

Chapitre 6

**Exemples d'inhibiteurs
(agents chimiques, antibiotiques et
antimétabolites)
interférant avec des étapes de
Biologie Moléculaire**

Ce chapitre montre quelques exemples d'agents moléculaires, d'origine naturelle ou synthétique, interférant avec la structure du génome ou avec la machinerie de biologie moléculaire, et ayant un intérêt soit pour la connaissance des mécanismes moléculaires, soit d'un point de vue médical en raison de leurs effets biologiques, soit pathogènes, soit thérapeutiques. Les exemples choisis dans ce chapitre (bien sûr, non exhaustif) concernent des molécules agissant sur la structure du génome (DNA) ou sur des enzymes des principales étapes de biologie moléculaire (réplication, transcription, traduction). Nous aborderons brièvement le(s) mécanisme(s) d'action de ces agents et l'intérêt de leur étude pour la connaissance des mécanismes de biologie moléculaire ou/et pour les applications dans le domaine médical (soit comme agents pathogènes ou comme agents thérapeutiques).

Avant de commencer ces exemples, nous allons définir et commenter quelques notions générales et termes utilisés dans ce cours.

Antibiotiques - A l'origine, le terme 'antibiotiques' (au sens le plus général) désignait des substances naturelles produites par des micro-organismes (bactéries ou champignons microscopiques) et toxiques pour d'autres microorganismes (par exemple, pénicilline, streptomycine..). Certaines de ces substances sont peu toxiques pour les cellules eucaryotes, tandis que d'autres sont fortement toxiques. Dans le milieu naturel, les micro-organismes produisent ces substances pour lutter contre des espèces concurrentes invasives. En médecine, le terme antibiotique est généralement utilisé dans un sens plus restreint pour désigner des antibiotiques antibactériens, peu toxiques pour les mammifères et donc utilisables comme agents anti-infectieux (le plus souvent antibactériens) en thérapeutique humaine ou vétérinaire.

Alors que les premiers antibiotiques étaient souvent utilisés dans leur forme naturelle, native (pénicilline, streptomycine..), par la suite ces molécules ont été souvent modifiées par synthèse chimique pour améliorer leur efficacité thérapeutique (efficacité antibactérienne, propriétés pharmacocinétiques...).

Toutes les bactéries n'ont pas la même sensibilité naturelle aux antibiotiques. De plus, la sensibilité d'une souche bactérienne peut évoluer en raison de l'apparition de mutants résistants à certains antibiotiques. C'est pourquoi, en pratique médicale, il est souvent nécessaire de faire réaliser par un laboratoire d'analyses médicales un antibiogramme qui évalue la sensibilité ou la résistance aux antibiotiques des souches bactériennes pathogènes prélevées sur les malades et permet d'optimiser la thérapeutique anti-infectieuse.

Les mécanismes d'action des antibiotiques sont très variés et parfois complexes: ils agissent en perturbant la structure et les fonctions vitales des bactéries (parois, membranes, production énergétique, voies métaboliques...). Ils peuvent avoir une (ou plusieurs) cible(s) moléculaire(s), une cible primaire à faible concentration et parfois des cibles secondaires à concentration plus élevée.

A noter aussi que le terme 'antibiotique' est parfois aussi utilisé en médecine pour désigner des molécules utilisées comme anticancéreux. Ces molécules sont nommées antibiotiques car elles sont d'origine naturelle et produites par des micro-organismes des mêmes familles que ceux qui produisent des antibiotiques antibactériens ou d'autres molécules d'intérêt médical. Par exemple, diverses bactéries du genre *streptomyces* produisent une grande variété de molécules (qui peuvent parfois être modifiées par hémisynthèse chimique pour améliorer leurs propriétés pharmacologiques), qui ont des utilisations variées : antibiotiques antibactériens (streptomycine, néomycine, spiramycine...), des anticancéreux (bléomycine, daunorubicine..), des antifongiques (nystatine..), des antiparasitaires (avermectines)... Parfois ces micro-organismes produisent d'autres substances trop toxiques pour être utilisables en médecine. Par ailleurs, il faut noter que la chimie pharmaceutique a inventé et produit un grand nombre de molécules de synthèse qui ont les mêmes utilisations thérapeutiques (antibactériens, antiviraux, antifongiques, antiparasitaires, anticancéreux..). A noter que l'origine naturelle ou synthétique ou semi-synthétique de ces molécules a un intérêt pour la recherche de nouvelles molécules, mais en pratique médicale, ce sont leurs propriétés pharmacologiques et leur intérêt thérapeutique qui importent le plus.

La biologie comparée des organismes montre que certaines structures ou mécanismes biologiques sont spécifiques de certaines classes d'organismes (ex. paroi bactérienne), tandis que d'autres (nombreux) se retrouvent dans plusieurs groupes d'organismes, mais souvent avec des différences (variabilité génétique due à des mutations survenues au cours de l'évolution).

Le but des recherches pharmacologiques anti-infectieuses est de trouver des inhibiteurs exploitant ces différences. Parfois les inhibiteurs ciblent des structures spécifiques de certains procaryotes et n'existant pas chez les mammifères: par exemple, les pénicillines sont des inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne qui n'existe pas chez les eucaryotes et sont donc strictement spécifiques (toxiques) pour ces bactéries (mais il faut noter que ces molécules, par exemple les pénicillines, peuvent avoir des effets indésirables chez les humains, par d'autres mécanismes, allergiques par exemple). Dans d'autres cas, bien que certains mécanismes biologiques généraux soient similaires chez les pathogènes et chez l'hôte, il existe des différences de structure moléculaire apparues au cours de l'évolution pour une même enzyme. Ces variations structurales sont parfois les cibles de certains inhibiteurs qui sont donc spécifiques des organismes porteurs de ces variations. Par exemple, nous verrons plus loin qu'il existe des inhibiteurs spécifiques des topoisomérases bactériennes (et sans effet sur les topoisomérases des mammifères) qui sont donc utilisables comme antibiotiques (antibactériens). Mais il est intéressant de remarquer que d'autres agents chimiques inhibent les topoisomérases de mammifères et sont utilisés comme anticancéreux.

Les antimétabolites sont des molécules qui perturbent le fonctionnement de voies métaboliques normales ou dysfonctionnelles de micro-organismes ou de cellules eucaryotes. Les antimétabolites sont souvent obtenus par synthèse chimique (certains sont des analogues structuraux des métabolites normaux et agissent par compétition avec ces métabolites). Certains antimétabolites agissent sur des micro-organismes pathogènes : certaines de ces molécules sont alors, selon leur spécificité, soit des antibactériens [= antibiotiques], soit des antiviraux, soit des antiparasitaires, soit des anticancéreux ...

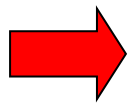
D'autres antimétabolites agissent sur des voies métaboliques eucaryotes et (quand leur toxicité est faible ou acceptable) peuvent être utilisés dans le traitement de certaines maladies métaboliques (nous avons vu l'exemple de l'allopurinol, qui inhibe la xanthine oxydase et la synthèse d'acide urique et est utilisé dans le traitement de la goutte) ou dans la chimiothérapie des cancers.

Bien sûr, il faut garder en mémoire que parmi tous les composés produits, seuls sont utilisables en médecine humaine ceux dont la toxicité est faible ou acceptable (en fonction du rapport bénéfice/risque).

Enfin, il faut noter que la terminologie peut paraître complexe et que les classifications des molécules utilisées en biologie et en thérapeutique sont ‘multi-entrées’ (ces molécules peuvent être classées dans divers groupes selon les propriétés: origine, structure, mécanisme d’action, effet biologique, utilisation thérapeutique..).

Prenons quelques exemple d’antibiotiques’ produits par des *streptomyces* (streptomycine, néomycine, spiramycine, bléomycine, daunorubicine, nystatine, FK-506/tacrolimus...) et regroupés selon divers critères de classification. Selon leur origine naturelle et leurs propriétés biologiques générales (toxicité pour des microorganismes) ce sont des ‘antibiotiques’. Selon leur structure, ces molécules appartiennent à la famille des aminosides (streptomycine, néomycine), macrolides (spiramycine, FK-506), anthracyclines (daunorubicine), peptides non ribosomiques (bléomycine). Selon leurs mécanismes d’action, ce sont agents intercalaires et inhibiteurs de topoisomérases II eucaryotes (daunorubicine..), inhibiteurs de la traduction procaryote (streptomycine, néomycine, spiramycine)... Selon leur utilisation médicale, certains sont soit des antibiotiques antibactériens (streptomycine, néomycine, spiramycine), soit des antifongiques (nystatine), soit des anticancéreux (bléomycine, daunorubicine), soit des immunosuppresseurs (FK-506).

En général, cette terminologie complexe et ces classifications multiples, ne gênent pas la compréhension des termes qui est souvent clarifiée par le contexte. Par exemple, en médecine clinique, le terme ‘antibiotique’ désigne en général un antibiotique antibactérien, tandis qu’un antibiotique utilisé comme anticancéreux (daunorubicine) est désigné comme ‘anticancéreux’.



Modifications du DNA : liaisons covalentes

Mitomycine C

La mitomycine C est une substance naturelle produite par une souche de *streptomyces*, découverte dans les années 50's au Japon.

Mécanisme d'action - La mitomycine C est activée par le métabolisme cellulaire (par réduction de la quinone et perte de groupement méthoxy) aboutissant à un agent alkylant bifonctionnel capable de former des liaisons covalentes et des pontages intercaténaires sur l'ADN. Il est intéressant de noter que ces pontages du DNA modifient les courbes de dénaturation/renaturation du DNA (car les brins de DNA ayant des ponts intercaténaires restent liés et se renaturent donc plus vite que les brins dénaturés non pontés qui sont dispersés dans la phase liquide). De plus, *in vivo*, ces pontages intercaténaires bloquent la séparation des brins du DNA et la réplication (effet antimitotique). D'autre part, certains dérivés forment des radicaux libres qui peuvent induire des cassures des brins d'ADN.

Toutes ces altérations perturbent les grandes fonctions du génome (réplication, transcription..) et sont toxiques pour ces cellules. Ces effets sont potentialisés par les rayonnements ionisants (et inversement la mitomycine C a un effet radio-sensibilisant).

Utilisation médicale - En thérapeutique, la mitomycine C est utilisée en chimiothérapie anti-cancéreuse dans le traitement de divers cancers (tube digestif, vessie, sein..). Elle est aussi utilisée pour réduire la fibrose en chirurgie oculaire (glaucome, strabisme) et pour prévenir la resténose lors de procédures de dilatation de certaines sténoses (de la trachée ou de l'œsophage).

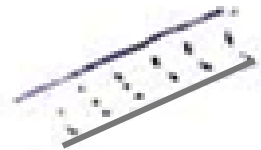
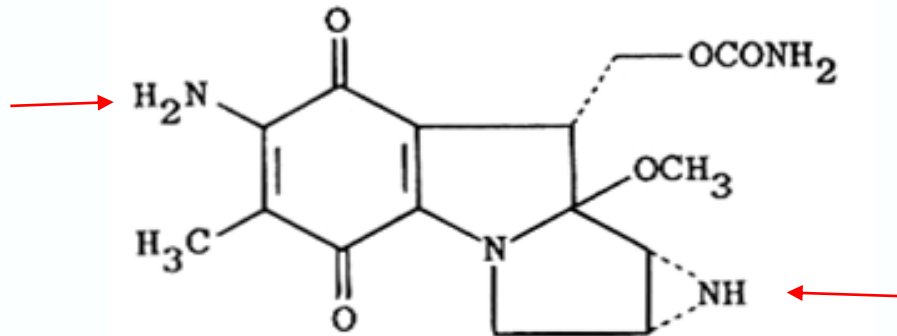
Modifications du DNA : liaisons covalentes

Mitomycine C

Utilisée en médecine dans le traitement de cancers

Mitomycine C → activation métabolique → agent alkylant bifonctionnel

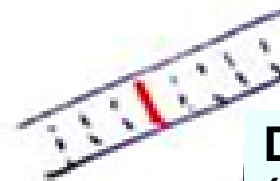
→ pontages covalents intercaténares du DNA → blocage de la réplication



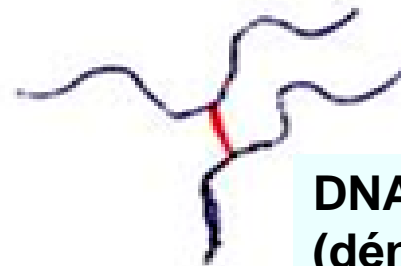
DNA normal natif



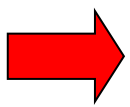
DNA normal dénaturé



DNA ponté par la mitomycine (non dénaturé)



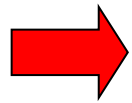
DNA ponté par la mitomycine (dénaturé)



– Agents mutagènes

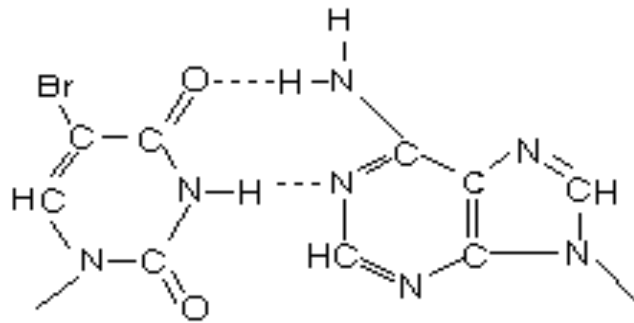
Nous allons voir maintenant d'autres exemples d'agents (interférant avec la machinerie du génome et) ayant des effets mutagènes. Nous avons choisi 3 exemples d'agents mutagènes ayant des mécanismes d'action différents:

- **bromo-uracile (BrU)** – BrU est un agent mutagène (obtenu par synthèse chimique) utilisé expérimentalement (sur cellules en culture) pour augmenter le taux de mutations et éventuellement sélectionner des mutants.
- **hydroxylamine** – L'hydroxylamine est un composé de synthèse utilisé en chimie et peut aussi être formé par oxydation d'ammonium par certains microorganismes. L'hydroxylamine peut modifier les bases du DNA et ainsi induire des mutations.
- **des agents intercalaires** (ou intercalants) – Les agents intercalaires sont des composés contenant dans leur structure un noyau polycyclique (tri- , tétra-cyclique..) plan pouvant s'insérer entre les plateaux de paires de bases de l'ADN. Certaines de ces molécules fluorescentes (éthidium, acridine orange..) sont utilisées en biologie pour visualiser l'ADN, car leur fluorescence augmente quand elles sont intercalées dans l'ADN. Ces agents intercalaires déforment la double hélice et perturbent diverses fonctions de l'ADN (réplication, transcription..). Lors de la réplication, elles peuvent induire l'addition de bases supplémentaires dans le brin néoformés et ont ainsi un effet mutagène (insertion). D'autres agents intercalaires ont des effets inhibiteurs sur le métabolisme de l'ADN et sont utilisés comme anticancéreux (daunorubicine et autres anthracyclines ont un effet inhibiteur sur la topoisomérase II des mammifères).



– Agents mutagènes

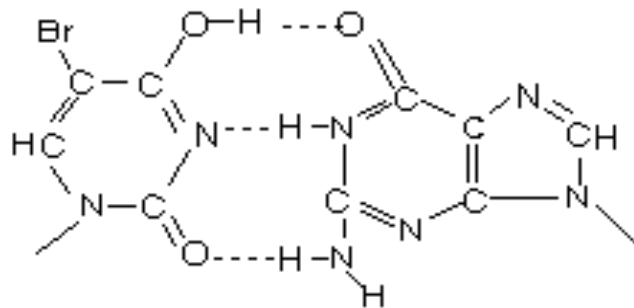
- BrU (5-bromo-uracile)



5-Bromouracil

Adenine

forme céto



5-Bromouracil

Guanine

forme énol

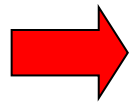
BrU (5-bromo-uracile) est un analogue de la thymine, métabolisé (en BrdU) et incorporé dans le DNA comme la thymine.

Mais l'électronégativité de Br modifie l'équilibre des tautomères en stabilisant les formes mineures (qui sont donc plus abondantes)

La forme majeure (céto) de BrU s'apparie avec A comme le thymine, tandis que la forme mineure (enol) s'apparie avec G (→ misappariement et mutation si non corrigé).

Comme les formes mineures sont plus nombreuses, les misappariements sont plus nombreux et le taux résiduel d'anomalies après 'proof reading' est plus élevé qu'avec la thymine → mutations ponctuelles (transitions AT → GC) plus nombreuses.

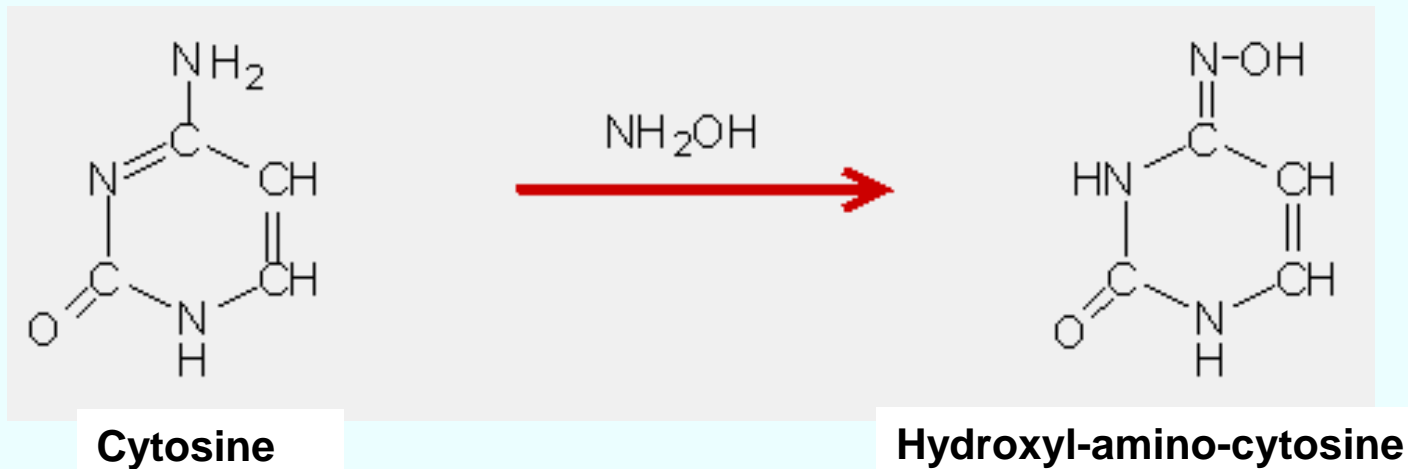
Donc, BrU est un agent mutagène.

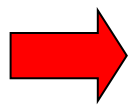


– Agents mutagènes

- Hydroxylamine (NH₂OH)

L'Hydroxylamine (NH₂OH) est un réactif utilisé en chimie de synthèse et être formé par certains microorganismes par oxydation de l'ammonium. L'Hydroxylamine peut réagir avec la cytosine pour donner de l'hydroxylaminocytosine qui s'apparie avec A (au lieu de l'appariement de C avec G) → mutation (transition) CG → AT
L'Hydroxylamine est donc mutagène.

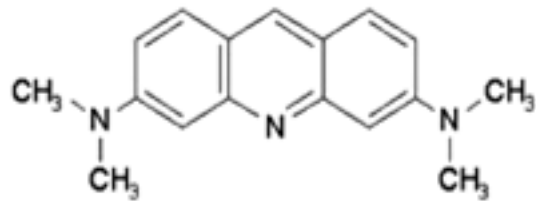




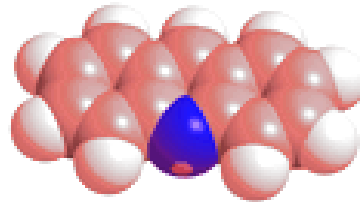
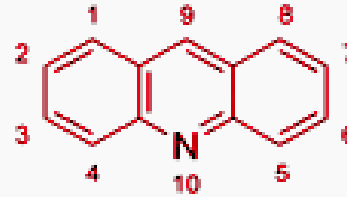
– Agents intercalaires (et mutagènes)

- Acridine orange et Ethidium

Acridine orange



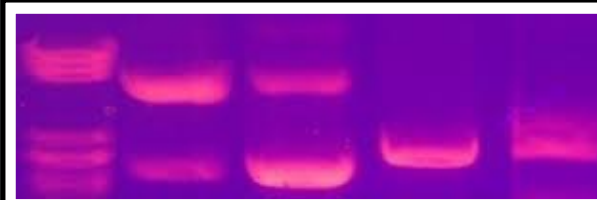
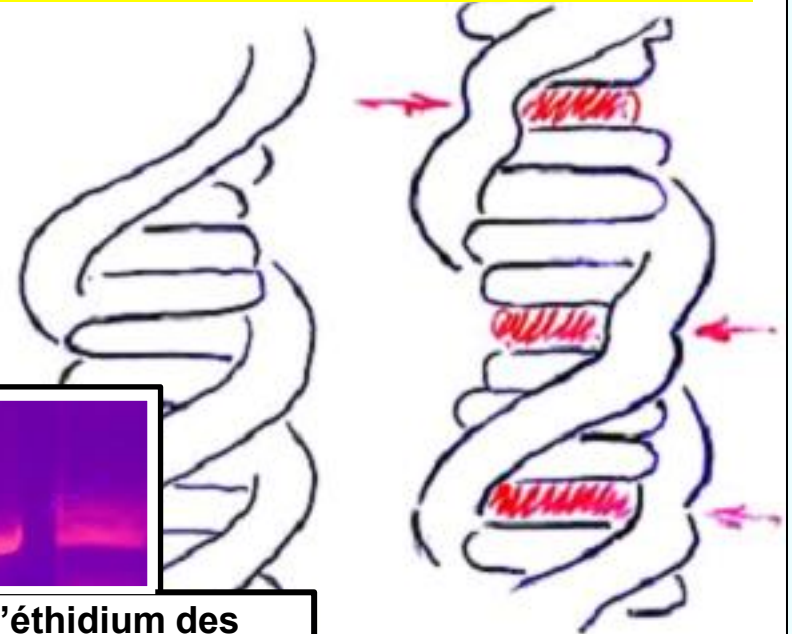
noyau acridine
(tricyclique plan)



Ethidium

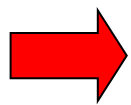


Agent intercalaire → insertion
entre les plateaux de paires de
bases de l'ADN



Coloration par le bromure d'éthidium des
bandes d'ADN séparées par électrophorèse

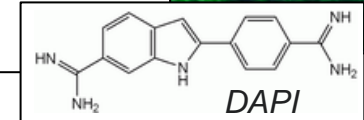
Les agents intercalaires sont mutagènes car ils peuvent induire des perturbations d'enzymes intervenant dans la réplication ou la transcription (pouvant induire par exemple une insertion d'un nucléotide supplémentaire qui peut induire un « frame shift » dans les régions codantes du génome).



– Agents intercalaires (et mutagènes)

- Acridine orange, Ethidium...

noyau cellulaire visualisé en microscopie à fluorescence (la fluorescence bleue est due à l'agent intercalaire DAPI inséré dans le DNA cellulaire).



Les agents intercalaires (ou intercalants) pris comme exemple sont des molécules fluorescentes tricycliques planes (pouvant s'insérer entre les plateaux de paires de bases de l'ADN) dont la fluorescence augmente lorsqu'elles sont intercalées dans l'ADN et qui sont utilisées pour visualiser l'ADN (par exemple, noyaux cellulaires en microscopie à fluorescence - image ci-dessus - ou en électrophorèse de fragments d'ADN - Figure sur la diapo précédente).

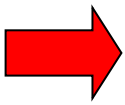
Ces molécules sont des agents mutagènes, car, parfois, lors de la réplication de l'ADN (lors de la séparation des brins) certaines de ces molécules restent intercalées entre deux paires de bases successives du brin matrice et lorsque la polymérase réplique ce brin, une base d'un NTP servant à la biosynthèse du brin néoformé peut s'apparier avec cette molécule intercalée et donc le brin néoformé contient un nucléotide supplémentaire (mutation par insertion) qui, dans les régions codantes du génome, peut induire un décalage du cadre de lecture (ou 'frame shift') et modifier la séquence polypeptidique traduite (voir chapitre mutation par insertion).

Ces agents utilisés dans les laboratoires de biologie moléculaire et cellulaire doivent donc être manipulé avec les précautions requises pour les agents mutagènes.

Exemples d'inhibiteurs des étapes de la machinerie de Biologie moléculaire (réplication, transcription, traduction..)

Nous allons voir dans la suite de ce cours, quelques exemples d'inhibiteurs de la machinerie moléculaire intervenant dans les principales étapes de réplication, transcription et traduction.

Nous soulignerons leur intérêt pour la connaissance des mécanismes de biologie moléculaire et leur intérêt dans le domaine médical, soit à cause de leurs effets toxiques pathogènes, soit en raison de leur utilisation thérapeutique.



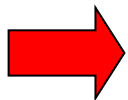
– Inhibiteurs d'enzymes du DNA : exemple d'inhibiteurs de la topoisomérase II

Un premier exemple d'inhibiteur enzymatique est l'acide nalidixique. Cette molécule, obtenue par synthèse chimique au début des années 60's a un effet inhibiteur de la topo-isomérase II (DNA-gyrase) bactérienne. Cet effet inhibiteur est relativement spécifique de la topo-isomérase II des bactéries (alors que la topoisomérase II des mammifères ne semble pas inhibée par les concentrations d'acide nalidixique utilisées en thérapeutique). Cette spécificité a donc permis d'utiliser l'acide nalidixique (et ses dérivés) comme antibiotique (antibactérien) en médecine.

Cependant, comme pour la plupart des antibiotiques, des bactéries résistantes apparaissent. La résistance de certaines de ces bactéries résulte de mutations de la topo-isomérase II bactérienne qui diminuent l'affinité et donc l'effet inhibiteur de l'acide nalidixique.

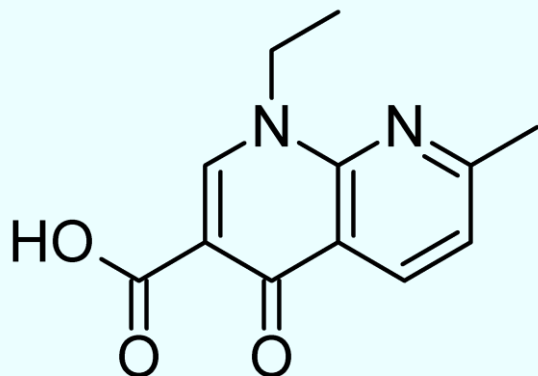
A noter que, par modification chimique, l'acide nalidixique a donné naissance à la famille (nombreuse) des quinolones et fluoroquinolones, largement utilisées en thérapeutique anti-infectieuse (antibactérienne) humaine et vétérinaire.

Enfin, les recherches en cours montrent que de nouvelles molécules de fluoroquinolones (obtenues également par synthèse chimique) ont un effet inhibiteur sur la topo-isomérase II humaine (et de mammifères) et ont donc un intérêt thérapeutique potentiel comme agents anticancéreux.



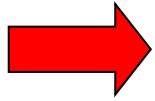
**– Inhibiteurs d'enzymes du DNA :
exemple d'inhibiteurs de la topoisomérase II**

**Acide nalidixique
(famille quinolones)**



**Inhibition de la DNA-gyrase
(topo-isomérase II) bactérienne
→ altération de la structure du
DNA (pas de super-tours) →
cassures du DNA et mort des
bactéries.**

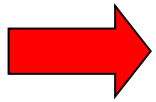
Utilisé en médecine comme antibiotique (anti-infectieux)



– Inhibiteurs de la Transcription

Nous avons choisi trois exemples d'inhibiteurs de la transcription agissant par des mécanismes différents et ayant un intérêt médical:

- actinomycine D
- rifamycine B
- alpha-amanitine



– Inhibiteurs de la Transcription

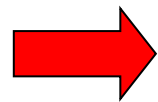
Actinomycine D

L'actinomycine D est un composé naturel synthétisé par des bactéries du genre *streptomyces* qui a été isolé en 1940.

Sa structure comporte un noyau tricyclique phenoxasone et deux pentapeptides cycliques identiques, contenant des acides aminés (par exemple, acides aminés de série D) caractéristiques des peptides non ribosomaux synthétisés par des bactéries. Le noyau phenoxasone peut s'insérer entre les plateaux de paires de bases du DNA (en particulier, dans des séquences riches en GC) et les peptides cycliques, localisés dans le petit sillon du DNA, stabilisent l'interaction de la molécule d'actinomycine avec le DNA. Aux concentrations généralement utilisées, l'actinomycine D inhibe préférentiellement la transcription (en inhibant la liaison ou/et la progression de la RNA polymérase).

L'actinomycine D est utilisée en biologie cellulaire pour bloquer la transcription (et pour savoir si un événement cellulaire étudié nécessite ou non la transcription de gènes).

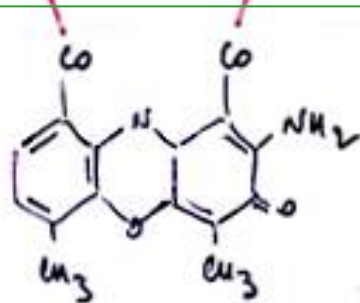
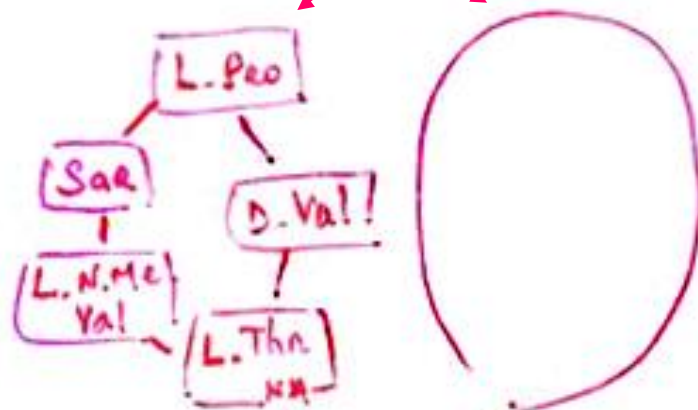
En médecine, l'actinomycine D est utilisée dans la chimiothérapie de certains cancers: en particulier pour divers sarcomes (rénaux, osseux, musculaires) et pour certaines tumeurs trophoblastiques (placentaires).



– Inhibiteurs de la Transcription

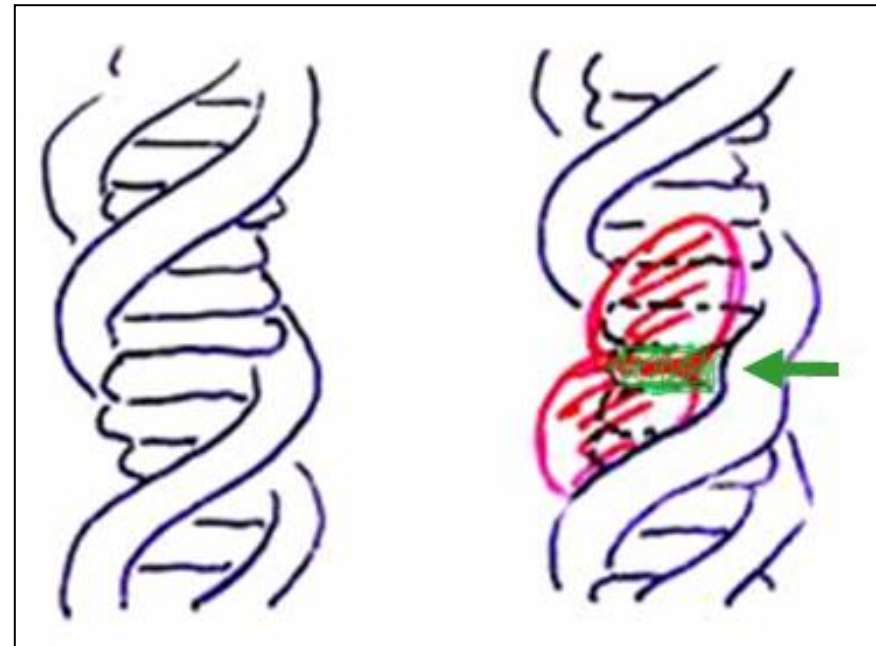
Actinomycine D

2 peptides cycliques

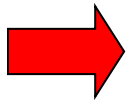


noyau phenoxazone

Intercalation du noyau phenoxazone
entre 2 plateaux de paires de bases.
→ inhibe la transcription (à faible
dose, perturbe peu la réplication)
→ perturbe les topoisomérases



Utilisée en biologie cellulaire expérimentale et en médecine comme anticancéreux



– Inhibiteurs de la Transcription

Rifamycine B

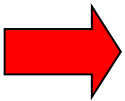
La rifamycine B a été la première rifamycine isolée dans les années 50's en Italie, à partir de cultures d'actinobactéries. La rifamycine B et plusieurs autres rifamycines de structure voisine, soit naturelles, soit obtenues par hémisynthèse (molécules naturelles modifiées chimiquement) se sont révélées utiles en médecine

Mécanisme d'action - La rifamycine B inhibe la RNA polymérase bactérienne (des bactéries sensibles) en se liant principalement à la sous unité β (comme révélé par des études structurales de cristallographie moléculaire et par l'étude des mutations de la RNA polymérase de souches mutantes résistantes à la rifamycine B).

La rifamycine B inhibe la RNA polymérase bactérienne au début de la transcription (mais si la rifamycine B se lie à la sous-unité β de la RNA polymérase après au début de la transcription, elle ne bloque pas la suite de la transcription = élongation du RNA). Ceci a permis de montrer que la sous-unité β a un rôle critique début de la transcription, mais n'est plus nécessaire pour l'élongation du RNA.

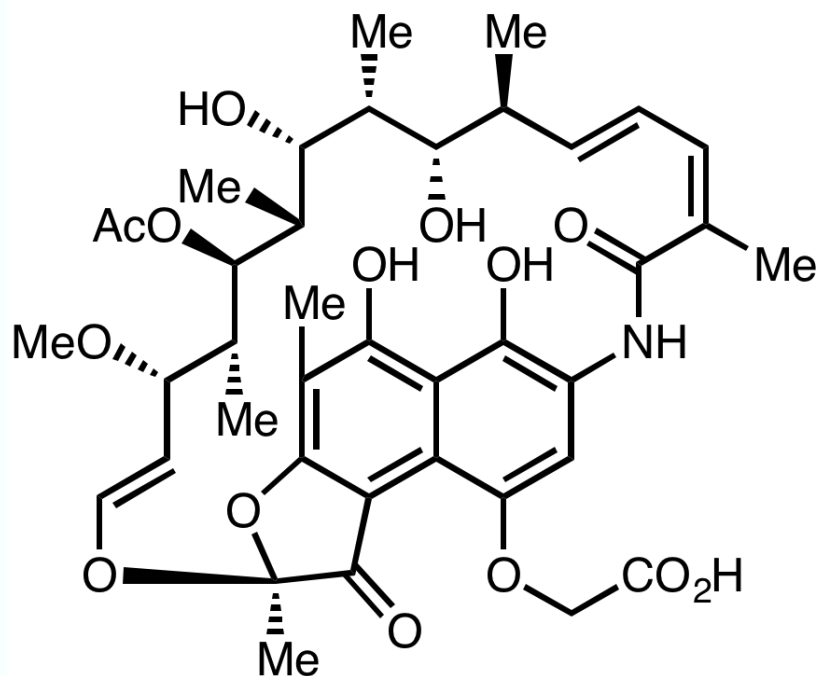
Utilisation médicale - La rifamycine B n'ayant pas d'effet inhibiteur sur les RNA polymérases des mammifères et n'étant généralement pas toxique, elle est largement utilisée en médecine, comme antibiotiques antibactériens.

La rifampicine, un dérivé d'hémisynthèse, s'est révélé particulièrement utile (en association avec d'autres antibiotiques spécifiques) dans la traitement de la tuberculose et d'autres infections à mycobactéries.



– Inhibiteurs de la Transcription

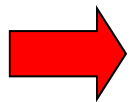
Rifamycine B



**Inhibition de la sous-unité β
de la RNA-Polse bactérienne**

**→ blocage du début de la
transcription (blocage de
l'initiation de la transcription,
mais pas de l'élongation des
RNA)**

Utilisée en médecine comme antibiotique (anti-infectieux)



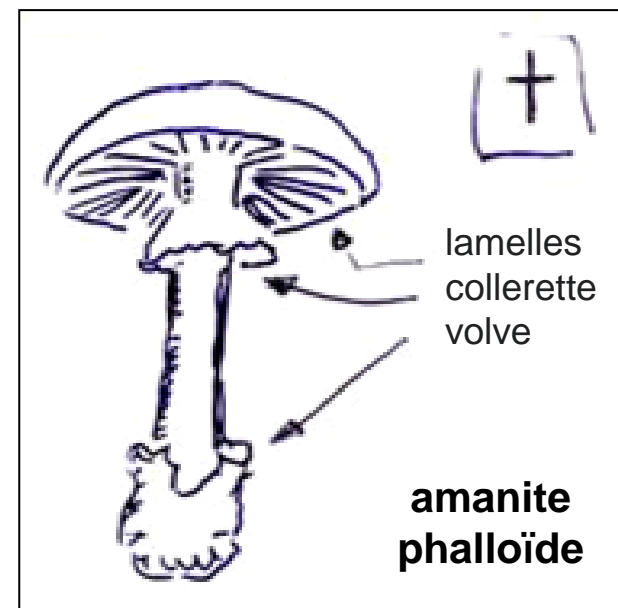
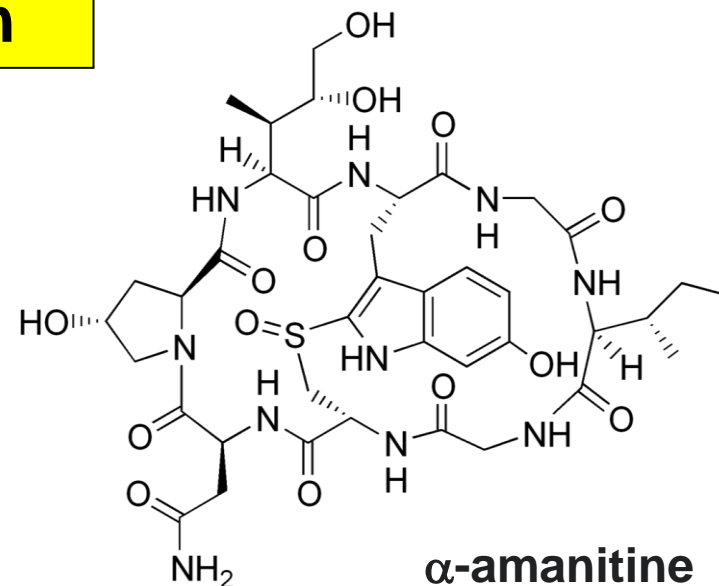
– Inhibiteurs de la Transcription

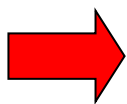
α -amanitine

L' α -amanitine est un octapeptide (synthétisé au niveau des ribosomes) cyclique produit (avec d'autres amatoxines de structure voisine) par diverses champignons du genre *Amanita* (amanites), en particulier par l'amanite phalloïde, l'un des rares champignons mortels dans nos régions.



Les amanites phalloïdes (comme la plupart des champignons mortels de nos régions) ont les 3 caractéristiques suivantes: lamelles, collerette et volve... donc si vous n'êtes pas de fins mycologues, évitez de consommer pas les champignons ayant ces 3 éléments !





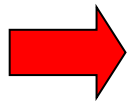
– Inhibiteurs de la Transcription

α -amanitine

L' α -amanitine est un inhibiteur des RNA polymérases II et III des mammifères, avec une plus grande affinité pour la RNA polymérase II. Elle ralentit (bloque) l'avancée de la RNA polymérase II, donc bloque la synthèse des mRNA (et des protéines) des cellules sensibles (on peut noter que les RNA polymérases des amanites ne sont pas inhibées par l' α -amanitine).

Intoxication par l' α -amanitine - Chez les humains, elle résulte généralement de l'ingestion d'amanites phalloïdes. La toxine absorbée par voie digestive est transportée par voie portale vers le foie qui est la première cible de l'intoxication. L' α -amanitine induit au niveau cellulaire un arrêt de la synthèse des protéines et une destruction cellulaire (apoptose) induisant une hépatite toxique avec signes de cytolyse (augmentation des transaminases) qui se complique souvent d'une atteinte rénale (syndrome hépato-rénal) qui, dans les cas les plus graves, évolue en 5 à 10 jours vers un coma et la mort, malgré les soins lourds (réanimation, greffe de foie..). Chaque année, 2 à 3 personnes meurent d'intoxication par les champignons (principalement amanites) en France.

Utilisation thérapeutique potentielle ? - Des essais de thérapie anti-cancéreuse utilisent de l' α -amanitine couplée à des anticorps spécifiques pour cibler certaines tumeurs ayant des antigènes spécifiques (exemple, α -amanitine couplées à des anticorps anti-PSA pour le cancer de la prostate..). Non utilisé en pratique médicale courante.

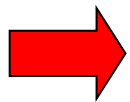


– Inhibiteurs de la Traduction

La traduction ribosomale est une cible de nombreux inhibiteurs d'intérêt médical dont nous allons voir quelques exemples.

Les ribosomes procaryotes et eucaryotes ont une similitude de structure et de fonctionnement qui suggèrent une origine phylogénétique commune. Cependant, au cours de l'évolution des divergences structurales sont apparues dans les lignées des organismes vivants. Ces différences ont été exploitées par la nature, et (plus récemment) par la recherche pharmacologique, pour produire des inhibiteurs plus ou moins spécifiques pour lutter contre les pathogènes. Certains de ces inhibiteurs sont suffisamment spécifiques (et peu toxiques) pour permettre une utilisation thérapeutique.

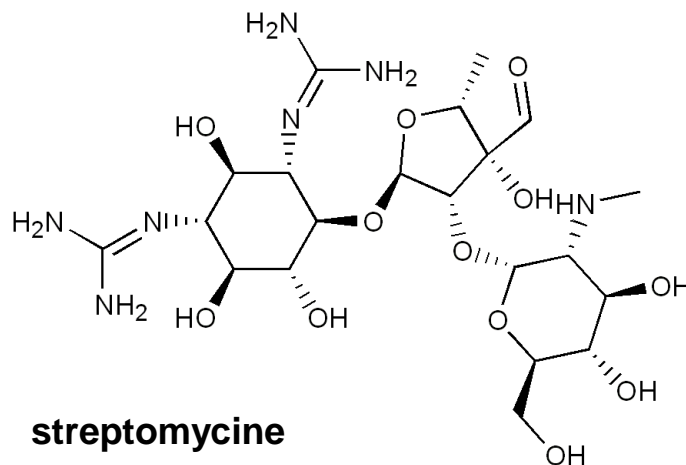
Les exemples choisis montrent quelques inhibiteurs utilisés comme antibiotiques (antibactériens), anticancéreux. Certains autres composés (utilisés uniquement en biologie expérimentale parce que trop toxiques pour une utilisation médicale) ont apporté des connaissances sur certains mécanismes moléculaires des ribosomes, ou servent couramment pour étudier certaines réponses biologiques sur culture cellulaire ou *in vitro* en biologie moléculaire.



– Inhibiteurs de la Traduction

Streptomycine

La streptomycine, isolée aux USA en 1943 à partir d'une souche d'actinobactéries (du genre *streptomyces*), est le premier antibiotique de la famille des aminosides (nom donné en référence à la structure de ces molécules contenant des sucres aminés) et le premier antibiotique utilisé dans le traitement de la tuberculose (1946). Mécanisme d'action - La streptomycine inhibe la synthèse protéique bactérienne en se liant à l'ARN 16S de la petite sous-unité 30S de ribosomes bactériens. Plus précisément, elle inhibe l'initiation de la traduction et perturbe la synthèse de la chaîne polypeptidique en induisant des erreurs de lecture des codons (faux sens) qui aboutissent à la synthèse de protéines de structure anormale et dysfonctionnelles, toxiques pour ces bactéries.



La streptomycine inhibe l'Initiation de la Traduction des procaryotes et induit des erreurs de lecture (erreurs faux sens) → protéines de structure primaire anormale

La streptomycine a été (est) utilisée en médecine comme antibiotique (anti-infectieux)

Streptomycine (suite)

La streptomycine a été le premier antibiotique utilisé dans le traitement de la tuberculose (1946) d'abord en monothérapie, puis en association avec d'autres antituberculeux (en raison de l'apparition rapide de souches résistantes lors des monothérapies).

Elle a également été utilisée pour traiter diverses infections bactériennes, mais son utilisation médicale a été progressivement réduite en raison de l'apparition de résistances, des effets toxiques (ototoxicité pouvant aboutir à une surdité irréversible, néphrotoxicité..) et de la découverte d'autres antibiotiques moins toxiques.

D'autres antibiotiques de la même famille (aminosides), de moindre ototoxicité, sont utilisés en thérapeutique anti-infectieuse.

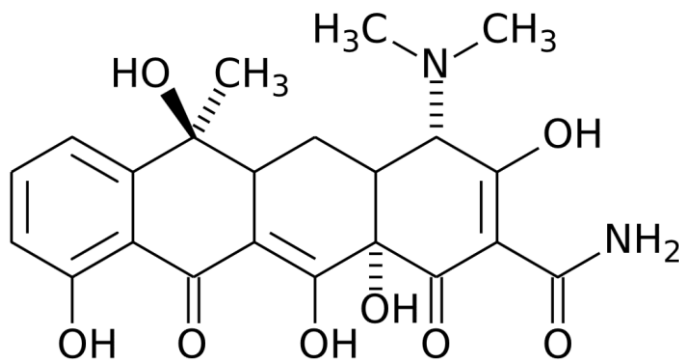
– Inhibiteurs de la Traduction

Tetracycline

La tétracycline a été isolée aux USA dans les années 50's à partir d'actinobactéries (*streptomyces*) et ainsi nommée en raison de la structure (4 cycles accolés). Elle est à l'origine de la famille d'antibiotiques du même nom 'tétracyclines'.

* Le nom de la famille des 'tétracyclines' est parfois abrégée 'cyclines', terme qu'il vaut mieux éviter en raison du risque de confusion avec les protéines régulatrices du cycle cellulaire.

Mécanisme d'action - La tétracycline inhibe la synthèse protéique bactérienne. Elle se lie à la petite sous-unité 30S du ribosome bactérien et inhibe la liaison des tRNA chargés avec l'acide aminé (tRNA-AA) sur la site A du ribosome des procaryotes, bloquant ainsi l'élongation des chaînes polypeptidiques bactériennes et donc la prolifération des bactéries sensibles. Elle n'a pas d'effet inhibiteur sur les ribosomes eucaryotes.



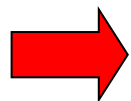
La Tétracycline se lie à la sous-unité 30 S des ribosomes procaryotes et inhibe la liaison des tRNA-AA sur le site A du ribosome procaryote bloquant ainsi la synthèse des protéines des bactéries sensibles

Utilisée en médecine comme antibiotique (anti-infectieux)

Tétracycline (suite)

Les tétracyclines, ayant un effet inhibiteur sélectif pour les procaryotes (et une toxicité faible pour les mammifères) sont utilisées en thérapeutique anti-infectieuse (antibactérienne).

Les tétracyclines sont largement utilisées en thérapeutique car elles ont un spectre d'action antibactérienne relativement large, et, de plus, sont capables de pénétrer dans les cellules eucaryotes et permettent donc de traiter des infections dues à des bactéries à tropisme intracellulaire (par exemple Chlamydia, Coxiella, Rickettsia, Mycobactéries...).



– Inhibiteurs de la Traduction

Parmi les inhibiteurs de la traduction, les 2 exemples suivants, chloramphénicol et cycloheximide, sont des inhibiteurs de la peptidyl-transférase (ribozyme porté par un rRNA de la grande sous-unité ribosomale) qui synthétise les liaisons peptidiques.

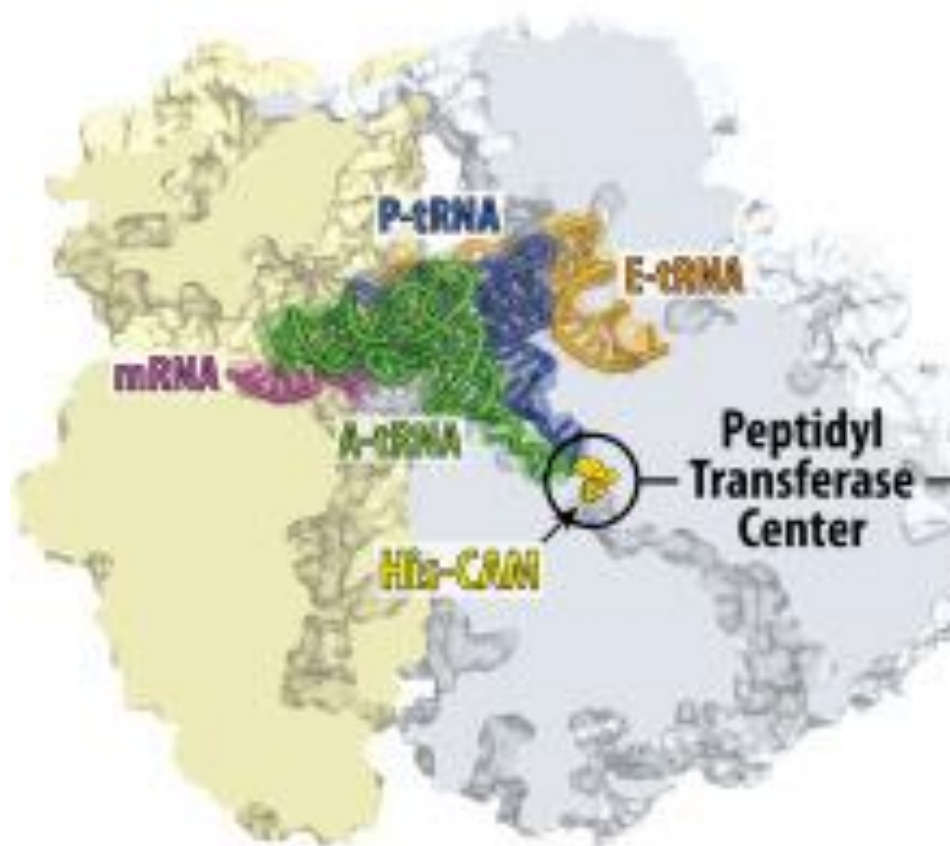
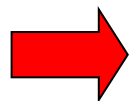


Schéma de ribosome bactérien montrant le site peptidyl-transférase (ribozyme situé sur la grande sous-unité ribosomale 50 S)

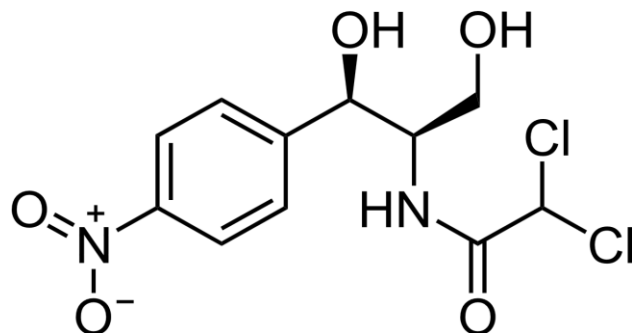


– Inhibiteurs de la Traduction

Chloramphénicol

Le chloramphénicol, est une substance naturelle isolée en 1947 à partir de cultures d'actinobactéries du genre *streptomyces*, puis obtenu par la chimie de synthèse.

Mécanisme d'action – Le chloramphénicol, inhibiteur de la peptidyl-transférase de la grande sous-unité ribosomale 50S bactérienne, inhibe sélectivement la synthèse des protéines des bactéries sensibles, tandis qu'il n'inhibe pas la peptidyl-transférase des ribosomes cytoplasmiques (eucaryotes). Cette spécificité d'inhibition des ribosomes bactériens, en faisait *a priori* un bon antibiotique (antibactérien). A noter cependant que, *in vitro*, le chloramphénicol inhibe la peptidyl-transférase des ribosomes mitochondriaux (ce qui est un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse de l'origine bactérienne des mitochondries).



Le Chloramphenicol inhibe spécifiquement la peptidyl-transférase de la sous-unité 50 S (des procaryotes et des mitochondries)

Utilisé en médecine comme antibiotique (anti-infectieux)

Chloramphenicol (suite)

Sur le plan des connaissances sur l'évolution, l'inhibition similaire de la peptidyl-transférase des ribosomes des mitochondries et des bactéries est un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse de l'origine bactérienne des mitochondries.

Utilisation médicale – Le chloramphénicol a été largement utilisé en médecine dans le passé, mais son utilisation par voie générale est maintenant abandonnée en France, en raison de la survenue d'effets indésirables très sévères (et la disponibilité d'autres antibiotiques moins dangereux). Les complications les plus sévères étaient des aplasies médullaires (certaines régressant après l'arrêt du traitement, d'autres non régressives étant souvent mortelles).

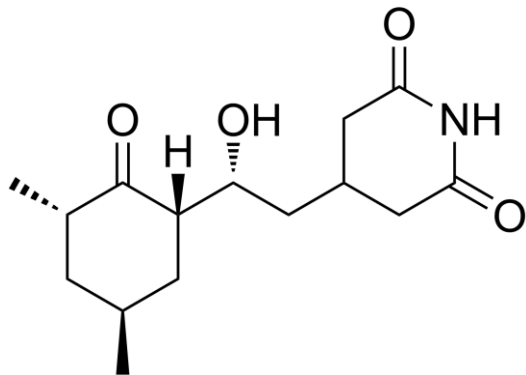
Il semble que le mécanisme de la toxicité du chloramphénicol soit lié à sa pénétration dans les mitochondries des sujets sensibles. Habituellement, les cellules humaine vivantes résistent au chloramphénicol car il ne pénètre pas dans les mitochondries (donc il n'inhibe pas la synthèse protéique mitochondriale et n'est pas toxique). Rarement, chez certains sujets, la perméabilité des mitochondries au chloramphénicol serait augmentée, et permettrait l'entrée du chloramphénicol dans les mitochondries où il inhiberait leur synthèse protéique, ce qui provoquerait des lésions mitochondriales à l'origine de la toxicité du chloramphénicol chez ces sujets.

Cycloheximide

Le cycloheximide est une substance naturelle produite par des actinobactéries du genre *streptomyces*, découverte en 1946 aux USA.

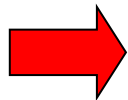
Mécanisme d'action – Le cycloheximide inhibe l'étape de translocation de la traduction ribosomale (translocation du mRNA et des tRNA par rapport au ribosome) eucaryote et ainsi bloque la synthèse protéique des cellules eucaryotes (animale et fongique). Il est généralement inactif vis-à-vis de la traduction chez les bactéries.

Utilisation – L'inhibition de la synthèse protéique eucaryote est très toxique pour ces cellules et le cycloheximide n'est donc pas utilisé en thérapeutique. Il est utilisé en biologie expérimentale sur des cellules eucaryotes pour bloquer la synthèse protéique (par exemple pour évaluer la demi-vie d'une protéine, ou pour savoir si un phénomène biologique étudié nécessite ou non une synthèse protéique *de novo*).



Le cycloheximide inhibe spécifiquement la peptidyl-transférase de la sous-unité 60 S (des eucaryotes), mais n'inhibe pas la traduction des procaryotes, ni des mitochondries.

Utilisé in vitro en Biologie cellulaire (inhibiteur de la synthèse protéique)

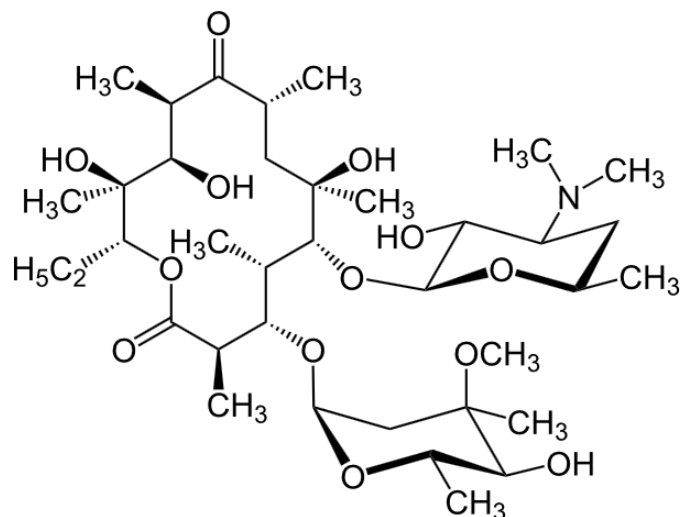


– Inhibiteurs de la Traduction

Erythromycine

L'érythromycine est une substance naturelle (produite par des actinobactéries) découverte au début des années 50's aux USA (dans un échantillon de sol provenant des Philippines). L'érythromycine appartient à la famille des macrolides (structure cyclique lactonique de grande taille), portant souvent des oses (sucres) neutres ou aminés.

Mécanisme d'action – L'érythromycine se lie à la sous-unité 50 S des ribosomes bactériens et inhibe l'étape de translocation de la traduction (translocation du mRNA et des tRNA par rapport au ribosome) des procaryotes, bloquant ainsi la synthèse protéique bactérienne. Elle est inactive vis-à-vis de la traduction eucaryote.



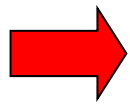
L'érythromycine se lie à la sous-unité 50 S et inhibe l'étape de translocation au niveau des ribosomes procaryotes

Utilisé en médecine comme antibiotique (anti-infectieux)

Erythromycine (suite)

Utilisation – L'érythromycine (et les macrolides) sont des antibiotiques qui sont largement utilisés en thérapeutique (ORL, broncho-pulmonaires..). Outre leur spectre d'activité antibactérienne, ils sont capables de pénétrer dans les cellules et permettent donc de traiter des infections dues à des bactéries ayant un tropisme intracellulaire.

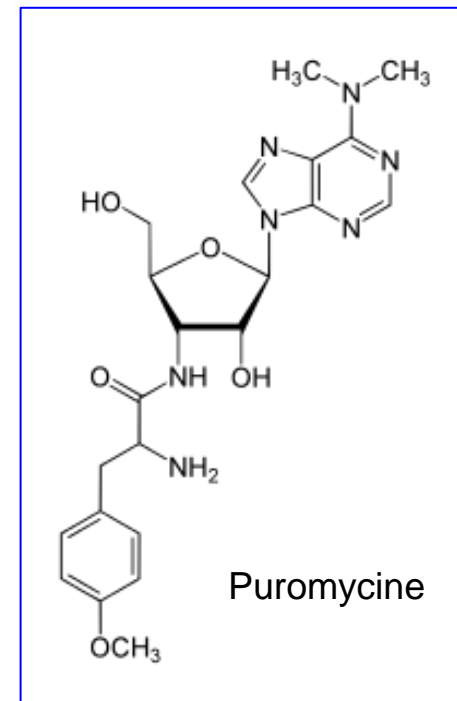
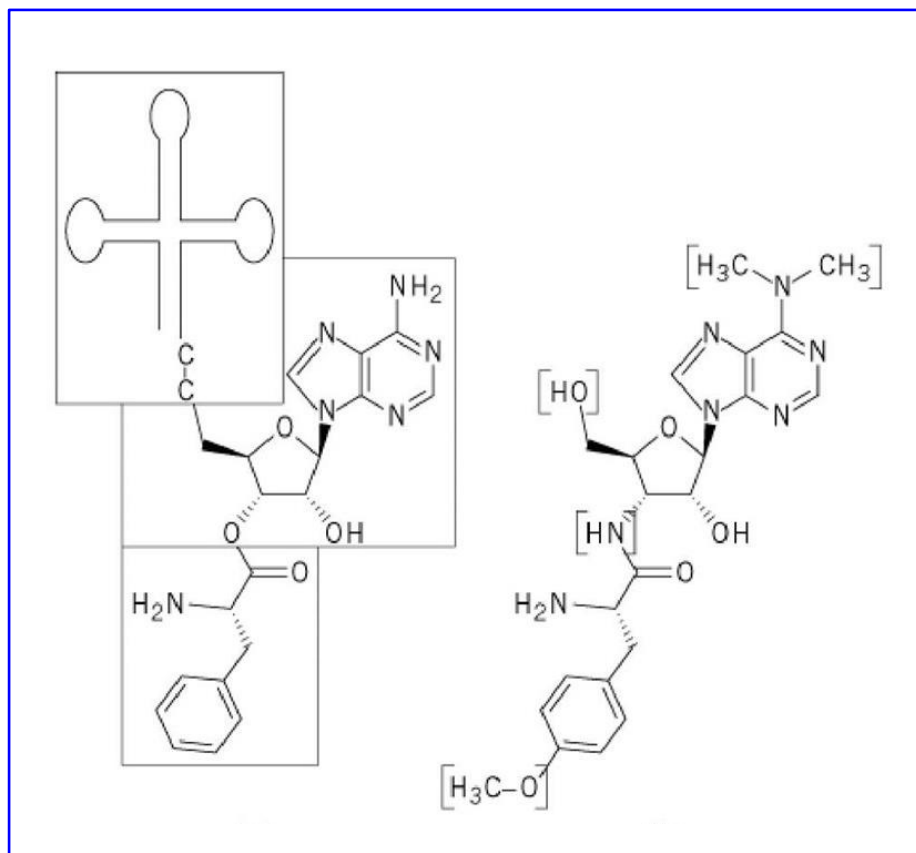
Cependant, les effets indésirables et les interactions médicamenteuses nombreuses qui potentialisent leur toxicité (allergies, troubles du rythme cardiaque..) nécessitent des précautions d'emploi et une surveillance médicale.



– Inhibiteurs de la Traduction

Puromycine

La puromycine est un antibiotique de structure nucléosidique produit par des Actinobactéries du genre *Streptomyces*.

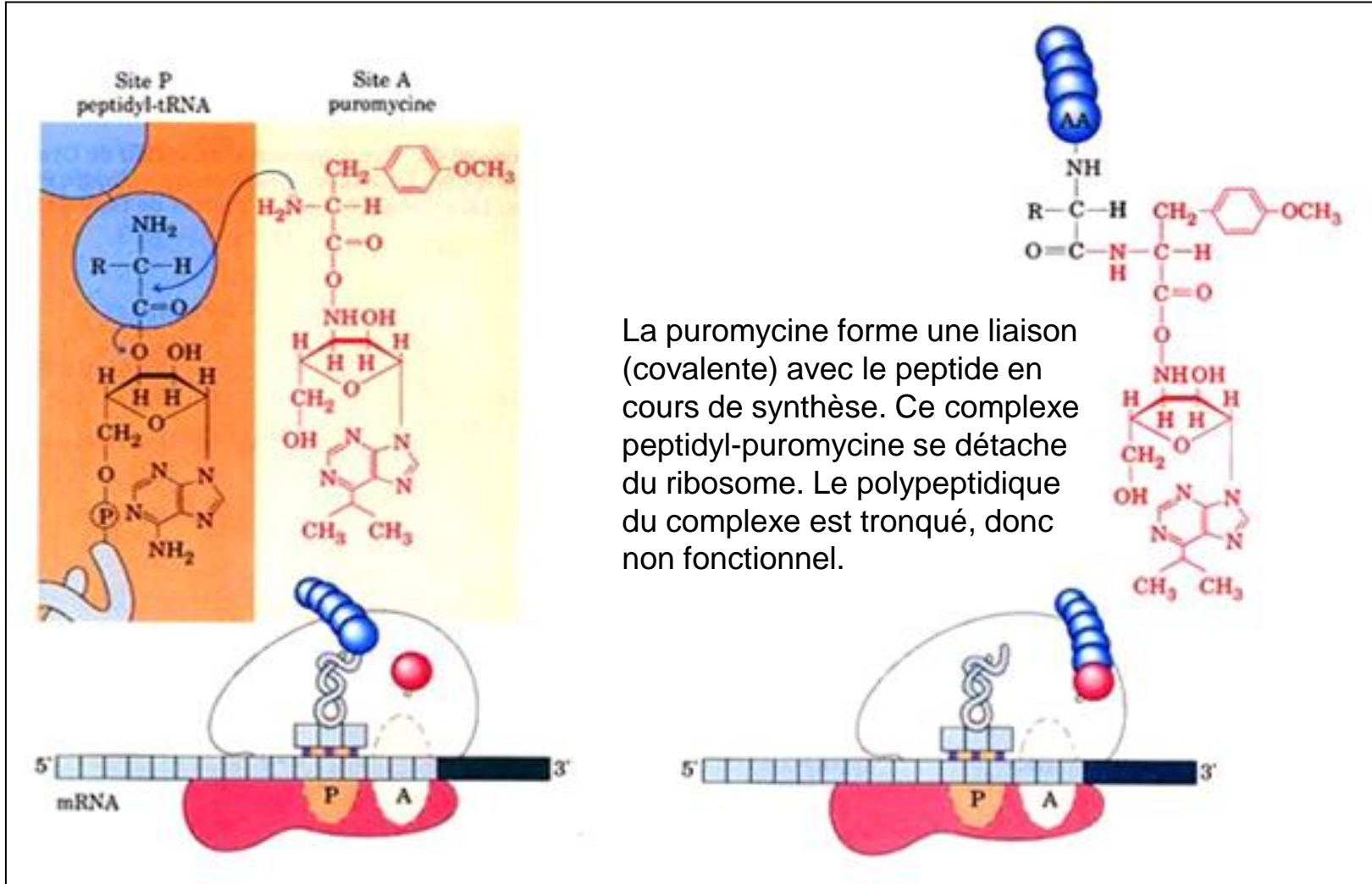


La puromycine (analogue de nucléoside lié à un acide aminé) est formé d'une N-diméthyladénine liée par une liaison N-osidique à un analogue aminé du ribose (3-amino-3-désoxy-ribose), lui-même lié par une liaison amide à une méthoxyphénylalanine.

La figure ci-contre montre l'analogie structurale de la puromycine avec l'adénosine terminale de l'extrémité CCA3' d'un tRNA chargé avec une phénylalanine.

Puromycine (suite)

Mécanisme d'action - La puromycine entre dans la cellule se place dans le site A des ribosomes (des procaryotes et des eucaryotes), sert d'accepteur pour le peptide en cours de synthèse et forme un complexe peptidyl-puromycine qui stoppe la traduction et se détache du ribosome. Les chaînes polypeptidiques de ces complexes sont tronquées, donc non fonctionnelles.



Puromycine (suite)

Utilisation – La puromycine a été un des outils moléculaires qui a permis d'étudier en biologie moléculaire l'étape de liaison des tRNA chargés sur le sites A des ribosomes, et le mécanisme de synthèse ribosomale des liaisons peptidiques.

La puromycine perturbant la synthèse des protéines de façon non sélective, elle a forte toxicité à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes, et n'a pas actuellement d'utilisation en pratique médicale courante.

Les substances d'origine naturelle (synthétisées par des micro-organismes) ou obtenues par la chimie de synthèse qui interfèrent avec le génome (modifications structurales) ou qui perturbent (le plus souvent inhibent) des étapes de biologie moléculaire sont très nombreuses. Les exemples choisis montrent que ces molécules sont des outils moléculaires qui ont permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires des cellules procaryotes et eucaryotes.

D'autre part, sur un plan médical, l'étude et la production de ces molécules (naturelles, d'hémisynthèse ou de synthèse totale) a été particulièrement fructueuse et d'une efficacité thérapeutique remarquable (par exemple dans le domaine des antibiotiques et des agents anticancéreux).

La recherche dans ce domaine continuera probablement à découvrir de nouveaux agents actifs sur de nouvelles cibles moléculaires, plus sélectifs, plus efficaces, moins toxiques et finalement devrait améliorer l'arsenal thérapeutique à disposition de la médecine.

Fin du chapitre
Exemples d'antibiotiques
et d'antimétabolites

