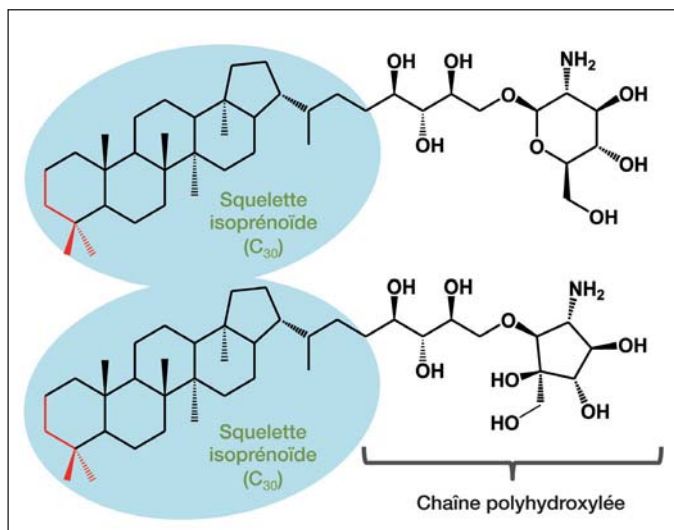


Figure 4

Hopanoïdes majeurs de la bactérie *Zymomonas mobilis*. Dans chaque squelette isoprénoïde, une unité isoprénique est représentée en rouge. Une telle unité se retrouve six fois dans le squelette hopane (triterpène, C<sub>30</sub>).

l'origine de cette chaîne latérale polyhydroxylée. Elle a été une occasion inattendue à s'intéresser à la biosynthèse de l'unité isoprénique par les bactéries et à découvrir une nouvelle voie insoupçonnée. À ces fins, un outil essentiel des chimistes a été la résonance magnétique nucléaire (RMN).

### 1.2.2. La résonance magnétique nucléaire (RMN) pour l'étude de la biosynthèse des isoprénoïdes dans les bactéries

Une technique d'analyse de choix pour détecter et suivre l'évolution de molécules organiques au cours des réactions chimiques – qu'elles aient lieu au laboratoire ou dans la nature – est la résonance magnétique nucléaire (**Encart « La résonance magnétique nucléaire (RMN), outil quotidien du chimiste pour étudier les molécules organiques »**). Elle permet en particulier de suivre les atomes de carbone constitutifs des squelettes de ces molécules, car il est facile

de détecter le carbone 13, qui est un isotope naturel stable du carbone.

Si l'on nourrit des bactéries avec une molécule marquée au carbone 13, par exemple de l'acétate (dont le carbone 13 est indiqué avec un point rouge sur la **Figure 6**), et si ces bactéries transforment bien cette molécule selon la voie de biosynthèse du mévalonate admise précédemment (voir la **Figure 3**), en passant par l'IPP et le DMAPP, on peut prévoir comme indiqué sur la **Figure 6** l'évolution des points rouges des atomes de carbone 13 dans les intermédiaires réactionnels jusqu'au produit final, qui est le squalène (composé naturel ainsi appelé car on le trouve dans le foie des requins). Puis, par une réaction de cyclisation enzymatique, la bactérie transforme le squalène en triterpène, qui conduira à notre molécule de hopanoïde étudiée, avec un marquage au carbone 13 attendu représenté sur la **Figure 7** par des cercles rouges.

## LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN), OUTIL QUOTIDIEN DU CHIMISTE POUR ÉTUDIER LES MOLÉCULES ORGANIQUES

Certains atomes tels que l'hydrogène ( $^1\text{H}$ ) et l'isotope 13 du carbone ( $^{13}\text{C}$ ) comportent un noyau qui a la propriété particulière de réagir sous l'effet de champs magnétiques dans les radiofréquences (en chimie quantique, on dit qu'ils possèdent un spin). En effet, lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement magnétique dans ces fréquences (appliqué sous forme d'impulsions), les noyaux peuvent absorber l'énergie du rayonnement, avant de la relâcher dans un deuxième temps (la relaxation) : c'est le phénomène de résonance magnétique nucléaire RMN, qui a été découvert en 1938 par Isidor Isaac Rabi, ce qui lui a valu le prix Nobel de Physique en 1944.

L'énergie mise en jeu dans l'absorption-émission des rayonnements magnétiques correspond à une fréquence bien précise qui dépend du champ magnétique et de la molécule analysée. Cela permet, grâce à la technique de spectrométrie RMN (Figure 5) développée grâce à la transformée de Fourier par Richard R. Ernst (prix Nobel de Chimie en 1991), de produire des spectres caractéristiques de la molécule étudiée (pour exemple, voir la Figure 7), où l'on identifie l'ensemble des atomes par des pics situés à des fréquences caractéristiques de l'environnement chimique de chaque atome.

Cette technique est usuellement utilisée par les chimistes pour caractériser les molécules qu'ils synthétisent par exemple, mais aussi par les biologistes et physiciens. Elle n'a cessé de s'affiner grâce aux découvertes, pour permettre de mettre en évidence des structures de plus en plus complexes, en faisant par exemple apparaître des relations de voisinage entre des atomes ou groupes d'atomes, que l'on peut même visualiser en deux dimensions : par exemple entre des atomes d'hydrogène (mesures de constantes de couplage (voir le paragraphe 1.2.3) et spectres COSY : à deux dimensions), ou entre hydrogènes et carbones (spectres HETCOR : à deux dimensions).

La spectrométrie RMN a par ailleurs trouvé une application dans l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM), utilisée usuellement en médecine pour des diagnostics\*.



**Figure 5**

*Spectromètre RMN : les échantillons sont introduits dans l'appareil où ils sont soumis à un champ magnétique de fréquence constante.*

\* À propos de l'IRM, voir *La Chimie et la santé, au service de l'homme*, chapitre de M. Port, coordonné par M.T. Dinh-Audouin, R.A. Jacquesy, D. Olivier et P. Rigny, EDP Sciences, 2010.

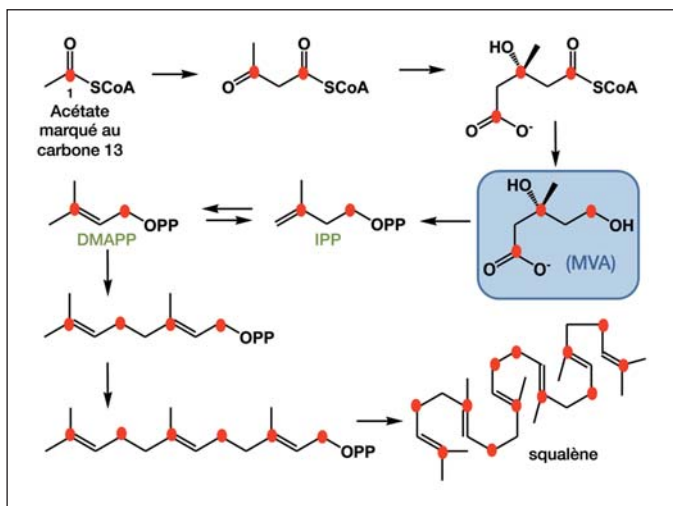


Figure 6

Prévision des positions des carbones 13 (points rouges) des molécules synthétisées selon la voie du mévalonate (MVA), à partir de l'acétate de départ marqué au carbone 13 sur le carboxylate en C1.

Or, l'analyse expérimentale des spectres RMN (Figure 7) ne concorde pas avec ce marquage attendu théorique selon la voie du MVA, et ce résultat est reproductible avec toute une série de bactéries (*Methylobacterium organophilum*, *M. fujisawaense* et *Rhodospseudomonas acidophila*). Il a donc fallu rechercher un autre mécanisme de biosynthèse des isoprénoides pour les bactéries.

### 1.2.3. Éluclation de la biosynthèse des unités isopréniques par les eubactéries

Aucune explication plausible n'ayant pu être trouvée à partir des expériences de culture de bactéries en présence d'acétate marqué au  $^{13}\text{C}$ , les recherches se sont tournées vers un autre système biologique, la bactérie *Zymomonas mobilis* (voir la Figure 4), qui intervient dans la fermentation du glucose en éthanol dans la production de la Tequila.

Cette bactérie a été cultivée non pas sur de l'acétate – qu'elle n'accepte ni comme source de carbone, ni comme

source d'énergie – mais sur différents isotopomères du glucose, représentés sur la Figure 8, avec un marquage différent au carbone 13 sur chaque atome de carbone afin de pouvoir suivre le devenir des atomes de carbone par RMN du carbone 13. Plusieurs expériences de marquage ont été réalisées avec du glucose marqué au  $^{13}\text{C}$ , soit en C2, C3, C5 ou C6.

L'analyse par RMN a permis de déduire l'origine des atomes de carbone des unités isopréniques représentées sur les Figures 8 et 9 par le squelette du diphosphate d'isopentényle (IPP). Deux atomes de carbone ont une origine double. Le groupe méthyle provient à parts égales des carbones C3 et C6 du glucose, et le carbone quaternaire des carbones C2 et C5. Tout se passe donc comme si l'on avait deux pools équimoléculaires d'origines différentes d'un même précurseur à deux atomes de carbone, l'un issu du fragment C2-C3 du glucose (en rouge), l'autre issu du fragment C5-C6 du glucose (en bleu).

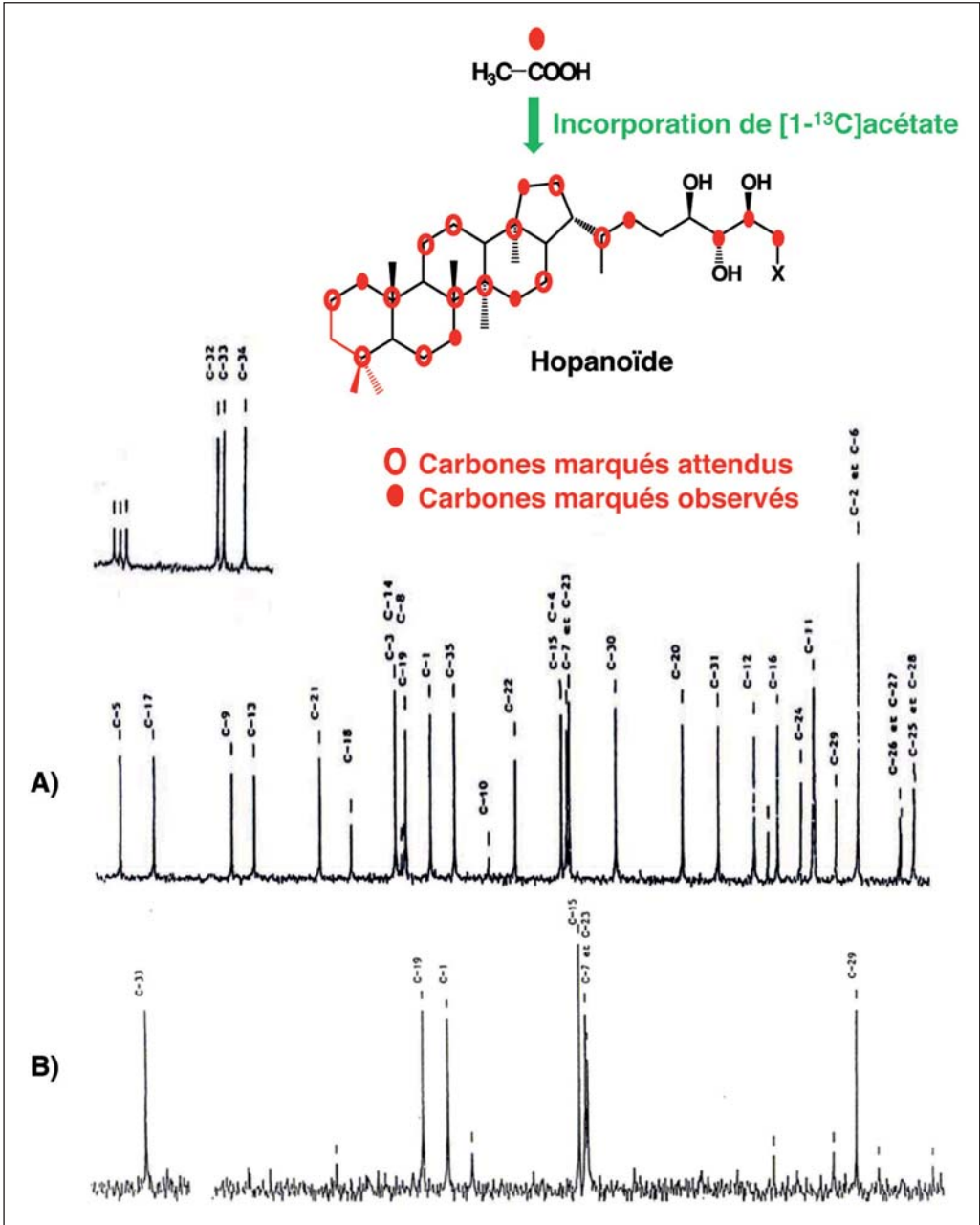


Figure 7

Spectres RMN du carbone 13 d'un hopanoïde de *Rhodospseudomonas palustris* après incorporation de  $[1-^{13}\text{C}]$ acétate (fréquence du champ 100 MHz).

A) Carbone en abondance naturelle : on voit les pics de l'ensemble des carbones de l'hopanoïde ; B) Incorporation de  $[1-^{13}\text{C}]$ glucose d'abondance isotopique 10 % : on observe six pics qui correspondent aux atomes marqués au carbone 13 : leurs intensités dépassent nettement celles des pics des carbones en abondance naturelle. Le marquage attendu selon l'hypothèse de la voie de la mévalonate n'est pas observé.



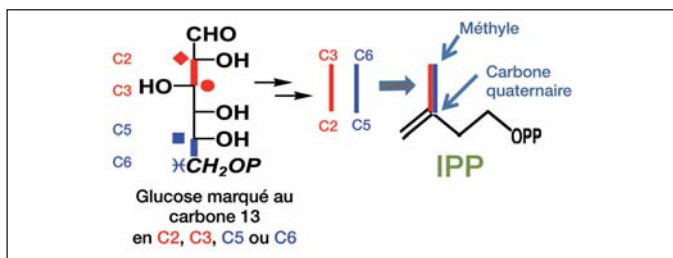


Figure 8

Incorporation du glucose marqué au carbone 13 (parties marquées : en rouge et bleu) dans une culture de bactérie *Zymomonas mobilis*, et déduction par analyses en RMN du carbone 13 de l'IPP. Les carbones marqués du glucose ont conduit à la formation du carbone du méthyle et du carbone quaternaire de l'IPP.

Vérifions si cette observation est en accord avec le catabolisme du glucose proposé en 1952 par N. Entner et M. Doudoroff, représenté sur la **Figure 9**. Si l'on suit l'évolution attendue des fragments C2-C3 (rouge) et C5-C6, ils proviennent de deux pools, le pyruvate et le phosphate de D-glycéraldéhyde (ultérieurement transformé en pyruvate par le métabolisme des phosphates de trioses), qui conduisent bien à l'ensemble C3/C6 pour le carbone du méthyle et à l'ensemble C2/C5 pour le carbone quaternaire de l'IPP, en accord avec le marquage expérimental observé sur les spectres RMN des molécules marquées au carbone 13 (voir la **Figure 8**).

Il reste à expliquer comment les trois autres atomes de l'IPP synthétisé par la bactérie ont pour origine les atomes C4, C5

et C6 du glucose. La **Figure 10** reprend la voie d'Entner-Doudoroff : le fragment C4-C5-C6 (en vert) correspond au squelette du phosphate de D-glycéraldéhyde et le fragment C1-C2-C3 (en rouge) correspond au pyruvate. La particularité de la bactérie *Zymomonas mobilis* est qu'elle ne transforme pas le pyruvate en phosphate de D-glycéraldéhyde. Les trois derniers atomes de carbone dont il reste à déterminer l'origine (en vert, **Figure 10**) proviennent uniquement du carbone C4 et du fragment C5-C6 du glucose.

Que peut-on conclure des incorporations de glucose marqué au  $^{13}\text{C}$  sur un seul atome de carbone ? D'une part, une unité isoprénique est formée chez *Zymomonas mobilis* à partir de deux précurseurs : un précurseur en  $\text{C}_2$  issu de la

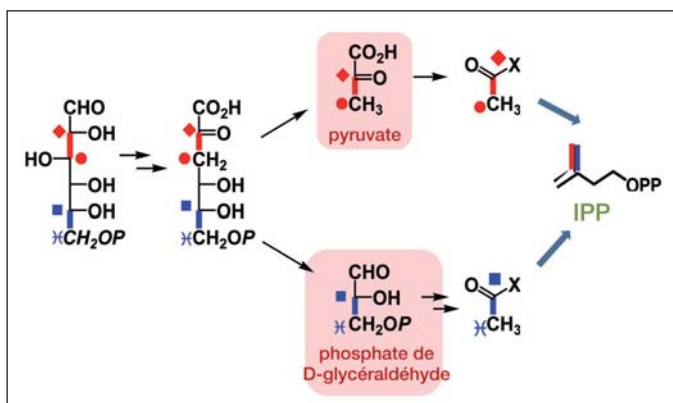


Figure 9

Voie d'Entner-Doudoroff pour la transformation par catabolisme du  $[^{13}\text{C}]$ glucose par la bactérie *Zymomonas mobilis* en unité isoprénique. Selon cette voie, le glucose se transforme en un acide, qui est ensuite coupé en deux pools (pyruvate et phosphate de D-glycéraldéhyde) évoluant tous deux vers le même intermédiaire, conduisant à l'unité isoprénique IPP. Cette hypothèse corrobore les déductions expérimentales de l'analyse des spectres de RMN.

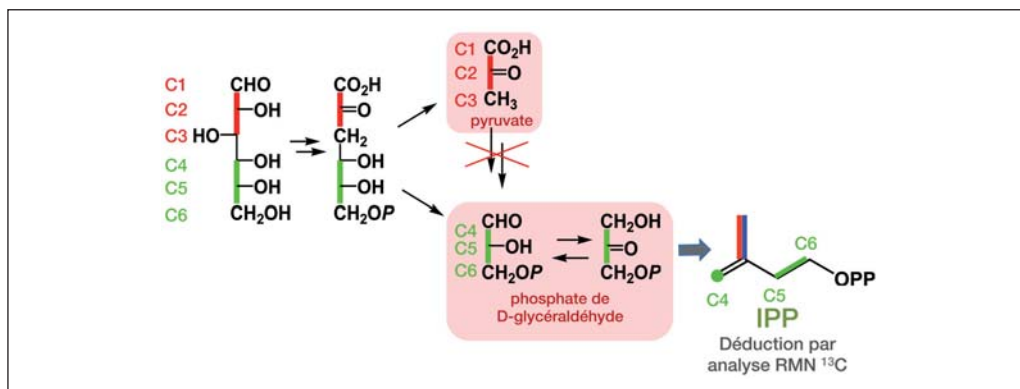


Figure 10

Voie d'Entner-Doudoroff : incorporation du phosphate de D-glycéraldéhyde (dérivé des carbones C4, C5 et C6 du glucose) dans l'IPP.

décarboxylation du pyruvate (Figure 10, fragment rouge et bleu) et un précurseur en C<sub>3</sub> correspondant à un dérivé du phosphate de D-glycéraldéhyde. D'autre part, un réarrangement intramoléculaire permet l'insertion de la sous-unité en C<sub>2</sub> entre les deux atomes de carbone du phosphate de D-glycéraldéhyde dérivés des carbones C4 et C5 du glucose.

Enfin, une dernière expérience a été réalisée avec un isotopomère uniformément marqué du glucose où les six atomes de carbone sont marqués. Une analyse par RMN plus approfondie, visant à mettre en évidence des relations de voisinage entre les atomes par examen des constantes de couplage (voir l'Encart « La résonance magnétique nucléaire (RMN), outil quotidien du chimiste pour étudier les molécules organiques »), a permis de confirmer les résultats expérimentaux précédents : d'une part l'origine des sous-unités en C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> engagés dans la formation du squelette d'une unité isoprénique (Figure 10) et d'autre part la présence du réarrangement intramoléculaire qui

permet d'obtenir le squelette ramifié en C<sub>5</sub> de l'isoprène à partir d'un squelette linéaire (voir la Figure 11).

C'est à ce stade qu'intervient le chimiste pour interpréter dans le détail l'ensemble de ces résultats expérimentaux à partir des mécanismes réactionnels connus en chimie organique et en chimie enzymatique. Cette réflexion théorique vise à proposer un premier schéma biogénétique hypothétique pour la formation d'une unité isoprénique à partir du pyruvate (en rouge, Figure 11) et du phosphate de D-glycéraldéhyde (en vert, Figure 11), en se fondant sur des mécanismes de réactions enzymatiques déjà connus (Encart « Schéma biogénétique hypothétique pour la biosynthèse des unités isopréniques chez les eubactéries : la voie du MEP »).

Sans entrer dans le détail de ce schéma biogénétique hypothétique, retenons que deux intermédiaires peuvent être postulés à partir des résultats expérimentaux des marquages au <sup>13</sup>C : il s'agit du 1-désoxyxylulose 5-phosphate (DXP) et du méthylérythritol phosphate (MEP).

## SCHEMA BIOGENETIQUE HYPOTHETIQUE POUR LA BIOSYNTHESE DES UNITES ISOPRENIQUES CHEZ LES EUBACTERIES : LA VOIE DU MEP

Les connaissances en chimie organique ainsi qu'en enzymologie ont permis de proposer un schéma biogénétique hypothétique pour expliquer comment la bactérie *Zymomonas mobilis* synthétiserait à partir de l'acide pyruvique et du phosphate de D-glycéraldéhyde les unités isopréniques (représentées par l'IPP) grâce à ses enzymes.

Un premier intermédiaire, 1-désoxyxylulose 5-phosphate (DXP), résulterait de la condensation de l'hydroxyéthylidène thiamine diphosphate (produit par la décarboxylation du pyruvate) sur le carbonyle du phosphate de D-glycéraldéhyde. Le DXP se réarrangerait ensuite pour conduire, après une réduction, au méthylérythritol phosphate (MEP), qui est le second intermédiaire (Figure 11). Il est intéressant de noter que les équivalents non phosphorylés de ces deux composés, DXP et MEP, étaient connus comme substances naturelles.

Bien qu'il ait été partiellement remis en cause au niveau du mécanisme de la réaction de réarrangement, ce schéma a permis de prévoir la formation du MEP pour laquelle de solides preuves ont été fournies ultérieurement.

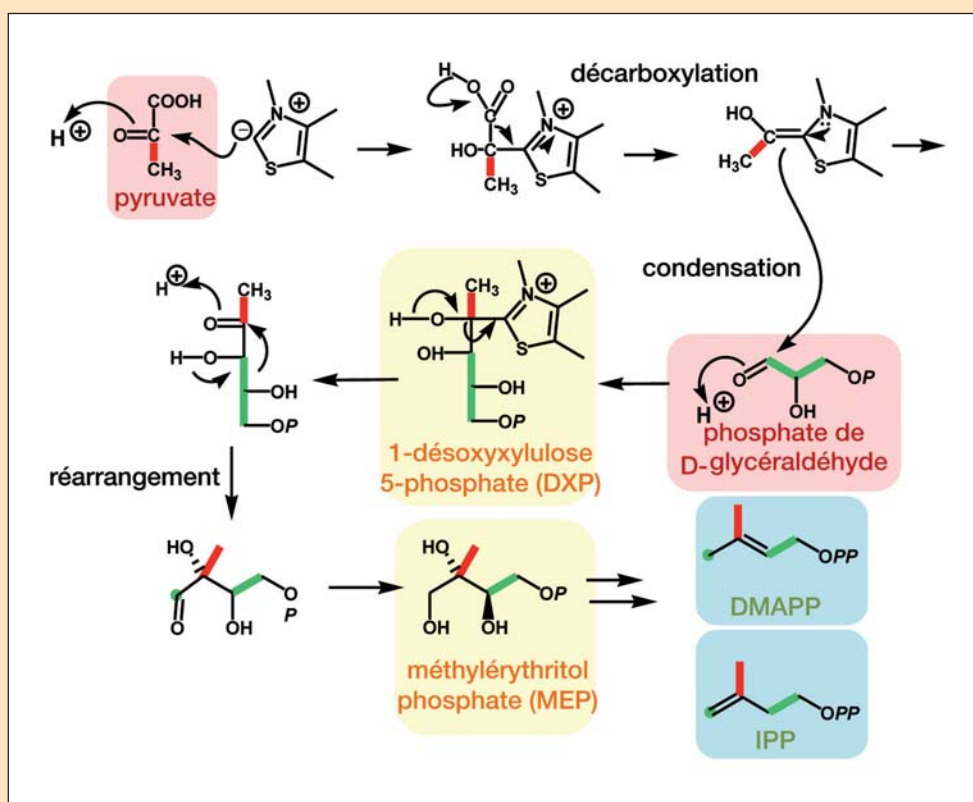


Figure 11

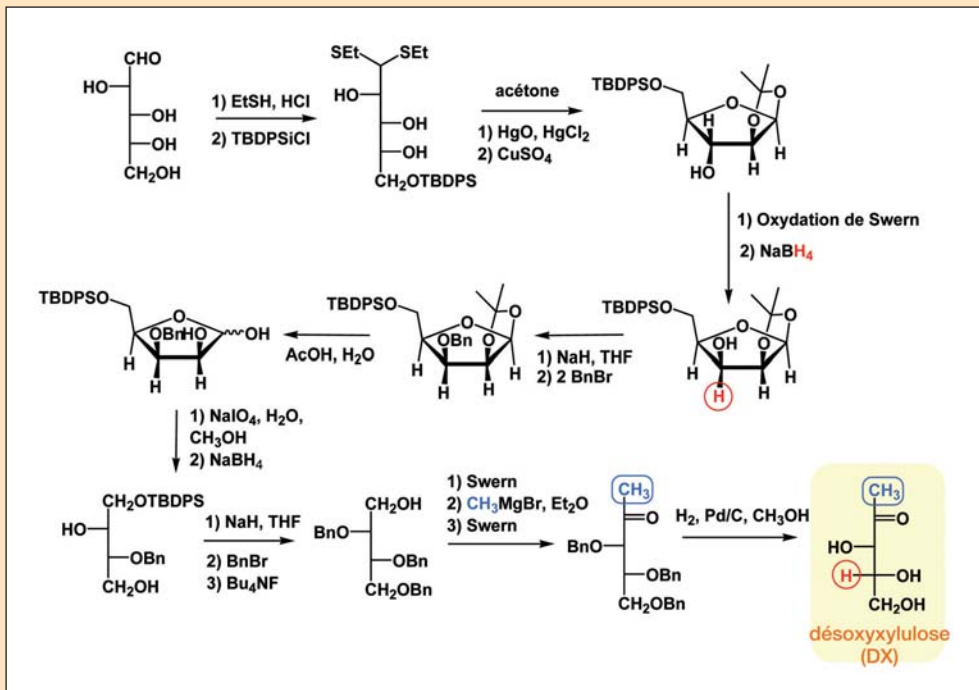
Mécanisme hypothétique pour la transformation du pyruvate et du phosphate de D-glycéraldéhyde en intermédiaires DXP puis MEP, pour expliquer la formation des unités isopréniques, diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) et diphosphate d'isopentényle (IPP).

Il reste à vérifier si ces deux intermédiaires DXP et MEP sont bien précurseurs des unités isopréniques. Dans ce but, les chimistes ont synthétisé ces deux intermédiaires en les marquant avec des isotopes stables (carbone 13 ou deutérium), afin de voir si ces intermédiaires hypothétiques sont assimilés par les bactéries et incorporés dans les unités isopréniques des

terpénoïdes. Le désoxyxylulose et le méthylérythritol, qui sont tous deux phosphorylés *in vivo* dans la cellule bactérienne, sont incorporés dans la chaîne terpénique de l'ubiquinone par le colibacille (au sujet de l'ubiquinone, voir le paragraphe 2.1). Ce résultat est en accord avec le rôle de précurseurs d'isoprénoïdes pour ces deux intermédiaires.

### ÉLUCIDATION DE LA VOIE DU MEP POUR LA BIOSYNTHÈSE DES UNITÉS ISOPRÉNIQUES

Les chimistes ont synthétisé un intermédiaire, un isotopomère doublement marqué du DXP, dans le but d'élucider la voie du MEP grâce à un suivi par RMN (**Figure 12**).



**Figure 12**

Synthèse chimique d'un isotopomère doublement marqué au <sup>2</sup>H et au <sup>13</sup>C du désoxyxylulose (DX) à partir du D-arabinose.

Les intermédiaires DXP et MEP sont convertis par la bactérie en unités isopréniques attendues IPP et DMAPP (**Figure 13**) :

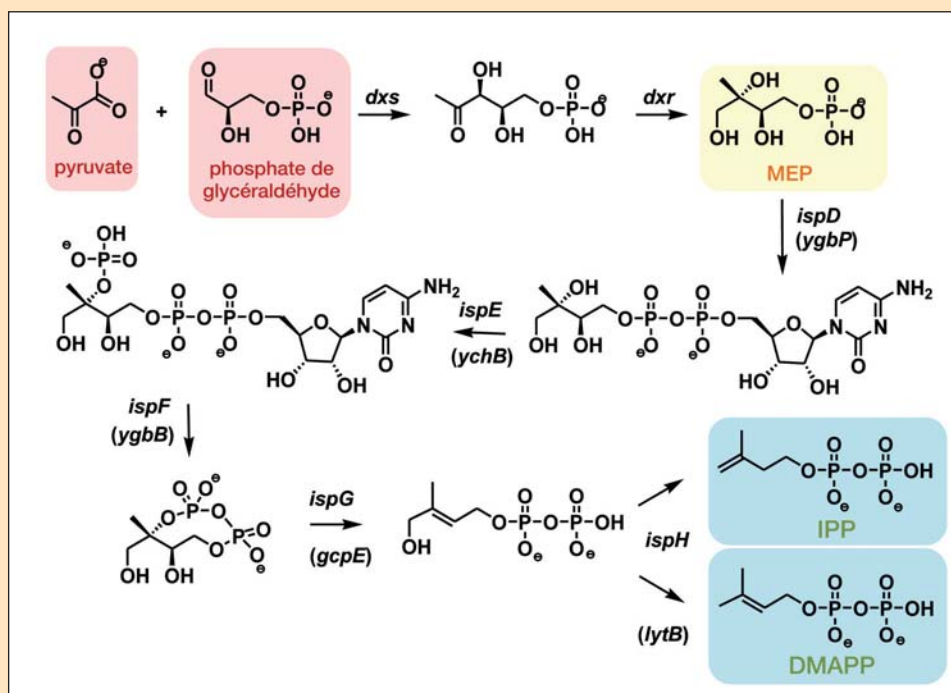


Figure 13

Voie du MEP pour la biosynthèse des unités isopréniques (IPP et DMAPP) à partir du pyruvate et du phosphate de D-glycéraldéhyde, présentant tous les intermédiaires et tous les gènes impliqués dans cette voie.

Le travail a été énorme, caractéristique du travail quotidien des chercheurs en chimie organique qui synthétisent des molécules souvent complexes, qui ne sont pas disponibles dans le commerce. L'Encart « **Élucidation de la voie du MEP pour la biosynthèse des unités isopréniques** » montre en détail, à titre d'exemple, toute la complexité d'une synthèse chimique du DXP, qui a été marqué au carbone 13 sur le groupe méthyle (CH<sub>3</sub>, en bleu, Figure 12) et au deutérium (H en rouge, Figure 12). Les deux premiers intermédiaires, DXP et MEP, sont ensuite convertis par la bac-

térie en unités isopréniques attendues IPP et DMAPP, par une séquence de réactions (Figure 13) qui s'est avérée n'avoir aucun point commun avec la voie du mévalonate identifiée dans le foie de rat (voir la Figure 3). L'élucidation complète de la voie du MEP a requis à la fois des expériences de marquage avec des isotopes stables et radioactifs ainsi que des techniques de biologie moléculaire et a impliqué de nombreux laboratoires.

Cette nouvelle voie de biosynthèse a été découverte indépendamment chez les bactéries par notre groupe à l'École

Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse, puis à l'Université de Strasbourg, ainsi que chez les plantes par le groupe de Duilio Arigoni à l'École Polytechnique Fédérale de Zürich (voir la partie 3 de ce chapitre). Elle s'est avérée être celle de la majeure partie des bactéries et est omniprésente dans les plastides des végétaux, remettant ainsi en cause le dogme de l'unicité et de l'universalité de la voie du mévalonate admis pendant quarante ans.

1.2.4. Bilan des deux voies de synthèse des unités isopréniques

La **Figure 14** résume la distribution des deux voies de biosynthèse pour la formation des unités isopréniques. La voie du **mévalonate** (sur fond bleu, détaillée sur la **Figure 3**) qui part de l'acide acétique a été la seule identifiée chez l'homme. On la retrouve aussi chez les champignons, les levures, le cytosol des cellules des plantes et plus rarement dans quelques bactéries (par

exemple les staphylocoques et les streptocoques).

La voie alternative que nous venons de décrire, incluant le **MEP** comme intermédiaire (sur fond jaune), démarre avec deux molécules issues du glucose : le pyruvate et le phosphate de D-glycéraldéhyde. C'est la voie majoritairement observée chez les bactéries, certains protozoaires parasites (par exemple *Plasmodium falciparum*, l'agent responsable du paludisme), les chloroplastes des végétaux et des algues supérieures (algues brunes, rouges, varech). C'est aussi la voie unique chez les algues vertes unicellulaires.

En résumé, nous connaissons deux voies de biosynthèse des unités isopréniques dont l'une, celle du MEP, est absente chez l'homme. Si l'on traitait donc un patient infecté par des bactéries qui fonctionnent avec la voie MEP, l'inhibition de cette voie de biosynthèse des isoprénoïdes peut devenir un traitement

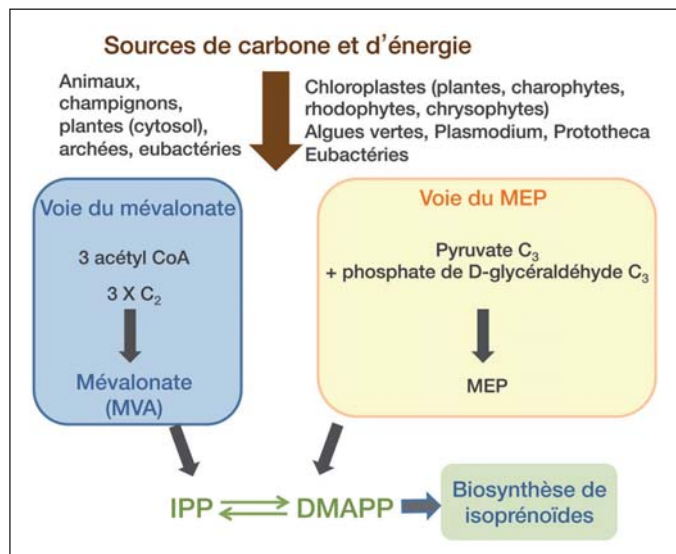


Figure 14

Bilan des voies de biosynthèse des unités isopréniques.

potentiellement intéressant pour l'homme.

Comment peut-on ainsi concevoir des agents antimicrobiens efficaces en utilisant ces nouvelles connaissances sur les mécanismes de biosynthèse des unités isopréniques ?

## 2 Application à la recherche de nouveaux antimicrobiens

### 2.1. Les isoprénoides, essentiels à la vie de bactéries

Les isoprénoides sont des molécules que l'on retrouve chez tous les êtres vivants. Beaucoup ne jouent pas de rôle physiologique évident. En revanche, on sait que certains, comme le cholestérol chez l'homme, sont des métabolites essentiels. Les bactéries quant à elles ne synthétisent pas de stérols mais des bactoprénols, composés importants pour la synthèse de leur paroi cellulaire, sans laquelle elles ne peuvent pas survivre. Elles ont par ailleurs aussi besoin d'ubiquinone, une molécule portant une longue chaîne isoprénoïde acyclique, qui joue un rôle essentiel dans les transferts d'électrons au sein des cellules, et dont le blocage de

la biosynthèse conduit également à la mort des bactéries.

Les bactéries qui utilisent la voie du MEP sont nombreuses et peuvent en principe toutes être détruites si l'on y bloque la biosynthèse des isoprénoides (**Tableau**). On peut citer en particulier *Escherichia coli* et toutes les entérobactéries, les *Pseudomonas*, les *Burkholderia*, les *Acinetobacter*, toutes à l'origine de maladie nosocomiale, répandue dans les hôpitaux, et qui deviennent très rapidement résistantes aux antibiotiques. D'autres agents pathogènes, pas uniquement bactériens, sont tout aussi préoccupants : *Mycobacterium tuberculosis*, la bactérie responsable de la tuberculose, et le protozoaire *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme.

### 2.2. Synthèse de composés bactéricides

Pour tuer une bactérie, on peut envisager de cibler l'une des réactions de la biosynthèse d'isoprénoides de la voie du MEP en l'inhibant par l'action d'un agent qui sera alors un bactéricide. La réaction cible qui a été la mieux explorée est celle transformant le 1-désoxyxylulose 5-phosphate (DXP), vu précédemment, en MEP (**Figure 15**).

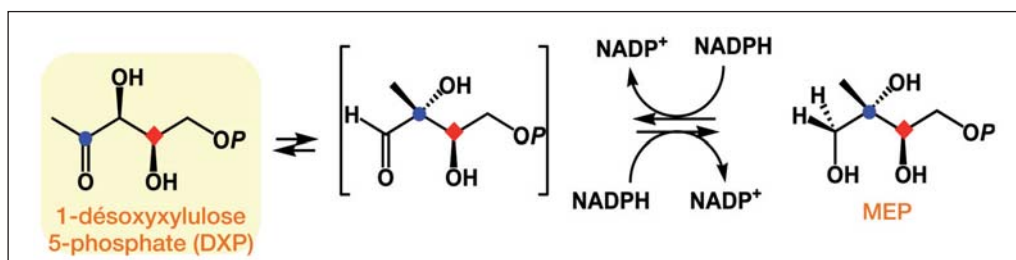
#### Tableau

*Micro-organismes (bactéries et protozoaires) synthétisant les isoprénoides par la voie du MEP.*

Entérobactéries
<i>Chlamydia</i> spp.
<i>Pseudomonas</i> spp.
<i>Burkholderia</i> spp.
<i>Acinetobacter</i> spp.
<i>Corynebacterium</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp.
<i>Clostridium</i> spp.
<i>Mycobacterium</i> spp.
Actinomycètes
<i>Plasmodium</i> spp.

**Figure 15**

Réaction de réarrangement et réduction du DXP en MEP en présence de NADPH (agent réducteur des organismes vivants) catalysée par l'enzyme réducto-isomérase.



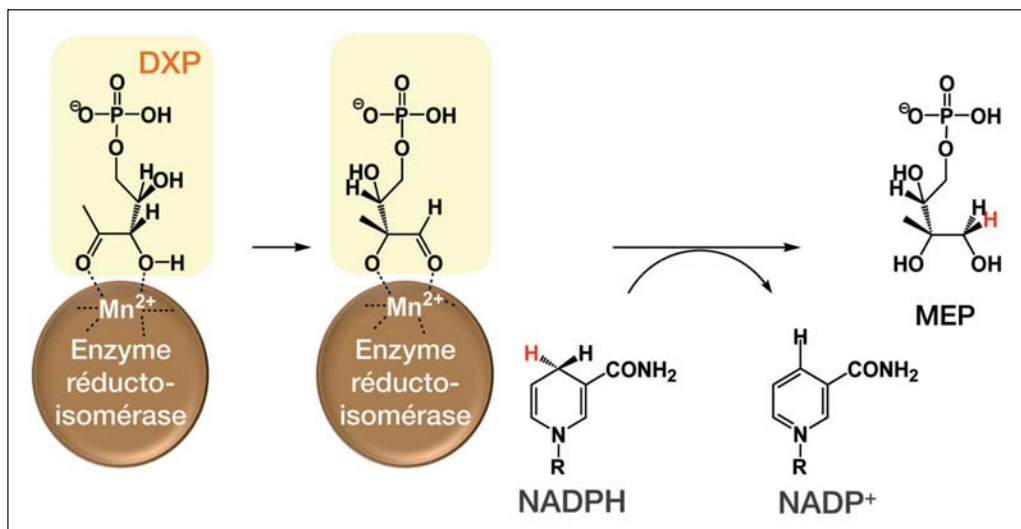


Figure 16

Catalyse de la transformation du DXP par l'enzyme réductoisomérase dans la biosynthèse des isoprénoïdes selon la voie du MEP. L'enzyme se lie à son substrat DXP via le cation  $Mn^{2+}$  pour conduire, en présence de l'agent réducteur NADPH par réarrangement et réduction, au MEP.

Cette réaction a lieu grâce à une enzyme de la bactérie qui la catalyse<sup>2</sup>, une réductoisomérase, dont la structure est connue : elle possède dans son site actif un cation manganèse ( $Mn^{2+}$ ) ou magnésium ( $Mg^{2+}$ ) qui se lie au substrat, le DXP, et joue le rôle d'un acide de Lewis pour catalyser sa transformation (Figure 16).

Si l'on veut inhiber cette réaction, il faut donc concevoir des molécules qui vont empêcher l'enzyme de jouer son rôle de catalyseur. Un antibiotique naturel produit par une bactérie du groupe des actinomycètes, la fosmidomycine, a été développé au Japon dans les années 1970 (Figure 17). Cette molécule a servi de modèle pour de nombreuses séries d'analogues obtenus par synthèse. La fosmidomycine pos-

sède une « pince chélatante » qui s'accroche par des liaisons très fortes au cation  $Mn^{2+}$  de l'enzyme. Cependant, si cette molécule naturelle est un inhibiteur extrêmement puissant de la réductoisomérase transformant le DXP en MEP, son utilisation *in vivo* se révèle décevante. Comme petite molécule anionique soluble dans l'eau, elle est facilement rejetée dans le milieu extérieur par les bactéries qui deviennent ainsi résistantes. Chez l'homme, elle est rapidement éliminée dans les urines, ce qui rend difficile d'atteindre une concentration thérapeutique intéressante.

Les travaux des chimistes se sont donc tournés vers la synthèse d'analogues de la fosmidomycine pour essayer d'obtenir des inhibiteurs aux propriétés plus intéressantes que celle de la fosmidomycine modèle. Deux molécules semblables à la fosmidomycine, mais dans lesquelles les pinces chélatantes sont inversées (Figure 18), se sont révélées particulièrement inté-

2. À propos de la catalyse enzymatique, voir *La Chimie et la santé, au service de l'homme*, chapitre de D. Mansuy, coordonné par M.-T. Dinh-Audouin, R.A. Jacquesy, D. Olivier et P. Rigny, EDP Sciences, 2010.



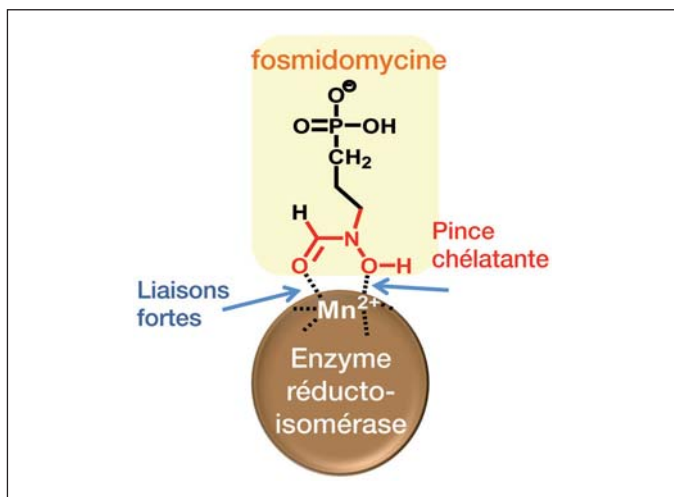


Figure 17

La fosmidomycine est un antibiotique d'origine naturelle capable d'inhiber la réducto-isomérase en se liant très fortement à son cation  $Mn^{2+}$ .

ressantes. Ces molécules ont été testées sur deux souches de colibacilles, l'une étant une souche sauvage, l'autre une souche résistante à la fosmidomycine. Une culture en tapis de chacune de ces bactéries a été réalisée sur des boîtes de Petri. Les molécules à tester ont été déposées sur trois confettis de papier filtre : sur le premier a été déposée comme référence la fosmidomycine, et sur les deux autres confettis ont été déposées les molécules synthétisées. On constate, par une simple observation du dia-

mètre de la zone d'inhibition de croissance des souches (les zones de non-croissance des bactéries ont un aspect et une couleur différents de ceux des zones colonisées), que la fosmidomycine **1** et la molécule **2** (Figure 18) sont actives sur la souche sauvage à peu près de la même manière, tandis que la molécule de synthèse **3** est toujours active sur la souche résistante à la fosmidomycine, ce qui est un résultat des plus intéressants dans la mise au point d'antibactériens de cette série.

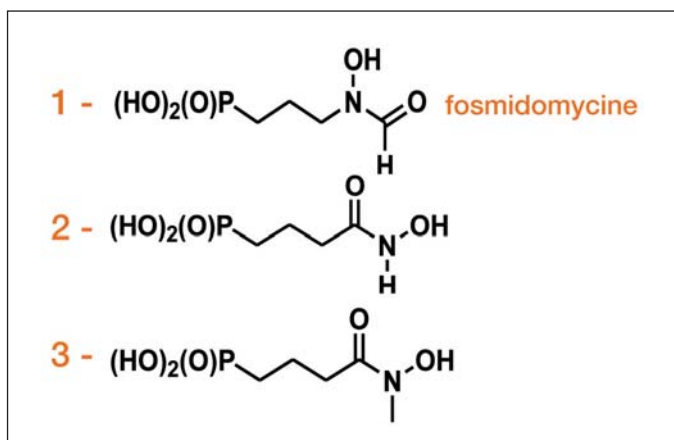


Figure 18

Deux molécules analogues de la fosmidomycine (**2** et **3**) synthétisées pour tester leur activité antibactérienne. La molécule **3** a conduit à des résultats satisfaisants.

Ainsi, la connaissance en microbiologie de la voie du MEP pour la biosynthèse des isoprénoïdes a pu être judicieusement mise à profit pour la conception d'un antibiotique efficace contre un agent infectieux pour l'homme et visant une cible enzymatique encore inexplorée. De nombreux travaux visent aux développements d'inhibiteurs d'autres enzymes de la voie du MEP.

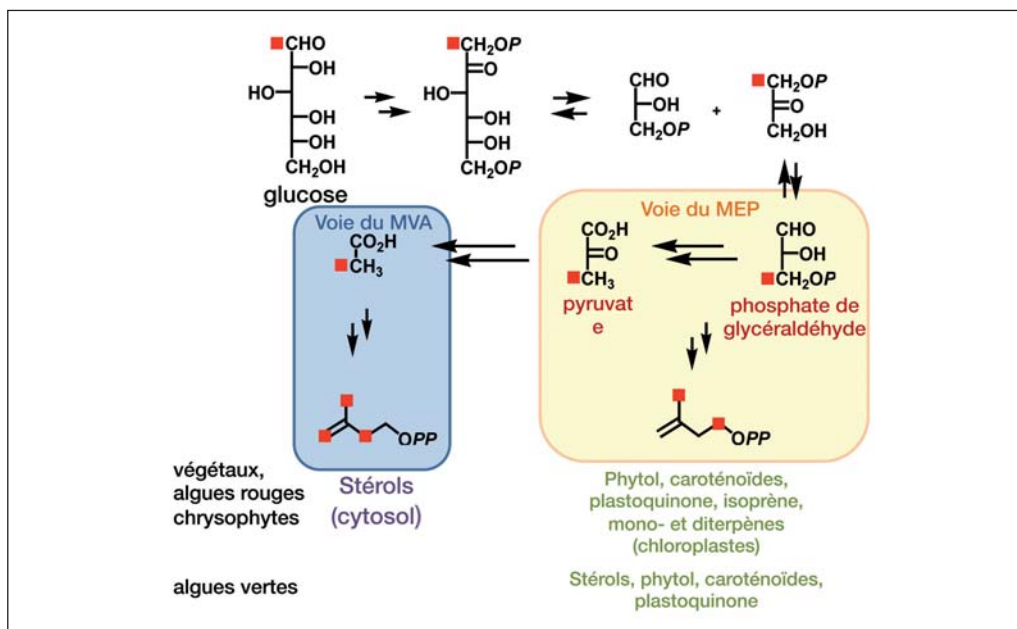
Qu'en est-il à présent des végétaux ? Existe-t-il également deux voies de biosynthèse des unités isopréniques comme nous l'avons observé chez les micro-organismes ?

### 3 Biosynthèse des unités isopréniques chez les végétaux

La biosynthèse des isoprénoïdes chez les végétaux a été étudiée dès les années 1950. Dès cette époque, comme la voie de biosynthèse du mévalonate (MVA) était bien connue chez la levure, les chercheurs ont incorporé de l'acétate (précurseur du mévalonate) marqué au carbone 14 et se sont rendus compte qu'il était très bien incorporé dans les stérols des végétaux (jusqu'à à 70 % d'incorporation du carbone 14). Par contre, les autres composés isoprénoïdes tels que le phytol, les caroténoïdes, ainsi que les mono- et les diterpènes n'incorporent pratiquement pas le carbone 14, ce qui avait alors été interprété à l'époque comme une imperméabilité de la membrane du chloroplaste au mévalonate (**Figure 19**).

Ce résultat peut maintenant être expliqué en faisant intervenir pour les plantes la seconde voie de biosynthèse des unités isopréniques découverte pour les bactéries, celle du MEP. La présence de cette voie peut être prouvée par une expérience très simple. Comme nous l'avons vu, cette seconde voie démarre avec deux métabolites du glucose, à savoir le pyruvate et le phosphate de D-glycéraldéhyde (voir les **Figures 12 et 13**), alors que la voie du mévalonate utilise l'acétate comme produit de départ (**Figure 3**). Ces deux voies peuvent être facilement différenciées par la distribution du marquage (analysée sur les spectres de RMN des isoprénoïdes de chloroplastes) résultant d'une incubation de glucose marqué au  $^{13}\text{C}$  en C1 (**Figure 19**, carrés rouges).

Les premières études ont été réalisées à Zurich sur des embryons de *Ginkgo biloba* pour étudier la biosynthèse des ginkgolides, des diterpénoïdes présentant des propriétés intéressantes sur le système cardiovasculaire. Par la suite, des marquages similaires ont été effectués sur une culture de tissus de carotte, des plantules d'orge et des lentilles d'eau. Une dichotomie a été observée : dans le cytosol, c'est-à-dire le gel dans lequel baignent les organites des cellules végétales, la voie de biosynthèse qui a été identifiée est celle du MVA observée chez les animaux (dont l'homme), tandis que dans les chloroplastes, c'est-à-dire les organites où se fait la photosynthèse et où s'accumulent les pigments (comme la chlorophylle et les



caroténoïdes), c'est la voie du MEP qui est présente.

Ces conclusions sont résumées sur la **Figure 20** : la voie de biosynthèse du MVA conduit aux stérols dans le cytosol (fond bleu), tandis que la voie du MEP mène aux terpénoïdes de chloroplastes (fond jaune).

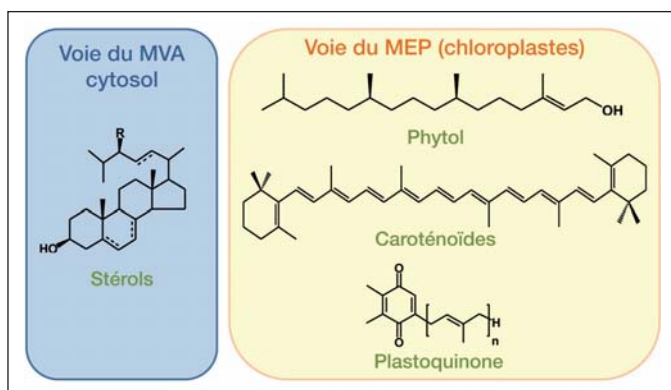
En fait, ce schéma n'est pas aussi simple, des échanges de précurseurs terpéniques peuvent avoir lieu entre les

deux compartiments, cytosol et chloroplastes.

Il reste donc encore un travail important à mener pour étudier la régulation de la biosynthèse des isoprénoïdes, dont beaucoup ont une importance capitale en chimie médicinale, comme le taxol (antitumoral, abordé en détail dans le **Chapitre de F. Guéritte**), les ginkgolides, les iridoïdes et les alcaloïdes indoliques à moitié monoterpénique, etc.

**Figure 19**

Les deux voies de biosynthèse des unités isopréniques (MVA et MEP) chez les végétaux, avec marquage du glucose au carbone 13 en C1 (carrés rouges). D'après les études de suivi des marquages au  $^{13}\text{C}$  par RMN, les deux voies se répartissent entre les deux compartiments des cellules végétales : le cytosol et le chloroplaste.



**Figure 20**

Répartition des voies de biosynthèse des isoprénoïdes dans les compartiments des cellules végétales. La voie du MVA est localisée dans le cytosol et conduit aux stérols (fond bleu), tandis que la voie du MEP se trouve dans les chloroplastes et conduit entre autres au phytol, aux caroténoïdes et à la plastoquinone (fond jaune).

## Comprendre la nature : un champ de recherche qui reste très ouvert pour les chimistes

Le champ est encore vaste pour l'étude des processus biologiques, et, nous l'avons vu, les sciences de la chimie y interviennent sous de multiples aspects :

- par la synthèse organique des précurseurs, des molécules marquées par des isotopes, ou encore des substrats de réactions enzymatiques ;
- par la caractérisation des structures des enzymes et des protéines (spectroscopie de RMN, spectrométrie de masse) ;
- par la chimie de ces systèmes supramoléculaires qui est la base de la biologie moléculaire.

Afin d'élucider la chimie du vivant, le chimiste doit aussi comprendre la microbiologie végétale et animale et savoir remettre en question les concepts communément acceptés, comme en témoignent les recherches sur les voies de biosynthèse des isoprénoïdes. En retour, les voies métaboliques sont une source de molécules à large potentiel d'activités, avec l'avantage que l'organisme les reconnaît depuis des millions d'années. Mais les systèmes sont extrêmement complexes et difficiles à étudier. Le travail est, en effet, de longue haleine, en particulier celui du chimiste. L'identification de la voie du MEP pour la biosynthèse des isoprénoïdes, une voie métabolique importante et insoupçonnée chez les bactéries et les végétaux, porte également un autre message : les découvertes majeures ne sont le plus souvent ni programmées, ni programmables.

#### Pour aller plus loin

- Rohmer M. (1999). *A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate*. *Comprehensive Natural Products Chemistry, Isoprenoids including Steroids and Carotenoids*, D.E. Cane ed., Pergamon, Oxford, Vol. **2**, chap. 2, 45-68.
- Schwarz M., Arigoni D. (1999). *Ginkgolide biosynthesis*. *Comprehensive Natural Products Chemistry, Isoprenoids including Steroids and Carotenoids*, D.E. Cane ed., Pergamon, Oxford, Vol. **2**, chap. 2, 367-399.
- Rohmer M. (2008). From molecular fossils of bacterial hopanoids to the formation of isoprene units : discovery and elucidation of the methylerythritol phosphate pathway, *Lipids*, **43** : 1095-1107.
- M. Rohmer. (2010). Methylerythritol phosphate pathway. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*, 2nd Edition ; L. Mander, H.W. Lui, eds. *Isoprenoids including Steroids and Carotenoids*, C.A. Townsend ed., Elsevier, Oxford, Vol. **1**, chap. 13, 517-555.

# Crédits photographiques

Fig. 5 : CNRS Photothèque  
- Fresillon Cyril. UMR 6612 -  
Centre de résonance magnétique  
biologique et médicale (CRMBM)  
- Marseille.