



**HAL**  
open science

# Inhibiteurs à visée thérapeutique de la phosphomannose isomérase de *Candida albicans* et du facteur de motilité autocrine : études cinétiques, structurales, mécanistiques et diagnostiques

Lama Ahmad

## ► To cite this version:

Lama Ahmad. Inhibiteurs à visée thérapeutique de la phosphomannose isomérase de *Candida albicans* et du facteur de motilité autocrine : études cinétiques, structurales, mécanistiques et diagnostiques. Chimie thérapeutique. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS459 . tel-02117107v2

**HAL Id: tel-02117107**

**<https://theses.hal.science/tel-02117107v2>**

Submitted on 3 May 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2017SACLS459

THÈSE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY,  
PRÉPARÉE À  
L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ICMMO, ECBB

ÉCOLE DOCTORALE N° 571

Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes.  
Spécialité : Chimie

Par

**Lama AHMAD**

Inhibiteurs à visée thérapeutique de la phosphomannose  
isomérase de *Candida albicans* et du facteur de motilité  
autocrine : étude cinétiques, structurales, mécanistiques et  
diagnostiques.

**Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 1/12/2017**

**Composition du jury :**

M. Herman van Tilbeurgh	Professeur, Université Paris-Saclay, Orsay	Président
M. Benoît Piro	Professeur, Université Paris Diderot, Paris	Rapporteur
M. Nohad Gresh	Directeur de Recherches CNRS, UPMC, Paris	Rapporteur
M. Frédéric Schmidt	Directeur de Recherches, Institut Curie, Paris	Examineur
M <sup>me</sup> Hafsa Korri-Youssoufi	Directeur de Recherches CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay	Examineur
M. Laurent Salmon	Professeur, Université Paris-Saclay, Orsay	Directeur de thèse



## **Remerciements :**

*La thèse est un travail individuel mais pas solitaire. C'est pourquoi, j'aimerais exprimer mes remerciements à toutes celles et ceux qui m'ont accompagné au cours de ces trois années.*

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO UMR8182) dirigé actuellement par le Professeur *David AITKEN* et auparavant par le Professeur *Jean-Pierre MAHY*. Je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance et tous mes remerciements pour m'avoir accueillie au sein de l'Institut.

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du Jury : M. *Frédéric SCHMIDT*, M. *Herman VAN TILBEURGH* et Mme *Hafsa KORRI-YOUSSOUFI* d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse, ainsi que M. *Nohad GRESH* et M. *Benoît PIRO* qui ont en plus accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Que ces personnes sachent qu'elles ont toute ma reconnaissance. Je vous remercie de me donner l'opportunité de discuter de mes travaux scientifiques avec vous.

Je remercie le Professeur *Laurent SALMON*, mon directeur de thèse et responsable de l'Equipe de Chimie Bioorganique et Bioinorganique pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail et qui, tout au long de la thèse, m'a attribué sa confiance et m'a permis de profiter d'une grande autonomie.

Je tiens tout particulièrement à remercier nos collaborateurs à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) : le Professeur *Herman VAN TILBEURGH*, responsable de l'équipe Fonction et Architecture des Assemblages Macromoléculaires, *Ines GALLAY*, *Noureddine LAZAR* et *Stéphane PLANCQUEEL* pour leur accueil, leur aide et leur participation à ce travail.

Je ne pourrais pas oublier le Docteur *Hafsa KORRI-YOUSSOUFI* qui m'a donné l'opportunité de travailler dans son groupe et m'a permis d'acquérir de nouvelles compétences en électrochimie.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères ainsi que ma profonde gratitude à tous mes professeurs à la faculté de pharmacie de l'Université Libanaise qui ont été pour moi un

modèle. Je remercie tout particulièrement le Docteur *Amal el HAJJ* pour ses conseils judicieux et son affectueux soutien.

Je remercie tous les membres de l'ECBB pour les bons moments passés et plus particulièrement : *Virginie DUBOSCLARD, Wadih GHATTAS, Rabih KHODER et Mélanie BILONG* pour leur aide à réaliser ce travail.

Je remercie *Jean-pierre BALTAZE* pour son aide précieuse en RMN.

*A ne pas oublier mes amis libanais : je garderai un bon souvenir de tous les moments passés ensemble !*

*Enfin, mes plus profonds remerciements vont à mes parents, ma famille et mon copain pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mon cursus. Je les remercie pour leur écoute et leur amour qui m'ont été essentiels durant ces années. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.*

# SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS .....	13
LISTE DES SCHEMAS .....	17
LISTE DES FIGURES .....	20
LISTE DES TABLEAUX.....	26
LISTE DES GRAPHES .....	27
AVANT-PROPOS .....	29
INTRODUCTION .....	31
GÉNÉRALITÉS SUR LES ALDOSE-CÉTOSE ISOMÉRASES : PRÉSENTATION DES PHOSPHOMANNOSE ET DES PHOSPHOGLUCOSE ISOMÉRASES ET OBJECTIFS DE LA THÈSE .....	31
1. Les phosphomannose et phosphoglucose isomérasés : de la classe des aldose-cétose isomérasés .....	33
1.1. Découverte des phosphomannose et phosphoglucose isomérasés .....	34
1.2. Mécanisme de transfert d'hydrogène .....	35
2. Présentation générale de la phosphomannose isomérase (PMI) .....	37
2.1. Réaction catalysée par la PMI .....	37
2.2. La PMI : complexe enzyme-métal.....	37
2.3. Les différents types de PMI : classification de Proudfoot.....	38
2.3.1. Les PMI de type I.....	39
2.3.2. Les PMI de type II.....	40
2.3.3. Cas particulier : organismes possédant deux types de PMI .....	42
2.3.4. Les PMI de type III.....	42
2.3.5. Les PMI type IV.....	42
2.4. Connaissances mécanistiques et structurales sur la PMI de <i>C. albicans</i> .....	42
2.5. La PMI de <i>Candida albicans</i> : vers de nouveaux antifongiques .....	52
2.5.1. Implication de la PMI dans le métabolisme chez l'homme .....	52
2.5.2. La PMI de <i>Candida albicans</i> : une cible thérapeutique potentielle .....	55
2.5.3. Conséquence d'une déplétion en PMI chez <i>Candida albicans</i> et d'autres microorganismes fongiques : approche d'une bithérapie antifongique .....	58
3. Présentation générale de la phosphoglucose isomérase (PGI).....	61

3.1.	Réaction catalysée par la PGI.....	61
3.2.	Aspects génétiques : conservation de la séquence.....	62
3.3.	Connaissances mécanistiques et structurales sur la PGI humaine.....	63
3.4.	Facteur de motilité autocrine-Phosphoglucose isomérase (AMF-PGI) : vers de nouveaux anti-métastatiques.....	72
3.4.1.	Implication dans le métabolisme chez l'homme .....	72
a)	La PGI : 2 <sup>ème</sup> enzyme de la glycolyse .....	72
b)	Implication de la PGI dans la néoglucogenèse.....	73
c)	Implication de la PGI dans la voie des pentoses phosphates .....	74
d)	Implication de la PGI dans la synthèse des oligosaccharides .....	74
3.4.2.	L'AMF-PGI : un biomarqueur de cancer validé .....	75
3.4.3.	Découverte de l'AMF-PGI.....	76
3.4.4.	gp78-AMFR : récepteur de l'AMF-PGI.....	77
3.4.5.	Interaction AMF-AMFR : rôle dans le développement de cancers métastatiques.....	77
a)	La migration des cellules cancéreuses induite par l'interaction AMF-AMFR met probablement en jeu une activation d'une protéine G .....	78
b)	Possibilité de dimérisation de l'AMFR .....	78
c)	Fixation de l'AMF via une interaction avec la chaîne glycosylée de l'AMFR .....	78
d)	Effet motogénique de l'AMF.....	79
e)	L'AMF : un facteur angiogénique .....	81
f)	L'AMF : un facteur anti-apoptotique .....	82
g)	L'AMF : une cytokine pro-métastatique .....	82
4.	Meilleurs inhibiteurs connus des deux enzymes.....	82
5.	Objectifs de la thèse .....	85
<b>CHAPITRE I.....</b>		<b>89</b>
<b>SYNTHÈSE DE NOUVEAUX INHIBITEURS DES PHOSPHOGLUCOSE ET DES PHOSPHOMANNOSE ISOMÉRASES .....</b>		<b>89</b>
1.	Introduction : état de l'art et stratégie proposée.....	91
2.	Ligands des métalloenzymes à zinc .....	94
3.	Choix des molécules cibles vs. CaPMI.....	97

4. Choix des molécules cibles vs hPGI.....	99
5. Stratégie de synthèse.....	100
<b>CHAPITRE II .....</b>	<b>105</b>
<b>SUREXPRESSION ET PURIFICATION DE CaPMI ET DE hPGI.....</b>	<b>105</b>
1. Introduction.....	107
2. Principe général de la surexpression des protéines.....	108
3. Surexpression de CaPMI.....	109
3.1. Système d'expression BL21/pRSET-C .....	109
3.2. Stock du plasmide pRSET-C/CaPMI .....	110
3.3. Transformation des bactéries BL21(DE3) par pRSET-C/CaPMI et production de CaPMI.....	111
3.4. Purification de CaPMI .....	112
3.5. Identification de CaPMI .....	113
4. Surexpression de hPGI.....	116
4.1. Purification de hPGI.....	116
4.2. Identification de hPGI .....	118
<b>CHAPITRE III .....</b>	<b>121</b>
<b>EVALUATIONS ENZYMATIQUES DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA PHOSPHOMANNOSE ISOMÉRISE DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ET DE LA PHOSPHOGLUCOSE ISOMÉRISE HUMAINE .....</b>	<b>121</b>
1. Introduction.....	123
2. Mesure des activités enzymatiques.....	124
2.1. Test enzymatique couplé PGI/G6PDH pour la mesure de l'activité de la PGI.....	124
2.2. Test enzymatique couplé PMI/PGI /G6PDH pour la mesure de l'activité de CaPMI 125	
3. Résultats de l'évaluation des inhibiteurs potentiels vis-à-vis de CaPMI et de hPGI.....	126
3.1. Évaluations du 5PAH et du 5PAA .....	126
3.2. Evaluation des composés à fonction mercapto (1' - 2) .....	128

3.3. Dérivés à groupement imidazole (3-6).....	131
3.4. Dérivés furane, thiophène, pyridine et sulfone (7-10).....	135
3.5. Composés à fonction amine terminale.....	138
4. Conclusion des évaluations cinétiques.....	140
<b>CHAPITRE IV .....</b>	<b>143</b>
<b>ETUDE CRISTALLOGRAPHIQUE DE COMPLEXES ENZYME-</b>	
<b>INHIBITEUR.....</b>	<b>143</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>145</b>
<b>A- STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE À HAUTE RÉOLUTION DU</b>	
<b>COMPLEXE CaPMI-5PAHz (CODE PDB : 5NW7) .....</b>	<b>146</b>
1. Aspects expérimentaux .....	146
2. Résultats et discussion .....	148
2.1. CaPMI-5PAHz : première structure cristalline de CaPMI avec un inhibiteur au site actif	148
2.2. Structure générale de CaPMI :.....	150
2.3. Interaction enzyme-inhibiteur.....	153
2.3.1. Le site de coordination du zinc .....	154
2.3.2. Site de fixation du groupe phosphate de 5PAHz .....	156
2.3.3. Identification de la base catalytique.....	160
2.4. Mécanisme de la réaction catalysée par les PMIs de type I : catalyse acido-basique mettant en jeu le Glu294.....	164
2.5. Conclusion .....	165
<b>B- STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE À HAUTE RÉOLUTION DES</b>	
<b>COMPLEXES hPGI-5PAED ET hPGI-5PAA.....</b>	<b>167</b>
1. Aspects expérimentaux .....	167
2. Résultats et discussions.....	168
2.1. Structure générale de la PGI humaine .....	168
2.2. Structures des complexes.....	170
2.3. Site actif du complexe hPGI-5PAED .....	173

2.4. Site actif du complexe hPGI-5PAA.....	175
2.5. Comparaison des deux complexes hPGI-5PAED et hPGI-5PAA.....	176
2.6. Conclusion .....	177
<b>C-TENTATIVES DE CRISTALLISATION DES COMPLEXES hPGI-5PADP ET hPGI-5PAF.....</b>	<b>178</b>
<b>CHAPITRE V .....</b>	<b>181</b>
<b>CONCEPTION D'UN BIOCAPTEUR ELECTROCHIMIQUE A BASE D'UN MONOSACCHARIDE POUR LA DETECTION DE L'AMF-PGI .....</b>	<b>181</b>
1. Introduction.....	183
2. Biocapteurs : pour une détection simple et rapide .....	184
3. Biocapteurs ampérométriques.....	185
4. Exemples de biocapteurs à base de sucres .....	185
5. Biocapteur à base du F6P pour la détection de la PGI du muscle de lapin.....	188
6. Biocapteur à base de 5PAED, <i>inhibiteur de l'AMF</i> .....	189
6.1. Choix des différents composants du biocapteur .....	189
6.2. Etapes de construction du biocapteur : .....	193
6.3. Elaboration du biocapteur et confirmation des modifications des surfaces .....	194
6.3.1. Activation de la surface d'or .....	194
6.3.2. Dépôt du film de polypyrrole.....	195
a) Mécanisme de polymérisation du pyrrole.....	195
b) Electrodeposition du pyrrole .....	195
6.3.3. Fonctionnalisation du polypyrrole par le PAMAM G2 .....	196
a) Mécanisme de greffage covalent du PAMAM G2 sur le polypyrrole.....	196
b) Electrodeposition du PAMAM G2 .....	197
6.3.4. Greffage de la sonde rédox.....	198
6.3.5. Greffage du biorécepteur .....	199
6.3.6. Blocage des esters libres du ferrocène par l'éthanolamine .....	200
6.4. Caractérisation des différentes étapes de construction du biocapteur .....	201
6.4.1. Les résultats de l'analyse par microscopie à force atomique (AFM) .....	201

6.4.2.	Les résultats de l'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) .....	202
6.4.3.	Analyse par spectroscopie de photoélectrons.....	203
6.4.4.	Analyse par spectroscopie infrarouge .....	205
6.5.	Performances analytiques du biocapteur .....	207
6.5.1.	Gamme de détection de l'AMF/PGI.....	207
6.5.2.	Limite de détection .....	208
6.6.	Sélectivité du biocapteur .....	209
7.	Bilan : preuve de concept validé.....	210
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>213</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>		<b>219</b>
1.	Synthèse organique .....	221
1.1.	Matériels et méthodes.....	221
1.2.	Synthèse des différents composés .....	221
Cf. pages suivantes. ....		221
1.2.1.	Synthèse de la 5-PAL <sup>160,162</sup> .....	222
1.2.2.	Synthèse du 5PAH <sup>160,186</sup> .....	223
1.2.3.	Synthèse du 5PACystine (1') .....	224
1.2.4.	Synthèse du 5PAMCystéamine (2).....	225
1.2.5.	Synthèse du 5PAIm (3).....	226
1.2.6.	Synthèse du 5PAMIm (4).....	227
1.2.7.	Synthèse du 5PAHis (5) .....	228
1.2.8.	Synthèse du 5PAPIm (6).....	229
1.2.9.	Synthèse du 5PAPy (7) .....	230
1.2.10.	Synthèse du 5PAF (8) .....	231
1.2.11.	Synthèse du 5PAT (9) .....	232
1.2.12.	Synthèse du 5PASufone (10).....	233
1.2.13.	Synthèse du 5PAED (11).....	234
1.2.14.	Synthèse du 5PADP (12).....	235
1.2.15.	Synthèse du 5PAHz <sup>160,186</sup> .....	236
2.	Tests enzymatiques .....	237

2.1.	Préparation des solutions .....	237
2.1.1.	Préparation du tampon HEPES 50 mM pH 7.1.....	237
2.1.2.	Préparation des solutions de substrats .....	237
2.1.3.	Préparation des solutions d'inhibiteurs.....	237
2.1.4.	Préparation des solutions d'enzymes .....	237
2.1.5.	Préparation de la solution de MgCl <sub>2</sub> 500 mM.....	238
2.1.6.	Préparation de la solution d'EDTA 50 mM.....	238
2.1.7.	Préparation de la solution de NADP <sup>+</sup> 40 mM.....	238
2.2.	Mode opératoire des différents tests cinétiques.....	238
2.2.1.	Méthode générale pour les tests PMI/PGI/G6PDH et PGI/G6PDH.....	238
2.2.2.	Mesure des activités spécifiques .....	239
2.2.3.	Mesure des IC <sub>50</sub> .....	241
2.2.4.	Mesures de K <sub>i</sub> et détermination de la nature de l'inhibition.....	241
2.2.5.	Contrôle de la validité du test à trois enzymes.....	242
3.	Surexpression de protéines .....	242
3.1.	Milieux de culture.....	242
3.2.	Souches bactériennes .....	243
3.3.	Tampons / hPGI.....	243
3.4.	Tampons / CaPMI.....	243
3.5.	Stocks de plasmides.....	244
3.6.	Purification de l'ADN .....	244
3.7.	Surexpression des protéines recombinantes - culture de 100 mL .....	245
3.7.1.	Lyse des bactéries .....	245
3.7.2.	Purification des protéines surexprimées .....	245
3.7.2.1.	Purification de CaPMI .....	245
3.7.2.2.	Purification de hPGI .....	246
3.8.	Gel SDS-PAGE .....	246
3.8.1.	Gel de séparation.....	246
3.8.2.	Gel de concentration.....	246

3.8.3. Migration et révélation .....	247
<b>ANNEXES .....</b>	<b>249</b>
1. Notions de cinétique enzymatique .....	251
2. Les méthodes électrochimiques utilisées .....	257
2.1. Les voltampérométries cyclique et à vague carrée .....	257
3. Méthodes d'analyse de surface .....	258
3.1. Spectroscopie de photoélectrons ou XPS .....	258
3.2. Microscope électronique à balayage (MEB) .....	259
3.3. Microscope à force atomique (AFM) .....	259
4. Données cristallographiques des structures obtenues .....	260
<b>PUBLICATIONS .....</b>	<b>263</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>265</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS

5PAA	5-phospho-D-arabinonate
5PAAm	5-phospho-D-arabinonamide
5PACystéamine	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-(sulfanyl)ethanamine
5PACystine	Bis[N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-(thio)ethanamine]
5PADP	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-3-(aminométhyl)ethanolamine
5PAED	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-aminoéthanamine
5PAEtOA	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-hydroxyéthylamine
5PAF	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-1-(furan-2-yl)methanamine
5PAGly	N-(5-phosphate -D-arabinoyl)glycine
5PAH	Acide 5-phospho-D-arabinonohydroxamique
5PAHis	N-(5-phosphate -D-arabinoyl)histamine
5PAHis	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)histamine
5PAHz	5-phospho-D-arabinonhydrazide
5PAIm	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-1-(imidazol-2-yl)methanamine
5PAMA	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)méthylamine
5PAMCystéamine	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-(methylsulfanyl)ethanamine
5PAMIm	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-1-(1-methylimidazol-2-yl)methanamine
5PAPIm	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-3-(imidazol-1-yl)propanamine
5PAPy	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-1-(pyridin-2-yl)méthanamine
5PASulfone	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-(methylsulfonyl)ethanamine
5PAT	N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-1-(thien-2-yl)methanamine
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
ACE	Angiotensin converting enzyme
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine triphosphate
AFM	Microscopie à force atomique
AMF	Facteur de motilité autocrine
AMFR	Récepteur du facteur de motilité autocrine
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine diphosphate
AuNP	Au nanoparticle
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BIS-TRIS	2,2-Bis(hydroxyméthyl)-2,2',2''-nitrioltriéthanol
Bs A	<i>Bacillus stearothermophilus A</i>
Bs B	<i>Bacillus stearothermophilus B</i>
BsPGI	Phosphoglucose isomérase de <i>Bacillus subtilis</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>

CA 15-3	Antigène du cancer 15-3
CaPMI	Phosphomannose isomerase de <i>C. albicans</i>
CDG	Carbohydre deficient glycoprotein
Con A	Concanavoline A
D <sub>2</sub> O	Oxyde de deutérium
DHAC	Histone désacétylase
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DMM	Médiateur de maturation et de différenciation
DmPMI	<i>Dehalococcoides mccartyi</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dol-P-Man	Dolichol phosphomannose
D-TH	Acide d-thréonohydroxamique
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E4P	4-phosphate-D-erythrose
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> R1
EcPMI	Phosphomannose isomérase de <i>Escherichia coli</i>
F6P	6-phosphate-D-fructose
FBP aldolase	Fructose-1,6-biphosphate aldolase
G6P	6-phosphate-D-glucose
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GCE	Glassy carbon electrode
GDI-β	<i>GDP dissociation inhibitor</i> -β
GDP-fucose	Guanosine-diphospho-fucose
GDP-mannose	Guanosine-diphospho-D-mannose
GLUT	Transporteur de glucose
GMP	Guanosine-5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase
Gp-78	Glycoprotéine de 78 kDa
GPI	Glycosyl phosphatidyl inositol
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMG CoA réductase	Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase
HRP	Peroxydase de raifort
HSV	Herpes simplex virus
IHE	Intermédiaire de haute énergie
IMAC	Chromatographie d'affinité de métal immobilisé
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IR-FT	Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier
JNK1	C-Jun N-terminal protein kinase 1
JNK2	C-Jun N-terminal protein kinase 1
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
$K_i$	Constante d'inhibition
$K_m$	Constante de Michaelis

<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
Lac	Opéron Lactose
LacI	Inhibiteur de l'opéron lactose
LB	Luria bertani
M1P	1-phosphate-D-mannose
M6P	6-phosphate-D-mannose
Maldi-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
MALS	Multi Angle Light Scattering
MANT	Transporteur de mannose
MAPK	Mitogen-activated protein <i>kinase</i>
MEB	Microscopie électronique à balayage
MM	Masse molaire
MMP	<i>Matrix Metalloprotease</i>
MWNT	Multiwalled carbon nanotube
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
Ni-NTA	Nickel-nitriloacetic acid
NLK	Neuroleukine
PAMAM	Polyamidoamine
PaPMI	Phosphomannose isomérase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDB	Protein data bank
PEG	Polyéthylène glycol
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PFK	Phosphofructokinase
PGH	Acide phosphoglycolohydroxamique
PGI	Phosphoglucose isomérase
PHI	Phosphohexose isomérase
PIR	Proteins with internal repeats
PKC	Protéine kinase C
PMI	Phosphomannose isomérase
PMM	Phosphomannomutase
Ppy	Polypyrrole
QH <sub>2</sub>	Hydroquinone
R5P	5-phosphate-D-ribose
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RmPGI	Rabbit muscle phosphoglucose isomérase
RPI	Ribose phosphate isomérase
Ru5P	5-phosphate-D-ribulose
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SAHA	Acide subérylanilide hydroxamique
ScPGI	Phosphoglucose isomérase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

ScPGI	Phosphoglucose isomérase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScPMI	Phosphomannose isomérase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIBFA	Sum of Interactions Between Fragments Ab initio computed
SIDA	Syndrôme d'immunodéficience acquise
SM-HR (ESI-)	Spectométrie de masse à haute résolution (electrospray en mode négatif)
StPMI	Phosphomannose isomérase de <i>Salmonella typhimurium</i>
Structure 3D	Structure tridimensionnelle
SWV	Square wave
<i>Tb</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TB	Terrific broth
TIM	Triose phosphate isomérase
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
$V^{app}$	Vitesse apparente
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
XI	Xylose isomérase
XPS	X-Ray photoelectron spectroscopy
ZBG	Zinc binding group

## LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1. Réaction catalysée par les aldose-cétose isomérases. ....	33
Schéma 2. Les deux isomérases I et II proposées par Gottschalk en 1947.....	34
Schéma 3. La PMI, enzyme isomérisant le M6P en G6P ou en F6P, d'après Slein. <sup>5</sup> .....	34
Schéma 4. Réactions catalysées par la PMI et la PGI.....	35
Schéma 5. Mécanisme de transfert d'hydrogène par transfert de proton ou transfert d'hydrure. Exemple d'un marquage isotopique en C2. ....	36
Schéma 6. Réaction catalysée par la PMI : passage par un énediol(ate). L'implication de l'enzyme dans les étapes d'ouverture et de fermeture du cycle n'a pas été démontrée.....	37
Schéma 7. Voie de biosynthèse du GDP-D-mannose à partir du F6P. PMI = phosphomannose isomérase, PMM = phosphomannomutase, GMP = guanosine-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase, GTP = guanosine triphosphate, Ppi = pyrophosphate, F6P = 6-phosphate D- fructose, M6P = 6-phosphate D-mannose,.....	41
Schéma 8. Mécanisme proposé pour l'isomérisation F6P-M6P catalysée par la PMI. <sup>53</sup> .....	51
Schéma 9. Rôle de la PMI chez l'homme et origine du mannose utilisé pour la synthèse des glycoprotéines. ....	53
Schéma 10. Principe du traitement du CDG type Ib chez l'homme par un apport exogène de D- mannose. G : glucose, M : mannose, G6P : 6-phosphate D-glucose, M6P : 6-phosphate D- mannose, GLUTx : transporteur de glucose, HK ou HK' : hexokinase, MANT : transporteur de mannose, PGI : phosphoglucose isomérase, PMI : phosphomannose isomérase. ....	54
Schéma 11. Principe de la bithérapie antifongique : association inhibiteur de PMI + D-mannose exogène. ....	61
Schéma 12. Réaction catalysée par la PGI : passage par un intermédiaire de haute énergie (IHE) de type.....	62
Schéma 13. Mécanisme de la réaction d'isomérisation catalysée par la PGI (Salmon, d'après Jeffery et coll. <sup>103,104</sup> ).....	71
Schéma 14. Les différentes étapes de la glycolyse. La glycolyse se divise en deux phases : la phase de préparation où le glucose est transformé en deux trioses phosphates avec consommation d'énergie ( <b>phase I</b> et la phase de restitution qui produit de l'énergie sous forme d'ATP ( <b>phase II</b> )). ....	72

Schéma 15. Inhibiteurs analogues de l'IHE 1,2-cis-ènediolate. ....	83
Schéma 16. Structure des inhibiteurs de l'activité AMF de la PGI. ....	84
Schéma 17. Approche utilisée pour la conception de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la PMI et de la PGI. ....	85
Schéma 18. Réactions catalysées par la triose phosphate isomérase (TIM) et la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBP) et leur inhibiteur PGH. ....	91
Schéma 19. Réactions catalysées par la PGI et la PMI et les analogues de leur IHE (5PAA et 5PAH). ....	92
Schéma 20. Approche utilisée pour la conception de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la PMI et de la PGI. ....	94
Schéma 21. Structure des inhibiteurs de l'ACE. Les fonctions ligands du zinc sont représentées en rouge. ....	94
Schéma 22. Structure des inhibiteurs hydroxamates de métalloprotéases. ....	95
Schéma 23. Mode de coordination du zinc des histones désacétylases par les deux inhibiteurs, l'acide suberoylanilide hydroxamique et le largazole. <sup>180</sup> ....	96
Schéma 24. Structure des composés à fonctions mercapto ou sulfure. ....	98
Schéma 25. Structure des composés à groupement imidazole et du composé pyridinique. ....	99
Schéma 26. Structure des dérivés furane, thiophène et sulfonique. ....	99
Schéma 27. Structure des composés à fonction amine terminale. ....	100
Schéma 28. Synthèse du synthon 5PAL. <sup>162</sup> ....	101
Schéma 29. Molécules déjà synthétisées au laboratoire à partir du synthon 5PAL. <sup>187</sup> ....	102
Schéma 30. Schéma général de synthèse des différents inhibiteurs ciblés à partir du synthon 5PAL. ....	102
Schéma 31. Structures numérotées du 5PAED(11) et du 5PAPy(7). ....	103
Schéma 32. Spectre de RMN du <sup>13</sup> C du composé de type pyridine, 5PAPy (7). ....	103
Schéma 33. Structure de la forme oxydée de la N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-(sulfanyl)ethanamine, nommée 5PACystine (1'). ....	104
Schéma 34. Exemple de production d'une molécule d'ADN recombinante grâce à l'enzyme de .....	108
Schéma 35. Principe de la production de protéine recombinante. ....	109

Schéma 36. Principe du test enzymatique PGI/G6PDH pour la mesure de l'activité PGI ; ecd : étape cinétiquement déterminante.....	124
Schéma 37. Principe du test enzymatique PMI/PGI/G6PDH pour la mesure de l'activité PMI ; ecd : étape cinétiquement déterminante.....	125
Schéma 38. Structure des dérivés à groupement imidazole.....	131
Schéma 39. Structures du 5PAH et du 5PAHz. Les groupements distincts sont marqués en rouge. .....	148
Schéma 40. Détermination graphique de la constante d'inhibition $K_i$ du 5PAHz vs. CaPMI selon Lineweaver-Burk. ....	149
Schéma 41. Rôle catalytique du zinc dans la réaction catalysée par CaPMI via son interaction bidentate avec les substrats de l'enzyme et l'IHE. ....	155
Schéma 42. Structure du DAH, mime non phosphorylé du 5PAH.....	158
Schéma 43. Mécanisme de l'isomérisation M6P-F6P catalysée par la PMI de <i>C. albicans</i> . ....	164
Schéma 44. Structures de l'IHE « 1,2-cis-ènediol(ate) » et de 5PAED ( <b>11</b> ) ; valeur de sa constante d'inhibition vs. PGI humaine.....	167
Schéma 45. Mécanisme proposé pour l'hydrolyse du 5PAED.....	172
Schéma 46. Schéma général du biocapteur proposé et de ses différents constituants.....	190
Schéma 47. Structures de l'IHE « 1,2-cis-ènediol(ate) » et de 5PAED ( <b>11</b> ) ; valeur de sa constante d'inhibition vs. PGI humaine.....	191
Schéma 48. Les différentes étapes de construction du biocapteur.....	193
Schéma 49. Mécanisme de formation du film de polypyrrole.....	195
Schéma 50. Mécanisme de greffage covalent du PAMAM G2 sur le polypyrrole. ....	197
Schéma 51. Principe du test enzymatique PMI/PGI/G6PDH pour la mesure de l'activité PMI.....	239
Schéma 52. Principe du test enzymatique PGI/G6PDH pour la mesure de l'activité PGI. ....	239
Schéma 53. Représentation de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration initiale du substrat. ....	252
Schéma 54. Représentation de la vitesse maximale d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration d'enzyme à concentration saturante du substrat.....	252
Schéma 55. Représentation de Lineweaver-Burk d'une cinétique de type de Michaelis-Menten. .....	253

Schéma 56. Schéma de la cinétique enzymatique dans le cas d'une inhibition compétitive selon Michaelis-Menten. ....	255
Schéma 57. Représentation de Lineweaver-Burk d'une inhibition compétitive. ....	256
Schéma 58. Représentation graphique secondaire de la pente $K_m/V_{max}$ en fonction de la concentration en inhibiteur [I]. ....	256

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Alignement de séquences de PMI de type I provenant de six organismes différents ( <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>H. sapiens</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>B. subtilis</i> ). La structure secondaire ainsi que la numérotation affichée correspondent au CaPMI. Les résidus identiques dans toutes les séquences sont représentés en caractère blanc et surlignés en rouge. Les résidus similaires sont surlignés en jaune. Les ligands du zinc sont marqués par un astérisque. Les autres acides aminés importants du site actif sont marqués par un triangle. <sup>27,43</sup> Cet alignement a été réalisé avec CLUSTALW et a été illustré avec ESPript. ....	40
Figure 2. Le motif commun aux PMI de type I et II (acides aminés en caractère gras). ....	41
Figure 3. Structure générale de CaPMI et des résidus de son site actif (PDB 1PMI). a) Structure de la PMI de <i>C. albicans</i> à 1.7 Å. On distingue trois domaines : le domaine hélicoïdal (en violet), le domaine C-terminal (en rouge) et le domaine catalytique contenant un atome de zinc au centre (en jaune). b) Les acides aminés du site actif : l'atome de zinc est représenté en bleu et les molécules d'eau le sont en rouge. <sup>27</sup> ....	43
Figure 4. La sphère de coordination du zinc au site actif de la PMI de <i>C. albicans</i> d'après Cleasby et al. ....	44
Figure 5. Mécanisme de la réaction catalysée par la PMI proposé par Gracy et Noltmann en 1968. ....	45
Figure 6. Structure du complexe CaPMI-5PAH obtenu par le logiciel SIBFA. <sup>53</sup> ....	47
Figure 7. Représentation du site actif des complexes SIBFA de CaPMI avec le 6-phosphate-β-D-mannopyranose (β-M6P) et le 6-phosphate-α-D-mannopyranose (α-M6P). <sup>53</sup> ....	48
Figure 8. Représentation du site actif des complexes SIBFA de la PMI de <i>C. albicans</i> avec le M6P sous sa forme linéaire avec (A) et sans (B) molécule d'eau. <sup>53</sup> ....	50
Figure 9. Organisation moléculaire de la paroi de <i>Candida albicans</i> d'après Netea et al. <sup>60</sup> ....	55

Figure 10. Structure d'un N-glycane chez candida albicans : un squelette polymannosidique. Mnn 1et 2 , M-pol I et II, Bmt et Och1 sont des mannosyltransférases. Mnn4, Mnt 3et 5 sont des phosphomannosyltransférases. Pmr1 est un transporteur de Mn <sup>2+</sup> dont dépend l'activité des différentes mannosyltransférases. <sup>68</sup> .....	57
Figure 11. Principales étapes de la formation d'un biofilm de C. albicans. La phase initiale dite d'adhérence est suivie d'une phase de croissance qui se distingue par la production d'une matrice polysaccharidique extracellulaire et par le développement de formes mycéliennes, puis d'une phase de maturation du biofilm néo-formé et enfin d'une phase de dispersion de microorganismes à partir du biofilm. <sup>76</sup> .....	59
Figure 12. Alignements de séquences de PGI provenant de 6 organismes différents d'après Jeffery et coll. Les résidus identiques à ceux de RmPGI (PGI du muscle de lapin) sont surlignés en bleu et les résidus du site actif interagissant avec le 6-phospho-D-gluconate (un inhibiteur de la RmPGI <sup>92</sup> ) sont surlignés en rouge.....	63
Figure 13. Structure tridimensionnelle d'un monomère de la PGI du porc. On distingue deux parties distinctes : le petit (a) et le grand (b) domaine, chacun formé de feuillets β entourés par des hélices α (PDB 1PGI). <sup>95,96</sup> .....	64
Figure 14. Structure tridimensionnelle d'un monomère de l'AMF-PGI (PDB 1IAT). <sup>98</sup> .....	65
Figure 15. Structure du complexe de l'AMF-PGI avec l'ion sulfate (a) et le β-méthylmercaptoéthanol (b) d'après .....	66
Figure 16. Structure du complexe de l'AMF-PGI avec l'E4P (PDB 1IRI). <sup>100</sup> .....	67
Figure 17. Structure des complexes de (a) l'AMF-PGI (PDB 1NUH) <sup>101</sup> et de (b) la RmPGI (PDB 1G98) <sup>102</sup> avec le 5PAA. ....	67
Figure 18. Structure du complexe de la RmPGI avec le 5PAH (PDB 1KOJ). <sup>103</sup> .....	68
Figure 19. Structure de RmPGI complexée avec le F6P (PDB 1HOX). <sup>104</sup> .....	69
Figure 20. L'interaction AMF-AMFR implique la chaîne glycosylée du récepteur.....	79
Figure 21. Réponse d'une cellule tumorale suite à une stimulation par l'AMF. <sup>150</sup> Activation de Rac1 et RhoA, protéines jouant un rôle clé dans l'organisation du cytosquelette d'actine et la motilité cellulaire. ....	80
Figure 22. Structure du complexe de la métalloprotéase-9 avec un inhibiteur de type reverse hydroxamate. <sup>177</sup> .....	95
Figure 23. Carte du vecteur d'expression pRSET-C. ....	110

Figure 24. Interaction entre les billes Ni-NTA agarose et les résidus histidines d'une protéine	112
Figure 25. Photo du gel d'électrophorèse de CaPMI à l'issue de la chromatographie d'échange d'ions.....	114
Figure 26. Image du western blot obtenu pour CaPMI. PM : marqueur de poids moléculaire, I : induit, S : surnageant, C : culot.....	114
Figure 27. Les différents fragments peptidiques théoriques issus de la digestion de CaPMI par la trypsine.....	115
Figure 28. Recouvrement de la séquence de CaPMI avec les séquences peptidiques (en rouge) obtenues par digestion avec la trypsine : un taux de recouvrement de 39% est obtenu. ....	115
Figure 29. Courbe obtenue pour CaPMI avec la méthode de diffusion de lumière multiangulaire MALS : la protéine est monomérique de 57.870 kDa. ....	116
Figure 30. Profil d'élution de la chromatographie par filtration sur gel de hPGI.....	117
Figure 31. Photo du gel d'électrophorèse de hPGI à l'issue de la chromatographie par filtration sur gel.....	118
Figure 32. Courbe obtenue pour hPGI avec la méthode MALS.....	118
Figure 33. Interaction $Zn^{2+}$ - imidazole. <sup>192</sup> .....	131
Figure 34. Représentation schématique de la méthode de la diffusion de vapeur en goutte suspendue (à gauche) et assise (à droite) utilisées dans les essais de cristallisation.....	146
Figure 35. Image de la goutte contenant les cristaux du complexe CaPMI-5PAHz.....	147
Figure 36. Structure du complexe CaPMI-5PAHz (code pdb : 5nw7) montrant la densité électronique autour du ligand « 5PAHz ». ....	150
Figure 37. Structure générale de CaPMI-5PAHz (5nw7) avec les différents résidus du site actif (l'inhibiteur n'est pas représenté par soucis de clarté). On distingue trois domaines, le domaine hélicoïdal (en vert), le domine C-terminal (en rouge) et le domaine catalytique contenant le ligand et l'atome de zinc au centre (en jaune). Les résidus du site actif sont représentés à droite de la figure : le zinc en gris et les molécules d'eau en rouge.....	151
Figure 38. Image globale de la superposition de CaPMI (1PMI, en bleu) et du complexe CaPMI-5PAHz (5NW7, en doré). Le zoom à droite de la figure montre la superposition des ligands du zinc.....	151
Figure 39. Mouvements des résidus du site de CaPMI engendrés par la fixation du 5PAHz (CaPMI en cyan et CaPMI-5APHz en noir). ....	152

Figure 40. Ensemble des interactions au site actif du complexe 5PAHz-CaPMI (PDB 5NW7).	153
Figure 41. Les ligands du zinc dans le complexe CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7). Le 5PAHz coordine le zinc selon le mode bidentate.	154
Figure 42. A) Sphère de coordination du zinc dans CaPMI seule (1pmi) <sup>27</sup> . B) Superposition des ligands du zinc de CaPMI seule (1pmi, en bleu) et du complexe CaPMI-5PAHz (5nw7, en noir).	156
Figure 43. Site de fixation du groupement phosphate.	157
Figure 44. Mouvements au niveau des ligands du phosphate engendrés par la fixation de 5PAHz : CaPMI (PDB 1PMI) en cyan et CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7) en noir. Les traits pointillés rose indiquent les déplacements des résidus ligands du phosphate (distances en Å).	159
Figure 45. Site de fixation du squelette polyhydroxylé et de la partie tête de l'inhibiteur.	160
Figure 46. Comparaison des distances séparant la Lys136 et le Glu294 de l'azote N1 et du carbone C1 du 5PAHz.	161
Figure 47. Superposition des structures de CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7) et de BsPMI-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (PDB 1QWR).	162
Figure 48. Mouvements au niveau des ligands de la partie tête et du squelette polhydroxylé (CaPMI en cyan et CaPMI-5PAHz en noir). Les traits en pointillés rose indiquent les déplacements des résidus (distances en Å).	163
Figure 49. Cristaux de forme cubique (gauche) ou en forme de baguettes (droite) de la PGI humaine co-cristallisée avec le 5PAED.	168
Figure 50. A) Goutte contenant le cristal du complexe hPGI-5PAED ( <b>11</b> ). B) Ensemble d'unités protéiques composants le motif cristallin.	169
Figure 51. Structure générale de la phosphoglucose isomérase humaine (complexe hPGI-5PAED). (A) Structure d'un dimère de hPGI. (B) Structure d'un monomère de hPGI : on distingue trois domaines, le grand domaine (jaune), le petit domaine (bleu) et le domaine C-terminal (orange).	169
Figure 52. Densité électronique de 5PAED (A) et de 5PAA (B) pour la structure du complexe hPGI-inhibiteur obtenu par co-cristallisation (zoom sur la partie tête).	170
Figure 53. Densité électronique autour du 5PAA dans le complexe hPGI-5PAA (zoom sur la partie tête).	171

Figure 54. Spectres de RMN du $^{13}\text{C}$ de 5PAED dans $\text{D}_2\text{O}$ à différents intervalles de temps ( $t = 0, 3$ et $6$ h).	172
Figure 55. Ensemble des interactions au site actif du complexe hPGI-5PAED. Les traits en pointillés violet indiquent les liaisons électrostatiques (liaisons hydrogène) détectées (distances en Å).	174
Figure 56. Ensemble des interactions au site actif du complexe hPGI-5PAA. Les traits en pointillés violet indiquent les liaisons électrostatiques (liaisons hydrogène) détectées (distances en Å).	175
Figure 57. Superposition structurale des deux complexes hPGI-5PAED (en cyan) et hPGI-5PAA (en vert).	177
Figure 58. Spectres de RMN du $^{13}\text{C}$ du 5PAF ( <b>8</b> ) à différents intervalles de temps ( $t = 0, 7$ et $10$ h).	179
Figure 59. Présentation schématique d'un biocapteur et de ses différents constituants.	184
Figure 60. Représentation schématique du biocapteur électrochimique pour le dosage compétitif de l'expression du mannose sur les cellules cancéreuses. $\text{QH}_2$ : hydroquinone, HRP : peroxydase de raifort, Con A : concanavoline A, GCE : glassy carbon electrode, AuNP : Au nanoparticle/nanoparticules d'or, MWNT : multiwalled carbon nanotube/multicouches de nanotubes de carbone.	187
Figure 61. Les différentes étapes de construction du biocapteur électrochimique pour la détection du peptide $\beta$ -amyloïde d'après Chikae et al. <sup>222</sup>	187
Figure 62. Les différentes étapes de construction du biocapteur à base de F6P pour la détection de RmPGI. <sup>172</sup>	188
Figure 63. Visualisation du site actif du complexe hPGI-5PAED par le logiciel Pymol.	192
Figure 64. Analyse par voltamétrie cyclique des surfaces d'or avant (A) et après (B) activation par $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0.5 M.	194
Figure 65. Electrodeposition du polypyrrole. (A) Voltammogramme montrant l'électrodeposition du pyrrole. Conditions : pyrrole 20 mM dans eau/ $\text{LiClO}_4$ 0.5 M, 2 cycles, 50 mV/s (B) Analyse de la surface d'or par voltamétrie cyclique avant et après greffage. Conditions : PBS 10 mM / pH 7.4 / 3 cycles à 50 mV.s <sup>-1</sup> .	196
Figure 66. Electrodeposition du PAMAM et analyse par voltamétrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . (A) Voltammogramme montrant le greffage du PAMAM. Conditions : PAMAM 1 mM dans	

eau/LiClO <sub>4</sub> 0.5 M , 3 cycles, 50 mV/s (B) Analyse de la surface d'or par voltamétrie cyclique avant et après greffage. Conditions : [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5 mM / 3 cycles / 50 mV.s <sup>-1</sup> .	198
Figure 67. Analyse de la surface d'or par voltamétrie cyclique avant (A) et après (B) greffage du ferrocène. Conditions : PBS 10 mM / pH 7.4 / 50 mV.s <sup>-1</sup> .	198
Figure 68. Analyse de la surface d'or par voltamétrie à vague carrée avant (A) et après (B) greffage du 5PAED.	199
Figure 69. Analyse de la surface d'or par voltamétrie à vague carrée avant (A) et après (B) greffage de l'éthanolamine. Conditions : PBS 10 mM / pH 7.4 / fréquence = 2 Hz.	200
Figure 70. Images obtenues par AFM pour les différentes étapes de construction du biocapteur.	201
Figure 71. Images obtenues par microscopie électronique à balayage pour les différentes étapes de construction du biocapteur.	202
Figure 72. Résultats de l'analyse par spectroscopie de photoélectrons pour les étapes Ppy et Ppy-PAMAM dans les deux régions du carbone et de l'azote.	204
Figure 73. Spectres obtenus par XPS après greffage du ferrocène et du 5PAED dans la région du fer et du phosphore.	205
Figure 74. Spectres infrarouge à transformée de Fourier du Ppy et du Ppy modifié par le PAMAM.	205
Figure 75. Comparaisons du spectre infrarouge à transformée de fourier du PAMAM avec celui obtenu après greffage du ferrocène et du 5PAED (Fc-5PAED).	206
Figure 76. Voltammogramme à vague carrée montrant la gamme de détection de l'AMF.	207
Figure 77. Courbe de calibration en échelle logarithmique établie à partir des résultats de la détection par voltamétrie à vague carrée.	208
Figure 78. Voltammogramme à vague carré montrant la sélectivité du biocapteur vs. de l'AMF par rapport à la G6PDH utilisées à 100 pM.	209
Figure 79. Montage d'une cellule voltampérométrique à trois électrodes.	257
Figure 80. Allure du potentiel imposé en voltampérométrie à onde carrée (A) et cyclique (B).	258
Figure 81. Principe de la microscopie à force atomique.	259

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les différents types de PMI. ....	38
Tableau 2. Quelques propriétés de PMI de type I provenant de différents organismes. ....	39
Tableau 3. Homologies de séquences entre des PGI provenant de différentes sources. ....	62
Tableau 4. Valeurs de $K_i$ ou $IC_{50}$ obtenues avec les inhibiteurs analogues de l'IHE sur la PGI et la PMI ( $\mu M$ ). ....	83
Tableau 5. Liste des principaux ligands de zinc. ....	97
Tableau 6. Exemples de médicaments agissant comme inhibiteurs d'enzymes. ....	123
Tableau 7. Résultats d'inhibition obtenus avec le 5PAH et le 5PAA sur la PMI de <i>Candida albicans</i> , la PGI humaine et la PGI du muscle de lapin. ....	127
Tableau 8. Résultats d'inhibition obtenus sur la PMI et la PGI avec les composés 5PACystine (1') et 5PAMCystéamine (2). ....	128
Tableau 9. Résultats d'inhibition obtenus sur la PGI et la PMI avec les dérivés à groupement imidazole. ....	132
Tableau 10. Résultats d'inhibition obtenus sur la PGI et la PMI avec les dérivés furane (5PAF, 8) et thiophène (5PAT, 9). ....	135
Tableau 11. Résultats d'inhibition obtenus sur la PGI avec les dérivés 5PAED (11) et 5PADP (12). ....	138
Tableau 12. Comparaison des propriétés des biocapteurs à base du F6P et à base du 5PAED pour la détection de RmPGI et de hPGI respectivement. ....	211
Tableau 13. Volumes utilisés pour la mesure des activités spécifiques des solutions I/1000, II/2000, III/2000. ....	240
Tableau 14. Protocole expérimental suivi pour la mesure de l' $IC_{50}$ du 5PAMIm vs PGI du muscle de lapin. ....	241
Tableau 15. Exemple d'une série de mesures pour la détermination du $K_i$ du 5PAF vs. PGI du muscle de lapin. ....	241
Tableau 16. Mesures de contrôle réalisées dans le cas de l'inhibition de la PMI d' <i>E. coli</i> par le dérivé 5PAT. ....	242
Tableau 17. Les données cristallographiques de la structure 3D du complexe CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7). ....	261

Tableau 18. Les données de raffinement de la structure 3D du complexe CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7).....	261
Tableau 19. Les données cristallographiques de la structure 3D du complexe hPGI-5PAED. ..	262
Tableau 20. Les données de raffinement de la structure 3D du complexe hPGI-5PAED. ....	262

## LISTE DES GRAPHES

Graphe 1. Détermination graphique du $K_i$ de 5PAH vs CaPMI selon Lineweaver-Burk. Le graphe en insert représente la pente de chaque droite du graphe primaire en fonction de la concentration en inhibiteur, l'abscisse à l'origine donnant la valeur de $K_i$ . ....	127
Graphe 2. Détermination graphique de l'IC50 du 5PACystine ( <b>1'</b> ) sur RmPGI. Conditions : [F6P] = 100 $\mu$ M, tampon HEPES 50 mM, 25 °C. La ligne continue correspond à une régression non-linéaire définie pour une inhibition compétitive (voir partie expérimentale).....	129
Graphe 3. Détermination graphique de l'IC50 du 5PACystéamine ( <b>2</b> ) sur RmPGI. Conditions : [F6P] = 100 $\mu$ M, tampon HEPES 50 mM, 25 °C. La ligne continue correspond à une régression non-linéaire définie pour une inhibition compétitive (voir partie expérimentale).....	130
Graphe 4. Détermination graphique de l'IC50 du 5PAMIm ( <b>4</b> ) sur hPGI. Conditions : [F6P] = 100 $\mu$ M, tampon HEPES 50 mM, 25 °C. La ligne continue correspond à une régression non-linéaire définie pour une inhibition compétitive (voir partie expérimentale). ....	133
Graphe 5 : Détermination graphique de l'IC50 du 5PAHis ( <b>6</b> ) sur RmPGI. Conditions : [F6P] = 100 $\mu$ M, tampon HEPES 50 mM, 25 °C. La ligne continue correspond à une régression non-linéaire définie pour une inhibition compétitive (voir partie expérimentale). ....	134
Graphe 6. Détermination graphique des constantes d'inhibition $K_i$ et $K_i'$ (5PAF « <b>8</b> » vs hPGI) selon Lineweaver-Burk. ....	137
Graphe 7. Détermination graphique des constantes d'inhibition $K_i$ et $K_i'$ (5PAED <b>11</b> vs hPGI) selon Lineweaver-Burk. ....	139
Graphe 8. Mesure de l'activité spécifique d'une solution de G6PDH (III/1000). ....	240



## AVANT-PROPOS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de l'Equipe de Chimie Bioorganique et Bioinorganique (ECBB) à l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO) sous la direction du Prof. Laurent Salmon dans le cadre de la thématique *Inhibiteurs d'aldose-cétose isomérases : aspects structuraux, mécanistiques et thérapeutiques* développée au laboratoire. Le travail de thèse présenté dans ce rapport a pour objet l'étude de deux enzymes de la classe des aldose-cétose isomérases : la phosphomannose isomérase de *Candida albicans* (CaPMI), impliquée dans les infections fongiques appelées candidoses, et la phosphoglucose isomérase humaine (hPGI), connue également sous le nom de facteur de motilité autocrine (AMF), un biomarqueur validé de cancers métastatiques. Étant donné le rôle que jouent CaPMI dans la survie de *Candida albicans* et celui de l'AMF-PGI dans le développement de cancers métastatiques chez l'homme, ces deux enzymes représentent des cibles thérapeutiques potentielles pour développer respectivement de nouveaux antifongiques et anti-métastatiques. L'obtention de structures tridimensionnelles de complexes enzyme – inhibiteur présente des intérêts mécanistique et thérapeutique indéniables, notamment dans le cas de la phosphomannose isomérase de *Candida albicans* pour laquelle aucune structure tridimensionnelle avec un inhibiteur ou un substrat au site actif n'a été décrit dans la littérature. De même, la mise au point de nouveaux dispositifs pour le diagnostic précoce de biomarqueurs cancéreux présente un intérêt thérapeutique évident. Ce manuscrit rapporte ainsi : 1) la synthèse de nouveaux inhibiteurs potentiels de la phosphomannose isomérase de *Candida albicans* et de la phosphoglucose isomérase humaine, 2) la surexpression et la purification des deux cibles enzymatiques, 3) l'évaluation cinétique des inhibiteurs synthétisés sur les deux enzymes, 4) la cristallisation et la résolution de deux structures tridimensionnelles à haute résolution obtenues par diffraction des rayons X de complexes enzyme – inhibiteur et 5) la conception d'un biocapteur électrochimique à partir d'un des inhibiteurs synthétisés pour la détection du facteur de motilité autocrine AMF dans le plasma humain.



## **INTRODUCTION**

**GÉNÉRALITÉS SUR LES ALDOSE-CÉTOSE ISOMÉRASES :  
PRÉSENTATION DES PHOSPHOMANNOSE ET DES  
PHOSPHOGLUCOSE ISOMÉRASES ET OBJECTIFS DE LA  
THÈSE**



# 1. Les phosphomannose et phosphoglucose isomérase : de la classe des aldose-cétose isomérase

Les aldose-cétose isomérase (EC 5.3.1.X) sont des oxydoréductase intramoléculaire catalysant l'interconversion réversible entre un aldose et un cétose, selon un mécanisme de transfert d'hydrogène, entre les deux carbone C1 et C2 d'une part, et entre les deux oxygène O1 et O2 d'autre part (Schéma 1).



Schéma 1. Réaction catalysée par les aldose-cétose isomérase.

A ce jour, 35 enzymes appartenant à cette famille sont référencées, dont les plus connues sont :

- La D-xylose isomérase XI (EC 5.3.1.5) catalyse l'isomérisation réversible du D-xylose en D-xylulose. Elle catalyse également la conversion du D-glucose en D-fructose pour la production de sirops de maïs à haute teneur en fructose à l'échelle industrielle.<sup>1</sup> Cette enzyme a montré également un intérêt thérapeutique en réduisant les symptômes associés au syndrome de la malabsorption du fructose.<sup>2</sup>
- La ribose phosphate isomérase RPI (EC 5.3.1.6) est impliquée dans la voie des pentoses phosphates. Elle catalyse l'isomérisation réversible du 5-phosphate D-ribose (R5P) en 5-phosphate D-ribulose (Ru5P).
- La triose phosphate isomérase TIM (EC 5.3.1.1) et la phosphoglucose isomérase PGI (EC 5.3.1.9) sont impliquées dans la glycolyse.
- La phosphomannose isomérase PMI (EC 5.3.1.8) est située à un carrefour métabolique entre la glycolyse et le métabolisme du mannose.

### 1.1. Découverte des phosphomannose et phosphoglucose isomérases

La phosphoglucose isomérase (PGI) a été découverte pour la première fois par Lohmann en 1933.<sup>3</sup> Elle a longtemps été connue sous le nom « d'isomérase de Lohmann » catalysant l'interconversion réversible entre le 6-phosphate-D-glucose (G6P) et le 6-phosphate-D-fructose (F6P, Schéma 2).

En 1947, Gottschalk a proposé, lors des études de l'effet de la température sur la vitesse de fermentation du glucose et du mannose, l'existence de deux types d'isomérases I et II ayant pour fonction de convertir les 6-phosphate aldohexoses en un produit commun, le 6-phosphate D-fructose (Schéma 2).<sup>4</sup>

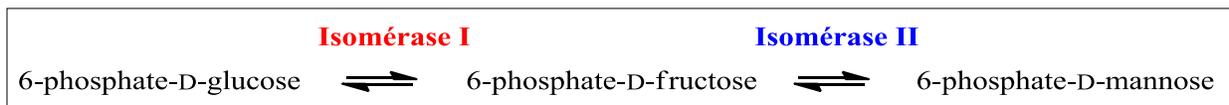


Schéma 2. Les deux isomérases I et II proposées par Gottschalk en 1947.

Plus tard, la distinction entre la PMI et la PGI a été établie par Slein en 1950 qui a réussi à purifier les deux enzymes à partir du muscle du lapin.<sup>5</sup> La PMI a été décrite comme isomérisant le 6-phosphate-D-mannose (M6P) en deux stéréoisomères possibles, le G6P ou le F6P (Schéma 3). Le produit de la réaction catalysée par la PMI est demeuré inconnu, l'enzyme n'ayant pas pu être isolée totalement sans PGI.

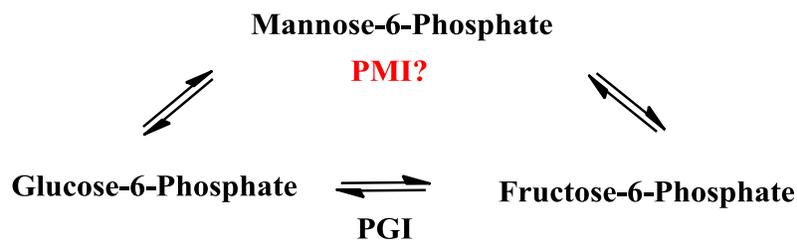


Schéma 3. La PMI, enzyme isomérisant le M6P en G6P ou en F6P, d'après Slein.<sup>5</sup>

En 1958, l'interconversion réversible entre le F6P et le M6P catalysée par la phosphomannose isomérase a été décrite définitivement par Noltmann et Bruns qui ont réussi à purifier la PMI de levure de bière exempte de PGI.<sup>6</sup>

La PMI et la PGI auxquelles nous nous intéressons catalysent donc l'isomérisation réversible du 6-phosphate D-fructose (F6P), respectivement en 6-phosphate D-mannose (M6P) et en 6-phosphate D-glucose (G6P). Ces deux réactions procèdent d'une catalyse acido-basique (transfert de proton entre C1 et C2) au cours de laquelle se forment des intermédiaires anioniques de type 1,2-*cis*-ènediolate (Schéma 4).<sup>7-9</sup>

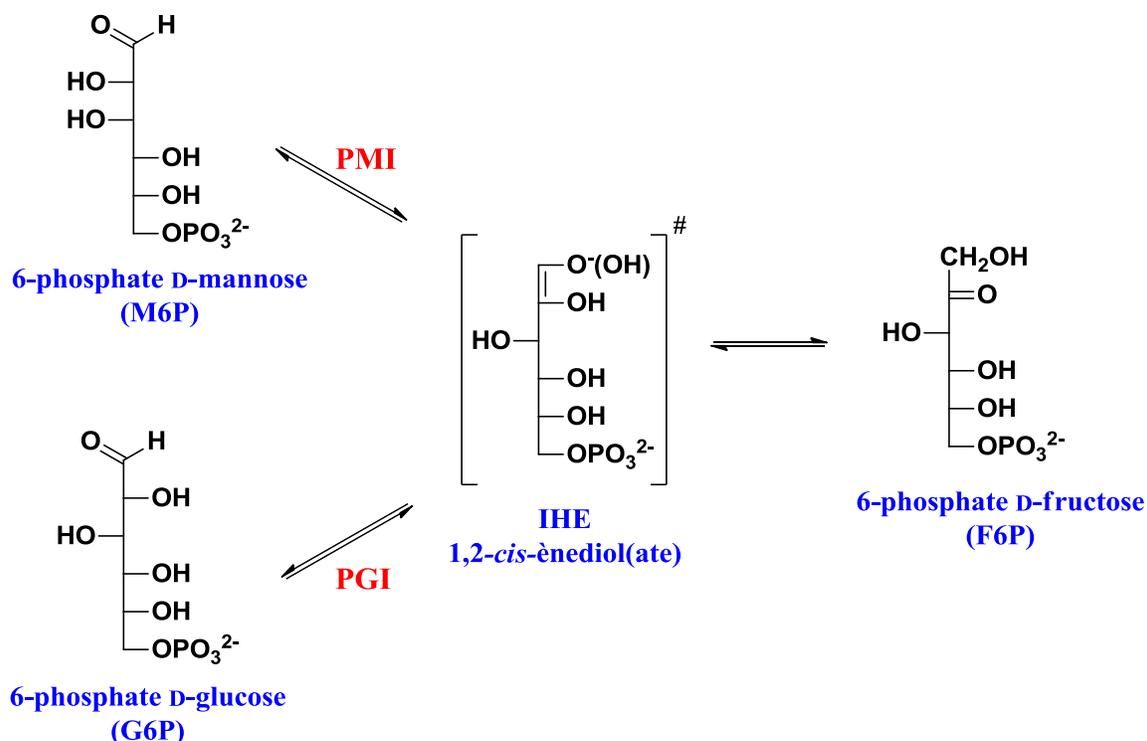


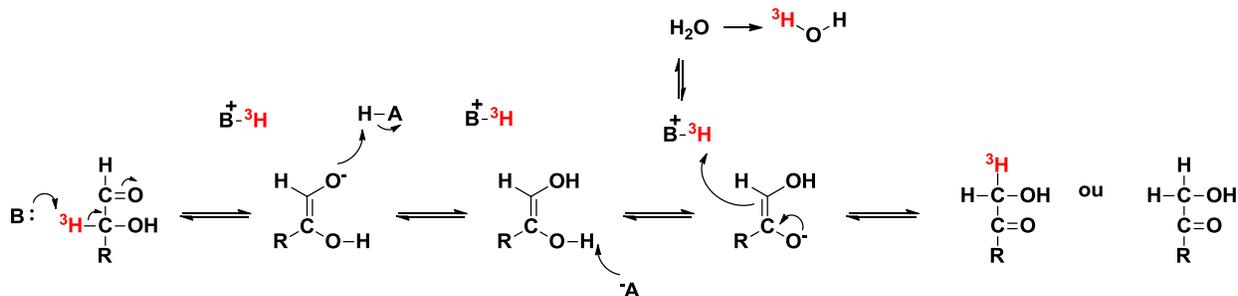
Schéma 4. Réactions catalysées par la PMI et la PGI.

## 1.2. Mécanisme de transfert d'hydrogène

Concernant la réaction catalysée par les aldose-cétose isomérases, deux types de mécanisme de transfert d'hydrogène entre les deux carbones C1 et C2 des substrats ont été rapportés<sup>10</sup> : soit par un transfert de proton et passage par un intermédiaire de haute énergie (IHE) de type « 1,2-*cis*-ènediol(ate) » comme dans le cas de la triose phosphate isomérase,<sup>11,12</sup> soit par un transfert d'hydrure comme dans le cas de la xylose isomérase (Schéma 5).<sup>13,14</sup> D'une manière générale, il semblerait que l'isomérisation des sucres phosphorylés fasse intervenir un mécanisme de type

*transfert de proton* alors que celle des sucres non-phosphorylés implique un mécanisme de type *transfert d'hydrure*.

Transfert de proton : passage par un énediol(ate)



Transfert d'hydrure

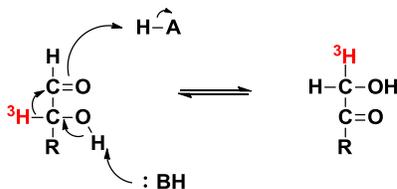


Schéma 5. Mécanisme de transfert d'hydrogène par transfert de proton ou transfert d'hydrure. Exemple d'un marquage isotopique en C2.

Grâce à des études de marquage isotopique, la discrimination entre les deux mécanismes d'isomérisation est possible. Dans le cas d'un mécanisme d'isomérisation par *transfert de proton*, l'utilisation d'un solvant marqué (oxyde de deutérium «  ${}^2\text{H}_2\text{O}$  » ou de tritium «  ${}^3\text{H}_2\text{O}$  ») et d'un substrat non-marqué permet de suivre l'incorporation de l'isotopie dans le produit formé. De même, l'utilisation d'un substrat marqué en C2 (pour un aldose) ou en C1 (pour un cétose) dans l'eau non-marquée donnera de l'eau marquée dans le cas d'un mécanisme par *transfert de proton*. Cependant, l'absence de transfert d'isotopie dans le solvant ou le produit ne prouve pas l'existence d'un mécanisme d'isomérisation par *transfert d'hydrure*. Ce dernier ne peut être confirmé que par des études structurales, ou en réalisant la réaction d'isomérisation à plus haute température, ou encore en présence d'un agent dénaturant comme l'urée ou le chlorure de guanidinium rendant ainsi les molécules d'eau accessibles au site actif.<sup>13</sup>

## 2. Présentation générale de la phosphomannose isomérase (PMI)

### 2.1. Réaction catalysée par la PMI

Découverte en 1950, la PMI (EC 5.3.1.8) catalyse l'isomérisation réversible entre le 6-phosphate  $\beta$ -D-mannopyranose ( $\beta$ -M6P) et le 6-phosphate  $\beta$ -D-fructofuranose ( $\beta$ -F6P) selon un mécanisme de transfert de proton et avec une spécificité absolue pour l'anomère  $\beta$  de chaque substrat.<sup>15,16</sup> Cette réaction procède d'une catalyse acido-basique au cours de laquelle se forme un intermédiaire de haute énergie (IHE) de type 1,2-*cis*-ènediol(ate) (Schéma 6).<sup>9,17</sup>

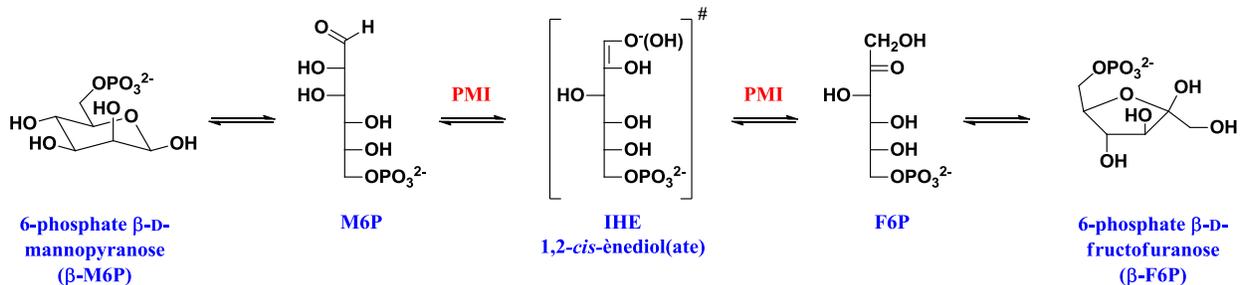


Schéma 6. Réaction catalysée par la PMI : passage par un ènediol(ate). L'implication de l'enzyme dans les étapes d'ouverture et de fermeture du cycle n'a pas été démontrée.

La PMI est une enzyme très répandue dans la nature et se trouve aussi bien chez les organismes eucaryotes que procaryotes où elle constitue un lien entre la glycolyse et le métabolisme du mannose permettant la synthèse de structures mannosylées ou de glycoconjugués (voir paragraphe 2.5.1.). Toutefois, elle est moins répandue dans le règne végétal d'où l'utilisation récente de la PMI d'*Escherichia coli* comme un gène marqueur de sélection des plantes : seules les plantes transformées sont capables de pousser sélectivement sur du milieu utilisant le mannose comme source unique de carbone.<sup>18-20</sup>

### 2.2. La PMI : complexe enzyme-métal

En 1958, Noltmann et Bruns ont suggéré la présence d'un métal au sein de la PMI des érythrocytes du porc du fait de son inhibition par des agents chélatants comme le versene, la phénanthroline et le  $\alpha, \alpha'$ -bipyridine.<sup>21</sup> Cette observation a été confirmée plus tard par Gracy et Noltmann qui ont réussi à purifier la PMI de *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>22</sup> Ils montrent alors que

la PMI de levure est une enzyme monomérique ayant une masse moléculaire de 45 kDa et contenant un atome de zinc par protéine.<sup>23</sup> Les auteurs rapportent que ce cation divalent semble jouer non seulement un rôle structural, mais également un rôle important dans la catalyse de la réaction enzymatique. D'une part, l'enzyme est strictement protégée par le substrat et par des inhibiteurs compétitifs de l'inhibition par des agents chélatants, confirmant ainsi que le métal se trouve bien au sein du site actif de l'enzyme. D'autre part, le zinc stimule fortement l'isomérisation non-enzymatique ou autrement dit la transformation de « Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein » du M6P.

### 2.3. Les différents types de PMI : classification de Proudfoot

Tableau 1. Les différents types de PMI.

PMI type I	PMI type II	PMI type III
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>22,24,25</sup>	<i>Escherichia coli</i> <sup>29</sup> <i>Salmonella typhimurium</i> <sup>30</sup> <i>Acetobacter xylinum</i> <sup>31</sup> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <sup>32</sup> <i>Helicobacter pylori</i> <sup>33</sup> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>34</sup> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <sup>35</sup> <i>Xanthomonas campestris</i> <sup>36</sup>	<i>Rhizobium meliloti</i> <sup>37</sup>
<i>Aspergillus nidulans</i> <sup>26</sup>		
<i>Candida albicans</i> <sup>27,28</sup>		
<i>Leshmania mexicana</i> <sup>38</sup>		
<i>Escherichia coli</i> <sup>39</sup>		
<i>Salmonella enterica</i> <sup>40</sup>		
<i>Cryptococcus neoformans</i> <sup>41</sup>		
<i>Caenorhabditis elegans</i>		
<i>Streptococcus mutans</i> <sup>32</sup>		
<i>Homo sapiens</i> <sup>25,29</sup>		

Suite à la purification de la PMI de levure, l'enzyme a longtemps été décrite comme ayant la seule fonction de catalyser l'isomérisation réversible entre le M6P et le F6P. Plus tard, l'équipe de Shinabarger a réussi à purifier la PMI de *Pseudomonas aeruginosa* qui s'est révélée alors bifonctionnelle, possédant en plus de son activité isomérase (PMI) une seconde activité guanosine-5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase (GMP).<sup>34</sup> Sur la base de ces résultats, mais principalement à partir des alignements de séquences primaires des différentes protéines ainsi qu'en se basant sur leurs propriétés cinétiques et physico-chimiques, Proudfoot et al.<sup>25</sup> ont

proposé une classification des PMI en 3 classes distinctes, qui fut ensuite complétée par Jensen et al. (Tableau 1).<sup>32</sup>

### 2.3.1. Les PMI de type I

Les PMI de type I sont des enzymes monofonctionnelles ne catalysant que la réaction d'isomérisation réversible entre le M6P et le F6P. Elles sont monomériques, de masse moléculaire d'environ 45 kDa et comprennent toutes un atome de zinc au sein de leur site actif. Leur pH optimal varie entre 7 et 8.5 (Tableau 2).

Tableau 2. Quelques propriétés de PMI de type I provenant de différents organismes.

Organisme	MW (kDa)	Monomère/dimère	Cation métallique	pH optimal
<i>S. cerevisiae</i> <sup>23</sup>	45	Monomère	Zn <sup>2+</sup>	7-7.2
<i>H. sapiens</i> <sup>25,29</sup>	48	Monomère	Zn <sup>2+</sup>	7-7.5
<i>C. albicans</i> <sup>25,27,28</sup>	46	Monomère	Zn <sup>2+</sup>	7-7.5
<i>S. typhimurium</i> <sup>30,42</sup>	42	Monomère	Zn <sup>2+</sup>	8.5

Elles sont homologues avec une identité de séquence supérieure à 30%. Les résidus importants du site actif ainsi que les ligands du zinc sont conservés d'une enzyme à l'autre (Figure 1). Ces enzymes ne tolèrent pas un changement au niveau de leur cofacteur métallique. Ainsi, le remplacement du zinc par d'autres métaux comme le nickel, le cadmium, le manganèse, le cuivre ou le fer entraîne une perte de leur activité PMI. Cependant, une augmentation de l'activité isomérase a été remarquée avec le cobalt uniquement.<sup>23</sup> Cette classe regroupe les PMI des organismes eucaryotes identifiées dont la PMI humaine, les PMI de plusieurs levures dont le chef de file est la PMI de *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi que les PMI de la plupart des bactéries et des parasites (Tableau 1).

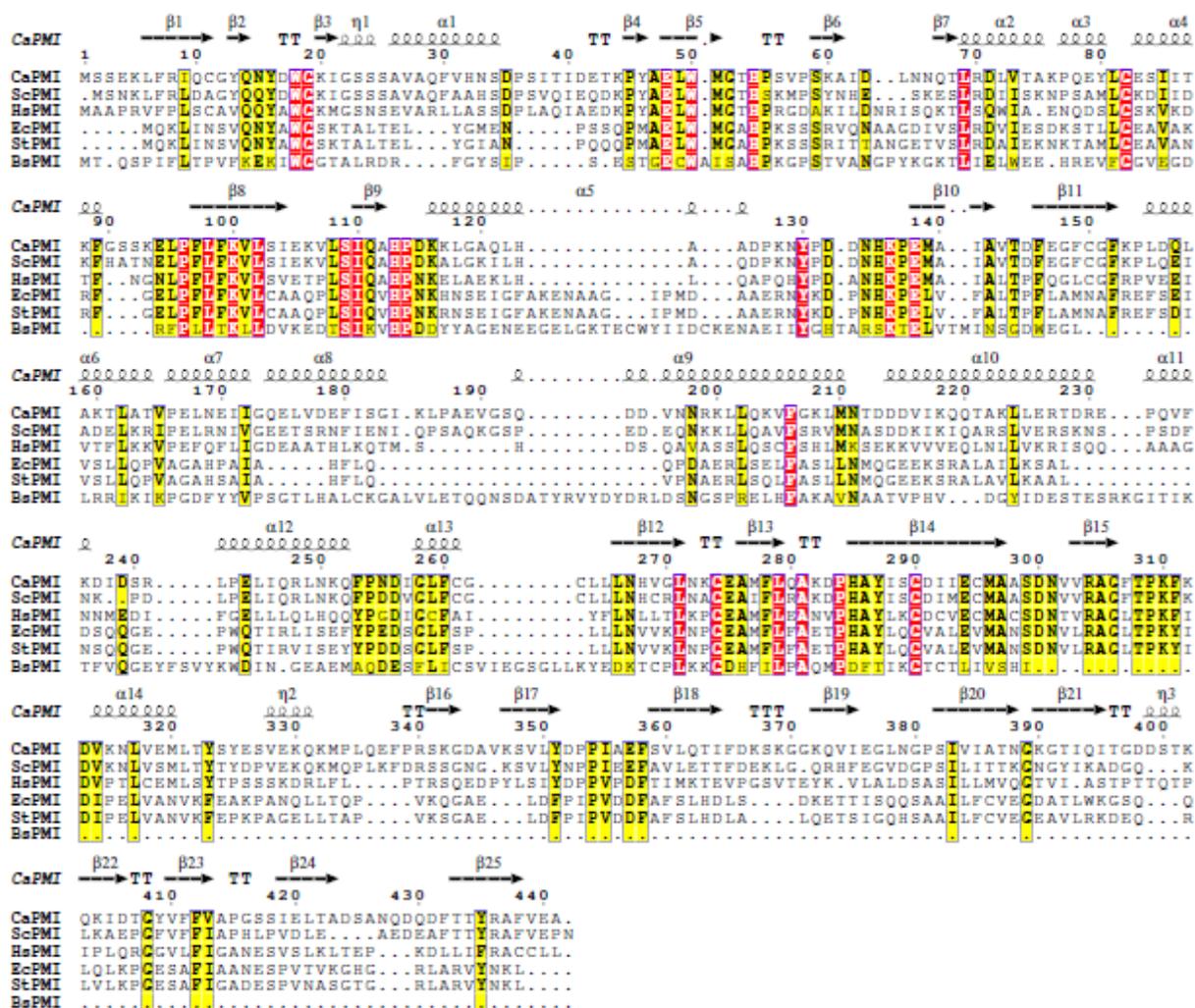


Figure 1. Alignement de séquences de PMI de type I provenant de six organismes différents (*C. albicans*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*). La structure secondaire ainsi que la numérotation affichée correspondent au CaPMI. Les résidus identiques dans toutes les séquences sont représentés en caractère blanc et surlignés en rouge. Les résidus similaires sont surlignés en jaune. Les ligands du zinc sont marqués par un astérisque. Les autres acides aminés importants du site actif sont marqués par un triangle.<sup>27,43</sup> Cet alignement a été réalisé avec CLUSTALW et a été illustré avec ESPript.

### 2.3.2. Les PMI de type II

Les PMI de type II sont des enzymes bifonctionnelles ayant une masse moléculaire d'environ 55 kDa et se trouvent exclusivement chez les bactéries (Tableau 1). Elles interviennent à deux niveaux distincts du métabolisme du mannose : en plus de leur activité isomérase ou PMI (isomérisation réversible du M6P en F6P), ces enzymes catalysent grâce à leur activité guanosine-5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase (GMP), la dernière étape de la production du GDP-mannose (guanosine-diphospho-D-mannose) (Schéma 7). Ce dernier est un

précurseur des manno-conjugués nécessaires à la survie cellulaire aussi bien des eucaryotes que des procaryotes<sup>25</sup> et à la pathogénicité de la plupart des microorganismes.<sup>38,44,45</sup>

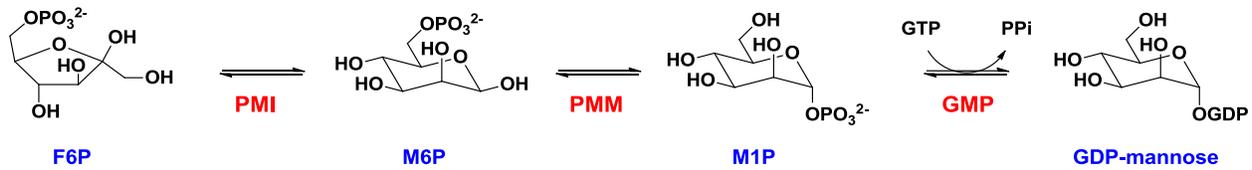


Schéma 7. Voie de biosynthèse du GDP-D-mannose à partir du F6P. PMI = phosphomannose isomérase, PMM = phosphomannomutase, GMP = guanosine-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase, GTP = guanosine triphosphate, Ppi = pyrophosphate, F6P = 6-phosphate D-fructose, M6P = 6-phosphate D-mannose, M1P = 1-phosphate D-mannose, GDP-mannose = guanosine-diphospho-D-mannose.

Les PMI de type II requièrent également la présence d'un métal dans leur site actif pour être fonctionnelles. Mais contrairement aux PMI de type I, ces enzymes tolèrent bien une variation au niveau du cofacteur métallique. Elles sont actives non seulement avec le zinc, mais aussi avec une large gamme de cations divalents tels que  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , et  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>34,36</sup>

Bien qu'homologues entre elles,<sup>33</sup> elles ne partagent cependant qu'une faible similarité de séquence avec les PMI de type I qui se limite à un petit motif d'acides aminés<sup>32</sup> appartenant au domaine PMI des enzymes bifonctionnelles (Figure 2).

<i>P. aeruginosa</i> (II)	389	TVKPGAR <b>LSLQMH</b> HHRAEHW
<i>X. campestris</i> (II)	386	TVKPGAT <b>LSLQMH</b> HHRAEHW
<i>R. rubrum</i> (II)	398	VVQPGER <b>LSLQMH</b> HHRAEHW
<i>A. calcoaceticus</i> (II)	392	TVKPGQK <b>LSIQMH</b> HHRSEHW
<i>S. mutans</i> (I)	92	ILDANDW <b>LSVQV</b> HPDNAYAL
<i>E. coli</i> (I)	94	VLCAAQ <b>PLSIQV</b> HPNKHNS
<i>S. enterica</i> (I)	94	VLCAAK <b>PLSIQV</b> HPNKRNS
<i>A. nidulans</i> (I)	104	VLSIRK <b>ALSIQA</b> HPNKKLAE
<i>S. cerevisiae</i> (I)	106	VLSIEKV <b>LSIQAH</b> PKALGK
<i>C. albicans</i> (I)	108	VLSIEKV <b>LSIQAH</b> PKLGA
<i>H. sapiens</i> (I)	107	VLSVET <b>PLSIQA</b> HPNKLAE
<i>C. elegans</i> (I)	96	VLSVLG <b>PLSIQI</b> HPTKEQ GK

Figure 2. Le motif commun aux PMI de type I et II (acides aminés en caractère gras).

D'après la structure 3D de la PMI de *C. albicans*<sup>27</sup> (type I), ce motif coïncide avec les résidus 108 à 113 se trouvant dans le site actif de la protéine.<sup>27,43</sup> La conservation de ces résidus entre les

PMI de type I et II évoque bien un processus catalytique commun qui renvoie à leur activité isomérase.

### **2.3.3. Cas particulier : organismes possédant deux types de PMI**

La coexistence exceptionnelle d'une PMI de type I et d'une autre enzyme à activité GMP a été remarquée chez *E. coli* et *S. typhimurium*.<sup>29</sup> Sur la base d'homologies de séquences, cette protéine à activité GMP a été considérée comme étant une PMI de type II. Cependant, la raison pour laquelle ces entérobactéries possèdent deux types de PMI n'est pas claire. Une hypothèse attribuant des rôles différents aux deux types d'enzymes a été émise par Proodfoot et al : les enzymes de type I sont de préférence impliquées dans le métabolisme du D-mannose, alors que les enzymes de type II interviennent plutôt dans la synthèse des capsules polysaccharidiques.<sup>29</sup>

### **2.3.4. Les PMI de type III**

Cette classe se limite à la PMI de la bactérie négative *Rhizobium meliloti* qui présente une similarité de séquence très faible avec les PMI de type I et II.

### **2.3.5. Les PMI type IV**

Une nouvelle famille de PMI a été récemment décrite dans la littérature. Parmi les PMIs appartenant à cette famille, on peut citer DmPMI (*Dehalococcoides mccartyi* PMI) ainsi que les homologues de la famille des actinobactéries, des firmicutes et des bactéroïdètes.<sup>46</sup> Les PMI appartenant à cette famille partagent une homologie de séquence très faible avec les PMI des autres familles et ont une activité PMI plus faible.

## **2.4. Connaissances mécanistiques et structurales sur la PMI de *C. albicans***

En 1996, Cleasby et al. sont les premiers à rapporter la structure de la PMI de *C. albicans* (résolution de 1.7 Å).<sup>27</sup> La structure PDB (1PMI) montre une protéine monomérique possédant 3 domaines : un domaine catalytique central entouré par un domaine hélicoïdal d'un côté et par un domaine C-terminal de l'autre côté. L'enzyme est formée de 13 hélices au total et de multiples feuillets  $\beta$  antiparallèles répartis sur les différents domaines de la façon suivante : le domaine hélicoïdal est composé de huit hélices  $\alpha$  réparties en deux blocs, tandis que le domaine C-

terminal est composé uniquement de feuillets  $\beta$  antiparallèles. Celui-ci contient à la fois les deux côtés C et N-terminaux (Figure 3) mais il a été désigné en tant que tel considérant qu'il est formé en majorité par des éléments appartenant au côté C-terminal. Le domaine catalytique central est, quant à lui, formé majoritairement de feuillets  $\beta$  antiparallèles, avec en plus 5 hélices  $\alpha$  situées du côté extérieur.

Le domaine central forme une crevasse profonde beaucoup plus large que celle trouvée dans le domaine C-terminal. Le site catalytique se situe au sein de cette crevasse dont les dimensions sont compatibles avec celles du substrat de l'enzyme (F6P ou M6P) en association avec un atome de zinc.

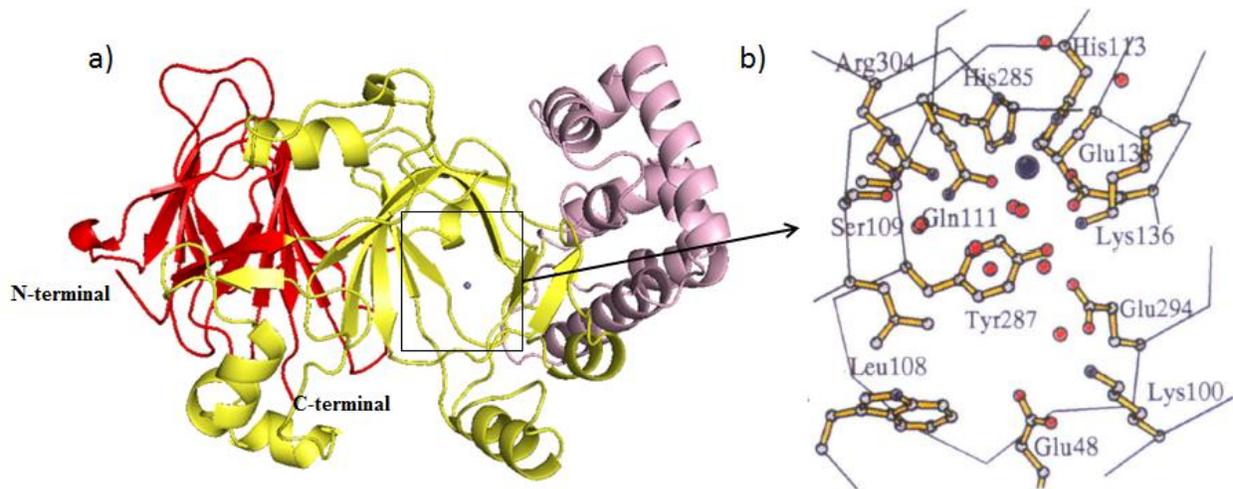


Figure 3. Structure générale de CaPMI et des résidus de son site actif (PDB 1PMI). a) Structure de la PMI de *C. albicans* à 1.7 Å. On distingue trois domaines : le domaine hélicoïdal (en violet), le domaine C-terminal (en rouge) et le domaine catalytique contenant un atome de zinc au centre (en jaune). b) Les acides aminés du site actif : l'atome de zinc est représenté en bleu et les molécules d'eau le sont en rouge.<sup>27</sup>

Le zinc est pentacoordiné : la sphère de coordination comprend quatre acides aminés dont les deux histidines 285 et 113, le glutamate 138, la glutamine 111, ainsi qu'une molécule d'eau. La géométrie de coordination est de type bipyramide trigonale, une géométrie en faveur généralement d'un rôle catalytique du zinc dans les métalloprotéines.<sup>27</sup> Cependant, un des angles de la base est supérieur à 150 °. Cette distorsion peut être expliquée par l'interaction supplémentaire du zinc avec le second oxygène du glutamate qui se situe dans le plan équatorial de la coordination du métal (Figure 4).



de 250 mM ! Finalement et le plus important, la densité électronique autour du F6P n'est pas claire, ce que les auteurs justifient par un début d'ouverture du cycle du  $\beta$ -F6P.

- Mécanisme d'action des PMI : état actuel des connaissances

Un mécanisme impliquant le passage par un intermédiaire ènediol(ate) a été suggéré par Topper et al en 1957.<sup>51</sup> Cette observation a été confirmée plus tard grâce à des études de marquage isotopique : l'utilisation du F6P marqué au tritium en position 1 induit la formation d'eau tritiée et aucune radioactivité n'a été retrouvée au niveau du M6P.<sup>9</sup> Ceci montre que le tritium est transféré sur un résidu basique de l'enzyme qui est ensuite déprotonée par l'eau, en accord avec un mécanisme de transfert de protons entre les 2 carbones C1 et C2 du substrat.

Ce n'est qu'en 1968 que Gracy et Noltmann proposent un mécanisme général pour la réaction catalysée par la PMI : un rôle catalytique est attribué au zinc et une histidine est proposée pour jouer le rôle de base catalytique (Figure 5).<sup>52</sup>

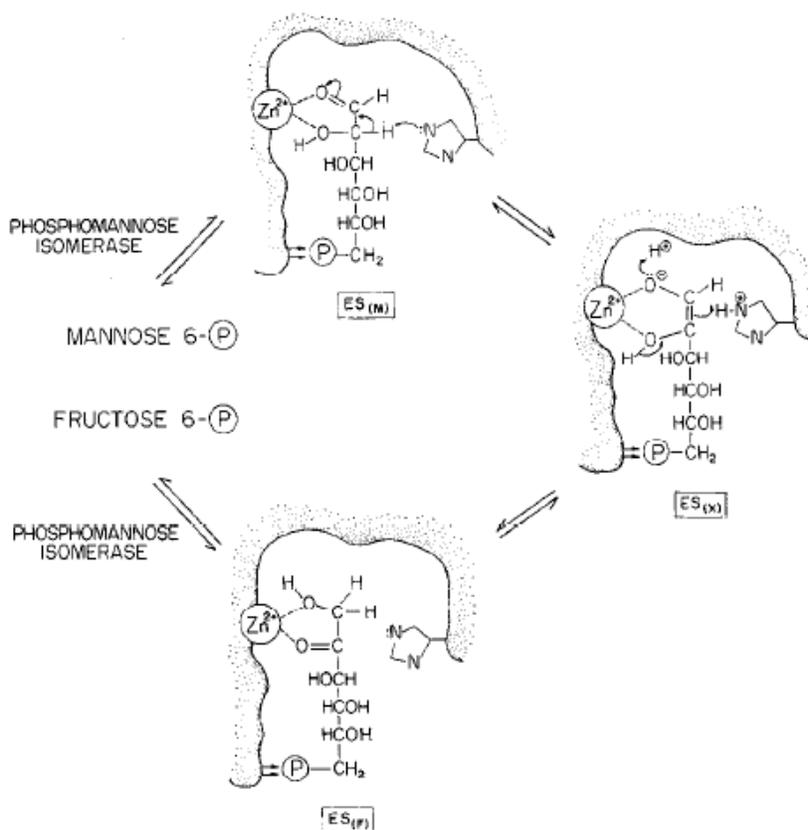


Figure 5. Mécanisme de la réaction catalysée par la PMI proposé par Gracy et Noltmann en 1968.

En 1996, la structure cristallographique de la PMI de *C.albicans* a été rapportée par Cleasby et al.<sup>27</sup> En l'absence de substrat ou d'inhibiteur au site actif, seulement quelques points concernant le mécanisme catalytique ont pu être énoncés :

- Un des deux résidus glutamate du site actif (Glu294 ou Glu48) est suggéré comme base catalytique potentielle.
- L'Arg304 semble essentiel à l'activité enzymatique en fixant probablement la partie phosphate du substrat.
- Les dimensions du site actif sont compatibles avec la fixation du substrat sous forme ouverte ou cyclique. Cependant, la plus grande affinité de l'enzyme pour des sucres ouverts par rapport à leurs analogues cycliques a été prise en compte comme argument en faveur de la fixation du substrat sous sa forme ouverte.

Cette étude n'a cependant pas permis aux auteurs de conclure quant aux rôles précis des différents acides aminés du site actif dans la réaction catalytique et quant à la possibilité que la PMI catalyse, comme la PGI, l'étape d'ouverture du substrat cyclique  $\beta$ -F6P ou  $\beta$ -M6P.

*Dans le but d'apporter des réponses à ces questions et de fournir des informations déterminantes concernant le mécanisme détaillé de la réaction catalysée par la PMI, des études de modélisation moléculaire utilisant le logiciel SIBFA (Sum of Interactions Between Fragments Ab initio computed) ont été menées par Nohad Gresh en collaboration étroite avec notre équipe. Ces travaux ont permis de générer in silico des structures d'un modèle théorique de l'enzyme complexée avec, 1) son substrat M6P sous ses deux formes cycliques  $\alpha$ - ou  $\beta$ -M6P, 2) le 5PAH, meilleur inhibiteur de l'enzyme rapporté dans la littérature et 3) le 5PAA, un très mauvais inhibiteur de la PMI (IC50 de l'ordre du mM).<sup>43,53</sup>*

En l'absence de structures cristallines, la structure théorique **CaPMI-5PAH** obtenue par minimisation d'énergie représente le premier modèle de l'enzyme avec un inhibiteur au site actif (Figure 6).<sup>43,53</sup> Cette structure montre que :

- Le 5PAH est ligandé au zinc de façon monodentate via l'oxygène porté par l'azote de la fonction hydroxamate, en accord ainsi avec un rôle catalytique pour le zinc.<sup>27</sup> Des études de modélisation ultérieures pour le même type de complexe ne rejette pas la possibilité

d'avoir une coordination de type bidentate dans lequel le zinc coordine à la fois l'oxygène du carbonyle et l'oxygène porté par l'azote.<sup>54</sup>

- Le zinc est pentacoordiné avec une géométrie de type bipyramide trigonale distordue : les ligands du métal (Gln111, His113, His285, Glu138) sont les mêmes que ceux observés dans la structure cristalline de la PMI seule rapportée par Cleasby et al.. Cependant, la molécule d'eau est remplacée ici par l'oxygène porté par l'azote de la fonction hydroxamate.
- La coordination du zinc avec l'hydroxamate est bien plus favorable que la chélation par le phosphate.
- Le complexe PMI-5PAH est beaucoup plus stable que celui avec le 5PAA, confirmant ainsi les résultats issus des études cinétiques.

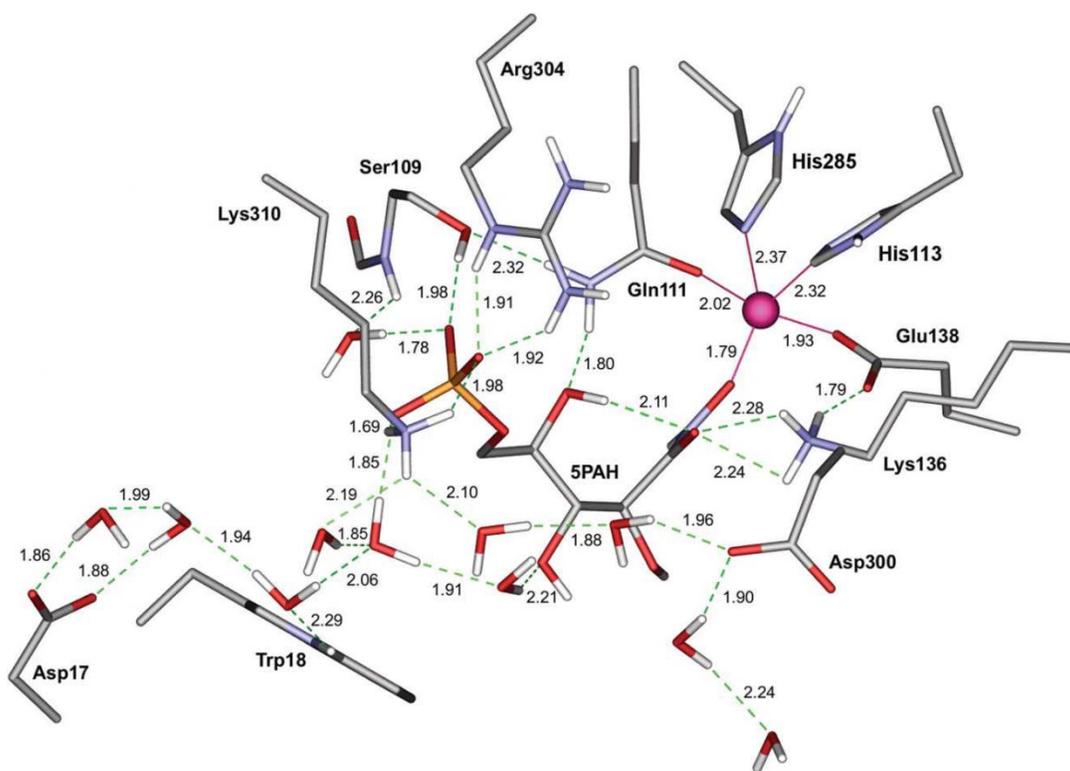


Figure 6. Structure du complexe CaPMI-5PAH obtenue par le logiciel SIBFA.<sup>53</sup>

Sur cette structure comprenant un réseau de 11 molécules d'eau, l'oxygène du carbonyle du 5PAH forme deux liaisons hydrogène avec la lysine 136 cationique, elle-même liée au glutamate

138. Le 5PAH est probablement déprotoné par la lysine, donnant naissance à une forme hydroxamate et une lysine chargée positivement. Cette dernière apparaît comme un bon candidat pour jouer le rôle de la base catalytique impliquée dans le mécanisme de transfert de proton entre les deux carbones C1 et C2. Ce rôle attribué à la Lys136 suppose cependant qu'elle soit initialement sous forme neutre, et donc que son  $pK_a$  soit bien inférieur à 10-11. Bien que cette possibilité existe (les  $pK_a$  des résidus du site actif peuvent être très différents de leur valeur normale), cette hypothèse n'a pas été démontrée dans cette étude. Le phosphate forme un réseau de liaisons hydrogène avec la Lys310, l'Arg304, la Ser109, et une molécule d'eau, confirmant ainsi le rôle évoqué pour l'arginine 304 à l'issue des études de mutation et d'inhibition irréversible précédemment publiées par différents auteurs.

D'autres informations intéressantes ont été fournies par les complexes *CaPMI-M6P*. Les structures théoriques du site actif de la PMI de *C. albicans* complexée avec le 6-phosphate- $\beta$ -D-mannopyranose ( $\beta$ -M6P) et le 6-phosphate- $\alpha$ -D-mannopyranose ( $\alpha$ -M6P) obtenues par minimisation d'énergie sont représentées dans la figure 7.

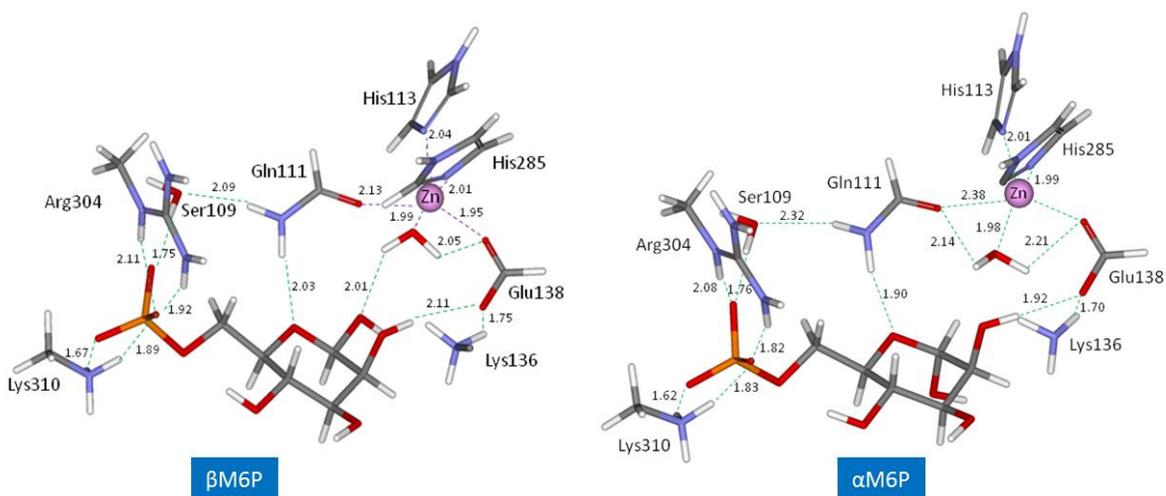


Figure 7. Représentation du site actif des complexes SIBFA de CaPMI avec le 6-phosphate- $\beta$ -D-mannopyranose ( $\beta$ -M6P) et le 6-phosphate- $\alpha$ -D-mannopyranose ( $\alpha$ -M6P).<sup>53</sup>

Tout d'abord, on note la présence nécessaire d'une molécule d'eau liée au zinc dans les deux modèles, ce qui est en accord avec la structure cristalline de CaPMI seul. En effet, en l'absence de cette molécule d'eau, les essais de minimisation d'énergie ont montré que les hydroxyles du

substrat sont incapables de se lier correctement au métal. Les calculs d'énergie montrent ensuite que le complexe le plus stable est celui de la PMI avec le  $\beta$ -M6P. Ceci est tout à fait en accord avec les résultats expérimentaux qui montrent que le  $\alpha$ -M6P possède une faible affinité pour la PMI et n'est pas un substrat de l'enzyme. Au niveau de la partie phosphate, on observe toujours dans le cas du  $\beta$ -M6P une stabilisation par cinq liaisons hydrogène mettant en jeu les résidus Arg304, Lys310 et Ser109. Ce dernier résidu est un accepteur d'une liaison hydrogène de la Gln111, elle-même en interaction avec l'oxygène cyclique du M6P. Cette Gln111 est également un des ligands du zinc. Le Glu138, en plus de coordonner le zinc, interagit directement avec le carbone C2 du sucre et via une molécule d'eau avec le carbone C1. Cette même molécule d'eau assure, dans le cas du  $\beta$ -M6P, la liaison du substrat au métal. Cette interaction est cependant absente dans le cas du  $\alpha$ -M6P où la molécule d'eau interagit avec la Gln111 au lieu du substrat. Cette différence structurale explique probablement le fait que le  $\alpha$ -M6P possède une faible affinité pour l'enzyme. Du côté du phosphate, la situation est très proche pour les deux anomères, avec cependant une liaison hydrogène en moins avec l'Arg304 dans le cas du  $\alpha$ -M6P.

Deux structures théoriques de complexes de CaPMI avec le M6P sous forme linéaire ont également été obtenues (Figure 8). Dans la première (A), on note toujours la présence de la molécule d'eau comme dans le cas du substrat cyclique. Celle-ci est en interaction avec l'oxygène porté par le C1 aldéhydique du M6P linéaire qui correspond à l'oxygène en C1 du  $\beta$ -M6P. Cependant, une deuxième structure (B) dans laquelle le M6P linéaire se coordine directement au zinc sans molécule interposée entre le substrat et le métal est également possible. On retrouve ainsi un mode d'interaction proche de ce que l'on observe avec le 5PAH lié de façon monodente au zinc. La sphère de coordination autour du phosphate est très proche de ce que l'on obtient avec les dérivés cycliques. On note la présence d'une interaction intramoléculaire supplémentaire entre le OH porté par le C5 du M6P et un des oxygènes du phosphate.

Les calculs des énergies montrent que les complexes obtenus avec le M6P linéaire sont moins stables que ceux obtenus avec le  $\beta$ -M6P cyclique, ce qui constituerait une information tout à fait originale. Une autre observation importante à noter est l'interaction de l'oxygène du C5 formant le cycle pyranosique avec la Gln111 dans le cas du  $\beta$ -M6P. Cette interaction est retrouvée aussi dans le cas du 5PAH, avec l'oxygène en C4 qui correspond à l'oxygène en C5 du  $\beta$ -M6P. La

Gln111 apparaît alors comme un bon candidat pour catalyser une étape probable d'ouverture du cycle. Cette hypothèse est renforcée par le comportement différent de la PMI vis-à-vis des deux anomères cycliques du M6P. En effet, si le substrat préférentiel de la PMI est la forme linéaire du M6P, il n'y aurait pas de raison pour que l'anomère  $\alpha$  ne soit pas transformé.

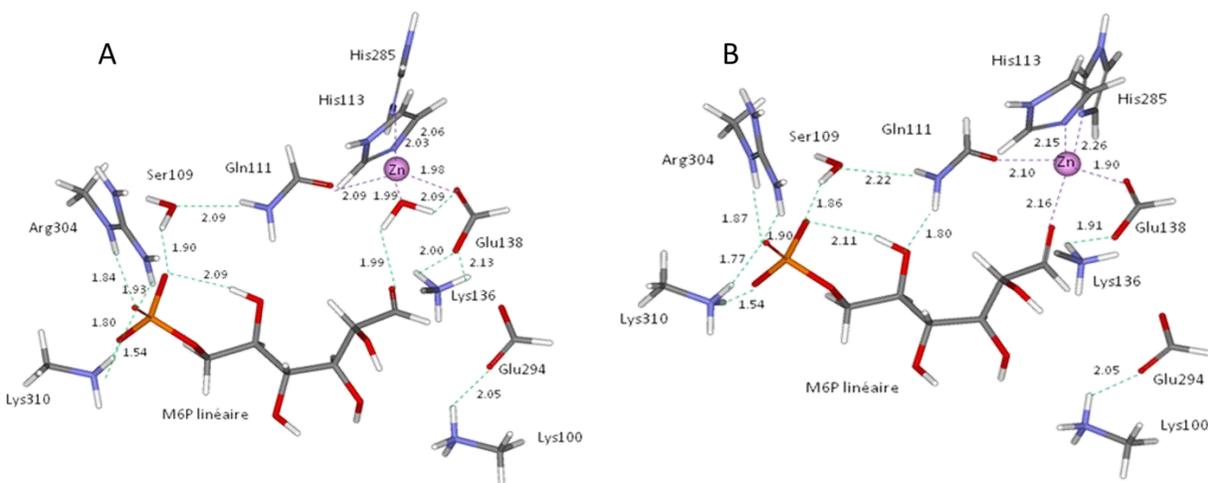
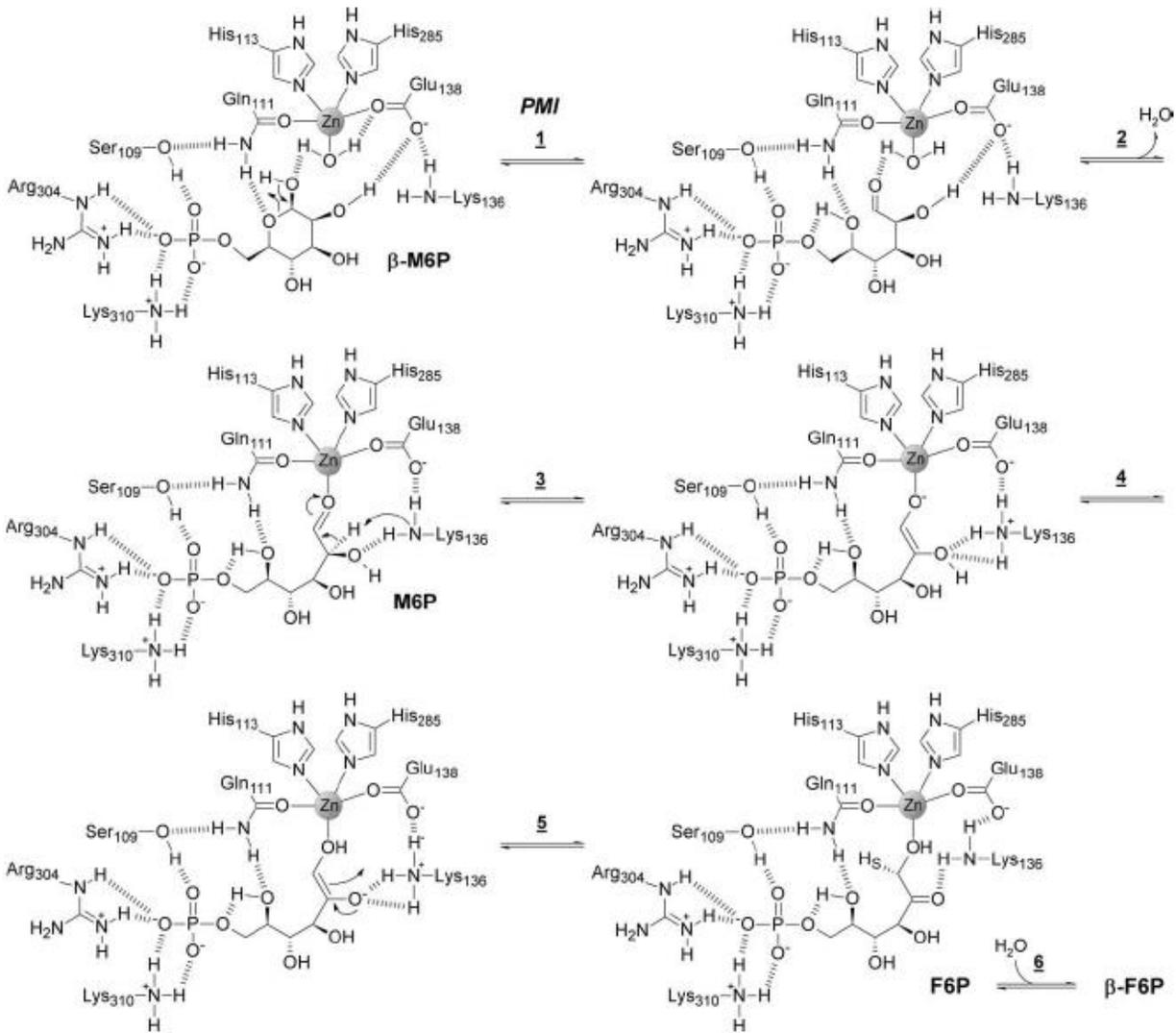


Figure 8. Représentation du site actif des complexes SIBFA de la PMI de *C. albicans* avec le M6P sous sa forme linéaire avec (A) et sans (B) molécule d'eau.<sup>53</sup>

A partir des modèles théoriques présentés précédemment et des observations qui en ont découlé, un mécanisme détaillé de la réaction catalysée par la PMI avec une étape d'ouverture de cycle représenté sur le schéma 8 a été proposé par les auteurs<sup>53</sup> :

**Étape 1** : comme montré précédemment, une molécule d'eau est interposée entre le substrat cyclique et le métal, ce qui diminue son  $pK_a$  et facilite sa déprotonation. Une fois déprotonée, elle arrache l'hydrogène de l'hydroxyle en C1 du  $\beta$ -M6P, conduisant à un intermédiaire anionique stabilisé par la Gln111 et par interaction avec l'oxygène du phosphate. Dans le cas du  $\alpha$ -M6P, cet hydrogène n'est pas du tout accessible et ne peut plus être déprotoné par la molécule d'eau, ce qui explique pourquoi ce composé n'est pas transformé par l'enzyme. **Étape 2** : une éjection de la molécule d'eau en dehors du site actif permet au M6P de se déplier par rotation de la liaison C3-C4. Celui-ci se coordine au zinc et l'isomérisation peut ainsi commencer. **Étape 3** : la Lys136, proche du C2 du substrat, a été proposée comme un bon candidat pour jouer le rôle de base catalytique. Celle-ci, sous sa forme neutre, peut arracher l'hydrogène porté par le C2 du substrat linéaire, conduisant à un premier intermédiaire *cis*-enediolate. **Étape 4** : il y a ensuite passage du premier IHE à un deuxième IHE de type enediolate, soit par prototropie entre les

deux oxygènes, soit *via* un résidu du site actif. **Étape 5** : ce deuxième IHE ènediolate est enfin reprotoné en position proS par la Lys136 en C1 pour conduire au F6P sous sa forme linéaire. **Étape 6** : la dernière étape est l'étape de fermeture de cycle qui se fait de manière symétrique à l'ouverture de cycle : on assiste à un repliement du F6P et à une fermeture de cycle assistée par une molécule d'eau. Le F6P est enfin libéré sous sa forme cyclique  $\beta$ -furanose.



*Schéma 8. Mécanisme proposé pour l'isomérisation F6P-M6P catalysée par la PMI.<sup>53</sup>*

Toutes ces études structurales et théoriques n'ont cependant pas permis d'établir indubitablement

le mécanisme de l'isomérisation catalysée par la PMI en l'absence de structures X à haute résolution de complexes de CaPMI avec un substrat ou un inhibiteur.

## **2.5. La PMI de *Candida albicans* : vers de nouveaux antifongiques**

### **2.5.1. Implication de la PMI dans le métabolisme chez l'homme**

La PMI joue un rôle clé entre la glycolyse et le métabolisme du mannose permettant la synthèse de glycoconjugués. La biosynthèse des chaînes oligosaccharidiques de ces glycoconjugués implique le précurseur GDP-D-mannose. Celui-ci est synthétisé à partir du M6P via la phosphomannomutase (PMM) et la GDP-D-mannose pyrophosphorylase. Le GDP-D-mannose joue, non seulement un rôle comme source de mannose, mais il est également un précurseur du GDP-fucose et du dol-P-Man (dolichol phosphomannose), donneurs de groupements fucose et mannose nécessaires pour les réactions de la glycosylation.

Chez les eucaryotes, il a longtemps été supposé que le M6P provenait principalement du F6P, un intermédiaire du métabolisme du glucose, sous l'action de la PMI. Cependant, la découverte d'un transporteur spécifique du mannose chez les mammifères a suggéré la participation du mannose exogène dans la synthèse des oligosaccharides mannosylés.<sup>55</sup> Ce transporteur qui fonctionne à des concentrations physiologiques du mannose est capable de délivrer cet hexose aux cellules, même en présence de 100 fois plus de glucose.<sup>56</sup> Des études ultérieures ont montré que le M6P formé sous l'action de la PMI ne contribue que faiblement (25% à 35%) à la production du mannose incorporé dans les chaînes oligosaccharidiques des N-glycosylprotéines.<sup>56,57</sup> Des études sur des fibroblastes ou des cellules d'origine hépatique (HepG2) humaines, ont montré que 7 à 14 % du mannose exogène utilisé à des concentrations physiologiques sont utilisés pour la glycosylation. Les 86 à 93 % restants sont pris en charge par la PMI. Au niveau des chaînes oligosaccharidiques des N-glycosylprotéines, on retrouve 65 à 75 % de mannose d'origine exogène et 25 à 35 % provenant du F6P via la PMI (schéma 9). De plus, en présence d'un excès de mannose tritié, une augmentation de la production d'eau tritiée a été remarquée montrant ainsi que le M6P formé est engagé dans la voie de la glycolyse via la PMI.<sup>57</sup> Ces études montrent que l'activité principale de la PMI serait de convertir l'excès de M6P en F6P plutôt que de fournir du mannose-6-phosphate pour la synthèse des glycoprotéines mannosylées.

La situation n'est pas la même chez tous les eucaryotes : des études utilisant du mannose tritié ont montré que chez le parasite *L. mexicana*, la majorité du M6P servant à la synthèse des glycoprotéines provient de la voie F6P/G6P contrairement à l'homme.<sup>38</sup>

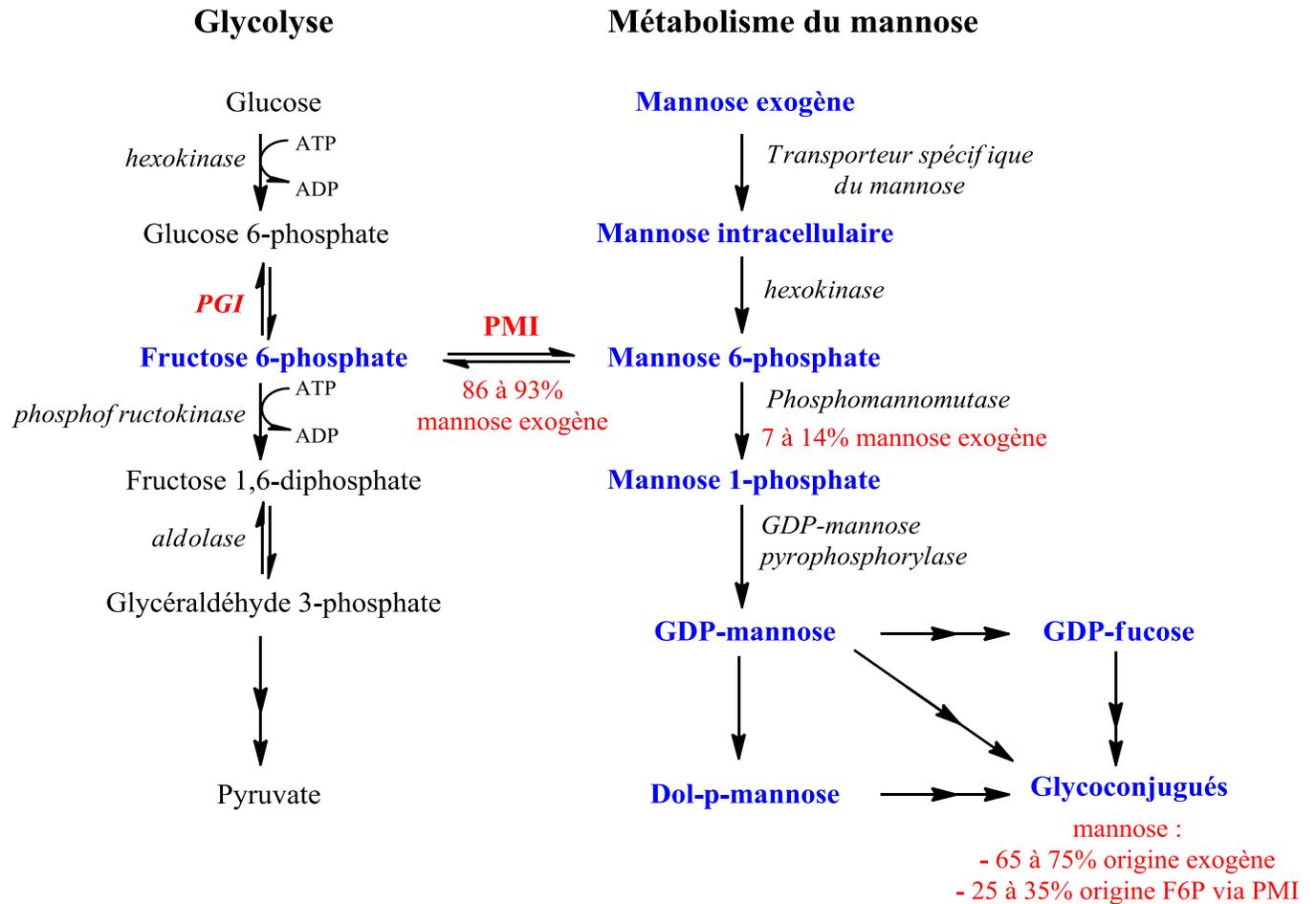


Schéma 9. Rôle de la PMI chez l'homme et origine du mannose utilisé pour la synthèse des glycoprotéines. La PMI ne contribue que faiblement (25% à 35%) à la production du mannose incorporé dans les chaînes oligosaccharidiques des N-glycosylprotéines.

Bien que la PMI ne contribue qu'à la production de 25 à 35% du mannose requis pour la synthèse des glycoprotéines, sa déficience n'est pas sans conséquence chez l'homme et est à l'origine d'une hypoglycosylation des protéines sériques. La synthèse des N-glycoprotéines se déroule en deux phases dans le réticulum endoplasmique (2 étapes) puis dans l'appareil de Golgi et fait intervenir plusieurs types d'enzymes dont la PMI. Une déficience dans l'une de ces enzymes se traduit par le syndrome d'hypoglycosylation des glycoprotéines (appelé également

CDG, *Carbohydrate Deficient Glycoprotein* ou *Congenital Disorders of Glycosylation*) dont on distingue plusieurs types en fonction de la nature de l'enzyme déficiente. La déficience en phosphomannose isomérase est ainsi reliée au CDG type Ib qui se manifeste essentiellement par des anomalies hépatodigestives. Le diagnostic est évoqué devant une cassure de la courbe pondérale qui survient dès les premiers mois de vie. Les diarrhées et les vomissements sont au premier plan. Une cirrhose peut apparaître associée à une hypoalbuminémie d'origine hépatique avec, pour les cas les plus graves, des complications parfois mortelles.

Cependant, parmi les différents types de CDG, seul le CDG type Ib peut être traité par une supplémentation orale en mannose. L'apport extérieur en mannose libre permet de compléter la cellule en mannose et donc en M6P, *celui-ci ne pouvant provenir du métabolisme du fructose/glucose*. Les doses administrées doivent être progressivement augmentées, jusqu'à avoir une mannosémie de l'ordre de 100-150  $\mu\text{M}$ . Une nette amélioration de l'état général peut ainsi être obtenue avec normalisation du bilan biologique (Schéma 10).

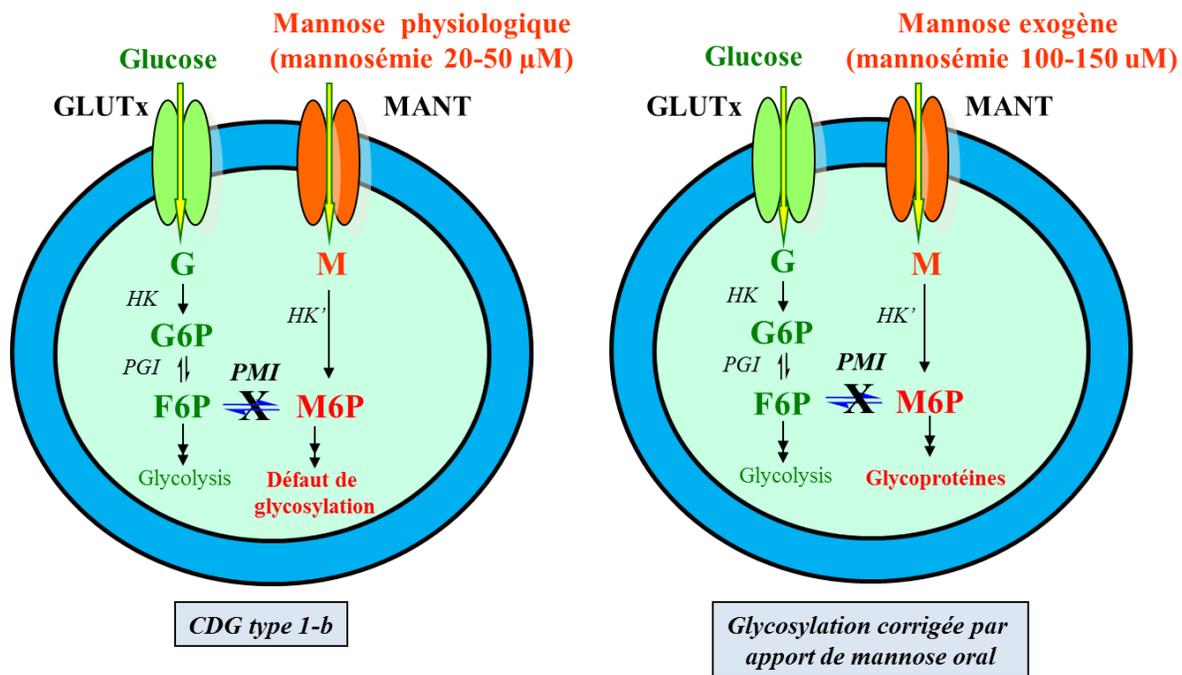


Schéma 10. Principe du traitement du CDG type Ib chez l'homme par un apport exogène de D-mannose. G : glucose, M : mannose, G6P : 6-phosphate D-glucose, M6P : 6-phosphate D-mannose, GLUTx : transporteur de glucose, HK ou HK' : hexokinase, MANT : transporteur de mannose, PGI : phosphoglucose isomérase, PMI : phosphomannose isomérase.

### 2.5.2. La PMI de *Candida albicans* : une cible thérapeutique potentielle

La paroi de *C. albicans* a été longtemps considérée comme une structure inerte et rigide sans autre fonction que de protéger une cellule fragile. Désormais, il est établi que la paroi est un élément essentiel pour la pathogénicité de *C. albicans*.<sup>58</sup> Il s'agit de la partie externe de l'enveloppe cellulaire qui confère à la levure non seulement sa forme et sa stabilité mécanique, mais aussi les premières interactions physiques avec son environnement, hôte compris.<sup>59-61</sup> Elle est composée de 80 à 90% de polysaccharides, de 6 à 25% de protéines et de 1 à 7% de lipides.<sup>59,62</sup> D'un point de vue structural, on distingue deux couches<sup>60</sup> (Figure 9) :

- La couche interne, diffuse en microscopie et adjacente à la membrane plasmique, est constituée essentiellement de chitine et de  $\beta$ -glucanes, *deux composants conférant à la paroi sa rigidité*.
- La couche externe, dense en microscopie, détermine le point de contact de la levure avec les cellules hôtes. Elle est constituée principalement de mannoprotéines (environ 40 %).<sup>62,63</sup> On distingue principalement les protéines à ancre GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) attachées à la couche interne par l'intermédiaire du réseau ramifié de  $\beta$ -(1,6)-glucanes et les protéines PIR (Proteins with Internal Repeats) associées directement aux  $\beta$ -(1,3)-glucanes.

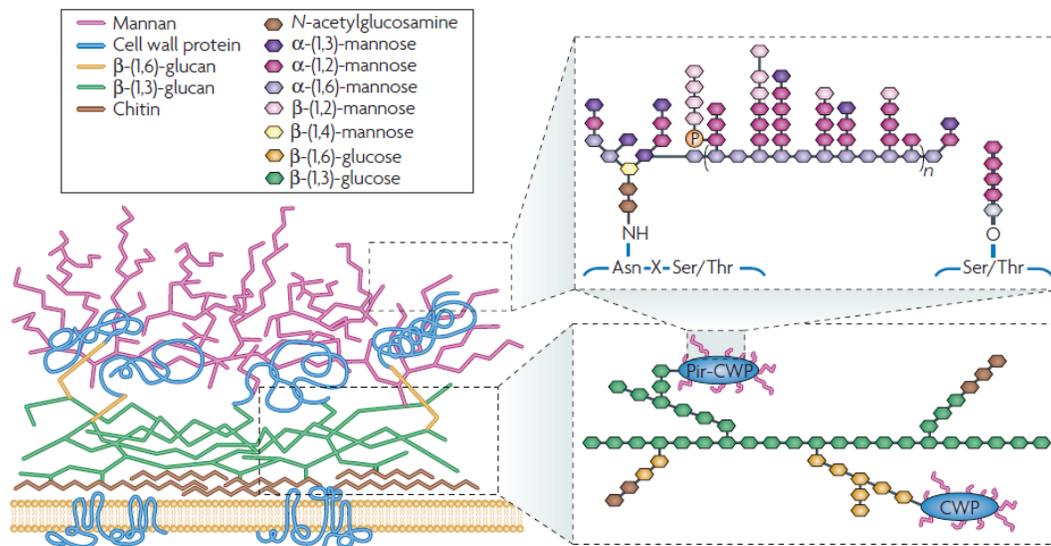


Figure 9. Organisation moléculaire de la paroi de *Candida albicans* d'après Netea et al.<sup>60</sup>

Les mannanes, *polymères de D-mannose*, constituent le composant essentiel des polysaccharides pariétaux (40%). Ils sont toujours associés par des liaisons covalentes avec des protéines formant des glycoprotéines ou avec des lipides formant des glycolipides. Majoritairement sous la forme de mannoprotéines, ils peuvent avoir un rôle structural, participant ainsi au maintien du squelette cellulaire par leur association à la chitine et aux  $\beta$ -glucanes, mais aussi enzymatiques (ex : protéolyse), contribuant ainsi à l'élaboration et aux modifications de la paroi, ou permettant la digestion des substrats dont la cellule a besoin pour sa croissance.<sup>58</sup> *A côté de ces fonctions, les mannoprotéines de surface (et en particulier les mannanes) jouent un rôle primordial en permettant à la levure d'adhérer aux tissus, étape indispensable à toute colonisation, et en confèrent à la paroi des propriétés antigéniques capables d'alerter le système immunitaire de l'hôte.* En effet, plusieurs études ont montré que c'est une mannoprotéine qui joue probablement le rôle d'adhésine chez *Candida albicans*.<sup>64-66</sup> C'est ainsi que le prétraitement de *C. albicans* par la concanavaleine A (une lectine se liant spécifiquement par affinité au D-mannose et au D-glucose), ou même l'addition de mannose durant la période d'incubation, inhibe l'adhésion de *C. albicans* aux cellules épithéliales buccales. Dans le même contexte, des cellules buccales prétraitées par la concanavaleine A sont incapables d'adhérer sur des levures n'ayant subi aucun prétraitement. Cependant, l'utilisation de lectine ne reconnaissant pas le mannose, ou même l'incubation des cellules avec un sucre autre que le mannose, n'a aucun effet inhibiteur sur l'adhérence de *C. albicans*.<sup>65</sup> Une autre étude menée sur des cellules épithéliales vaginales montre que l' $\alpha$ -mannosidase, enzyme qui catalyse l'hydrolyse des liaisons osidiques entre les résidus de  $\alpha$ -D-mannose, inhibe également l'adhésion d'extraits de parois fongiques riches en mannanes à leur surface.<sup>66</sup> Toutes ces études montrent que les mannoprotéines jouent le rôle d'adhésines permettant à *C. albicans* de coloniser les tissus de l'hôte mais aussi des implants synthétiques (cathéters, prothèses...) favorisant ainsi la formation de biofilms.

Contrairement aux mammifères qui synthétisent différents types de chaînes glycaniques, *Candida albicans* est capable de synthétiser uniquement des glycoconjugués de type poly ou oligomannosidique (O-/N-glycoconjugués). Les étapes de biosynthèse des N-glycoprotéines dans le réticulum endoplasmique sont bien conservées chez les eucaryotes et consistent toujours en l'obtention d'une protéine portant la séquence glycanique suivante :  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  (8 résidus mannose (Man) + 2 résidus N-acétylglucosamine (GlcNAc)). Tout comme chez l'homme, la synthèse des N-glycoprotéines se fait en deux temps. Tout d'abord, la chaîne peptidique d'une

part, et l'oligosaccharide précurseur de la chaîne glycanique d'autre part, sont synthétisés de façon concomitante dans le réticulum endoplasmique (RE). L'oligosaccharide est transféré en bloc sur la chaîne peptidique. Dans un deuxième temps, l'oligosaccharide subit une maturation dans l'appareil de Golgi jusqu'à l'obtention de sa structure finale, caractéristique de la protéine qui le porte. En effet, c'est lors de cette étape de la maturation golgienne que se produit la divergence entre les N-glycoprotéines de levures et celles de mammifères. Chez les mammifères, on trouve des N-glycoprotéines composées d'un noyau pentasaccharidique commun ( $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ) et des antennes formées de N-acétylglucosamine, de galactose, de fucose, de mannose et d'acide sialique. Chez les levures, on trouve uniquement des glycoprotéines de type oligo- et polymannosidiques dont les antennes sont composées uniquement de résidus mannoses montrant ainsi le rôle critique que joue ce monosaccharide chez cette levure (Figure 10).<sup>67</sup>

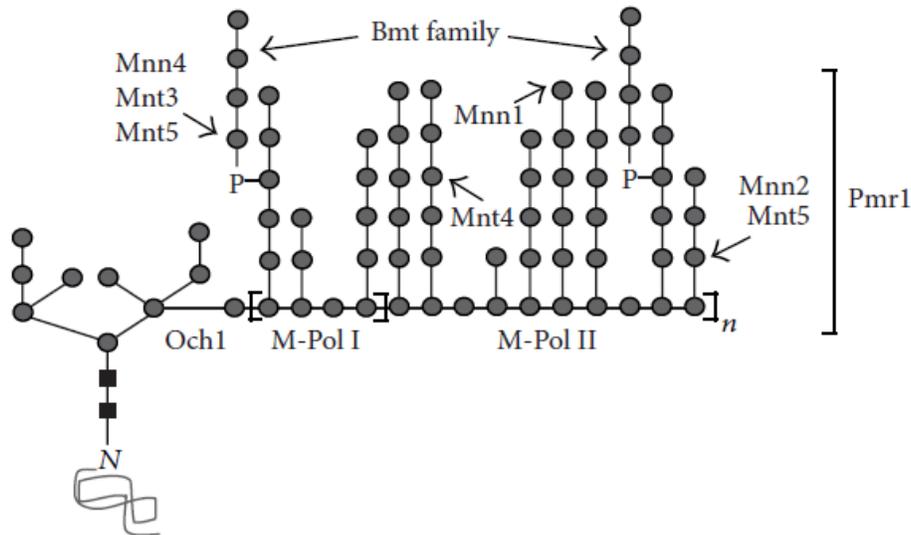


Figure 10. Structure d'un N-glycane chez *Candida albicans* : un squelette polymannosidique. Mnn 1 et 2, M-pol I et II, Bmt et Och1 sont des mannosyltransférases. Mnn4, Mnt3 et 5 sont des phosphomannosyltransférases. Pmr1 est un transporteur de  $\text{Mn}^{2+}$  dont dépend l'activité des différentes mannosyltransférases.<sup>68</sup>

L'approvisionnement en mannose est assuré par les précurseurs GDP-mannose et dol-P-mannose (dolichol phosphomannose). Ce dernier provient du GDP-mannose grâce à une dol-P-Man synthase (dolichol phosphomannose synthase). Le GDP-mannose, comme déjà mentionné, a comme précurseur le M6P qui peut provenir via deux voies : soit par phosphorylation directe du mannose exogène via une hexokinase, soit par interconversion du F6P via la PMI. Une large famille de transporteurs de glucose<sup>69</sup> a été décrite chez *C. albicans* dont récemment le transporteur codé par le gène HGT-12 qui peut fonctionner également comme un transporteur d'hexoses.<sup>70</sup>

Cependant, aucun transporteur spécifique du mannose n'a été rapporté dans la littérature suggérant ainsi que la majorité du mannose entrant dans la synthèse des glycoprotéines chez ce microorganisme provient de la glycolyse via la PMI. La PMI joue ainsi un rôle très important comme fournisseur de résidus mannose nécessaires à la synthèse des N-glycanes, composants essentiels de la paroi cellulaire (40%) et conférant à *C. albicans* son pouvoir pathogène. L'inhibition de cette enzyme aura donc des conséquences profondes sur la survie et la virulence de cette levure.

### **2.5.3. Conséquence d'une déplétion en PMI chez *Candida albicans* et d'autres microorganismes fongiques : approche d'une bithérapie antifongique**

Les candidoses sont, par leur fréquence et leur gravité, au premier rang des infections opportunistes. Parmi les candidoses, *Candida albicans* reste la levure la plus fréquemment isolée chez l'homme, malgré l'augmentation de l'incidence des infections par d'autres espèces du genre *Candida* telles que *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei*.<sup>71,72</sup> *Candida albicans* est une levure saprophyte du tube digestif et des muqueuses génitales, mais qui peut parfois être à l'origine d'infections opportunistes, localisées bénignes ou généralisées le plus souvent sévères, parfois mortelles. Les candidoses profondes surviennent essentiellement dans un contexte nosocomial et sont associées à une lourde morbidité et une mortalité élevée de l'ordre de 26 à 46%.<sup>73</sup> Elles surviennent chez des patients gravement immunodéprimés, essentiellement les malades du SIDA ou des patients soumis à une antibiothérapie, une corticothérapie, des traitements immunosuppresseurs ou chimiothérapeutiques, ou même des patients traumatisés ou brûlés. *Candida albicans* est le pathogène le plus souvent isolé chez les patients VIH+ atteints de candidoses, avec un taux de mortalité associée élevé de l'ordre de 62 à 72%.<sup>72,74</sup> Ce pathogène peut aussi former des biofilms (Figure 11) à l'origine d'infections invasives chez certains patients porteurs de matériel implanté (cathéters, sondes urinaires...)<sup>75,76</sup> Ces biofilms posent un problème majeur car ils présentent une résistance élevée à la plupart des antifongiques.<sup>75,76</sup>

Bien que des traitements antifongiques efficaces existent, des résistances apparaissent.<sup>77-81</sup> L'augmentation de la fréquence des infections fongiques invasives s'est accompagnée d'une prescription accrue d'antifongiques, polyènes et azolés, avec pour conséquence le développement de résistances : un champignon peut intrinsèquement être résistant à un

antifongique, ou acquérir une résistance secondaire sous l'effet d'une exposition prolongée à la drogue. L'apparition de ces résistances et l'accroissement continu de la fréquence des infections fongiques amènent à s'interroger sur de nouvelles cibles thérapeutiques.

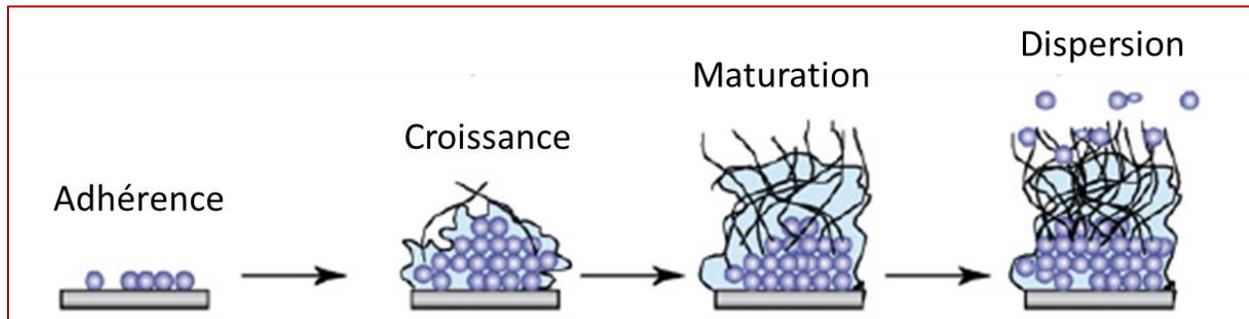


Figure 11. Principales étapes de la formation d'un biofilm de *C. albicans*. La phase initiale dite d'adhérence est suivie d'une phase de croissance qui se distingue par la production d'une matrice polysaccharidique extracellulaire et par le développement de formes mycéliennes, puis d'une phase de maturation du biofilm néo-formé et enfin d'une phase de dispersion de microorganismes à partir du biofilm.<sup>76</sup>

Etant donné le rôle vital que joue la paroi cellulaire ainsi que son implication dans la virulence de la plupart des microorganismes fongiques pathogènes, l'inhibition de la synthèse des molécules constituant cette paroi constitue une approche prometteuse pour le développement d'antifongiques. La caspofungine, appartenant à la famille des échinocandines, est le premier représentant de cette nouvelle approche thérapeutique. Ce médicament, uniquement disponible par voie intraveineuse, agit en inhibant la (1,3)- $\beta$ -D-glucane synthase, responsable de l'incorporation de glucose dans les fibrilles de glucane. La déplétion en glucane de la paroi des cellules fongiques conduit à une instabilité osmotique et à la mort cellulaire. Son utilisation est cependant limitée au traitement des aspergilloses sévères en cas d'échec ou d'intolérance aux autres antifongiques.<sup>82</sup>

Tout comme la (1,3)- $\beta$ -D-glucane synthase, la PMI peut être une cible thérapeutique potentielle. Les effets d'une absence en PMI ont été étudiés chez la plupart des champignons et levures. Ces études ont montré que les microorganismes fongiques privés de PMI sont incapables de sécréter les glycoprotéines constituant leur paroi cellulaire. Cependant, une supplémentation du milieu de culture en D-mannose est capable de pallier dans certains cas la déficience en PMI. C'est le cas par exemple de *S. cerevisiae* ou d'*Aspergillus fumigatus* qui retrouvent une croissance normale sur un milieu de culture enrichi par 5 ou 3 mM de mannose respectivement.<sup>83,84</sup> Toutefois, une supplémentation en mannose est incapable de pallier la défaillance en PMI chez *Aspergillus*

*nidulans*<sup>26</sup> et ne permet pas de restaurer les défauts morphologiques causés par l'absence de cette enzyme chez *C. neoformans*.<sup>41</sup> Ceci suggère que le système de prise en charge du mannose exogène chez ces deux pathogènes est inefficace voire inexistant. Il existe peu de données quant à la situation chez *Candida albicans* : une seule étude a été menée par l'équipe de Smith et al. qui a montré que des mutants privés de PMI, cultivés sur un milieu contenant 25 mM de mannose et 25 mM de glucose, puis transférés sur un milieu contenant uniquement du glucose ont présenté des défauts morphologiques sévères et une perturbation de la cytokinèse au fur et à mesure que les cellules s'épuisent en mannose.<sup>28</sup>

Toutes ces études montrent l'importance de la PMI pour la croissance et la survie de ces microorganismes qui apparaît alors comme une cible thérapeutique potentielle pour concevoir de nouveaux antifongiques. Une étude menée par l'équipe de Wills et al. vient appuyer cette hypothèse : l'absence de la PMI chez des mutants de *C. neoformans* provoque non seulement un arrêt de la croissance in vitro mais également une perte de la virulence in vivo<sup>41</sup> du pathogène, montrant pour la première fois la validité de la PMI en tant que cible antifongique potentielle.

Concernant notre travail ciblant *C. albicans*, la levure la plus fréquemment rencontrée chez l'homme, il est à priori nécessaire de concevoir des inhibiteurs sélectifs de la PMI de *Candida albicans* vis-à-vis de la PMI humaine, ce qui sera difficile vue la forte homologie de séquence existante entre les deux enzymes. En conséquence, une bithérapie consistant à combiner un inhibiteur de la PMI avec un apport oral de D-mannose a été proposée dans notre laboratoire (Schéma 11).<sup>53</sup> Cette bithérapie est inspirée de l'approche thérapeutique utilisée pour le traitement du CDG type 1b : un apport oral de D-mannose permet de corriger toutes les anomalies provoquées par la déficience de la PMI chez l'homme. Dans notre approche, l'apport du D-mannose permettrait de limiter les effets d'une inhibition de la PMI humaine sans toutefois rétablir la virulence des microorganismes visés. En effet, au vu des résultats précédemment énoncés, il semble que les microorganismes pathogènes possèdent un système de prise en charge de mannose exogène peu efficace voire inexistant dans certains cas (*Aspergillus nidulans* et *Cryptococcus neoformans*). D'une part, aucun transporteur spécifique n'a été décrit dans la littérature chez *C. albicans* et chez les autres microorganismes mentionnés ci-dessus, tandis que chez l'homme, un transporteur spécifique et très efficace de D-mannose existe (ce transporteur peut délivrer le mannose en présence même de 100 fois plus de glucose). D'autre part, les quantités de mannose ajoutées au milieu (5 mM et 25 mM dans le cas de *Candida albicans*) pour

réparer les défauts sont nettement plus élevées que la valeur de la mannosémie recherchée dans le traitement du CDG type 1b (100-150  $\mu\text{M}$ ).

Bien que la sélectivité d'un médicament soit un critère aussi important que sa « puissance », il faut toujours considérer le rapport bénéfice/risque : la lourde morbidité et la mortalité élevée associées aux infections nosocomiales touchant des personnes atteintes du virus du SIDA ou des patients ayant un cancer sont beaucoup plus graves que les effets indésirables liés à une inhibition de la PMI et qui sont traitables par un simple apport de D-mannose.

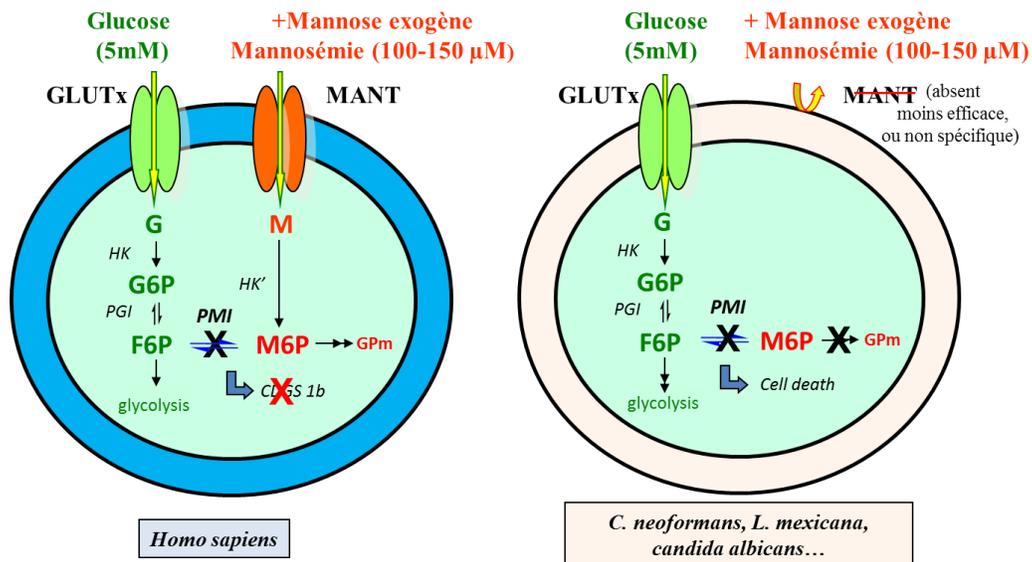


Schéma 11. Principe de la bithérapie antifongique : association inhibiteur de PMI + D-mannose exogène.

### 3. Présentation générale de la phosphoglucose isomérase (PGI)

#### 3.1. Réaction catalysée par la PGI

La phosphoglucose isomérase (PGI, EC 5.3.1.9) est présente chez la plupart des organismes : on la trouve aussi bien chez les procaryotes (bactéries) que chez les eucaryotes (animaux, plantes, champignons et parasites). Découverte en 1933, la phosphoglucose isomérase est généralement une protéine dimérique intervenant à la deuxième étape de la glycolyse où elle catalyse l'isomérisation réversible entre le F6P et le G6P (Schéma 12). Tout comme la PMI, cette isomérisation procède d'une catalyse acido-basique au cours de laquelle se forme un intermédiaire de haute énergie de type 1,2-*cis*-enediol(ate). Cependant, la PGI est active sans

cofacteur métallique. Il a été montré que les PGI possèdent une sélectivité pour les anomères  $\alpha$ -pyranose du G6P et  $\beta$ -furanose du F6P (Schéma 12).<sup>85,86</sup> La PGI du muscle de lapin catalyse par ailleurs la mutarotation de ses deux substrats ainsi que celle du 6-phosphate D-mannose (M6P)<sup>15</sup>. Elle réalise également l'épimérisation du G6P en M6P.<sup>87</sup>

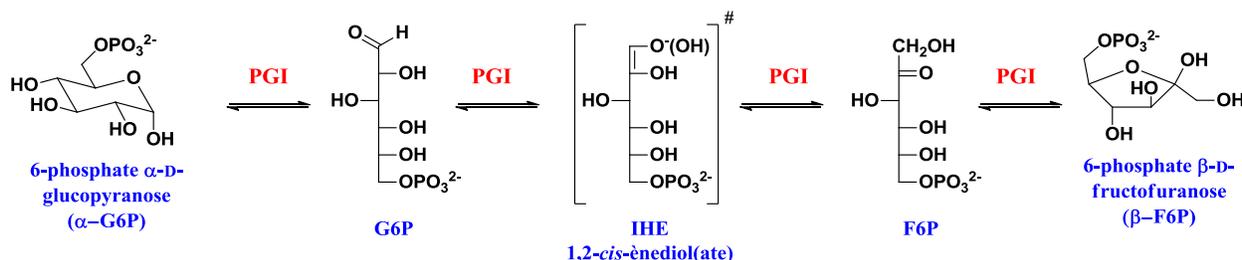


Schéma 12. Réaction catalysée par la PGI : passage par un intermédiaire de haute énergie (IHE) de type 1,2-cis-enediol(ate).

### 3.2. Aspects génétiques : conservation de la séquence

La PGI est une protéine qui s'est hautement conservée au cours de l'évolution (plus de 50% de conservation entre la levure et l'homme). Un haut degré de similarité existe entre les séquences protéiques des différentes PGI répertoriées à ce jour (Tableau 3).<sup>88</sup>

Tableau 3. Homologies de séquences entre des PGI provenant de différentes sources.

Organisme	porc	souris	levure	<i>K. lactis</i>	Pf	Tb	Clarkia	<i>E. coli</i>	Bs A	Bs B
Homme	93	89	58	57	38	57	63	64	23	21
porc		89	59	56	39	58	64	65	23	22
souris			58	57	37	57	64	63	23	21
levure				86	39	53	59	59	24	21
<i>Kluyveromyces lactis</i>					41	52	60	59	25	22
<i>Plasmodium falciparum</i> (Pf)						40	41	40	24	23
<i>Trypanosoma brucei</i> (Tb)							58	57	23	22
Clarkia								88	25	23
<i>Escherichia coli</i>									24	22
<i>Bacillus stearothermophilus</i> A (BsA)										70

Plusieurs alignements de séquences primaires de PGI provenant d'organismes différents ont été décrits dans la littérature.<sup>88-91</sup> Un d'entre eux est montré dans la figure 12. On observe ainsi une

cinquantaine de résidus parfaitement conservés à travers les six organismes, avec une très grande similitude au niveau des résidus du site actif de l'enzyme.

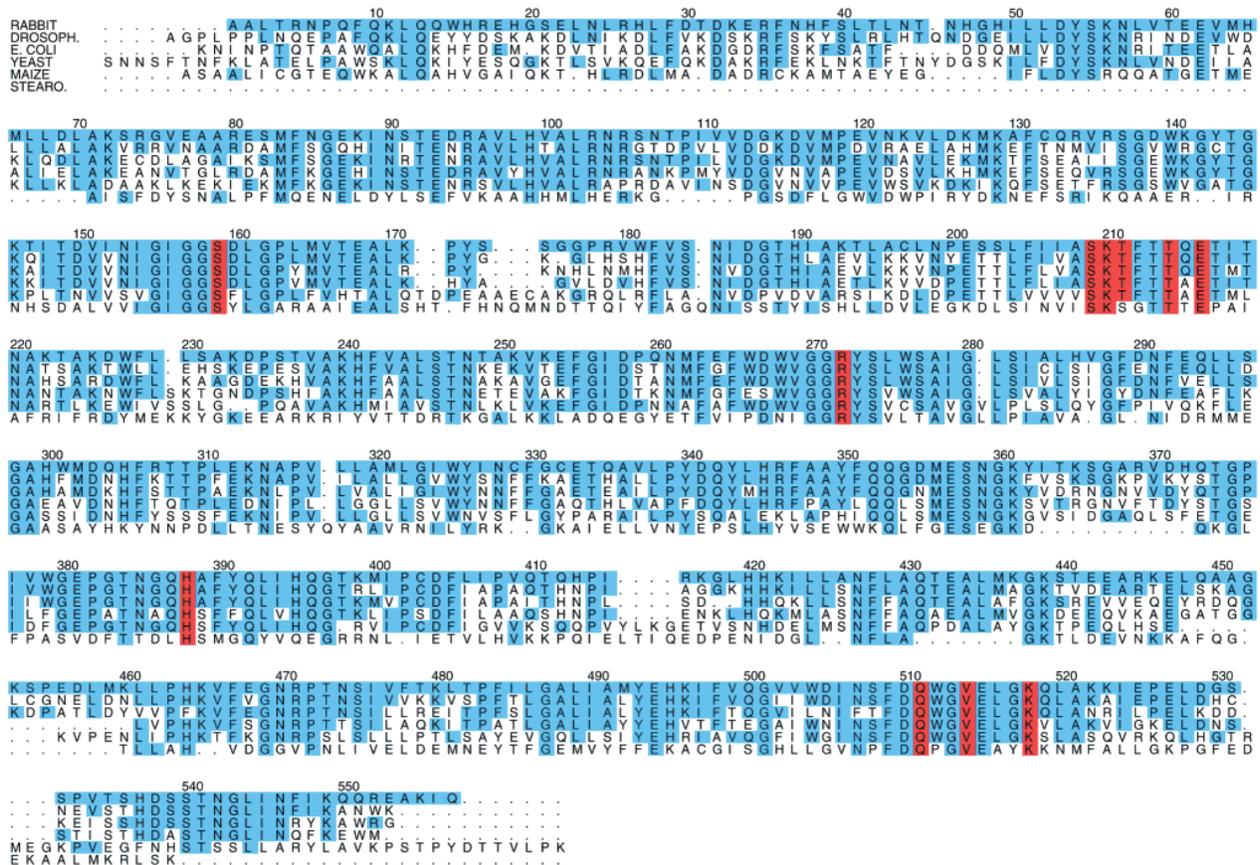


Figure 12. Alignements de séquences de PGI provenant de 6 organismes différents d'après Jeffery et coll. Les résidus identiques à ceux de RmPGI (PGI du muscle de lapin) sont surlignés en bleu et les résidus du site actif interagissant avec le 6-phospho-D-gluconate (un inhibiteur de la RmPGI<sup>92</sup>) sont surlignés en rouge.

En 2004, une nouvelle famille distincte de PGI a été décrite chez plusieurs espèces comme *Pyrobaculum aerophilum*, *Aeropyrum pernix* et *Thermoplasma acidophilum*.<sup>93,94</sup> Ces PGI exercent les deux activités PMI et PGI d'une manière équivalente. Elles ont une faible similarité de séquences avec les autres PGIs provenant des eucaryotes et des bactéries et constituent par leur double activité un groupe distinct de PGI.

### 3.3. Connaissances mécanistiques et structurales sur la PGI humaine

En 1976, Shaw et Muirhead ont rapporté la première structure tridimensionnelle de la PGI provenant de muscle de porc (PDB 1PGI).<sup>95,96</sup> Cependant, la séquence de la protéine n'était pas

connue à l'époque. De plus, la résolution n'étant que de 3,5 Å (Figure 13), ces données n'ont pas permis une analyse détaillée de la protéine. Ils ont pu déduire toutefois que la PGI est composée de deux parties distinctes : le grand et le petit domaine. Le grand domaine est formé de six feuillets  $\beta$  parallèles entourés d'hélices  $\alpha$ , une structure classique des enzymes glycolytiques. Le petit domaine est également composé de quatre feuillets  $\beta$  reliés entre eux par des hélices  $\alpha$ .

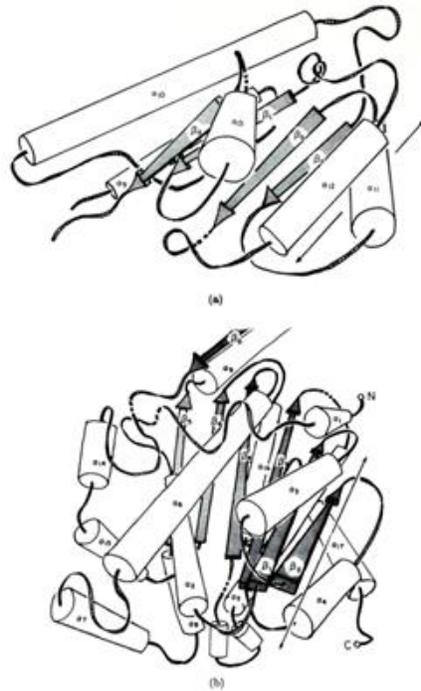


Figure 13. Structure tridimensionnelle d'un monomère de la PGI du porc. On distingue deux parties distinctes : le petit (a) et le grand (b) domaine, chacun formé de feuillets  $\beta$  entourés par des hélices  $\alpha$  (PDB 1PGI).<sup>95,96</sup>

La protéine est dimérique et contient deux sites actifs homologues. Chaque site actif est partiellement formé, d'une part, par deux domaines de feuillets  $\beta$  d'une sous-unité, d'autre part, par une portion de chaîne de la deuxième sous-unité : ceci explique pourquoi l'enzyme n'est active que sous sa forme dimérique. Ce n'est qu'en 1999 que sera publiée la première structure X à haute résolution (2.3 Å) d'une PGI, celle de *Bacillus stearothermophilus* (PDB 2PGI).<sup>91</sup> Au cours des années suivantes, beaucoup d'autres structures cristallographiques à haute résolution de diverses PGI ont été déposées à la Protein Data Bank.

En 2001, la première structure à haute résolution (1.9 Å) du complexe de la PGI du muscle de lapin avec le 5-phospho-D-arabinonate (RmPGI-5PAA, PDB 1G98), le 2<sup>ème</sup> meilleur inhibiteur de l'enzyme après l'acide 5-phospho D-arabinonohydroxamique (5PAH), fut publiée par Jeffery et al. en collaboration avec l'équipe de Salmon et al. C'est cette structure qui a permis

d'identifier le site actif complet de l'enzyme et notamment le Glu357 comme base catalytique. Cette même année, deux structures cristallines de la PGI humaine (AMF-PGI) ont été rapportées par Cordeiro et al.<sup>97</sup> (PDB 1JLH) et Read et al.(PDB 1IAT).<sup>98</sup> Cette dernière structure résolue à 1.6 Å montre une protéine de structure proche de celle du porc. Chaque monomère est formé de 557 acides aminés et comprend un petit et un large domaine : le large domaine qui contient l'extrémité N-terminal est formé de six feuillets  $\beta$  parallèles et antiparallèles entourés par des hélices  $\alpha$ . Le petit domaine contenant le côté C-terminal est formé quant à lui de cinq feuillets  $\beta$  entourés également par des hélices  $\alpha$  (Figure 14).

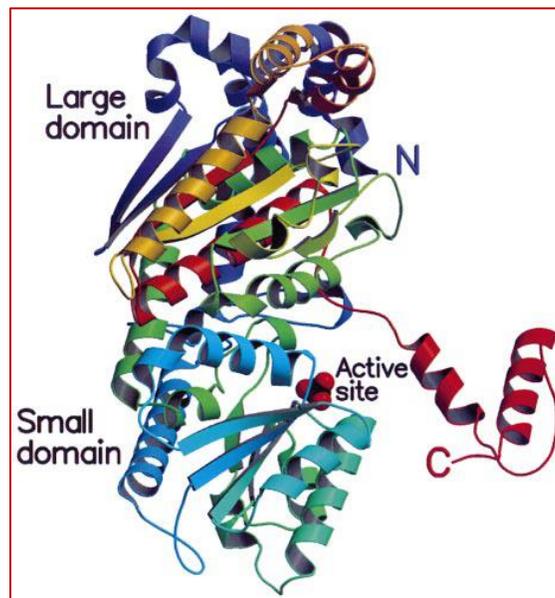


Figure 14. Structure tridimensionnelle d'un monomère de l'AMF-PGI (PDB 1IAT).<sup>98</sup>

On remarque une extension de 45 résidus du côté C-terminal dans l'autre monomère ainsi qu'une interaction des résidus 438-468 avec des résidus de l'autre monomère, ce qui explique la grande stabilité de l'enzyme dans des conditions dénaturantes.

Bien que la structure ne comprenne ni inhibiteur ni substrat au sein du site actif de l'enzyme, une fixation fortuite d'un ion sulfate et d'une molécule de  $\beta$ -mercaptoéthanol a beaucoup aidé les auteurs à l'identification des résidus du site actif impliqués dans la fixation du groupe phosphate ainsi que d'autres parties du substrat (G6P ou F6P). Le sulfate est lié à 6 ligands dont 2 thréonines (211 et 214), deux sérines (159 et 209), la lysine 210 ainsi que la thréonine 217 via une molécule d'eau. Quant au  $\beta$ -mercaptoéthanol, il forme deux liaisons hydrogène avec la

glycine 158 et l'histidine 388 (acide aminé du site actif appartenant à l'autre monomère) via son oxygène, ainsi qu'une autre liaison hydrogène via son soufre avec une molécule d'eau, elle-même coordonnée à la lysine 210 (Figure 15). D'autres résidus importants du site actif ont été également identifiés tels que le Glu357 et l'Arg272. Les auteurs proposent également le Glu357 comme un bon candidat pour jouer le rôle de la base catalytique dans la réaction catalysée par la PGI sachant que ce résidu avait déjà été identifié comme tel par Jeffery et al. en 2001.

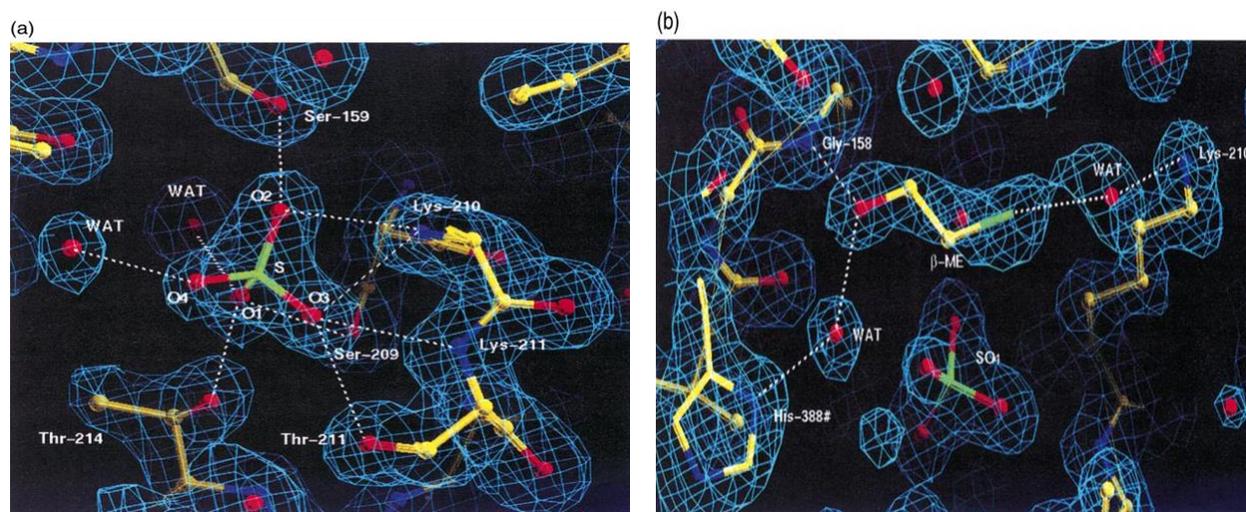


Figure 15. Structure du complexe de l'AMF-PGI avec l'ion sulfate (a) et le  $\beta$ -mercaptopéthaneol (b) d'après Read et al. (PDB 1IAT).<sup>98</sup>

Ces mêmes résidus du site actif ont été également identifiés en 2002 dans la structure de l'AMF-PGI complexée avec le D-érythrose 4-phosphate (E4P), un bon inhibiteur de la PGI ( $K_i$  de l'ordre de 0.7-1  $\mu$ M sur RmPGI<sup>99</sup>). Dans cette structure résolue à 2.4 Å (PDB 1IRI),<sup>100</sup> les ligands du phosphate sont exactement les mêmes que ceux identifiés dans les structures précédentes. On note également la présence d'une molécule d'eau reliant le phosphate et la Thr217. L'oxygène en C3 est coordonné à l'His388, tandis que l'oxygène du C1, en fonction de sa conformation, peut coordonner soit le Glu357, soit la Gly158. Une autre molécule d'eau relie la Lys518 à l'oxygène en C4 et à l'oxygène en C2 de l'E4P. Deux résidus se révèlent très importants pour l'activité AMF : l'histidine 388 et la thréonine 214 (Figure 16 ; dans cette figure, on voit que les numéros acides aminés sont différents d'une unité car la méthionine N-terminale est prise en considération dans la séquence de la protéine). En effet, le remplacement de l'His388 par une Phe ou de la Thr214 par un Asp provoque une altération de l'activité AMF comparativement à la

protéine non mutée : les cellules ne répondent pas aux mutants d'AMF et montrent une motilité basale. Ces deux résidus sont probablement impliqués dans la fixation de l'AMF sur la chaîne glycosylée de l'AMFR.<sup>100</sup>

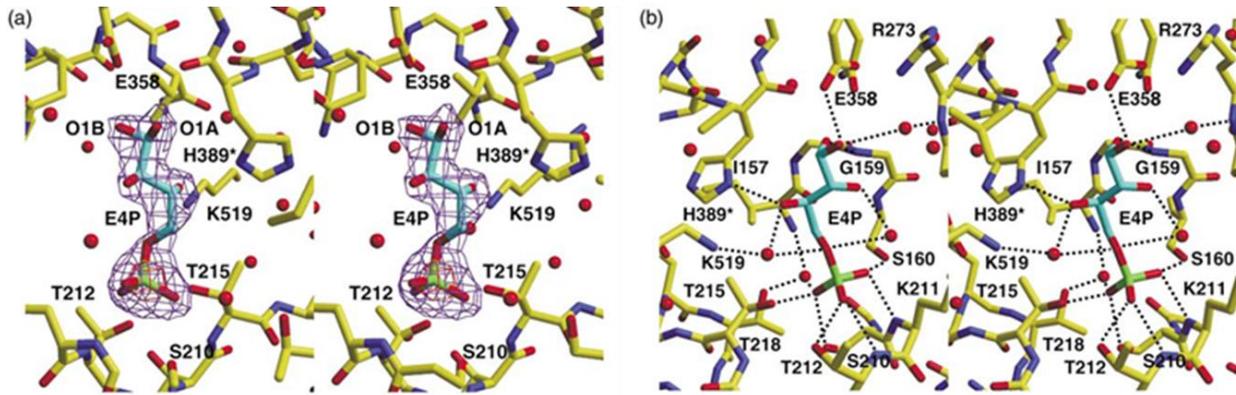


Figure 16. structure du complexe de l'AMF-PGI avec l'E4P (PDB 1IR1).<sup>100</sup>

En 2003, Davies et al. rapportent la structure à une résolution de 2.5 Å du complexe de la PGI humaine avec le 5PAA (PDB 1NUH).<sup>101</sup> Les auteurs confirment, en accord avec d'autres études notamment la structure du complexe RmPGI-5PAA,<sup>102</sup> que le glutamate 357 est la base catalytique impliquée dans la réaction d'isomérisation catalysée par la l'AMF-PGI. Les deux structures sont représentées dans la figure 17.

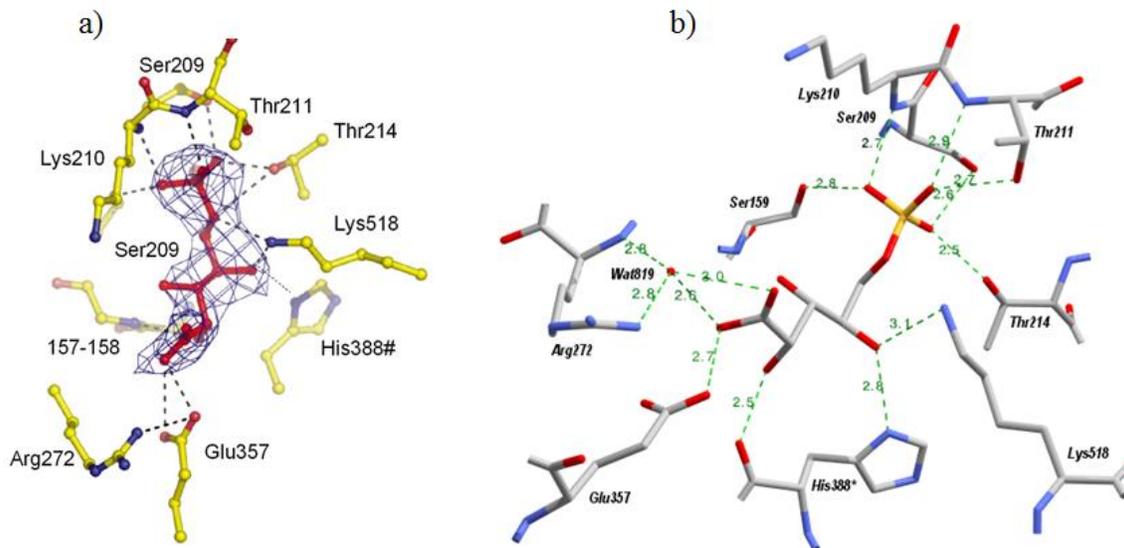


Figure 17. Structure des complexes de (a) l'AMF-PGI (PDB 1NUH)<sup>101</sup> et de (b) la RmPGI (PDB 1G98)<sup>102</sup> avec le 5PAA.

Dans le cas du complexe RmPGI-5PAA (PDB 1G98), le Glu357 se trouve à 2.7 Å de l'atome O1 du carboxylate correspondant au C1 du substrat et à 3.2 Å de l'atome correspondant au C2 (Figure 17 b). Il est donc idéalement placé pour jouer le rôle de base catalytique impliquée dans le transfert de proton entre les carbones C1 et C2 du substrat. Le résidu Arg272, quant à lui, semble être impliqué dans la stabilisation de l'IHE 1,2-*cis*-enediolate par son interaction avec la molécule d'eau correspondant à l'atome O1 de l'intermédiaire. De par leur interaction avec l'hydroxyle en C4 de l'inhibiteur, correspondant à l'hydroxyle en C5 du substrat, les résidus His388 et Lys518 pourraient catalyser l'étape initiale d'ouverture cyclique du substrat  $\alpha$ -G6P ou  $\beta$ -F6P.

En 2002, toujours en collaboration avec le groupe du Pr. Jeffery, notre équipe a obtenu la structure cristallographique à haute résolution (1.9 Å) par diffraction des rayons X du complexe RmPGI-5PAH (PDB 1KOJ),<sup>103</sup> dont le site actif est représenté sur la Figure 18.

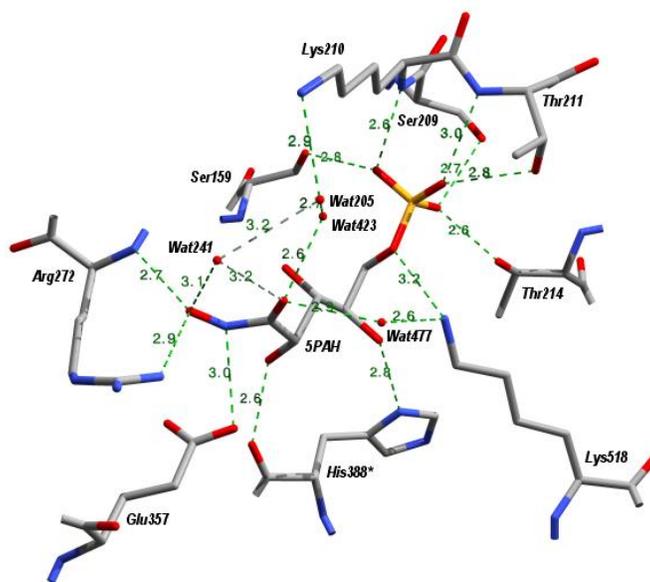


Figure 18. Structure du complexe de la RmPGI avec le 5PAH (PDB 1KOJ).<sup>103</sup>

Cette structure avec le 5PAH est très analogue à celle obtenue précédemment pour le complexe avec le 5PAA, où le couple 5PAA + Wat819 mime très bien le 5PAH. Cette étude confirme les conclusions émises lors de l'étude structurale précédente quant au rôle des aminoacides Arg272, Glu357, His388 et Lys518, quatre résidus totalement conservés dans l'alignement des séquences de 129 PGI. La présence de la molécule d'eau (Wat 241) à 3.1 et 3.2 Å des deux oxygènes du groupe CONHOH (Figure 18) est intéressante. Elle est impliquée probablement dans la

stabilisation des intermédiaires ènediolates de la réaction catalysée par la PGI et dans le transfert de proton entre les deux atomes O1 et O2 du substrat.

- Mécanisme de la réaction catalysée par la PGI

Le mécanisme de l'étape de l'ouverture cyclique du F6P a été proposé par le Pr. Jeffery suite à une étude structurale du complexe RmPGI-F6P (PDB 1HOX) montrant clairement une interaction du résidu His388 avec l'oxygène cyclique du F6P, ce qui suggère une His388 sous forme protonnée (Figure 19).<sup>104</sup>

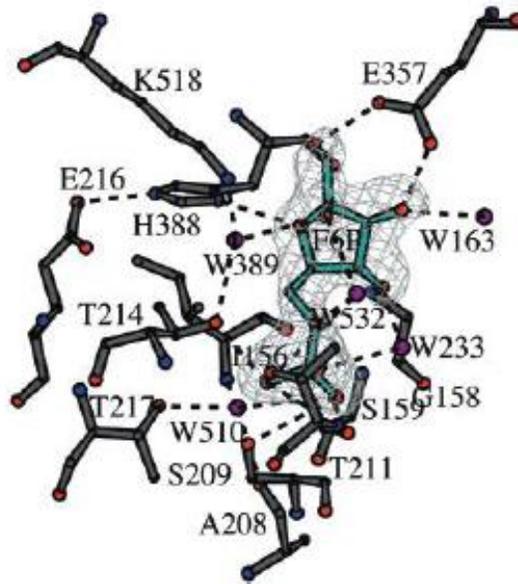


Figure 19. Structure de RmPGI complexée avec le F6P (PDB 1HOX).<sup>104</sup>

Le Glu216, en interagissant avec l'histidine, semble positionner correctement ce dernier en face de l'oxygène furanosique du  $\beta$ -F6P. Ces observations montrent que l'histidine catalyse probablement l'étape d'ouverture cyclique. On note une interaction indirecte de la Lys518 et de la Thr214 avec l'hydroxyle anomérique du substrat via la molécule d'eau 389. Cette dernière est bien positionnée pour capter le proton de l'hydroxyle en C1 et assurer l'ouverture du cycle du substrat.

Il en a ainsi été déduit le mécanisme d'ouverture cyclique rapporté sur le Schéma 13 (Etape 1) par cette molécule d'eau. Une fois le G6P sous forme ouverte, la molécule d'eau (protonnée ou non) "sortirait" du site actif, ce qui aurait pour conséquence un changement conformationnel de

la structure du site actif. La Lys518 se déplace notamment de 4 Å pour interagir avec les oxygènes O5 et O6 du substrat, ce qui induit une rotation de la liaison C3-C4 de 140 ° (Etape 2) et positionne ainsi le C1 correctement vis-à-vis du Glu357 et de l'Arg272 pour les étapes d'isomérisation proprement dites (étapes 3, 4 et 5). Le Glu357 joue alors le rôle de base catalytique en arrachant le proton en C2 du G6P (Etape 3). Il se forme le premier intermédiaire de haute énergie de type 1,2-*cis*-enediolate, qui, par un transfert de proton entre les 2 oxygènes O1 et O2, donne le deuxième intermédiaire de haute énergie. Cette étape peut se faire soit par simple prototropie soit par l'intervention d'une molécule d'eau (Etape 4). L'Arg272 participe à la stabilisation de l'IHE formé. Ce dernier est enfin reprotoné par le Glu357 en C1 pour conduire au F6P sous sa forme linéaire (Etape 5). Le proton est introduit en position proR. La dernière étape est l'étape de fermeture de cycle qui se fait de manière symétrique à l'ouverture de cycle : on assiste d'abord à une rotation de la liaison C3-C4 (Etape 6), puis à la fermeture de cycle assistée par la molécule d'eau (Etape 7). Le F6P est enfin libéré sous sa forme cyclique  $\beta$ -furanose.

Grâce à ces études structurales de complexes PGI-substrat et PGI-inhibiteur, et notamment celles publiées par les équipes des professeurs Jeffery et Salmon, le mécanisme d'isomérisation catalysée par la PGI est aujourd'hui très bien décrit, contrairement à celui catalysé par la PMI.

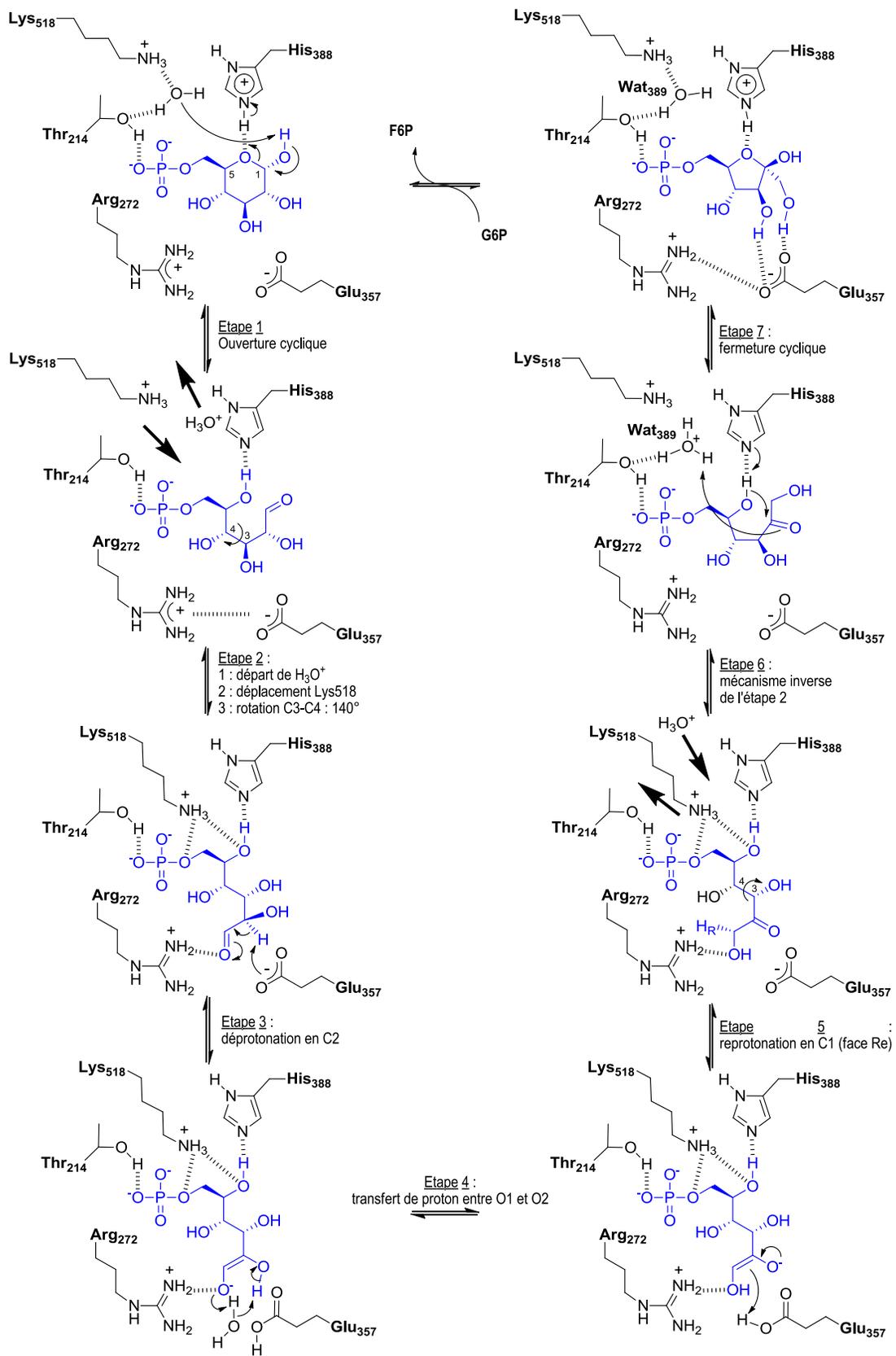


Schéma 13. Mécanisme de la réaction d'isomérisation catalysée par la PGI (Salmon, d'après Jeffery et coll. <sup>103,104</sup>).

### 3.4. Facteur de motilité autocrine-Phosphoglucose isomérase (AMF-PGI) : vers de nouveaux anti-métastatiques

#### 3.4.1. Implication dans le métabolisme chez l'homme

##### a) La PGI : 2<sup>ème</sup> enzyme de la glycolyse

La phosphoglucose isomérase catalyse l'interconversion réversible du 6-phosphate D-fructose (F6P) en 6-phosphate D-glucose (G6P). Elle intervient ainsi à la deuxième étape de la *glycolyse* nommée également voie d'Embden-Meyerhoff, une voie métabolique par laquelle le glucose est converti en pyruvate avec production de 2 moles d'ATP (Schéma 14).

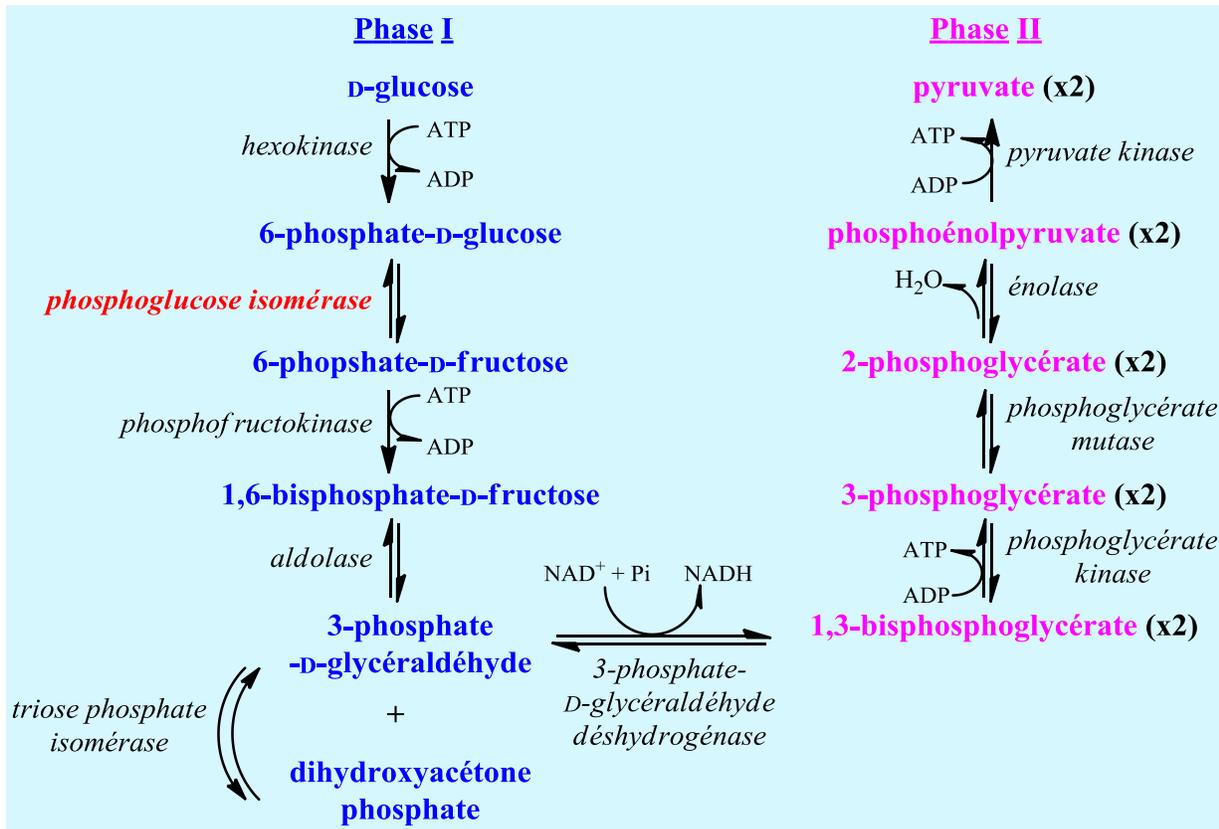


Schéma 14. Les différentes étapes de la glycolyse. La glycolyse se divise en deux phases : la phase de préparation où le glucose est transformé en deux trioses phosphates avec consommation d'énergie (**phase I**) et la phase de restitution qui produit de l'énergie sous forme d'ATP (**phase II**).

Cette succession de dix réactions enzymatiques, probablement la voie biochimique la mieux comprise, joue un rôle clé dans le métabolisme énergétique en fournissant une quantité non négligeable de l'énergie utilisée par la plupart des organismes et en produisant du pyruvate,

molécule fournissant le cycle de Krebs et certaines voies anaboliques. Le pool de  $\text{NAD}^+$  cytosolique constitue le pouvoir oxydant de la glycolyse. Ce dernier doit être régénéré pour permettre à la glycolyse de se poursuivre. En conditions aérobiques, le  $\text{NAD}^+$  est régénéré par réoxydation du NADH via la phosphorylation oxydative.

La PGI se trouve alors à un véritable carrefour métabolique : elle est impliquée non seulement dans la glycolyse mais aussi indirectement dans d'autres voies métaboliques telles que le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative, la néoglucogénèse, la voie des pentoses phosphates et la biosynthèse des oligosaccharides. Ainsi, la déficience en PGI n'est pas sans conséquence chez l'homme et est, par sa fréquence, la seconde des enzymopathies érythrocytaires de la voie d'Embden-Meyerhof, venant après le déficit en pyruvate kinase. Bien que le déficit enzymatique puisse concerner plusieurs tissus, le tableau clinique est habituellement limité à une anémie hémolytique non-sphérocytaire chronique. C'est une maladie génétique autosomale récessive rare qui est due à une mutation au niveau du gène de la PGI localisé sur le chromosome 19. Elle se caractérise par la lyse de globules rouges due à une accumulation du G6P et au manque d'ATP et se manifeste généralement par un ictère néonatal, une faiblesse musculaire, une splénomégalie et une lithiase biliaire. Les seuls traitements disponibles sont les transfusions sanguines répétées et la splénectomie.

#### **b) Implication de la PGI dans la néoglucogénèse**

Le glucose est la source principale d'énergie nécessaire au fonctionnement de l'ensemble des cellules de l'organisme. Les besoins en glucose de l'organisme sont couverts par l'alimentation, la glycogénolyse hépatique et la **néoglucogénèse**. L'alimentation étant intermittente et le stock hépatique de glycogène épuisable, la néoglucogénèse, qui consiste à synthétiser du glucose à partir de dérivés non glucidiques, participe activement au maintien de la concentration du glucose dans le sang pour entretenir le capital glucidique nécessaire aux tissus gluco-dépendants : cerveau et globules rouges. Elle a lieu à 90% dans le foie et à 10% dans le rein et l'intestin. La PGI joue ainsi un rôle primordial dans la néoglucogénèse qui emprunte les mêmes enzymes de la glycolyse y compris la phosphoglucose isomérase. Cependant, trois de ces enzymes l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase, catalysent des réactions irréversibles et très exergoniques dans le sens de la glycolyse ; la néoglucogénèse n'est autre que la glycolyse inversée mais tout en contournant ces trois étapes irréversibles. Pour contourner ces 3 difficultés,

la cellule fait appel à d'autres réactions thermodynamiquement plus favorables catalysées par des réactions spécifiques de la néoglucogenèse.

### c) Implication de la PGI dans la voie des pentoses phosphates

La *voie des pentoses phosphates* est étroitement imbriquée avec celle de la glycolyse mais avec une finalité plus anabolique que catabolique. C'est une voie métabolique qui n'a pas pour but, contrairement à la glycolyse, de produire de l'énergie, mais la production des espèces suivantes :

- Du NADPH, coenzyme réduit nécessaire à des réactions de synthèses réductrices, notamment la biosynthèse des acides gras, du cholestérol et des hormones stéroïdes. Elle sert aussi à conserver le pool du glutathion réduit dont le rôle est de lutter contre le stress oxydatif cellulaire.
- Du 5-phosphate D-ribose, précurseur de la synthèse de nucléotides puriques et pyrimidiques, et de coenzymes flaviniques et pyridiniques.
- Du 4-phosphate D-érythrose, précurseur des acides aminés aromatiques.

Le substrat de la voie des pentoses phosphates est le 6-phosphate D-glucose (G6P) : en dérivation sur la glycolyse, cette voie la quitte au niveau G6P pour la rejoindre au niveau du F6P et du 3-phosphate D-glycéraldéhyde. La phosphoglucose isomérase intervient ainsi dans le recyclage du F6P formé en G6P qui sert à alimenter la voie des pentoses phosphates.

### d) Implication de la PGI dans la synthèse des oligosacharides

La glycosylation des protéines est un processus biologique essentiel. Elle intervient dans la stabilisation spatiale des protéines qui aide à leur repliement tri-dimensionnel. Elle permet également de modifier leurs propriétés physicochimiques (solubilité, protection contre les protéases et les agressions acide, alcaline et osmotique). Enfin, elle permet la reconnaissance antigénique : les chaînes glucidiques des protéines sont des médiateurs importants pour la reconnaissance entre cellules et sont impliquées dans divers processus physiologiques tels que la fécondation, la différenciation cellulaire, le rassemblement des cellules pour former des organes, mais aussi dans des processus pathologiques tels que l'infection des cellules par des bactéries et des virus, la formation de tumeurs malignes ainsi que la résistance des cellules cancéreuses à des médicaments cytostatiques (implication de la P-glycoprotéine).

La biosynthèse de toutes les N-glycoprotéines membranaires se fait via un précurseur oligosaccharidique commun formé de trois glucoses, neuf mannoses et deux N-acétylglucosamine. Le GDP-mannose (guanosine diphosphomannose), synthétisé à partir du M6P, est un donneur de groupement mannose pour les réactions de la glycosylation. La PGI, par l'intermédiaire de ses substrats précurseurs du mannose 6-phosphate joue ainsi un rôle important dans la biosynthèse des glycoprotéines.

### **3.4.2. L'AMF-PGI : un biomarqueur de cancer validé**

Bien que la PGI soit une enzyme à localisation intracellulaire, une forte activité glycolytique a été cependant détectée dans le sérum<sup>105-109</sup> ou les urines<sup>110</sup> de patients atteints de tumeurs malignes au niveau du sein, de la vessie, du rein, de l'utérus et des appareils gastrointestinal et colorectal. En effet, une fois dans le milieu extracellulaire, la PGI joue un autre rôle, celui de facteur de motilité autocrine désigné par «AMF» ou «AMF-PGI». Des tests in-vitro montrent que cette cytokine est capable de stimuler la motilité des cellules de fibrosarcome humain « HT-1080 » dès une concentration de 1 pg/mL.<sup>111</sup> Des taux élevés de cette cytokine ont été corrélés à la progression des tumeurs et au développement de métastases.<sup>112-114</sup> Secrété uniquement par les cellules tumorales,<sup>115-117</sup> l'AMF est un biomarqueur de détection précoce de cancers, potentiellement métastatiques, pouvant aussi servir comme marqueur prédictif de la réponse à une thérapie anti-cancéreuse.

En plus de son activité AMF, d'autres activités extracellulaires ont été attribuées à l'exo-PGI :

- La neuroleukine (NL) qui joue à la fois le rôle d'une lymphokine et d'un facteur neurotrophique.<sup>118,119</sup>
- Le médiateur de maturation et de différenciation (DMM) qui induit la différenciation des cellules leucémiques myéloïdes en cellules monocytiques.<sup>120</sup>
- Un antigène impliqué dans la polyarthrite rhumatoïde<sup>121</sup> et dans l'agglutination des spermatozoïdes humains pouvant ainsi être à l'origine de l'infertilité masculine.<sup>122</sup>

La PGI est donc une protéine multifonctionnelle dont l'activité (et le nom) dépend de sa localisation dans l'organisme.<sup>123</sup>

### 3.4.3. Découverte de l'AMF-PGI

Le facteur de motilité autocrine a été découvert en 1986 par l'équipe de Liotta et al.<sup>115</sup> qui a réussi à le purifier à partir de cellules métastatiques de mélanome humain « A2058 ». Il a été désigné par « facteur de motilité autocrine » (AMF) étant donné qu'il stimule la motilité, à la fois dirigée (chimiotaxie) et aléatoire, des cellules de mélanome qui le produisent.

Dans le but d'explorer la nature de ce facteur métastatique, des alignements de séquences protéiques ont été menés : l'AMF a été ainsi distingué des autres chimioattracteurs et facteurs de croissances déjà connus pour être impliqués dans les métastases tumorales. Plus tard, l'AMF a été décrit comme étant identique à la phosphoglucose isomérase.<sup>89</sup> En effet, une homologie entre l'AMF purifiée à partir de cellules d'un modèle murin de fibrosarcome et la phosphoglucose isomérase extraite du muscle de lapin a été prouvée en se basant, non seulement sur l'alignement de séquences nucléotidiques, mais aussi sur leurs propriétés physicochimiques et leur activité biologique<sup>89</sup> :

- Les deux protéines donnent une bande identique vers 55 kDa par migration sur gel SDS-PAGE.
- Les deux protéines sont reconnues par le même anticorps polyclonal anti-AMF.
- L'AMF est dotée d'une activité isomérase comparable à celle de la PHI du muscle de lapin (92.3% de l'activité isomérase de la PHI).
- La PGI extraite du muscle de lapin a une activité AMF comparable à celle de l'AMF purifié.
- L'érythrose-4-phosphate et le 6-phospho-D-gluconate, qui sont des inhibiteurs de l'activité PGI, inhibent également la motilité des cellules tumorales stimulée par l'AMF.

Le fait que la PGI, *une phosphoenzyme*, soit un marqueur métastatique peut paraître surprenant. Néanmoins, d'autres « phosphoenzymes » telles que les protéines kinases, la thymidine phosphorylase<sup>124,125</sup> (facteur de croissance dérivé des plaquettes) et l'autotaxine<sup>126</sup>, une lysophospholipase D, ont été également décrites dans la littérature pour être impliquées dans le développement de cancers métastatiques.

#### **3.4.4. gp78-AMFR : récepteur de l'AMF-PGI**

L'AMF exerce ses effets par fixation sur un récepteur membranaire. Ce récepteur a été purifié pour la première fois à partir de cellules de mélanome de souris « B16-F1 ». <sup>127,128</sup> La reconnaissance d'une lectine par ce récepteur a prouvé sa nature glycoprotéique. Il a été alors défini comme étant une glycoprotéine de 78 kDa (gp78). Grâce à l'utilisation d'un anticorps polyclonal anti-gp78 (Fab) couplé à un anticorps fluorescent, il a été démontré qu'il s'agit d'un récepteur membranaire de surface.

Un peu plus tard, ce récepteur a été identifié comme étant le récepteur de l'AMF (AMFR), <sup>116</sup> suite aux observations suivantes :

- L'interaction d'un anticorps monoclonal anti-gp78 avec ce récepteur donne un effet comparable à celle produite par l'AMF.
- L'AMF entre en compétition avec l'anticorps anti-gp78 au niveau de son site de fixation sur le récepteur. L'interaction AMF-AMFR a été confirmée plus tard par autoradiographie. <sup>117</sup>

Tout comme son ligand, l'AMFR peut servir comme un marqueur de pronostic des cancers humains. En effet, des taux élevés d'AMFR ont été détectés dans les urines de patients atteints de cancer de la vessie comparativement aux individus ayant simplement des problèmes urologiques. <sup>129</sup> Dans le même sens, une surexpression de l'AMFR a été corrélée positivement à un stade avancé et à un mauvais pronostic de plusieurs types de cancers tels que le cancer du poumon, <sup>130-133</sup> de la vessie, <sup>134</sup> de l'œsophage, <sup>135</sup> gastrique, <sup>136</sup> colorectal, <sup>137</sup> du sein, <sup>138</sup> du foie, <sup>139</sup> et le cancer cutané. <sup>140</sup>

#### **3.4.5. Interaction AMF-AMFR : rôle dans le développement de cancers métastatiques**

L'AMF est une cytokine sécrétée par les cellules tumorales et exerce son effet par interaction avec son propre récepteur exprimé à la membrane de ces cellules. Ne possédant pas un peptide signal essentiel à sa sécrétion, l'AMF est sécrété dans le milieu extracellulaire via un chemin non

classique qui reste à élucider. Une phosphorylation au niveau du résidu Ser185 est supposée induire sa sécrétion d'où son appellation sous le nom de phosphoenzyme.<sup>141</sup>

La transduction du signal résultant de l'interaction AMF-AMFR reste encore mal définie. Elle déclenche néanmoins une stimulation de la motilité des cellules tumorales *in vitro*<sup>115</sup> et le développement de métastases *in vivo*.<sup>142</sup>

Bien qu'un mécanisme précis de l'interaction AMF-AMFR ne soit pas décrit, différents travaux ont permis d'éclaircir quelques points intéressants dans cette voie de signalisation.

**a) La migration des cellules cancéreuses induite par l'interaction AMF-AMFR met probablement en jeu une activation d'une protéine G**

Mises en présence de la toxine de *Bordetella pertussis*, les cellules de mélanome humain «B16-F1» et « A0258 » stimulées par l'AMF retrouvent leur motilité normale.<sup>116,126</sup> Cette toxine inhibe également l'effet induit par l'anticorps anti-gp78 sur la motilité des cellules « B16-F1 », une autre preuve que l'AMF agit par interaction avec cette glycoprotéine.<sup>116</sup> Ces résultats montrent que l'AMF provoque une augmentation de la motilité cellulaire via l'activation d'une protéine G sensible à la toxine de *Bordetella pertussis*. Cette hypothèse a été appuyée plus tard par l'équipe de Shimizu et al. qui a décrit l'AMFR comme étant une protéine à sept hélices transmembranaires et donc appartenant très probablement à la famille des récepteurs couplés aux protéines G.<sup>143</sup>

**b) Possibilité de dimérisation de l'AMFR**

L'AMFR existe probablement sous forme dimérique du fait que ce récepteur contient un motif leucine-zipper au sein de sa séquence d'acides aminés.<sup>143</sup> Ce motif, qui consiste en une répétition périodique d'un résidu leucine tous les sept acides aminés, favorise la dimérisation d'une protéine et dans certains cas son oligomérisation. Cette suggestion est en accord avec le fait que son ligand, l'AMF-PGI, est également une enzyme dimérique.

**c) Fixation de l'AMF via une interaction avec la chaîne glycosylée de l'AMFR**

L'AMFR a été découvert à l'origine comme étant une glycoprotéine « O-glycosylée ». Un site de N-glycosylation a été également supposé exister au niveau du domaine extracellulaire du récepteur dont la fonction exacte n'était pas claire à cette époque.<sup>143</sup> Récemment, un rôle très

important dans la reconnaissance de l'AMF a été attribué à la chaîne N-glycosylée du récepteur. En effet, le récepteur privé de son site de « N-glycosylation », et donc de sa chaîne sucre est incapable de fixer l'AMF. Dans le même contexte, le récepteur purifié et traité par une N-glycosidase, et donc privé également de sa chaîne glycosylée, n'inhibe pas la motilité des cellules HT-1080 stimulée par l'AMF. De plus et comme nous l'avons déjà mentionné, les cellules tumorales stimulées par l'AMF retrouvent leur motilité normale lorsqu'elles sont placées en présence d'inhibiteurs de la réaction d'isomérisation de la PGI, comme le 6-phospho-D-gluconate (6PGA) ou le 4-phosphate D-érythrose (E4P).<sup>89</sup>

*Ces observations suggèrent fortement que l'interaction AMF-AMFR implique la partie oligosaccharidique du récepteur (Figure 20).*<sup>144</sup>

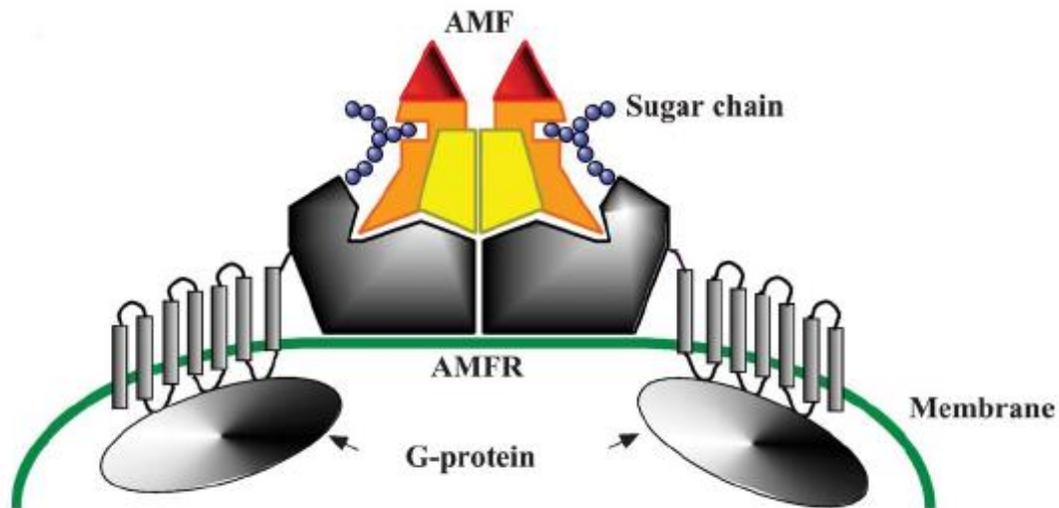


Figure 20. L'interaction AMF-AMFR implique la chaîne glycosylée du récepteur.

#### d) Effet motogénique de l'AMF

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il existe peu d'informations au sujet de l'interaction de l'AMF avec son récepteur. Mais, d'une façon générale, l'interaction AMF-AMFR induit :

- L'internalisation du complexe récepteur-ligand.<sup>145</sup>
- La phosphorylation de l'AMFR.<sup>111</sup>

- L'activation d'une protéine G sensible à la toxine de *Bordetella pertussis*,<sup>116,145,146</sup> ainsi que des protéines kinases comme la protéine kinase C (PKC)<sup>147,148</sup> qui joue un rôle important dans l'organisation du cytosquelette d'actine.
- La production d'un messager intracellulaire classique : l'inositol triphosphate.<sup>149</sup>

En accord avec les faits mentionnés ci-dessus, un mécanisme décrivant l'effet de l'AMF sur la motilité des cellules tumorales a été rapporté par Tsutsumi et al.<sup>150</sup> qui conclut que l'**AMF stimule la motilité des cellules tumorales via l'activation de deux types de protéines appartenant à la famille Rho, jouant un rôle clé dans l'organisation du cytosquelette d'actine**<sup>150</sup> (Figure 21).

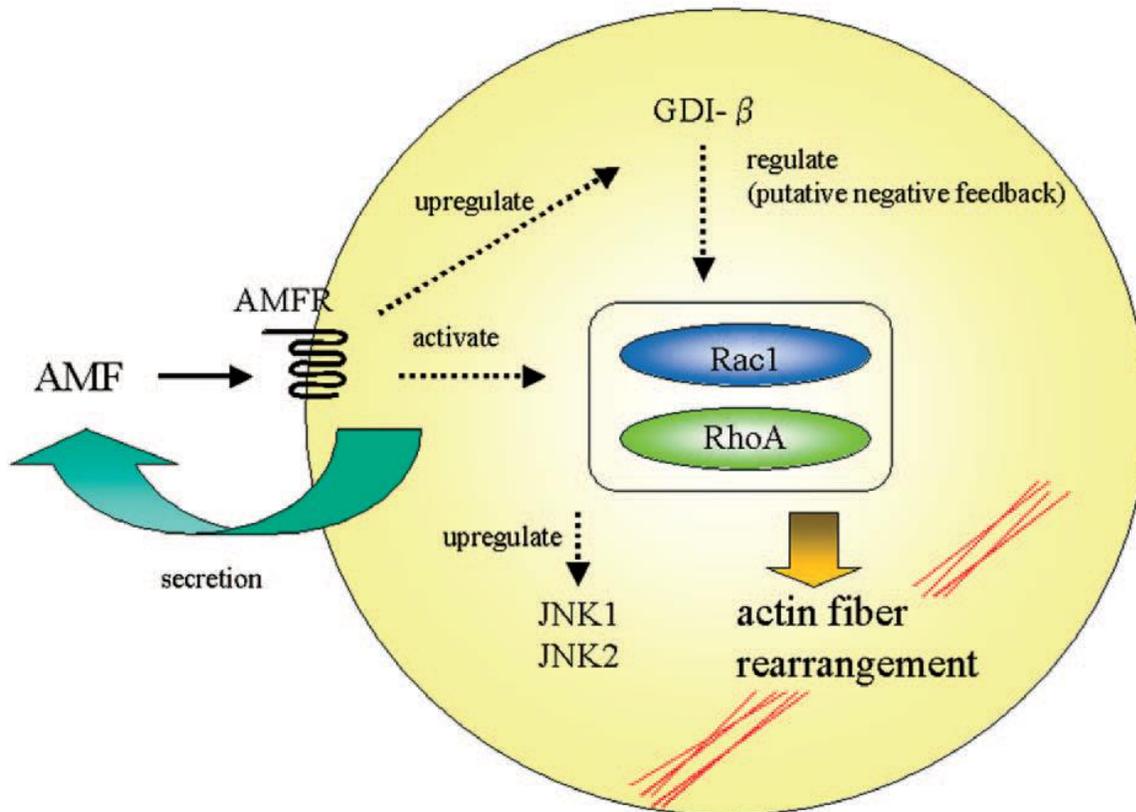


Figure 21. Réponse d'une cellule tumorale suite à une stimulation par l'AMF.<sup>150</sup> Activation de Rac1 et RhoA, protéines jouant un rôle clé dans l'organisation du cytosquelette d'actine et la motilité cellulaire.

En effet, la stimulation des cellules de mélanome humain « A375 » par l'AMF induit à l'échelle moléculaire :

- L'activation de petites protéines G appelées Rac1 et RhoA, qui appartiennent à la famille Rho appelées également RhoGTPases.

- La régulation positive des protéines JUN kinases « JNK1 » et « JNK2 » dont l'activité est modulée par les RhoGTPases.
- La régulation positive de la protéine « GDI- $\beta$  » (guanine nucleotide dissociation inhibitors), une protéine régulatrice de l'activité des RhoGTPases.<sup>151</sup>

L'AMF induit ainsi, via un chemin complexe de signalisation, le réarrangement des filaments d'actine, la formation de filaments contractiles de myosine et d'actine ou fibres de stress, et des extensions membranaires appelées lamellipodes. A cela vient s'ajouter une régulation négative des E-cadhérines<sup>152</sup> aboutissant à une perte d'adhésion intercellulaire, "une étape cruciale à la migration cellulaire" : **les cellules tumorales dont les fonctions prolifératives sont déjà altérées, acquièrent ainsi une capacité migratoire leur permettant de se disséminer et d'envahir d'autres tissus avoisinants.**

#### *e) L'AMF : un facteur angiogénique*

Outre la stimulation de la motilité des cellules cancéreuses, l'AMF joue un rôle critique dans le «switch angiogénique» des tumeurs, un processus essentiel à la progression tumorale et au développement de métastases. Incubées sur du gel de collagène, des cellules endothéliales humaines matures mises en présence de l'AMF prolifèrent et donnent naissance à des structures en forme de tubules. L'AMF stimule également l'expression de l'AMFR à la surface de ces cellules, évoquant ainsi un mode de stimulation paracrine pour cette cytokine. In vivo, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins a été détectée chez des souris transplantées par des cellules tumorales surexprimant l'AMF de façon stable, un effet non observé chez celles transplantées par des cellules tumorales n'exprimant pas l'AMF. Cet effet est également inhibé en présence de l'E4P (un inhibiteur de l'AMF).<sup>153</sup>

Pour aller plus loin, il a été démontré que l'AMF stimule, via un mode autocrine la production du VEGF (vascular endothelial growth factor) par les cellules tumorales, et via un mode paracrine la surexpression des récepteurs au VEGF de type 1 et 2.<sup>154,155</sup> La fixation du VEGF sur ses récepteurs stimule, via une cascade de signalisation, la locomotion et la prolifération des cellules endothéliales aboutissant ainsi à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui peuvent répondre aux besoins métaboliques des cellules tumorales.

#### f) L'AMF : un facteur anti-apoptotique

En plus de ses effets angiogénique et motogénique, un rôle anti-apoptotique a été attribué à l'AMF. En effet, des cellules de fibrosarcome humain «HT1080» surexprimant et sécrétant de hauts niveaux d'AMF sont résistants à la mytomycine, un médicament inducteur de l'apoptose.<sup>156</sup> Cette activité anti-apoptotique est due à une régulation négative de deux protéines appelées Apaf-1 et caspase-9, selon un chemin de signalisation dépendant de l'activation d'une protéine kinase C, de la phosphatidyl inositol-3-kinase et d'une MAPK (mitogen-activated protein kinase).

#### g) L'AMF : une cytokine pro-métastatique

Bien que la PGI intracellulaire soit une enzyme primordiale au bon fonctionnement de l'organisme, l'exo-PGI a par contre des effets néfastes. Une fois sécrétée par les cellules tumorales, elle joue le rôle d'une cytokine pro-métastatique connu sous le nom d'AMF : ayant des effets *anti-apoptotique*, *angiogénique* et *stimulant de la migration cellulaire*, l'AMF est strictement relié à la progression tumorale vers un stade invasif et métastatique.

Cette protéine demeure le sujet de nombreuses recherches scientifiques : il a été montré récemment que l'extinction du gène de l'AMF a pour effet de diminuer la migration des cellules tumorales de glioblastome humain ainsi que la taille de la tumeur,<sup>157</sup> et dans le même contexte, la suppression de la colonisation pulmonaire des souris transplantées par des cellules d'ostéosarcome.<sup>158</sup> D'autre part, des souris transfectées par des cellules de cancer du colon humain surexprimant de façon stable la PGI développent de larges tumeurs ainsi que des métastases hépatiques, comparativement aux cellules n'exprimant pas l'AMF qui elles, par contre, étaient incapables de coloniser le foie des souris et donnent naissance à des tumeurs de taille beaucoup plus réduite.<sup>159</sup> Ces résultats viennent confirmer davantage le rôle que joue cette cytokine dans la progression tumorale et le développement de cancers métastatiques. Le diagnostic précoce de son activité et son inhibition présentent un intérêt thérapeutique évident.

### 4. Meilleurs inhibiteurs connus des deux enzymes

Pendant très longtemps, les meilleurs inhibiteurs connus de la PGI étaient le 5-phospho-D-arabinonate (5PAA) et le 4-phosphate D-érythrose (E4P) ; aucun puissant inhibiteur n'était rapporté pour la PMI. Ce n'est que récemment, et par analogie avec l'IHE commun des réactions

catalysées par ces deux enzymes, que de nouveaux inhibiteurs compétitifs ont été conçus dans notre équipe (Schéma 15) : l'acide 5-phospho-D-arabinonhydroxamique (5PAH), le 5-phospho-D-arabinonhydrazide (5PAHz) et le 5-phospho-D-arabinonamide (5PAAm). Les résultats d'inhibition obtenus avec ces composés ( $K_i$  ou IC50) sont rapportés dans le tableau 4.<sup>53,160-162</sup>

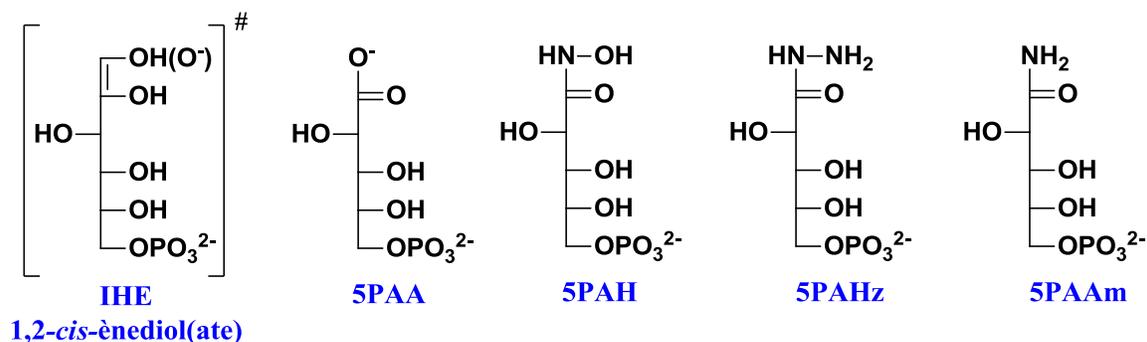


Schéma 15. Inhibiteurs analogues de l'IHE 1,2-cis-enediolate.

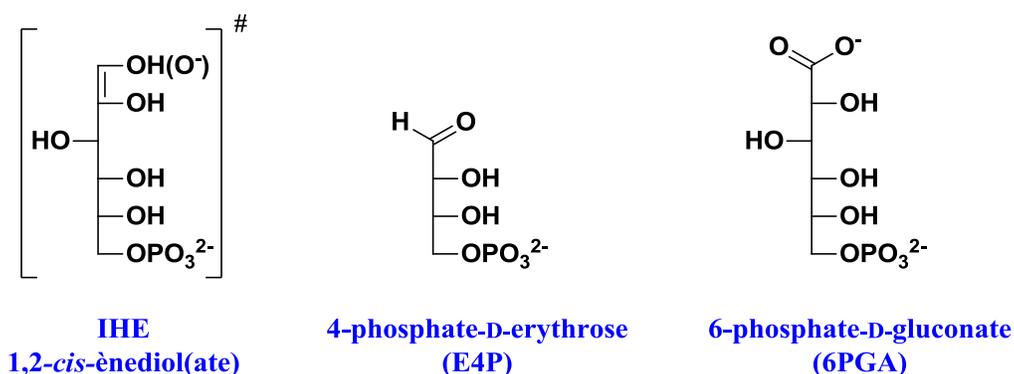
Tableau 4. Valeurs de  $K_i$  ou IC50 obtenues avec les inhibiteurs analogues de l'IHE sur la PGI et la PMI ( $\mu\text{M}$ ).

	ScPMI	PaPMI	EcPMI	ScPGI	BsPGI	RmPGI
<b>5PAA</b>	<b>3600 ± 0.7*</b>	<b>20000 ± 1*</b>	-	<b>2.1 ± 0.4</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.47 ± 0.07</b>
$K_m/K_i$	-	-		33	45	68
<b>5PAH</b>	<b>0.086 ± 0.012</b>	<b>0.137 ± 0.012</b>	<b>0.084</b>	<b>0.228 ± 0.018</b>	<b>0.098 ± 0.014</b>	<b>0.195 ± 0.006</b>
$K_m/K_i$	1410	18250	3952	303	456	513
<b>5PAAm</b>	-	-	<b>11 ± 3</b>	<b>4.2 ± 0.9</b>	-	-
$K_m/K_i$	-	-	65	16	-	-
<b>5PAHz</b>	-	<b>32*</b>	<b>2 ± 0.2</b>	<b>8.0 ± 0.8</b>		
$K_m/K_i$		78*	160 ± 30	9		

\* : IC50, PGI : phosphoglucose isomérase, PMI : phosphomannose isomérase, Sc : *S. cerevisiae*, Pa : *P. aeruginosa*, Ec : *E. coli*, Bs : *B. subtilis*, Rm : rabbit muscle.

Le 5PAH est le plus puissant inhibiteur rapporté dans la littérature pour les deux enzymes avec un  $K_i$  de 86 nM sur la ScPMI et de 98 nM sur la BsPGI. La non-sélectivité de cet inhibiteur vient confirmer l'hypothèse selon laquelle les mécanismes des isomérisations catalysées par la PMI et la PGI mettent en jeu un IHE identique de type 1,2-cis-enediol(ate). Cependant et de manière surprenante, le 5PAA montre une très mauvaise inhibition de la PMI avec des  $K_i$  de 3.6 et 20 mM sur la ScPMI et la PaPMI respectivement. Ce composé n'est peut-être pas assez long pour obtenir une bonne inhibition étant donné que l'hydroxyle en C1 de l'IHE n'est pas mimé. Il est

pourtant un très fort inhibiteur de la PGI avec un  $K_i$  de  $1.47 \mu\text{M}$  sur la RmPGI. La PGI de muscle de lapin a donc une affinité 70 fois meilleure pour le 5PAA que pour son substrat F6P ou G6P. La valeur de son  $K_i$  est fonction du pH et varie entre  $30 \mu\text{M}$  à pH 9 et  $0.3 \mu\text{M}$  pour un pH  $< 7$ .<sup>163</sup> L'inhibition pH-dépendante du 5PAA traduit une stabilisation électrostatique du composé au sein du site actif et est en accord avec un IHE de type anionique. Une exception notable concerne l'E4P<sup>99</sup> : il lui manque en effet une bonne partie des interactions favorables des carbones 1 et 2 du G6P ou du F6P et présente pourtant une forte activité inhibitrice de l'enzyme avec un  $K_i$  de  $0.7 \mu\text{M}$  sur RmPGI (Schéma 16). De plus, il ne possède pas de charge négative sur le carbone terminal. Il semblerait que cet inhibiteur, bien que compétitif, n'interagisse pas de la même façon que les autres inhibiteurs compétitifs au site actif de l'enzyme.<sup>164</sup>



*Schéma 16. Structure des inhibiteurs de l'activité AMF de la PGI.*

Les composés 5PAAm et 5PAHz sont aussi de bons inhibiteurs de la PMI et de la PGI, tout en restant moins bons que le 5PAH. Les différences d'inhibition observées entre le 5PAH et le 5PAHz suggèrent peut-être un IHE de type anionique (1,2-*cis*-enediolate). Avec un  $pK_a$  autour de 9, le pourcentage de forme déprotonée de 5PAH est faible mais suffisant pour une inhibition efficace, alors qu'avec un  $pK_a$  autour de 17, le 5PAHz se trouve entièrement sous forme neutre. En plus de l'inhibition de la réaction d'isomérisation catalysée par la PGI, ces composés sont des inhibiteurs de l'activité AMF de la PGI : l'E4P et le 6PGA (Schéma 16), un analogue du substrat F6P, inhibent également la motilité des cellules stimulée par l'AMF *in vitro*.<sup>89</sup> De nombreux autres inhibiteurs de PGI ont été rapportés dans la littérature mais restent de moins bons inhibiteurs que ceux synthétisés dans notre laboratoire.

## 5. Objectifs de la thèse

Le travail de thèse présenté ici s'inscrit dans le cadre des recherches développées par le Prof. Laurent SALMON au laboratoire concernant l'étude des aspects structuraux, mécanistiques et thérapeutiques des aldose-cétose isomérases, et plus précisément des PMI et PGI. Les PMI et PGI représentent en effet des cibles thérapeutiques potentielles pour le développement de nouvelles molécules à activités respectivement antifongique et anti-métastatique. De puissants inhibiteurs analogues des intermédiaires de haute énergie des PMI et PGI ont été synthétisés par le passé au laboratoire tel le plus puissant d'entre eux : l'acide 5-phospho D-arabinono-hydroxamique (5PAH), cependant non sélectif entre les deux enzymes.

En premier lieu, l'objectif de la thèse est de poursuivre la recherche de nouveaux inhibiteurs sélectifs pour chacune des deux cibles thérapeutiques. L'idée est d'élaborer une petite chimiothèque selon une approche rationnelle par modification du composé de référence analogue de l'IHE, le 5PAH, au niveau de sa partie tête. Deux stratégies ont été proposées pour atteindre cet objectif : 1) En mettant à profit la présence du cofacteur zinc de la PMI absent chez la PGI et 2) en ciblant un résidu carboxylate spécifique du site actif de la PGI (Glu357). La première stratégie consiste à introduire dans certaines des molécules un ligand du zinc ou groupe ZBG (Zinc Binding Group) dans le but de cibler spécifiquement la PMI. La deuxième stratégie consiste à introduire des groupements à fonction amine terminale dans le but de cibler le résidu carboxylate de la PGI.

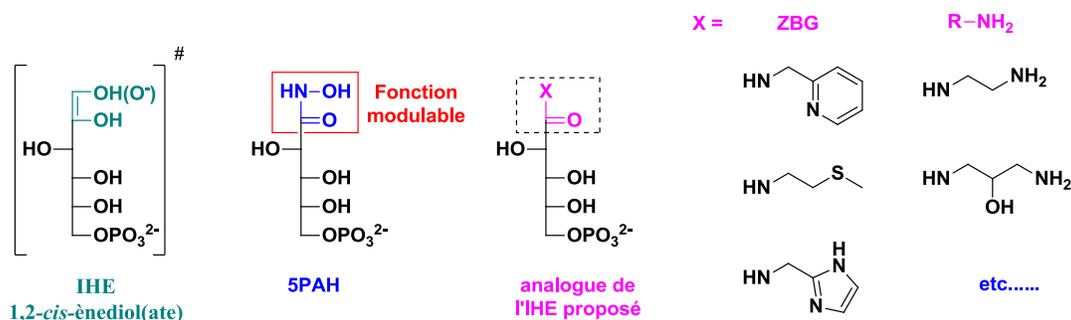


Schéma 17. Approche utilisée pour la conception de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la PMI et de la PGI.

Ces inhibiteurs modifiés au niveau de leur partie tête sont moins bons mimes de l'IHE que le 5PAH : cette propriété augmentera la chance de gagner en terme de sélectivité. L'étude des relations structure-activité de cette petite chimiothèque contribuera à mieux définir, d'une part, les critères définissant un bon inhibiteur, et d'autre part, ceux dirigeant la sélectivité vis-à-vis des deux enzymes.

Après avoir évalué les propriétés inhibitrices de ces molécules sur les enzymes cibles surexprimées au laboratoire, nous nous sommes également intéressés à l'étude par diffraction des RX des complexes enzyme-inhibiteur les plus pertinents, notamment dans le cas de la PMI pour laquelle aucune structure de l'enzyme n'a encore été décrite dans la littérature avec un inhibiteur ou un substrat au site actif et que beaucoup d'informations mécanistiques restent encore à élucider. Ces structures de complexes enzyme-inhibiteur pourraient alors apporter non seulement des renseignements sur la nature des interactions de l'inhibiteur au site actif de l'enzyme, mais également fournir de précieuses informations mécanistiques et structurales déterminantes pour une conception rationnelle future de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique.

Au delà des aspects structuraux, mécanistiques et thérapeutiques, les inhibiteurs synthétisés peuvent présenter un intérêt supplémentaire en terme de diagnostic pour la détection des enzymes ciblées. Nous avons ainsi conçu et étudié un nouveau biocapteur à base d'un inhibiteur de type monosaccharide pour la détection de l'AMF/PGI, cette protéine étant un biomarqueur métastatique validé. Les méthodes décrites dans la littérature pour la détection de l'AMF-PGI dans les fluides biologiques comprennent des méthodes enzymatiques,<sup>107,165,166</sup> colorimétriques<sup>167</sup> et immunologiques.<sup>168-171</sup> Cependant, ces méthodes classiques sont généralement complexes et difficiles à mettre en oeuvre. De plus, la phase de préparation des échantillons et d'exploitation des résultats augmentent la durée de l'analyse. Afin d'améliorer la facilité et la rapidité avec laquelle le dépistage peut être effectué, il est nécessaire d'éliminer autant d'étapes que possible dans le processus d'analyse. C'est dans ce contexte que le développement de capteurs miniaturisés, biocompatibles et plus simple d'utilisation est apparu comme une priorité. Un tel outil a déjà été développé dans notre laboratoire. Cependant, la PGI du muscle de lapin avait alors été utilisée comme enzyme modèle de l'AMF-PGI pour tester les performances analytiques du biocapteur.<sup>172</sup> Dans le cadre de cette thèse, nous avons développé

un nouvel outil pour la détection de la cible réelle, l'AMF-PGI, en utilisant comme biorécepteur un des inhibiteurs synthétisés au cours de ce travail.



## **CHAPITRE I**

# **SYNTHÈSE DE NOUVEAUX INHIBITEURS DES PHOSPHOGLUCOSE ET DES PHOSPHOMANNOSE ISOMÉRASES**



## 1. Introduction : état de l'art et stratégie proposée

La connaissance des mécanismes et des intermédiaires réactionnels, voire des états de transition, impliqués dans les réactions catalysées par les enzymes est fondamental. En effet, les recherches entreprises dans ce domaine sont souvent orientées vers la création de molécules à visée thérapeutique mimant les états de transition et/ou les intermédiaires de haute énergie (IHE), ceux-ci étant considérés comme les structures les plus fortement liées par l'enzyme au cours du chemin réactionnel. Par conséquent, des analogues de l'état de transition ou d'IHE sont généralement puissants car ils se lient plus fortement à l'enzyme que le substrat correspondant. Ainsi, l'acide phosphoglycolhydroxamique (PGH) se lie 40000 fois plus fortement à la D-fructose-1,6-bis-phosphate (FBP) aldolase de la levure que le dihydroxyacétone phosphate (DHAP), un des substrats de l'enzyme.<sup>173</sup> Ce même composé (PGH) est aussi inhibiteur de la triose phosphate isomérase (TIM) avec une affinité 155 fois supérieure à celle du DHAP.<sup>174</sup> La fonction acide hydroxamique de cet inhibiteur mime très bien la fonction ènediol(ate) de l'IHE mises en jeu dans ces deux réactions, aussi bien d'un point de vue électrostatique que stérique (Schéma 18). Dans le cas de la FBP aldolase de classe II, *une métalloenzyme à zinc*, s'ajoute une coordination du métal avec d'une part, l'oxygène du carbonyle et d'autre part, l'oxygène porté par l'azote de la fonction hydroxamate.<sup>175</sup>

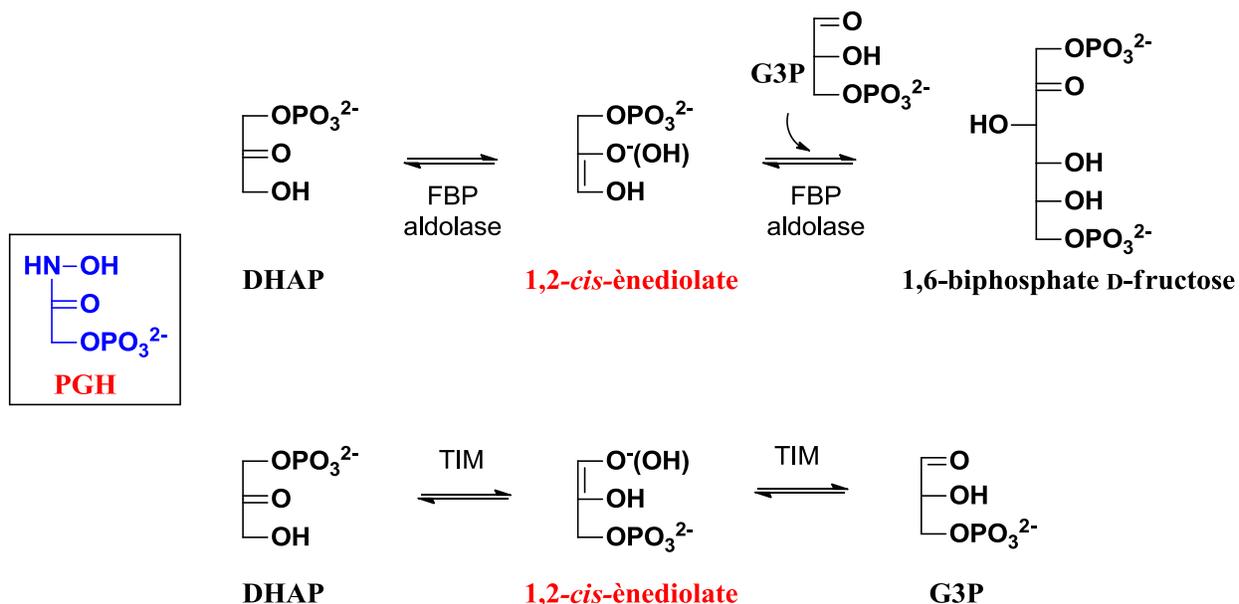


Schéma 18. Réactions catalysées par la triose phosphate isomérase (TIM) et la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBP) et leur inhibiteur PGH.

Selon la même approche, Chirgwin et Noltmann ont synthétisé et testé le 5-phospho-D-arabinonate (5PAA) en tant qu'inhibiteur compétitif analogue de l'IHE de la réaction catalysée par la **phosphoglucose isomérase**.<sup>163</sup> Cet inhibiteur a montré une forte inhibition de l'enzyme de levure avec un  $K_i$  de 2.1  $\mu\text{M}$  et un rapport  $K_m/K_i = 33$ . Étant chargé négativement, les auteurs ont suggéré que ces résultats sont en accord avec un IHE chargé de type 1,2-*cis*-enediolate et que le carbonyle du 5PAA mime bien la double liaison C=C de l'IHE. Cependant, l'analogie structurale n'est pas complète. En effet, l'oxygène O1 de l'IHE supposé n'est pas représenté dans le 5PAA. Le groupement carboxylate n'est probablement pas la fonction chimique qui mime le mieux la fonction enediol(ate) surtout que le 5PAA est un très mauvais inhibiteur de la PMI qui met en jeu le même type d'IHE (Schéma 19).<sup>161</sup>

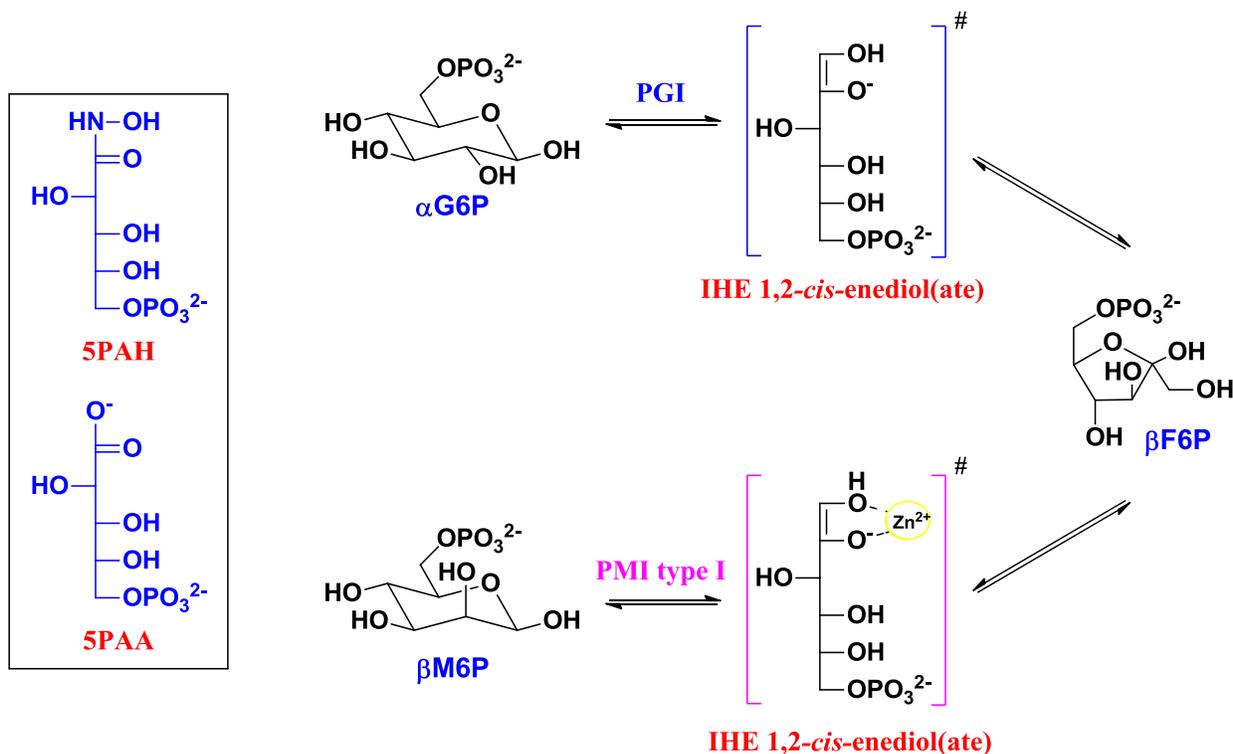


Schéma 19. Réactions catalysées par la PGI et la PMI et les analogues de leur IHE (5PAA et 5PAH).

Par conséquent, comme pour la TIM et la FBP aldolase, et afin de mimer le plus possible l'IHE de la réaction catalysée par la PGI et la PMI, l'acide 5-phospho-D-arabinonohydroxamique (5PAH) a été synthétisé dans notre laboratoire en 1998.<sup>162</sup> Ce dernier représente à ce jour le meilleur inhibiteur rapporté dans la littérature des deux enzymes. Il se lie respectivement 1410 et

303 fois plus fortement que leurs substrats à la PMI et à la PGI de *S. cerevisiae*. La fonction acide hydroxamique notamment sous forme déprotonée du 5PAH est un excellent mime de la fonction ènediolate de l'IHE commun impliqué dans les réactions catalysées par ces deux enzymes.

Cependant, un des problèmes majeurs du 5PAH, est le **manque de sélectivité vis-à-vis des deux enzymes**. Il présente également des limites importantes dues à sa faible biodisponibilité orale et à sa toxicité : la fonction acide hydroxamique est facilement hydrolysable et son hydrolyse libère de l'hydroxylamine très cytotoxique. Par conséquent, l'objectif de cette thèse est de poursuivre la recherche de nouveaux inhibiteurs sélectifs pour chacune des deux cibles thérapeutiques. En fait, la PMI et la PGI ont le même IHE de type 1,2-*cis*-ènediolate sauf que celui-ci est coordonné à un atome de zinc dans le cas de la PMI (Schéma 19). Un mime de la fonction 1,2-*cis*-ènediolate inhibera donc facilement les deux enzymes. D'ailleurs, le cas du 5PAA est instructif. Sa fonction carboxylate est un mauvais mime de la fonction ènediolate (mime incomplet) ; c'est la raison pour laquelle il est un mauvais inhibiteur de la PMI. Dans le cas de la PGI, sa très bonne inhibition n'est due qu'à la présence fortuite d'une molécule d'eau au site actif qui vient compléter la partie carboxylate, l'ensemble formant ainsi un bon mime de la fonction ènediolate. De plus, le 5PAA ne peut être qu'un ligand monodentate du zinc. Ceci pourrait expliquer en outre pourquoi ce composé n'inhibe pas la PMI, et pourquoi 5PAH et 5PAHz sont au contraire de bons inhibiteurs des deux enzymes. Ces derniers sont, par leur fonction CONHOH et CONHNH<sub>2</sub>, de bons ligands bidentate du zinc et aussi de très bons mimes de la fonction ènediolate.

Comme énoncé dans la partie « objectifs de la thèse » de l'introduction, l'idée est d'élaborer une petite chimiothèque selon une approche rationnelle par modification du composé de référence analogue de l'IHE, le 5PAH, au niveau de sa partie tête. Deux stratégies sont proposées pour atteindre cet objectif : 1) en mettant à profit la présence du cofacteur zinc de la PMI absent chez la PGI et 2) en ciblant un résidu carboxylate du site actif de la PGI (Glu357). La première stratégie consiste à introduire dans certaines des molécules un ligand du zinc ou groupe ZBG (Zinc Binding Group) dans le but de cibler spécifiquement la PMI. Ces mimes de l'IHE non-mimes de l'ènediolate et portant en tête un ligand du zinc sont potentiellement des inhibiteurs sélectifs de la PMI. La deuxième stratégie consiste à introduire des groupements à fonction amine terminale dans le but de cibler un résidu carboxylate de la PGI. Nous nous sommes ainsi

dirigés vers des molécules plus stables contenant un groupe azoté plus ou moins encombré au niveau de la partie tête tout en conservant le squelette polyhydroxylé et la partie phosphate de l'IHE nécessaires pour une bonne affinité pour l'une ou l'autre des deux enzymes (Schéma 20).

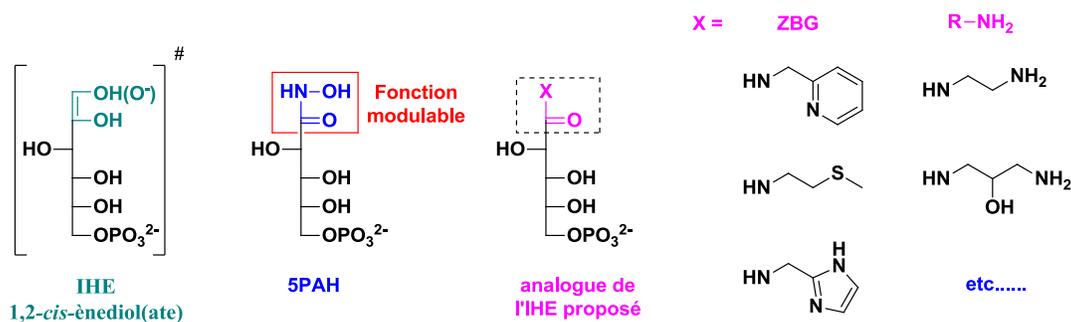


Schéma 20. Approche utilisée pour la conception de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la PMI et de la PGI.

## 2. Ligands des métalloenzymes à zinc

La stratégie utilisée pour concevoir des inhibiteurs spécifiques de CaPMI met à profit la présence du cofacteur zinc de la PMI absent chez la PGI : les molécules porteuses d'une fonction ligand du zinc (ZBG ou zinc binding group) au niveau de leur partie tête sont sans doute moins bons mimes de l'IHE mais de bons chélatants du zinc, augmentant ainsi la possibilité d'inhiber spécifiquement la PMI. Beaucoup de médicaments sur le marché ont été conçus selon ce principe : par exemple, parmi les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), une métalloenzyme à zinc, le captopril et le zofenopril possèdent une fonction thiol et coordinent le zinc selon un mode de chélation monodentate, le fosinopril cible le zinc grâce à une fonction phosphinate et l'énalapril avec une fonction acide carboxylique (Schéma 21).<sup>176</sup>

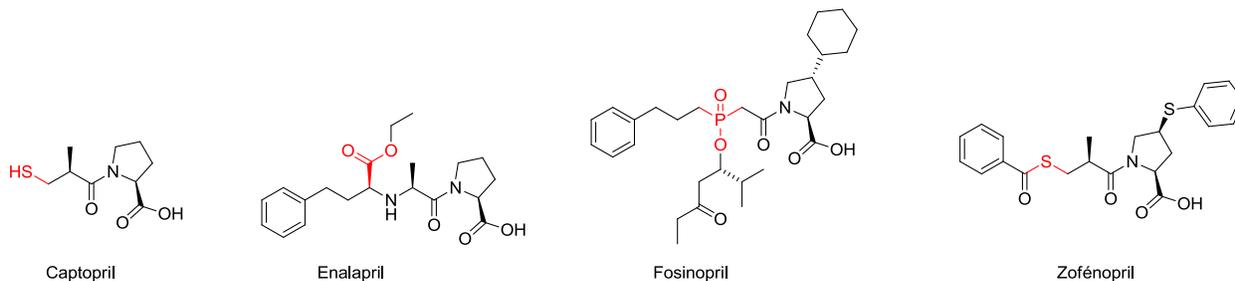


Schéma 21. Structure des inhibiteurs de l'ACE. Les fonctions ligands du zinc sont représentées en rouge.

D'autres structures 3D de métalloenzymes à zinc complexées avec des inhibiteurs montrent une chélation de type bidentate. Tel est le cas du complexe de la métalloprotéase-9 (MMP-9) avec un inhibiteur à fonction « reverse hydroxamate » dont la structure 3D a été résolue à 2.3 Å (PDB 1GKC). Dans cette structure, le zinc est penta-coordiné. On distingue 4 ligands dont trois histidines et l'inhibiteur qui chélate le zinc d'une manière bidentate via les deux oxygènes de sa fonction reverse hydroxamate.<sup>177</sup>

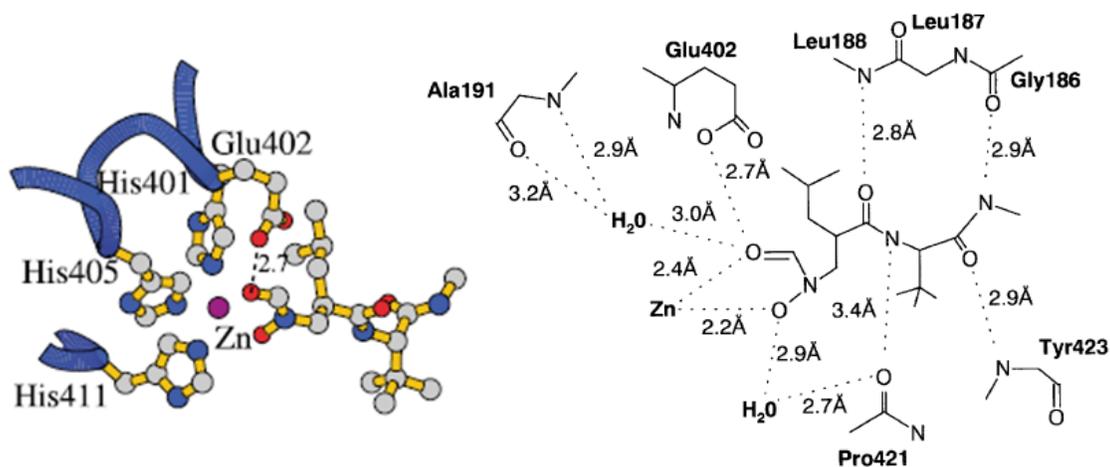


Figure 22. Structure du complexe de la métalloprotéase-9 avec un inhibiteur de type reverse hydroxamate.<sup>177</sup>.

De la même façon, le Marimastat et le Batimastat ciblent le zinc des métalloprotéases MMP-1, 2, 3, 7 et 9 par leur fonction hydroxamate. Cependant, ces deux composés ont été abandonnés en phase III, le premier pour son faible rapport bénéfice/risque et le deuxième pour sa faible biodisponibilité par voie orale.<sup>178,179</sup>

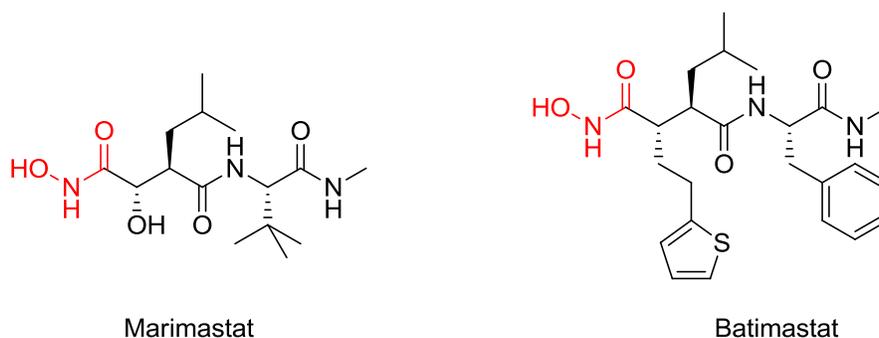


Schéma 22. Structure des inhibiteurs hydroxamates de métalloprotéases.

Deux types de coordination sont alors possibles, monodentate ou bidentate. C'est ainsi que des inhibiteurs des histones désacétylases (DHAC), le largazole (PDB 3RQD), une molécule naturelle, et l'acide subéroylanilide hydroxamique (SAHA) (PDB, 1C3S), une molécule de synthèse, chélatent le zinc d'une manière mono- et bidentate respectivement.<sup>180</sup> Ce dernier est d'ailleurs utilisée en tant que molécule thérapeutique en oncologie.

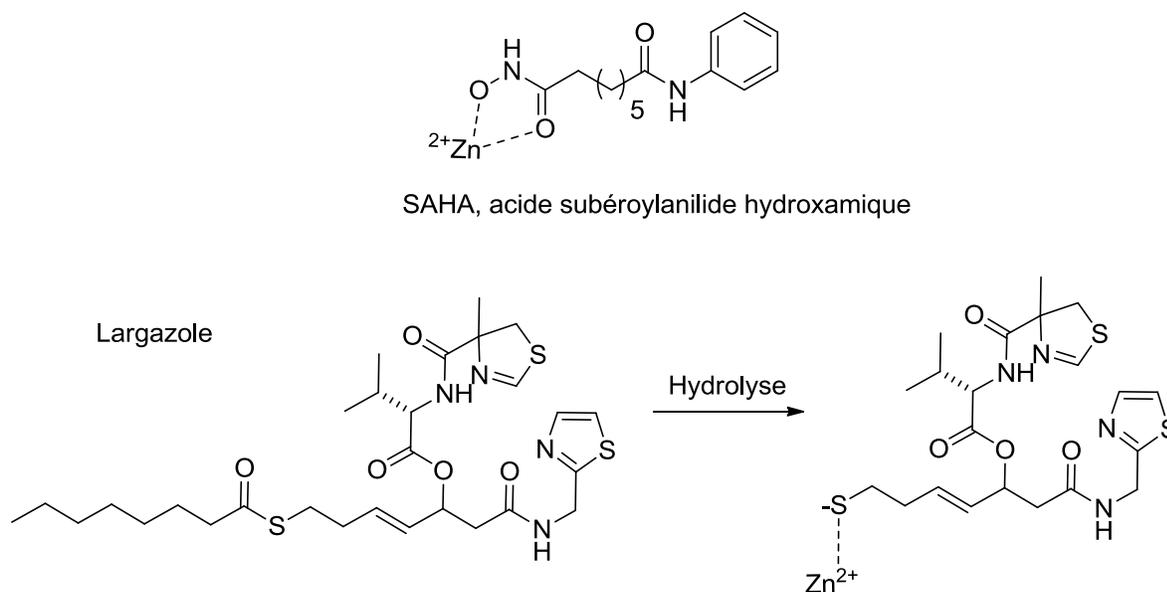


Schéma 23. Mode de coordination du zinc des histones désacétylases par les deux inhibiteurs, l'acide subéroylanilide hydroxamique et le largazole.<sup>180</sup>

Le tableau 5 ci-après résume les principaux ligands du zinc décrits dans la littérature.<sup>181,182</sup> On remarque qu'un grand nombre de fonctions sont capables d'assurer la fonction ligand du zinc tant qu'elles possèdent un doublet électronique disponible pour une interaction avec le cation métallique.

Tableau 5. Liste des principaux ligands de zinc.

Acide hydroxamique		Acide barbiturique Acide thiobarbiturique	
Acide carboxylique		Acide phosphonique Acide phosphinique	
Thiol		Dérivés acide squarique	
Mercaptoacétone		Tétrazole	
Mercaptoalcool		Imidazole	
Mercaptoamide		Alcool	
Nitro		1,3,4-Triazole-thiol	
Pyridine-amide <sup>183,184</sup>		pyridine <sup>185</sup>	
Hydrazide		Amide	

### 3. Choix des molécules cibles vs. CaPMI

Notre travail consiste alors en la synthèse d'une petite chimiothèque par modification de la partie tête de l'IHE commun des réactions catalysées par la PGI et la PMI dans le but de cibler l'une ou

l'autre des deux enzymes faisant l'objet de ce travail de thèse : la phosphomannose isomérase de *C. albicans* et la phosphoglucose isomérase de l'homme. Différents types de ligands du zinc ont été choisis pour la conception d'inhibiteurs spécifiques de la PMI :

- **Composés à fonction mercapto** : la N-(5-phosphate-D-arabinoyle)-2-(sulfanyl)ethanamine à fonction thiol (**dérivé cystéamine, 5PACystéamine, 1**) et son dérivé méthylé la N-(5-phosphate-D-arabinoyle)-2-(méthylsulfanyl)ethanamine (**dérivé méthyl cystéamine, 5PAMCystéamine, 2**) ont été synthétisées. Etant un groupement donneur d'électrons, le groupement méthyle peut renforcer les propriétés chélatantes du soufre et permet également d'éviter les problèmes d'oxydation de la fonction thiol en disulfure (Schéma 24).

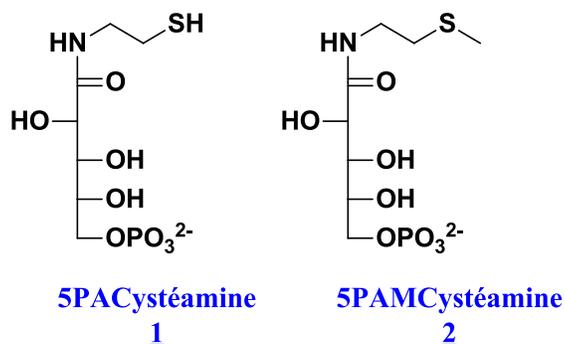


Schéma 24. Structure des composés à fonctions mercapto ou sulfure.

- **Composés à groupement imidazole et pyridine** (Schéma 25) : la N-(5-phosphate-D-arabinoyle)-1-(imidazol-2-yl)methanamine (**dérivé imidazole, 5PAIm, 3**) et son dérivé méthylé la N-(5-phosphate-D-arabinoyle)-1-(1-méthylimidazol-2-yl)methanamine (**dérivé méthyl imidazole, 5PAMIm, 4**) ont été obtenues. Ce dernier permet de montrer l'influence de substituer l'atome d'hydrogène de l'azote, *donneur d'une liaison hydrogène*, par un groupement méthyle sur l'affinité du composé pour l'enzyme. Afin d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne carbonée entre l'azote de l'amide et le groupement imidazole, deux autres molécules ont été proposées : la N-(5-phosphate-D-arabinoyle)histamine (**dérivé histamine, 5PAHis, 5**), et la N-(5-phosphate-D-arabinoyle)-3-(imidazol-1-yl)propanamine (**dérivé propyl imidazole, 5PAPIm, 6**). En plus des composés imidazoliques, un composé à groupement méthylpyridine, la N-(5-

phosphate-D-arabinoyl)-1-(pyridin-2-yl)méthanamine (**5PAPy**, **7**) nous a paru aussi intéressant.

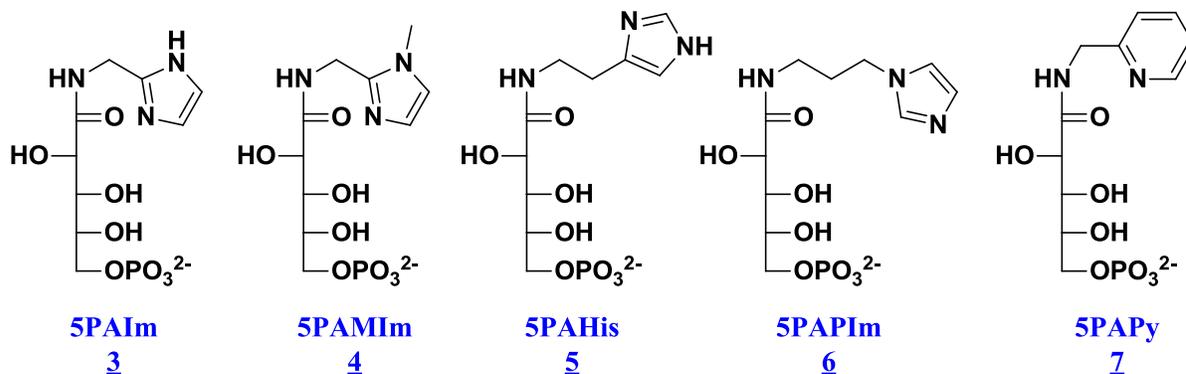


Schéma 25. Structure des composés à groupement imidazole et du composé pyridinique.

- **Autres composés** : pour compléter cette petite chimiothèque, d'autres molécules ont été proposées sans démarche rationnelle comme les dérivés furane (**5PAF**, **8**), thiophène (**5PAT**, **9**), et le dérivé sulfonique (**5PASulfone**, **10**).

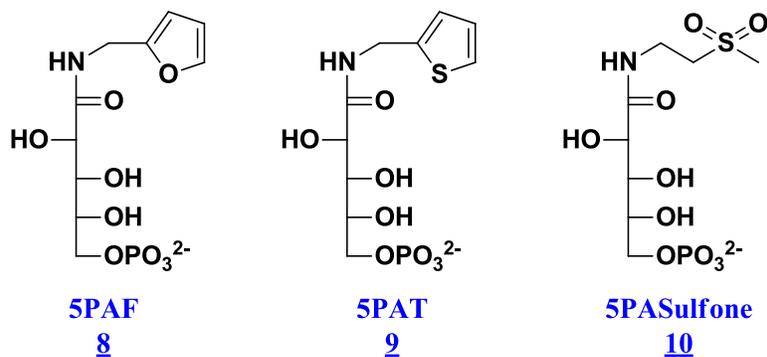
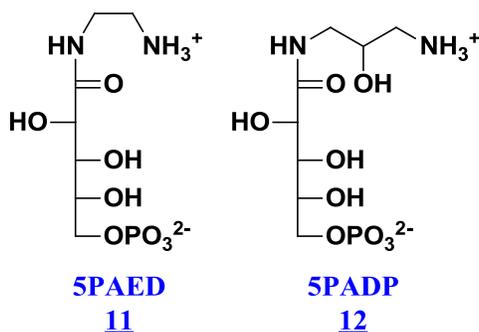


Schéma 26. Structure des dérivés furane, thiophène et sulfonique.

#### 4. Choix des molécules cibles vs hPGI

- Deux autres molécules, la N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-aminoéthylamine (dérivé éthylènediamine, **5PAED**, **11**) et la N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-3-(aminométhyl) ethanolamine (dérivé diaminopropanol, **5PADP**, **12**) se terminant toutes les deux par

une fonction amine terminale ont été proposées pour inhiber plus spécifiquement la hPGI. Ces deux composés se protonant évidemment à pH neutre peuvent donner naissance à une interaction avec le glutamate 357 du site actif de la PGI et qui représente la base catalytique de l'enzyme. Cette fonction n'étant pas un ligand du zinc, la PMI ne devait pas être inhibée par les deux composés **11** et **12**. De plus, la CaPMI ne possède pas de résidu carboxylate (Asp/Glu) près du cofacteur zinc au site actif à l'exception du Glu138 qui est déjà engagé dans sa coordination au zinc.



*Schéma 27. Structure des composés à fonction amine terminale.*

Dans un but de comparaison, nous avons synthétisé à nouveau le 5PAA, molécule introduite par Chirgwin et Noltmann en 1975 et le 5PAH synthétisé pour la première fois dans notre laboratoire en 1998.<sup>162</sup>

## 5. Stratégie de synthèse

Toutes nos molécules cibles partagent une structure commune, un groupement phosphate et un squelette polyhydroxylé de configuration D-arabino, ainsi qu'une fonction variable au niveau de la partie tête. Elles peuvent toutes être obtenues à partir d'un précurseur commun, la 5-phosphate-D-arabinono-1,4-lactone (5PAL) obtenue pour la première fois au laboratoire ECBB en 1998.<sup>162</sup> Chirgwin et Noltmann<sup>163</sup> ont décrit la synthèse du 5PAA par décarboxylation oxydative du F6P en milieu basique et en présence d'oxygène. En 1998, Hardré et al.<sup>160,162,186</sup> ont réussi à reproduire la même réaction en utilisant le G6P (moins onéreux que le F6P) comme précurseur. L'oxydation de ce dernier se fait dans les mêmes conditions de température, de

concentrations de NaOH et de substrat que pour l'oxydation du F6P, mais seul le temps de réaction varie : 72 h au lieu de 48 h. Ainsi, une coupure oxydante par le dioxygène en milieu alcalin du G6P conduit au sel de sodium du 5-phospho-D-arabinonate (5PAA). La purification du 5PAA consiste en sa précipitation sous forme de sel de barium. L'échange des cations barium contre des ions Na<sup>+</sup> ou des protons conduit respectivement au sel de sodium (5PAA/Na<sup>+</sup>) et à la forme acide (5PAA/H<sup>+</sup>) du 5PAA. Une cyclisation de la forme acide du 5PAA (lactonisation) par simple évaporation suivi d'un séchage intensif sous P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> pendant plusieurs jours conduit au synthon 5PAL avec un rendement de 76% (Schéma 28).

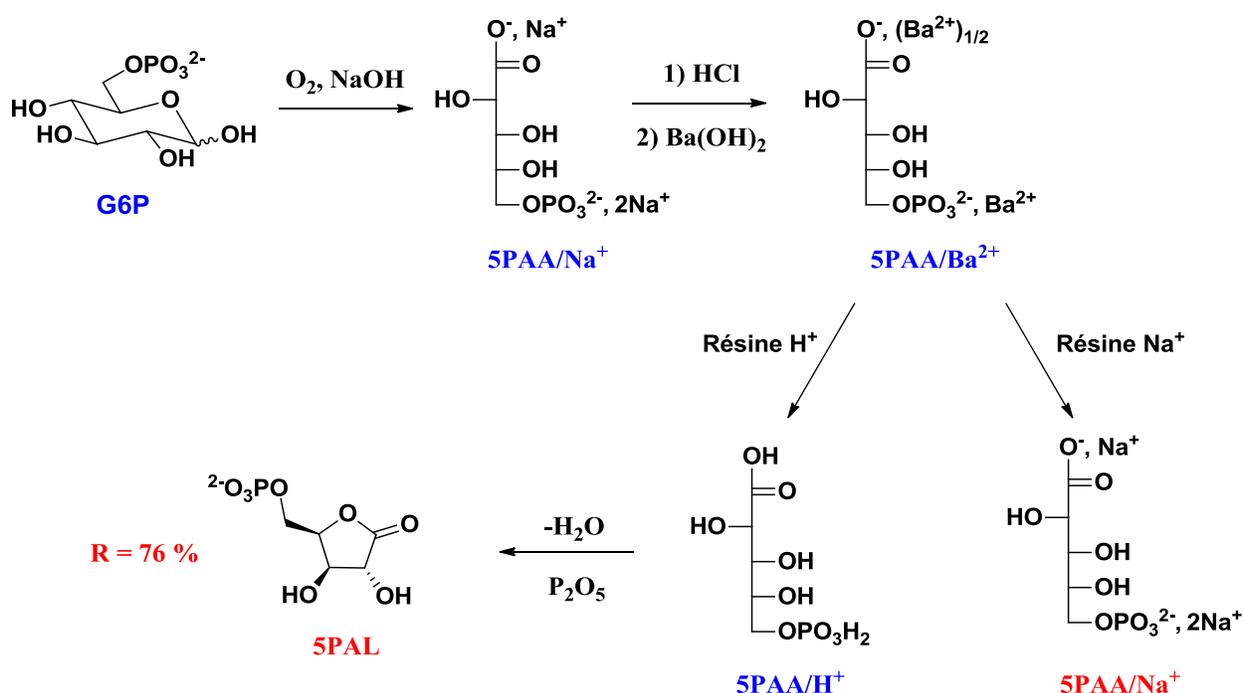


Schéma 28. Synthèse du synthon 5PAL.<sup>162</sup>

Une simple addition nucléophile d'hydroxylamine (solution aqueuse d'hydroxylamine à 50%) sur cette lactone permet l'obtention du 5PAH.<sup>162</sup> De même, des analogues neutres de la fonction acide carboxylique du 5PAA comme le dérivé hydrazide (5PAHz), le dérivé amide (5PAAm) ainsi que d'autres molécules avec des fonctions variées anioniques ou neutres au niveau de leur partie tête tels que la N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-méthylamine (5PAMA), la N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-hydroxyéthylamine (5PAEtOA) et la N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-glycine

(5PAGly) ont été déjà synthétisées au laboratoire selon la même procédure (Schéma 29).<sup>187</sup> Le synthon 5PAL apparaît donc comme un précurseur très intéressant permettant d'accéder à un grand nombre de composés en une seule étape.

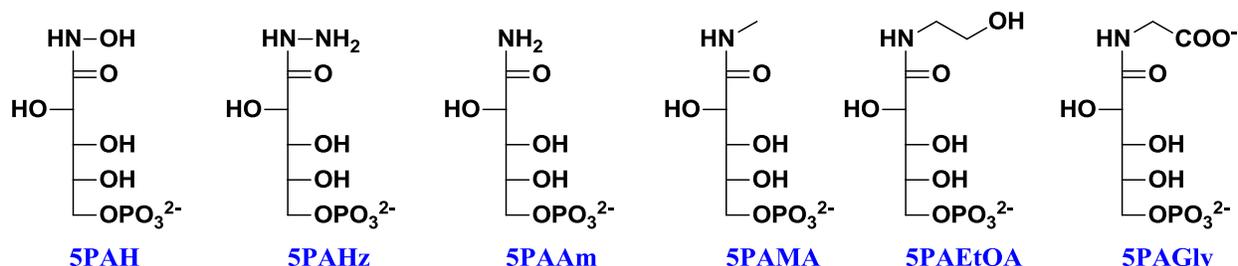


Schéma 29. Molécules déjà synthétisées au laboratoire à partir du synthon 5PAL.<sup>187</sup>

En effet, l'addition nucléophile de différentes amines primaires sur cette lactone permet l'obtention de tous nos inhibiteurs potentiels. Une simple chromatographie sur résine échangeuse d'ions sous forme sodique permet d'obtenir les différents inhibiteurs ciblés sous forme de sels de sodium (Schéma 30).

La seule contrainte de cette réaction est la nécessité d'utiliser de forts nucléophiles comme les amines primaires donnant des réactions complètes à 100% afin d'éviter d'obtenir un mélange de produits ioniques dont la purification peut être complexe.

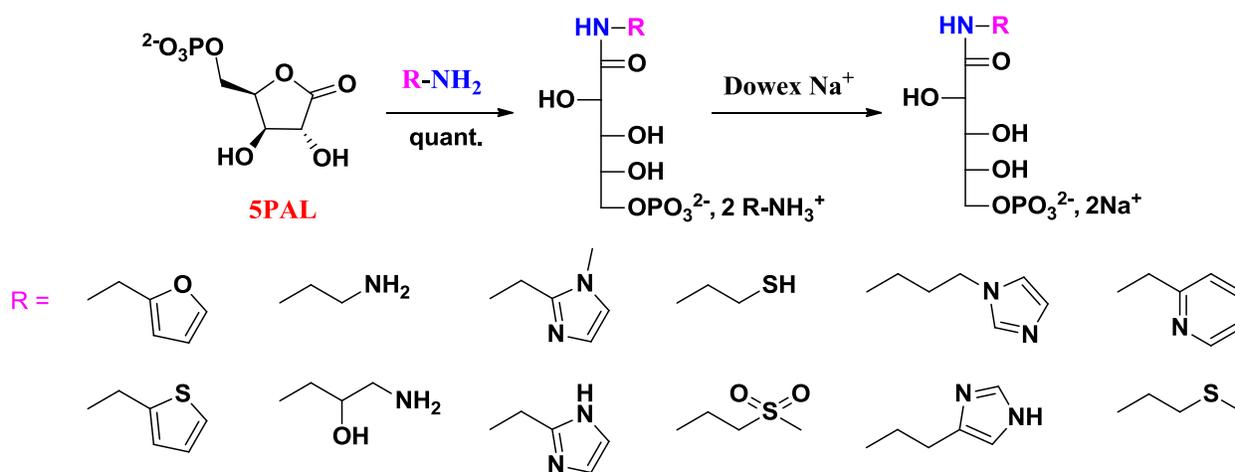


Schéma 30. Schéma général de synthèse des différents inhibiteurs ciblés à partir du synthon 5PAL.

Toutes ces molécules ont été caractérisées par spectroscopie de RMN du  $^1\text{H}$ , du  $^{13}\text{C}$  et du  $^{31}\text{P}$ , ainsi que par spectrométrie de masse à haute résolution. Le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  montre toujours un pic autour de 175.5-177 ppm correspondant au groupe carbonyle, deux doublets pour C4 et C5 et un pic pour chacun des carbones C2 et C3 dans la région allant de 65 à 72 ppm. Leurs spectres ressemblent à celui du 5PAH avec les pics additionnels correspondants aux fonctions ajoutées au niveau de la partie tête.

Dans le cas du 5PAED (**11**) par exemple, on observe sur le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$ , en plus des pics cités ci-dessus, deux pics à 39.8 et 47.4 ppm correspondant aux carbones C6 et C7 respectivement. De même, dans le cas du 5PAPy (**7**), on observe des pics à 156.3, 148.2, 138.2, 122.8, 121.3 et 43.8 ppm correspondant aux carbones C7, C11, C9, C10, C8 et C6 respectivement (Schéma 31 et 32). Ces signaux mettent clairement en évidence la présence du groupement méthylpyridine additionnel par rapport au 5PAH ou 5PAA.

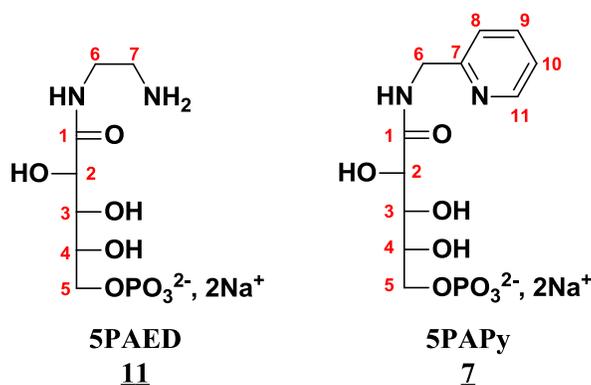


Schéma 31. Structures numérotées du 5PAED(**11**) et du 5PAPy(**7**).

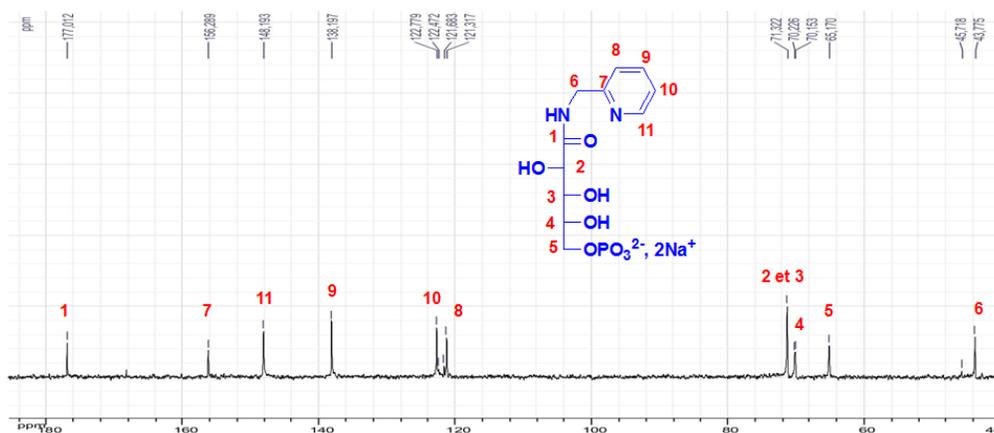


Schéma 32. Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  du composé de type pyridine, 5PAPy (**7**).

De la même manière, tous les autres composés ont pu être mis en évidence par spectroscopie de RMN (voir partie expérimentale) à l'exception du 5PACystéamine (**1**). La fonction thiol de ce dernier s'est oxydée après passage sur la résine Dowex de sodium pour donner le composé disulfure dont la structure est présentée sur le schéma 32 (dérivé cystine, 5PACystine, **1'**). En effet, une fois en présence de résine sodium basique, la forme thiolate ( $-S^-, Na^+$ ) obtenue favorise la formation du pont disulfure entre deux monomères. L'oxydation a été confirmée par spectrométrie de masse et par un déplacement important des pics correspondant aux carbones C6 et C7 en RMN du  $^{13}C$  après l'échange. Ce problème aurait pu être évité en laissant le produit sous forme de sel de cystéamine sans procéder à l'échange sur résine Dowex- $Na^+$ . Les propriétés inhibitrices du disulfure **1'** ont néanmoins été évaluées sur les deux enzymes ciblées.

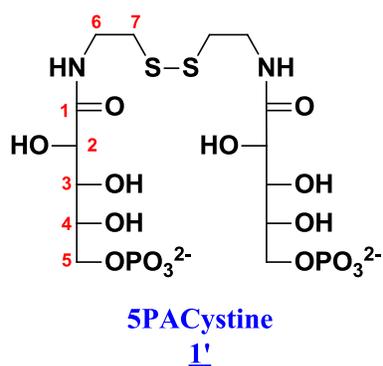


Schéma 33. Structure de la forme oxydée de la N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-(sulfanyl)ethanamine, nommée 5PACystine (1').

En conclusion, une petite chimiothèque regroupant 12 nouveaux inhibiteurs potentiels des réactions catalysées par CaPMI et hPGI a pu être synthétisée par variation de la fonction tête de l'IHE dans le but d'être testée par la suite sur nos deux enzymes cibles. A noter que dans une optique comparative, tous les inhibiteurs synthétisés ont été testés sur les deux enzymes indépendamment de l'enzyme ciblée initialement.

## **CHAPITRE II**

### **SUREXPRESSION ET PURIFICATION DE CaPMI ET DE hPGI**



## 1. Introduction

L'évaluation cinétique de nos inhibiteurs potentiels ainsi que les expériences de cristallographie nécessitent d'avoir une quantité suffisante de protéines cibles pures, faisant ainsi appel à la technologie de l'ADN recombinant. Cette technologie qui a révolutionné la recherche en biologie est maintenant d'un usage courant pour la production de protéines recombinantes à des fins thérapeutiques ou scientifiques.

Grâce à cette technologie, il est désormais possible de produire n'importe quelle protéine à partir d'un gène isolé transféré dans une cellule qui prend en charge son décodage et le plus souvent la sécrétion de la protéine en question. Cette protéine produite en dehors de sa cellule d'origine est dite recombinante. Ceci est rendue possible grâce à la découverte des enzymes de restriction capables de découper l'ADN de la protéine d'intérêt et celui d'un plasmide vecteur en des sites spécifiques. Les extrémités simples brins complémentaires des deux ADN peuvent ainsi s'apparier et se réunir par la suite d'une manière covalente au moyen d'une ADN ligase (Schéma 34). Le plasmide résultant qui consiste en une molécule d'ADN recombinante refermée sur elle-même peut ainsi se répliquer dans des bactéries *E. coli* facilement transformables et les plus couramment utilisées en tant que système d'expression. Armée des instructions nécessaires, cette bactérie peut être transformée en micro-usine capable de produire rapidement, et avec un minimum d'énergie, une grande variété de composés utiles, et ce, sans aucun risque de grève (!). Le premier succès de la bactérie dans ce rôle a été la production de l'insuline humaine. Avant son introduction, les patients étaient traités avec de l'insuline provenant d'animaux d'abattoirs qui n'est pas identique à l'insuline humaine et qui peut être à l'origine de réactions allergiques et immunitaires. Ce n'est qu'en 1982 que l'insuline produite par cette bactérie fut commercialisée, représentant ainsi la première application de la technologie de l'ADN recombinant.

Aujourd'hui et grâce à cette même technologie, plus de 160 protéines recombinantes ont obtenu leur autorisation de mise sur le marché en Europe et dans le monde entier, parmi lesquelles on peut citer l'hormone de croissance, l'érythropoïétine, les hormones thyroïdiennes, des cytokines, des facteurs de croissance et beaucoup d'autres protéines thérapeutiques.

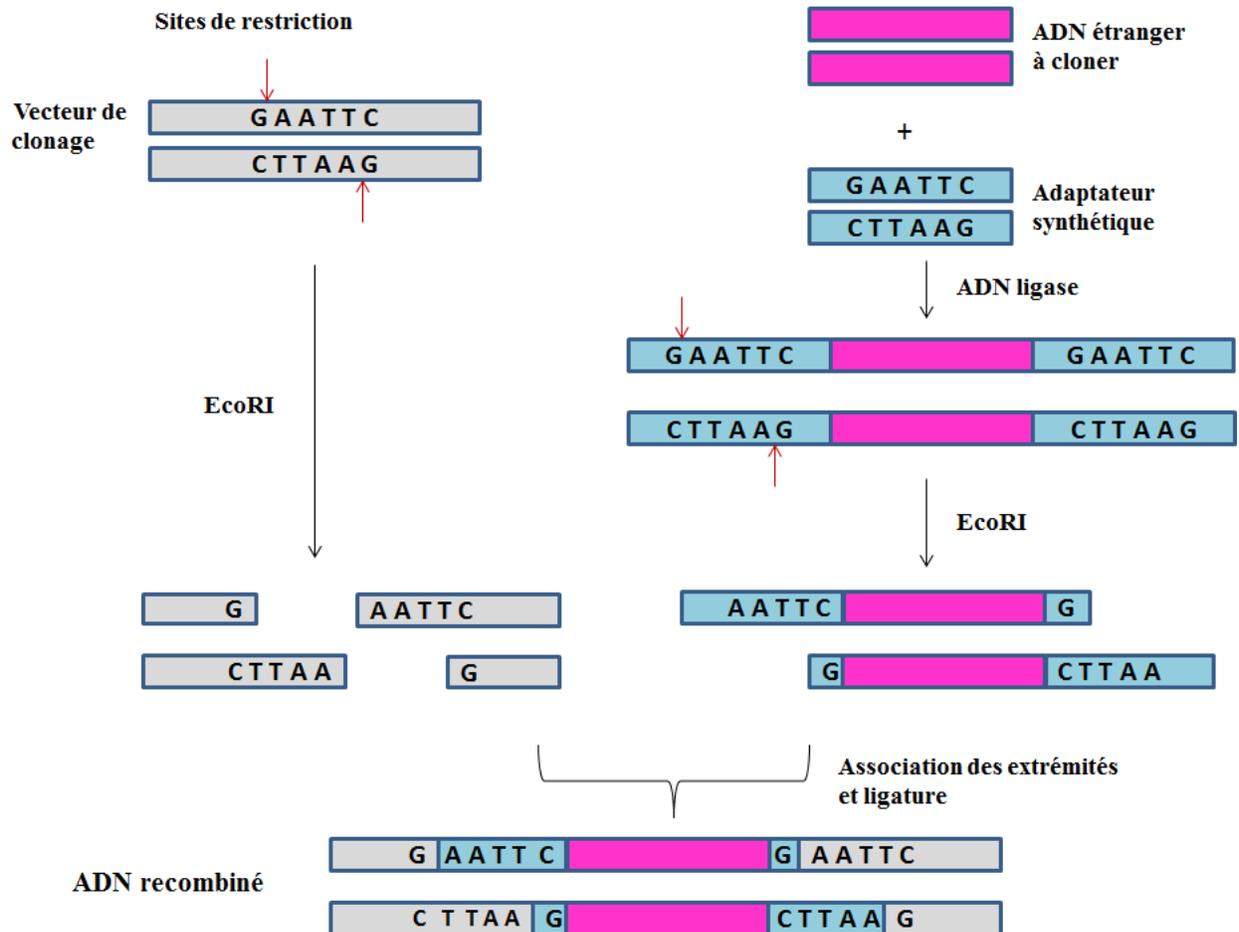


Schéma 34. Exemple de production d'une molécule d'ADN recombinante grâce à l'enzyme de restriction « EcoRI ».

## 2. Principe général de la surexpression des protéines

Une protéine recombinante est nommée ainsi dans la mesure où elle est produite de façon exogène dans une cellule dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique (Schéma 35).

Ce processus s'appuie sur :

- l'emploi d'un vecteur le plus souvent plasmidique transportant le gène d'intérêt codant pour la protéine recherchée,
- l'utilisation d'une cellule hôte qui va servir comme une véritable usine pour la production de la protéine d'intérêt,
- enfin, une phase de production, d'extraction et de purification de la protéine.



Schéma 35. Principe de la production de protéine recombinante.

Il est tout d'abord nécessaire de choisir un hôte. Le choix est relativement vaste, cependant le système d'expression utilisant les bactéries *E. coli.*, génétiquement bien comprises, est de loin le système le plus couramment utilisé car très économique, rentable, rapide et pouvant être mis en place dans tous les laboratoires.

### **3. Surexpression de CaPMI**

Le protocole de surexpression de CaPMI utilisé est basé sur les travaux de Gowda et al.<sup>188</sup> et Smith et al..<sup>28</sup> Cependant, la souche *E. coli* BL21(DE3) a été utilisée à la place de la souche BL21(DE3)pLysS. Le plasmide pLys présent dans cette dernière code pour une lysozyme inhibitrice de l'ARN polymérase du bactériophage T7, diminuant ainsi le niveau basal de la transcription qui pourra exister même en absence d'inducteur transcriptionnel.

#### **3.1. Système d'expression BL21/pRSET-C**

La souche *E. coli* BL21(DE3) est commercialisée par Sigma Aldrich. Cette souche a la particularité, comme toutes les souches *E. coli* B, d'être dépourvue de la protéase majoritaire, codée par le gène *lon*, qui catalyse le clivage endoprotéolytique des protéines recombinantes de la cellule. Ce système est donc particulièrement adapté pour la production de protéines hétérologues intègres.

Le plasmide qu'on appelle « pRSET-C/CaPMI » utilisé a été fourni par la société ThermoFisher-Invitrogen. Il s'agit d'une construction où la séquence codante du gène de CaPMI a été clonée dans le vecteur d'expression pRSET-C entre les deux sites de restriction NheI et BamHI. Ce vecteur possède un promoteur T7 qui règle la transcription, un gène de résistance à l'ampicilline, un codon d'initiation de traduction ATG et une étiquette polyhistidine (6xHis) en N-terminal facilitant une purification ultérieure par chromatographie d'affinité sur résine nickel (Figure 23).

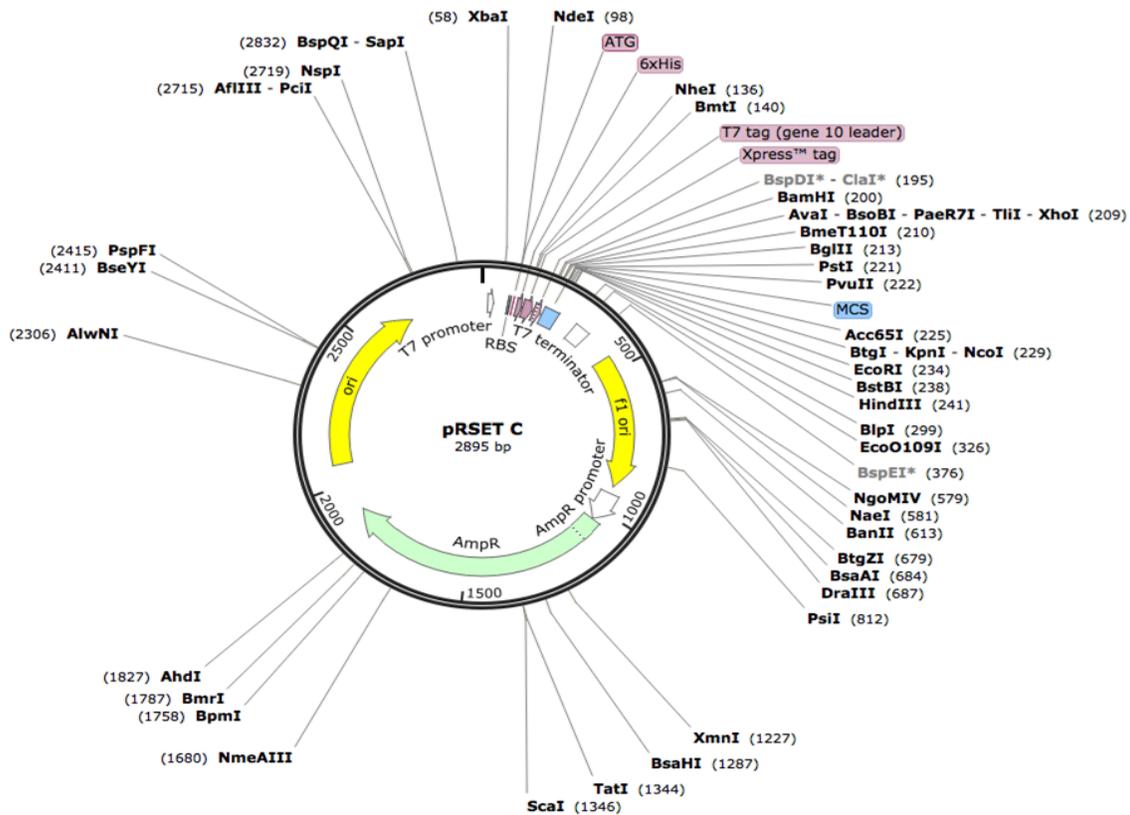


Figure 23. Carte du vecteur d'expression pRSET-C.

### 3.2. Stock du plasmide pRSET-C/CaPMI

Des bactéries *E. coli* DH5 $\alpha$  sont transformées par le plasmide pRSET-C/CaPMI. La transformation se fait par choc thermique pendant 20 s à 42 °C. On sélectionne les bactéries ayant intégré le plasmide en étalant les cellules sur une boîte de Pétri constituée de milieu autoclavé LB agar (Luria Bertani agar) et de l'ampicilline (100  $\mu$ g/mL). Après culture des colonies obtenues, l'ADN est extrait par la méthode de lyse alcaline, purifié sur résine

échangeuse d'ions, puis précipité par addition d'isopropanol. Ce stock de plasmide servira par la suite à transformer les bactéries BL21(DE3).

### **3.3. Transformation des bactéries BL21(DE3) par pRSET-C/CaPMI et production de CaPMI**

On se sert du stock de plasmide préalablement préparé pour réaliser la transformation de la souche d'*E. coli* BL21(DE3) dont le protocole est similaire à celui utilisé pour la souche DH5 $\alpha$  sauf que le choc thermique est réalisé pendant 45 s au lieu de 20 s.

#### **- Induction de l'expression par l'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG)**

Une culture au 1/100<sup>ème</sup> dans un milieu TB (Terrific Broth) supplémenté toujours en ampicilline (50  $\mu$ g/mL) est initiée à partir de la préculture du milieu LB. La surexpression de CaPMI est induite par ajout d'IPTG (0.3 mM) lorsque la DO (Densité Optique) à 600 nm de la culture atteint une valeur entre 0.6 et 0.8. En effet, les souches *E. coli* «DE3» possèdent dans leur génome le gène de l'ARN polymérase T7 qui est sous le contrôle du promoteur lacUV5. En absence d'IPTG, la transcription du gène d'intérêt est réprimée grâce à la fixation du répresseur *lacI* sur les opérons *lac*. En se liant au répresseur, l'IPTG induit un changement de conformation de celui-ci le rendant inactif. L'ajout d'IPTG dans le milieu de culture induit alors la transcription de l'ARN polymérase du phage T7 à partir du promoteur *lacUV5* par l'ARN polymérase d'*E. coli*. L'ARN polymérase du phage T7 transcrit ensuite le gène d'intérêt à partir du promoteur T7 reconnu par l'ARN polymérase T7.

#### **- Lyse des bactéries**

Le culot de bactéries est lysé dans un tampon 50 mM TRIS pH = 8, 300 mM NaCl, 10% glycérol et 1% triton x-100. Ce dernier a pour rôle de perméabiliser les membranes cellulaires des bactéries en solubilisant les phospholipides membranaires. L'ajout de lysozyme qui détruit la paroi des bactéries et de benzonase qui joue le rôle d'ARNase et d'ADNase provoque la lyse des bactéries. La lyse est ensuite complétée par sonication ultrasonique.

### 3.4. Purification de CaPMI

La protéine a été purifiée par *chromatographie d'affinité de métal immobilisé (IMAC : Immobilized-Metal Affinity Chromatography)* comme décrit dans la littérature.<sup>188</sup> Ce type de chromatographie utilise les liaisons de coordination qui peuvent se former entre un ion métallique et certains acides aminés donneurs d'électrons. Les ions métalliques sont immobilisés sur des billes d'agarose grâce à un composant chélatant fixé de manière covalente à celle-ci. Dans notre cas, et grâce à la présence d'une queue polyhistidine à l'extrémité N-terminale, la protéine a été purifiée sur des billes d'agarose recouvertes d'acide nitriloacétique complexant des ions nickel (Ni-NTA agarose, Figure 24). Après lavage de la colonne, la protéine est éluée avec un ligand compétiteur, l'imidazole.

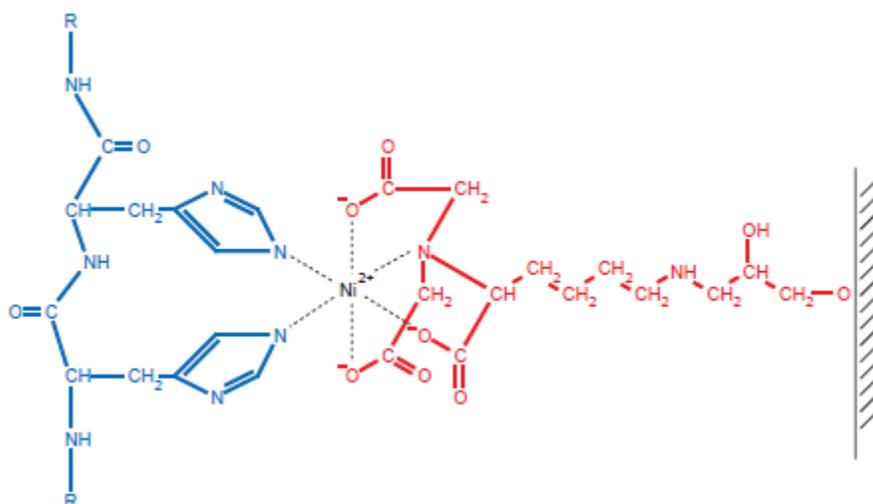


Figure 24. Interaction entre les billes Ni-NTA agarose et les résidus histidines d'une protéine étiquetée par un His-tag d'après la société Qiagen.

En raison d'un degré de pureté insuffisant, une purification ultérieure par *chromatographie échangeuse d'ions* est nécessaire. La protéine a été dialysée contre un tampon 20 mM TRIS HCl, pH 8.5 et 20 mM NaCl, puis concentrée et déposée sur la colonne mono Q® HR 16/10 échangeuse d'anions. Lorsqu'on purifie une protéine, le pH et la concentration saline de la solution tampon dans laquelle la protéine est dissoute sont choisis de sorte que la protéine désirée soit fortement liée à l'échangeur d'ions choisi. *Son point isoélectrique étant de 5.59, la protéine a une charge nette négative à pH 8.5.* Un petit volume de la solution protéique non purifiée est déposé en haut de la colonne puis est éluée avec un gradient de NaCl 1 M de 0 à 100%.

Classiquement, la concentration en sel variée de façon continue lors de l'élution afin de libérer les unes après les autres les différentes protéines liées à la résine. En effet, différentes protéines peuvent se lier à la résine échangeuse d'ions mais avec des affinités différentes de telle façon que les protéines ayant une affinité relativement faible migrent plus rapidement dans la colonne que celles qui se lient à la colonne avec des affinités supérieures. L'élution par gradient permet une meilleure séparation des protéines qu'une élution par une seule solution ou par paliers. La protéine d'intérêt est éluée quand la concentration en NaCl atteint une valeur de 150 mM. La protéine est alors dans un tampon final contenant du NaCl à une concentration de 150 mM et du tampon TRIS 20 mM à pH 8.5.

### **3.5. Identification de CaPMI**

La protéine a été identifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE = sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Il s'agit d'une électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes dans laquelle la migration des protéines ne dépend que de leur masse. Les protéines sont préalablement chauffées en présence du détergent SDS et du  $\beta$ -mercaptoéthanol, ce qui permet la dissociation et la dénaturation des sous-unités des oligomères. Toutes les protéines qui ont subi ce traitement se retrouvent sous forme de monomères solvatés par le SDS et sont donc chargés négativement. Les protéines, ainsi traitées, possèdent globalement toutes la même charge et se séparent alors en fonction de la masse moléculaire du monomère. Les protéines migrent sous l'influence d'un champ électrique, les plus petites sont moins freinées et migrent donc plus vite. Les protéines sont par la suite colorées au bleu de Coomassie. Le gel révèle la présence d'une protéine de poids moléculaire autour de 50 kDa correspondant bien à la phosphomannose isomérase de *Candida albicans* (Figure 25). D'après le gel, la protéine est pure : aucune purification ultérieure n'est donc réalisée.

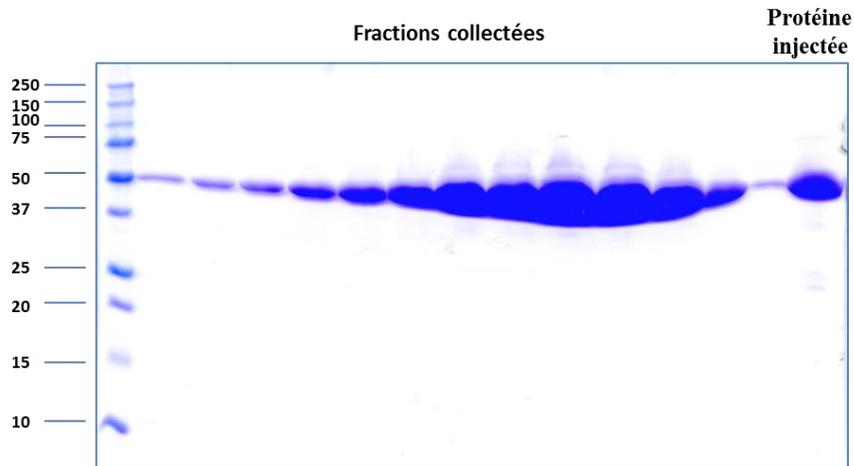


Figure 25. Photo du gel d'électrophorèse de CaPMI à l'issue de la chromatographie d'échange d'ions.

La protéine a été transférée par la suite sur une feuille de nitrocellulose (étape appelée empreinte ou blotting en anglais), puis mise en contact avec un anticorps de souris dirigé contre l'His-tag. La localisation de l'anticorps lié est réalisée par chimioluminescence grâce à un autre anticorps de souris couplé à une enzyme (peroxydase de raifort ou HRP) qui catalyse une réaction lumineuse et noircit le film. L'observation de cette bande noire confirme bien la présence de CaPMI étiquetée par un His-tag (Figure 26).

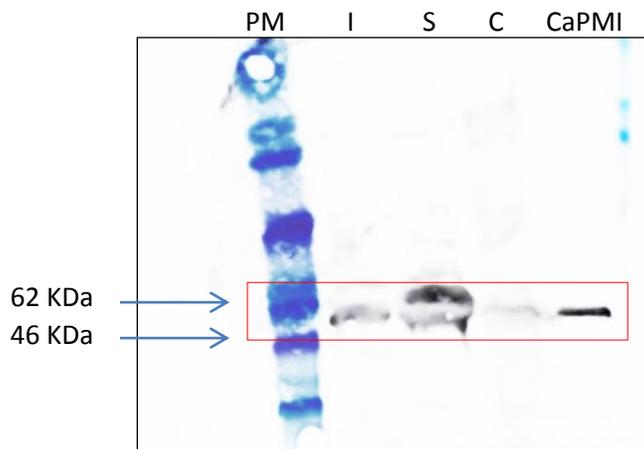


Figure 26. Image du western blot obtenu pour CaPMI. PM : marqueur de poids moléculaire, I : induit, S : surnageant, C : culot

Des analyses supplémentaires ont été réalisées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight) et MALS (Multi Angle Light Scattering ou diffusion muti-angulaire de la lumière).

Dans la première, la protéine a été digérée par la trypsine puis analysée directement par spectrométrie de masse de type MALDI. Les masses théoriques des 18 fragments peptidiques issus de la digestion par la trypsine ont été recherchées dans le spectre de masse du produit de la digestion (Figure 27). On retrouve la masse attendue pour les 18 fragments. De plus, un taux de recouvrement de 39% entre la protéine et les 18 séquences peptidiques est obtenu. Ces résultats confirment bien la présence de notre protéine (Figure 28).

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
23 - 34	1531.6779	1530.6706	1530.6562	9.45	0	R.IQCGYQNYDWGK.I
75 - 84	1157.6414	1156.6341	1156.6200	12.2	0	K.AIDLNNQTLR.D
85 - 102	2005.0991	2004.0918	2004.0779	6.95	1	R.DLVTAKPQEYLGESIITK.F
108 - 114	893.5128	892.5055	892.5058	-0.39	0	K.ELPFLFK.V
121 - 131	1235.7219	1234.7146	1234.7034	9.13	1	K.VLSIQAHPDK.L
200 - 213	1513.7424	1512.7351	1512.7168	12.1	0	K.LPAEVGSQDDVNNR.K
200 - 214	1641.8416	1640.8343	1640.8118	13.7	1	K.LPAEVGSQDDVNNRK.L
242 - 250	1119.5929	1118.5856	1118.5720	12.2	1	R.TDREPQVFK.D
251 - 262	1454.8152	1453.8079	1453.7889	13.1	1	K.DIDSRLPELIQR.L
256 - 262	868.5281	867.5209	867.5178	3.56	0	R.LPELIQR.L
297 - 318	2433.1274	2432.1201	2432.1100	4.15	0	K.DPHAYISGDIIECMAASDNVVR.A
345 - 354	1273.6802	1272.6729	1272.6649	6.34	1	K.QKMPLQEFPR.S
345 - 354	1289.6808	1288.6735	1288.6598	10.7	1	K.QKMPLQEFPR.S + Oxidation (M)
347 - 354	1017.5272	1016.5199	1016.5113	8.46	0	K.MPLQEFPR.S
347 - 354	1033.5226	1032.5153	1032.5062	8.80	0	K.MPLQEFPR.S + Oxidation (M)
362 - 381	2282.2029	2281.1956	2281.1882	3.25	0	K.SVLYDPPIAEFSVLQTIFDK.S
417 - 450	3784.7698	3783.7625	3783.7904	-7.38	1	K.QKIDTGYVFFVAPGSSIELTADSANQDQDFTTYR.A
419 - 450	3528.6328	3527.6255	3527.6369	-3.23	0	K.IDTGYVFFVAPGSSIELTADSANQDQDFTTYR.A

Figure 27. Les différents fragments peptidiques théoriques issus de la digestion de CaPMI par la trypsine.

```

1 MRGSHHHHHH GMASMSSEKL FRIQCGYQNY DWGKIGSSSA VAQFVHNSDP
51 SITIDETKPY AELWMGTHPS VPSKAIDLNN QTLRDLVTAK PQEYLGESII
101 TKFGSSKELP FLFKVLSIEK VLSIQAHPDK KLGAQLHAAD PKNYPDDNHK
151 PEMAIAVTDF EGFCGFKPLD QLAKTLATVP ELNEIIGQEL VDEFISGIKL
201 PAEVGSQDDV NNRKLLQKVF GKLMNTDDDDV IKQQTAKLLE RTDREPQVFK
251 DIDSRLPELI QRLNKQFPND IGLFCGCLLL NHVGLNKGEA MFLQAKDPHA
301 YISGDIIECM AASDNVVRAG FTPKFKDVKN LVEMLTYSYE SVEKQKMPLQ
351 EFPRSKGDAV KSVLYDPPIA EFSVLQTIFD KSKGGRQVIE GLNGPSIVIA
401 TNGKGTIQIT GDDSTKQKID TGYVFFVAPG SSIELTADSA NQDQDFTTYR
451 AFVEA

```

Figure 28. Recouvrement de la séquence de CaPMI avec les séquences peptidiques (en rouge) obtenues par digestion avec la trypsine : un taux de recouvrement de 39% est obtenu.

La diffusion multi-angulaire de la lumière (MALS) consiste quant à elle à envoyer un faisceau laser dans une solution contenant une suspension des macromolécules. L'intensité de la lumière dispersée par une molécule est directement proportionnelle à sa masse molaire. Cependant, une fois que les monomères forment un dimère, les deux monomères se déplacent ensemble. La lumière diffusée du dimère est deux fois plus intense que la lumière totale dispersée à partir de deux monomères indépendants. Tout simplement, en doublant la masse molaire pour une même concentration, l'intensité de la lumière diffusée double. La diffusion de la lumière représente donc une technique puissante pour déterminer la masse molaire des macromolécules en solution et pour surveiller la présence d'agrégats protéiques (dimère, trimère...). Dans notre cas, le MALS montre bien une protéine monomérique avec une taille moyenne de 57.870 kDa (Figure 29).

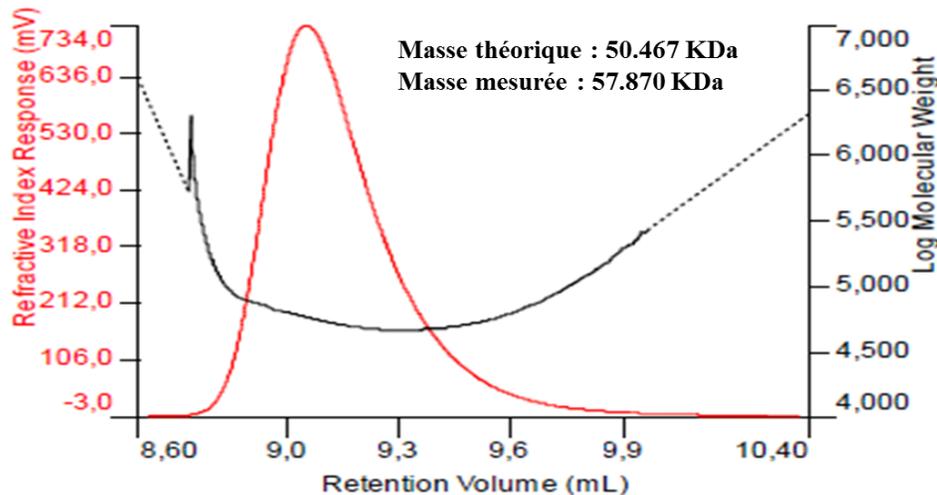


Figure 29. Courbe obtenue pour CaPMI avec la méthode de diffusion de lumière multiangulaire MALS : la protéine est monomérique de 57.870 kDa.

## 4. Surexpression de hPGI

Le même système d'expression BL21(DE3)/pRSET-C a été utilisé. Ce travail a été réalisé selon le protocole de surexpression de hPGI décrit par Read et al..<sup>98</sup>

### 4.1. Purification de hPGI

La présence d'une queue polyhistidine en C-terminal a permis la purification de hPGI par chromatographie d'affinité sur résine de nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ). La purification a été complétée par une chromatographie d'exclusion de taille en utilisant une colonne Superdex S200 (16/60). Dans la

chromatographie d'exclusion appelée également chromatographie par filtration sur gel ou par tamisage moléculaire, les molécules sont séparées selon leur taille et leur forme. Ici, la phase stationnaire est constituée par des billes d'agarose (une substance hydratée spongiforme) dont les pores correspondent à une zone relativement étroite de dimensions moléculaires. Ces billes fonctionnent en quelque sorte comme un tamis moléculaire : les molécules trop grandes ne pouvant pas traverser les pores pour entrer dans les billes traversent la colonne rapidement alors que les plus petites piégées dans les pores nécessitent un volume de solvant plus grand pour être éluées. La figure 30 montre le profil d'éluion (absorbance en fonction du volume de rétention) de la chromatographie par filtration sur gel de hPGI : un épaulement à la base du pic montre que la protéine a tendance à former des agrégats, ce qui est en accord avec sa structure dimérique. Le tampon final dans lequel la protéine se trouve est constituée par 20 mM TRIS pH 7.5, 50 mM NaCl et 10% de glycérol.

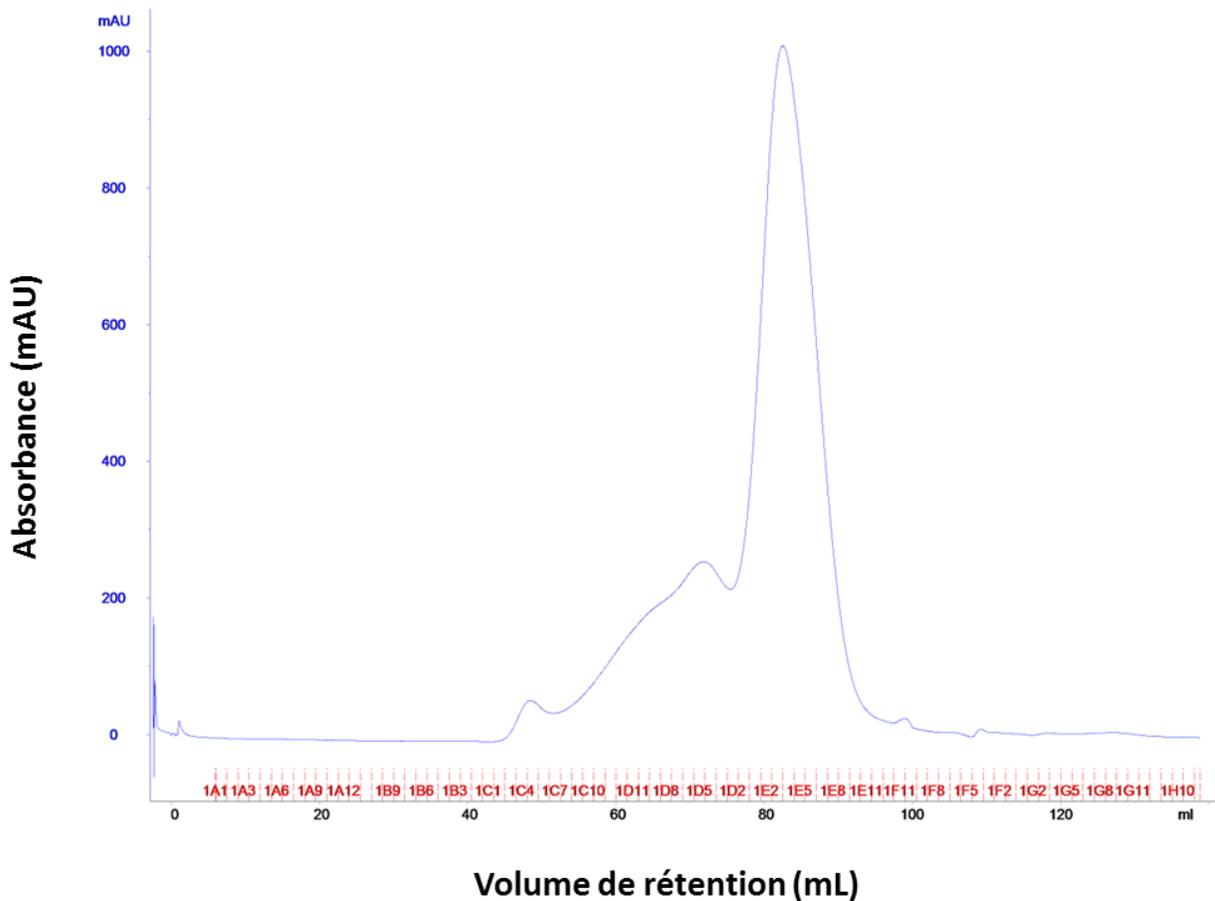


Figure 30. Profil d'éluion de la chromatographie par filtration sur gel de hPGI.

## 4.2. Identification de hPGI

A l'issue de la chromatographie par filtration sur gel, la protéine a été caractérisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide qui met en évidence une protéine pure ayant un poids moléculaire compris entre 50 et 75 kDa (Figure 31), ce qui correspond bien au poids moléculaire attendu qui est de 64.94 kDa.

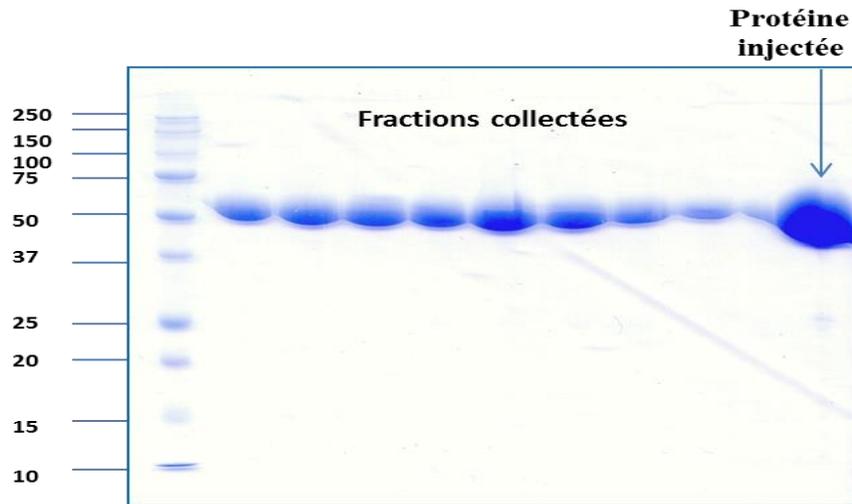


Figure 31. Photo du gel d'électrophorèse de hPGI à l'issue de la chromatographie par filtration sur gel.

L'analyse par diffusion mutli-angulaire de la lumière (MALS) montre une protéine de masse moléculaire égale à 130 kDa, ce qui est tout à fait en accord avec la structure dimérique de la phosphoglucose isomérase humaine (Figure 32).

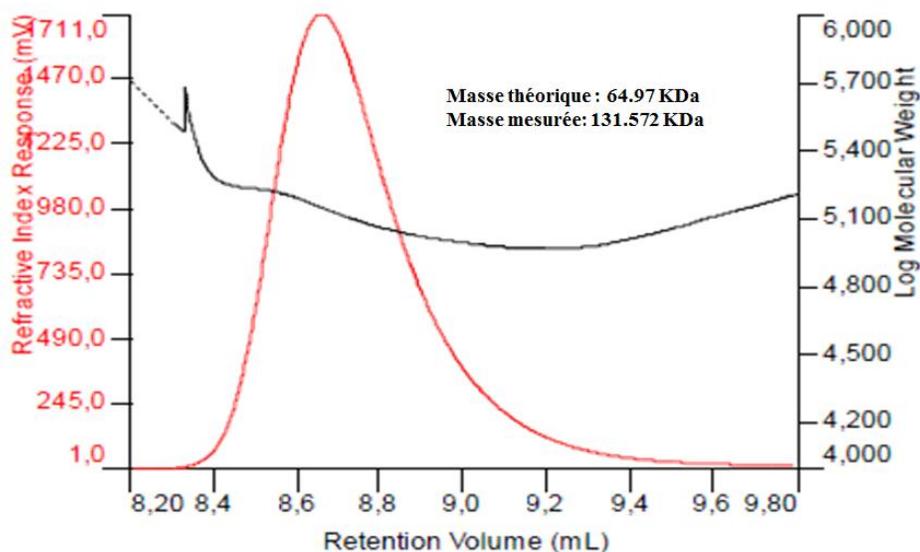


Figure 32. Courbe obtenue pour hPGI avec la méthode MALS.

En conclusion, les deux protéines ont été surexprimées avec un haut degré de pureté et un très bon rendement : 1) 29 mg de CaPMI pour 250 mL de culture et 2) 100 mg de hPGI pour 1 L de culture. Ces deux protéines vont ainsi permettre, d'une part, de réaliser les évaluations cinétiques de nos inhibiteurs potentiels, et d'autre part, de mener les études structurales par diffraction des rayons X de complexes enzyme-inhibiteur.



### **CHAPITRE III**

**EVALUATIONS ENZYMATIQUES DE NOUVEAUX  
INHIBITEURS DE LA PHOSPHOMANNOSE ISOMÉRISE DE  
*CANDIDA ALBICANS* ET DE LA PHOSPHOGLUCOSE  
ISOMÉRISE HUMAINE**



## 1. Introduction

L'enzymologie est la partie de la biochimie qui étudie les propriétés structurales et fonctionnelles des enzymes. En fait, toutes les réactions qui concourent aux performances et au développement des êtres vivants sont déclenchées et régulées par un (ou une) enzyme.

*Véritables catalyseurs du monde vivant*, les enzymes permettent de faire évoluer plus rapidement une réaction chimique donnée. La connaissance approfondie des enzymes a des repercussions aussi bien pour la communauté scientifique que pour la société en général. Elle conduit par exemple à la compréhension de nombreuses maladies associées à des activités enzymatiques aberrantes. Une part importante de la recherche pharmaceutique est consacrée à la découverte d'inhibiteurs spécifiques de ces activités dans le but de stopper ou de ralentir la progression de ces maladies. En effet, la plupart des médicaments communément utilisés agissent comme des inhibiteurs spécifiques d'enzymes impliquées dans le processus pathologique concerné (Tableau 6). Dans notre cas, on s'intéresse à la PMI de *Candida albicans* dans le but de concevoir des anti-fongiques et à la PGI humaine comme une cible potentielle pour la découverte d'agents antimétastatiques.

Tableau 6. Exemples de médicaments agissant comme inhibiteurs d'enzymes.

Maladie	Enzyme cible	Médicament
<b>Hypertension</b>	Enzyme de conversion de l'angiotensine	Captopril, Enalapril...
<b>Infections fongiques</b>	Lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase	Fluconazole, Itraconazole..
<b>Inflammation</b>	Cyclooxygénase	Ibuprofène, Kétoprofène...
<b>hypercholestérolémie</b>	HMG C <sub>0</sub> A réductase	Atorvastatine, Lovastatine...
<b>Goûte</b>	Xantine oxydase	Allopurinol
<b>Cancer</b>	Dihydrofolate réductase	Méthotrexate
<b>SIDA</b>	Protéase du VIH	Ritonavir
<b>SIDA</b>	Transcriptase inverse	Zidovudine
<b>Infections à HSV (Herpes simplex virus)</b>	AND polymérase	Aciclovir
<b>Glaucome</b>	Anhydrase carbonique	Acétazolamide

Le paragraphe suivant présente les tests enzymatiques que nous avons utilisés pour mesurer l'activité enzymatique de CaPMI et de hPGI en présence ou non des inhibiteurs synthétisés au cours de cette étude.

## 2. Mesure des activités enzymatiques

### 2.1. Test enzymatique couplé PGI/G6PDH pour la mesure de l'activité de la PGI

L'activité enzymatique d'une PGI est généralement mesurée dans le sens F6P vers G6P.<sup>165</sup> L'isomérisation du F6P en G6P peut être suivie par spectrophotométrie en couplant à cette première réaction une deuxième réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). La méthode repose sur l'oxydation du G6P issue de l'isomérisation du F6P en 6-phosphogluconolactone (6PGL) par la G6PDH. Cette dernière réaction utilise un cofacteur, le  $\text{NADP}^+$ , et s'accompagne de la formation de NADPH donnant un signal spectrophotométrique mesurable à 340 nm (avec un coefficient d'extinction molaire  $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La G6PDH étant en large excès par rapport à la PGI, la mesure de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps donne accès à la vitesse initiale ( $V_0$ ) de la réaction d'isomérisation catalysée par la PGI : la vitesse d'absorption du NADPH ( $V^{\text{app. NADPH}}$ ) est égale à la vitesse initiale ( $V_0$ ) de la réaction catalysée par la PGI.

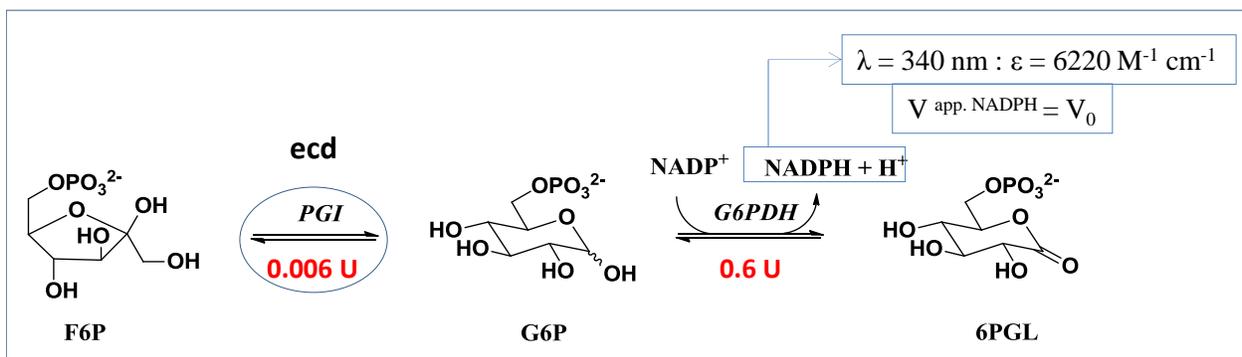


Schéma 36. Principe du test enzymatique PGI/G6PDH pour la mesure de l'activité PGI ; ecd : étape cinétiquement déterminante

## 2.2. Test enzymatique couplé PMI/PGI /G6PDH pour la mesure de l'activité de CaPMI

L'activité enzymatique d'une PMI est généralement mesurée dans le sens M6P vers F6P.<sup>189</sup> L'isomérisation du M6P en F6P est couplée à la fois à la réaction catalysée par la PGI et à celle catalysée par la G6PDH. La méthode repose sur les isomérisations successives du M6P en F6P, catalysée par la PMI, du F6P en G6P, catalysée par la PGI, et sur l'oxydation de ce dernier en 6PGL par la G6PDH. Les enzymes de couplage sont introduites en large excès par rapport à la PMI de telle façon que la vitesse de conversion du NADP<sup>+</sup> en NADPH soit égale à celle de la réaction catalysée par la PMI.

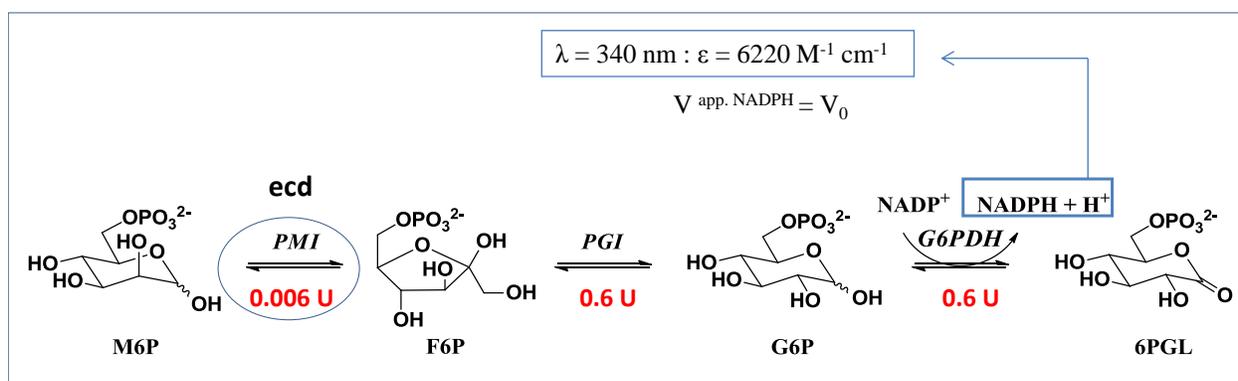


Schéma 37. Principe du test enzymatique PMI/PGI/G6PDH pour la mesure de l'activité PMI ; ecd : étape cinétiquement déterminante.

Ce type de test couplé pose le problème de l'inhibition des enzymes de couplage par les molécules étudiées, notamment dans le cas de la PMI qui met en jeu le même intermédiaire de haute énergie que celui de la réaction catalysée par la PGI. Il a cependant été démontré dans notre laboratoire que l'ajout d'un large excès d'enzymes de couplage suffit pour s'affranchir de ce problème dans le cas du 5PAH qui est un inhibiteur fort de la PGI et de la PMI.<sup>161</sup> Toutefois, et afin d'éliminer toute ambiguïté, des contrôles pour chaque inhibiteur ont été réalisés. Les contrôles permettent de vérifier qu'une augmentation de l'activité totale des enzymes de couplage n'a aucun effet sur la vitesse de la réaction concernée. De même, à activité totale constante des enzymes de couplage, la vitesse observée doit être proportionnelle à l'augmentation de l'activité totale de l'enzyme en question.

### 3. Résultats de l'évaluation des inhibiteurs potentiels vis-à-vis de CaPMI et de hPGI

Dans le cadre de la conception de nouveaux inhibiteurs compétitifs et spécifiques de la réaction d'isomérisation réversible du F6P en M6P catalysée par la phosphomannose isomérase de *Candida albicans* et de celle du F6P en G6P catalysée par la phosphoglucose isomérase humaine, toutes les molécules synthétisées et caractérisées (**1'** à **12**) ont été évaluées initialement sur la PGI du muscle de lapin (RmPGI) et la PMI d'*Escherichia coli* (EcPMI) commerciales, et ce, à titre de comparaison avec les propriétés inhibitrices d'autres inhibiteurs de ces deux enzymes dont les valeurs sont rapportées dans la littérature. Ces deux protéines possèdent un haut degré de similitude avec l'AMF/PGI humaine (92%) et CaPMI respectivement (cf. introduction 3.3.1.). Les molécules **1'** à **12** ont ensuite été évaluées sur les enzymes cibles surexprimées et purifiées au laboratoire.

Les propriétés inhibitrices de tous les composés synthétisés ont été évaluées dans du tampon HEPES 50 mM, pH 7.1 et à une température de 25 °C.

#### 3.1. Évaluations du 5PAH et du 5PAA<sup>162</sup>

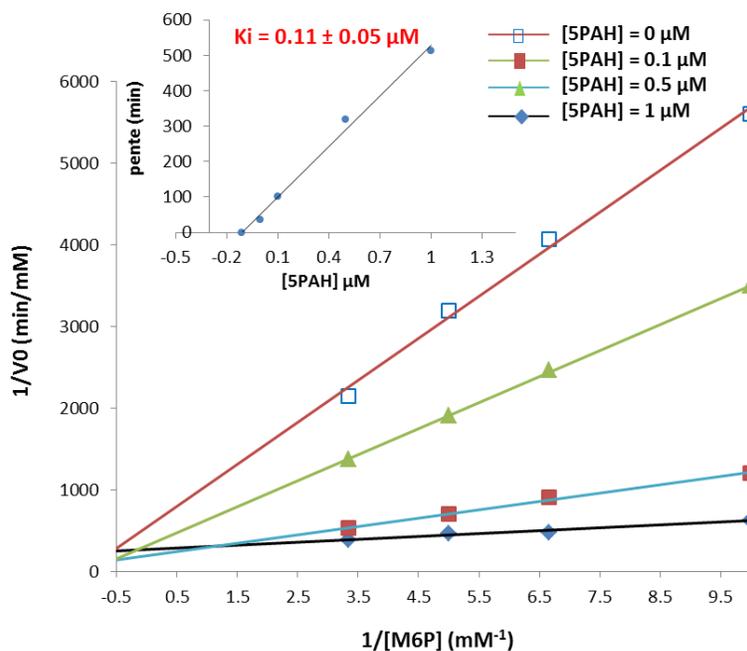
Dans un premier temps, nous avons procédé à des mesures des IC<sub>50</sub> et des  $K_i$  du 5PAH, l'inhibiteur de référence,<sup>160-162</sup> sur la PMI de *candida albicans* et sur la PGI humaine, ces valeurs n'étant pas rapportées dans la littérature. De même, les mesures de l'IC<sub>50</sub> et du  $K_i$  du 5PAA, meilleur inhibiteur sélectif de la PGI humaine,<sup>160,162</sup> ont également été réalisées. Ces valeurs nous servent de référence afin d'estimer le pouvoir inhibiteur des nouvelles molécules rapportées dans cette étude.

Les valeurs des  $K_i$  et IC<sub>50</sub> obtenues pour le 5PAH sur la PGI et la CaPMI sont très proches de celles rapportées dans la littérature pour la PMI d'*E.coli* et la PGI de levure respectivement (Tableau 7). En toute logique, Le 5PAH se révèle être le plus puissant inhibiteur compétitif de la PMI de *Candida albicans* (Graphe 1), mais également de la PGI humaine. Ces résultats confirment que le 5PAH est un excellent analogue de l'IHE de type 1,2-*cis*-ènediolate partagé par les deux enzymes. Un comportement similaire du 5PAH et du 5PAA vis-à-vis des PGI du muscle de lapin et humaine est remarqué, traduisant ainsi le fort degré de similitude (92%) existant entre ces deux PGI.

Tableau 7. Résultats d'inhibition obtenus avec le 5PAH et le 5PAA sur la PMI de *Candida albicans*, la PGI humaine et la PGI du muscle de lapin.

Paramètres	RmPGI	hPGI	ScPGI <sup>a</sup>	CaPMI	EcPMI <sup>d</sup>
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$60 \pm 20$ (Lit. <sup>a</sup> : $100 \pm 9$ )	$50 \pm 10$ (Lit. <sup>b</sup> : 37)	(Lit. <sup>a</sup> : $69 \pm 6$ )	130 (Lit. <sup>c</sup> : 200)	(Lit. <sup>b</sup> : $330 \pm 30$ )
<b>5PAH</b> IC50 ( $\mu\text{M}$ )	$0.888 \pm 0.006$	$0.796 \pm 0.006$	-	$0.204 \pm 0.006$	-
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$0.21 \pm 0.06$	$0.19 \pm 0.06$	$0.23 \pm 0.02$	$0.11 \pm 0.05$	$0.08 \pm 0.01$
$K_m/K_i$	276	263	303	1181	4100
<b>5PAA</b> IC50 ( $\mu\text{M}$ )	$0.450 \pm 0.005$	$0.456 \pm 0.002$	-	-	-
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$0.39 \pm 0.08$	$0.15 \pm 0.08$	$2.1 \pm 0.4$	-	-
$K_m/K_i$	148	333	33	-	-

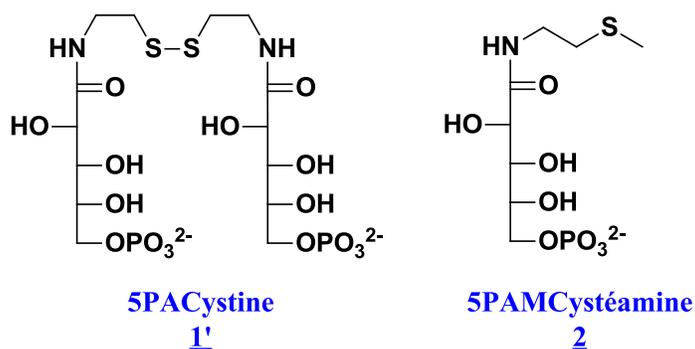
Conditions : tampon HEPES 50 mM, pH 7.1, 25 °C. <sup>a</sup> Tampon TRIS 50 mM, pH 8, 30 °C. <sup>b</sup> Tampon HEPES 20 mM, pH 7.5, 30 °C. <sup>c</sup> Tampon HEPES 50 mM, pH 8, 37 °C. <sup>d</sup> Tampon HEPES 50 mM, pH 7.7, 25 °C. <sup>53</sup>



Grappe 1. Détermination graphique du  $K_i$  de 5PAH vs CaPMI selon Lineweaver-Burk. Le graphe en insert représente la pente de chaque droite du graphe primaire en fonction de la concentration en inhibiteur, l'abscisse à l'origine donnant la valeur de  $K_i$ .

On observe cependant un écart pour la valeur déterminée pour le 5PAA sur la PGI humaine en comparaison avec celle décrite dans la littérature sur la PGI de levure. La valeur du  $K_i$  passe de 2.1  $\mu\text{M}$  à pH 8 (ScPGI) à 0.15  $\mu\text{M}$  à pH 7 (hPGI), mettant en évidence que l'inhibition engendrée par ce composé est probablement dépendante du pH et serait due à une meilleure stabilisation électrostatique du 5PAA au sein du site actif de hPGI à pH 7 comme cela a été déjà décrit par *chirgwin et al.*<sup>163</sup> qui avaient proposé l'implication d'un résidu arginine dans cette stabilisation. Le 5PAA est un excellent inhibiteur compétitif de la PGI humaine avec un rapport de  $K_m/K_i$  de 333, du même ordre de grandeur que celui engendré par le 5PAH ( $K_m/K_i = 263$ ).

### 3.2. Evaluation des composés à fonction mercapto (1' - 2)



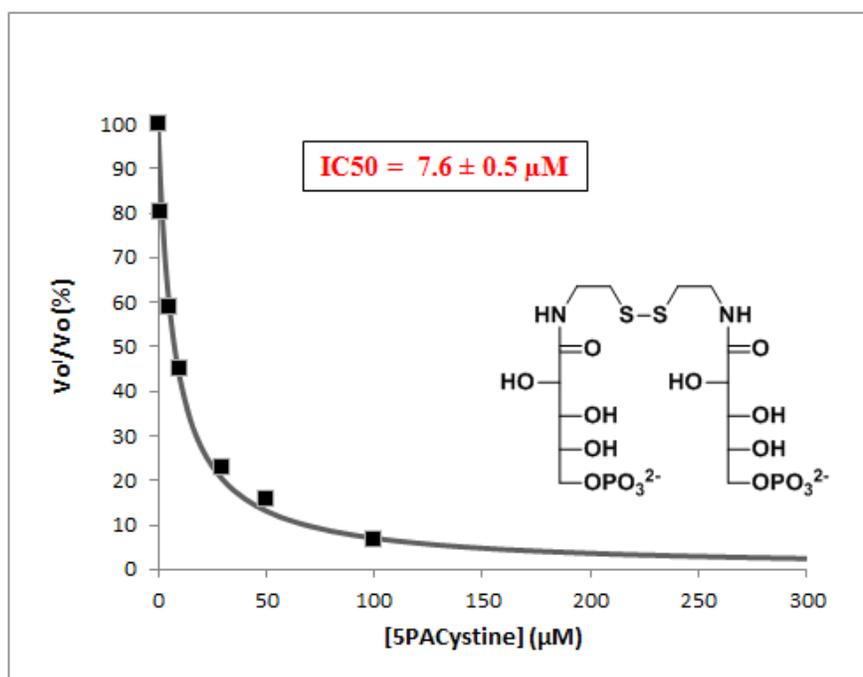
Les résultats obtenus avec les composés 5PACystine (1') et 5PAMCystéamine (2) sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8. Résultats d'inhibition obtenus sur la PMI et la PGI avec les composés 5PACystine (1') et 5PAMCystéamine (2).

Inhibiteur	Paramètres	CaPMI	EcPMI	RmPGI
<b>5PAH</b>	IC50 ( $\mu\text{M}$ )	0.204 $\pm$ 0.006	0.16*	0.888 $\pm$ 0.006
	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	0.11 $\pm$ 0.05	0.08 (Lit. <sup>161</sup> )	0.21 $\pm$ 0.06
	$K_m/K_i$	1181	3952	276
<b>5PACystine (1')</b>	IC50 ( $\mu\text{M}$ )	580 $\pm$ 50	430 $\pm$ 20	7.6 $\pm$ 0.5
<b>5PAMCystéamine (2)</b>	IC50	690 $\pm$ 30	1050 $\pm$ 50	30 $\pm$ 2

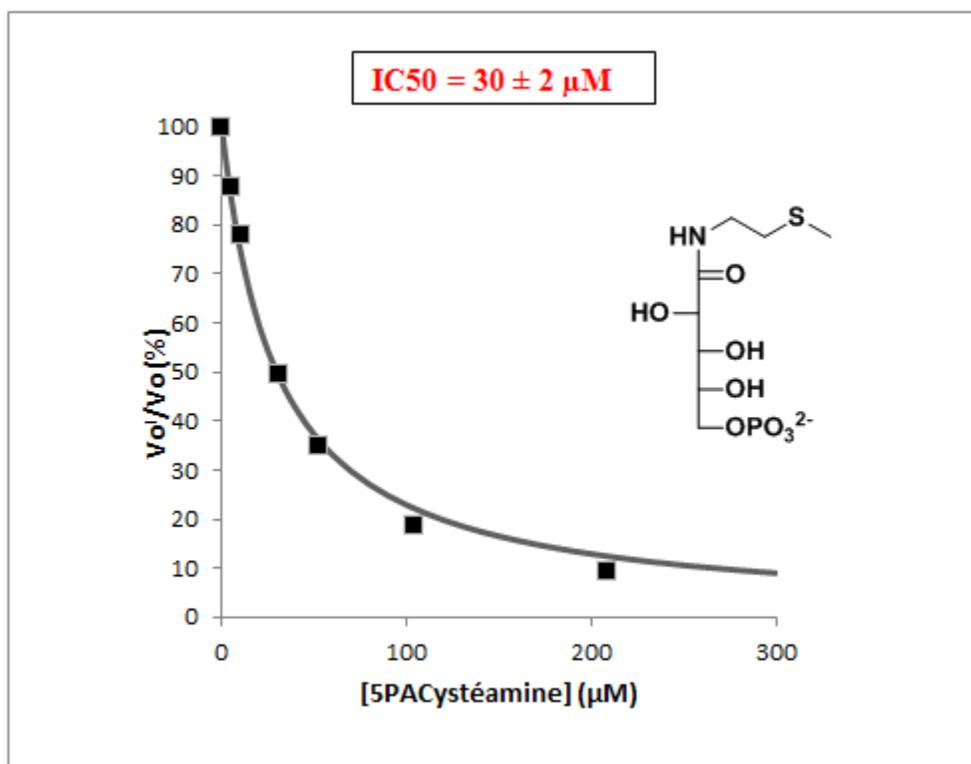
\*Valeur calculée ( $\text{IC}_{50} = 2 K_i$ ).

Dans le cas de la PMI, les résultats sont comparables : le 5PACystine (**1'**) est un mauvais inhibiteur de la PMI de *C. albicans* et de la PMI de *E. coli* avec des IC50 du même ordre de grandeur : une perte d'affinité d'un facteur d'environ 3000 par rapport au 5PAH est observé sur la PMI de *C. albicans*. Le composé sous forme dimérique occupe une place deux fois plus importante que le substrat naturel de l'enzyme (M6P ou F6P) dans le site actif, ce qui explique la mauvaise inhibition des deux PMI. À l'inverse, et de manière très surprenante, ce composé s'est révélé être un bon inhibiteur de la phosphoglucose isomérase de muscle de lapin avec une IC50 de 7.6  $\mu$ M (Graphe 2 et Tableau 8). Il reste moins puissant que le 5PAH mais avec seulement un facteur défavorable de 8 par comparaison des IC50 alors même que le 5PACystine (**1'**) n'est pas un analogue de l'IHE, mais au mieux un analogue de substrat (ou d'une partie de celui-ci). Dans le cas d'une inhibition compétitive comme le suggère la régression non-linéaire du graphe 2, on peut imaginer qu'une partie correspondant à la taille d'un monomère puisse s'insérer à l'intérieur du site actif de la PGI, ce qui n'est pas le cas de la PMI. Il est possible que l'autre partie de l'inhibiteur interagisse favorablement avec les résidus de la PGI extérieurs au site actif, ce qui reste à démontrer.



Grappe 2. Détermination graphique de l'IC50 du 5PACystine (**1'**) sur RmPGI. Conditions : [F6P] = 100  $\mu$ M, tampon HEPES 50 mM, 25 °C. La ligne continue correspond à une régression non-linéaire définie pour une inhibition compétitive (voir partie expérimentale).

Des observations proches peuvent être faites pour le dérivé 5PAMCystéamine (**2**) qui lui aussi montre une très mauvaise inhibition de la PMI avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 1 mM sur la PMI de *E. coli* et de 690 μM sur la PMI de *C. albicans*. L'ajout d'une chaîne sur l'azote de la fonction amide conduit à une perte d'inhibition importante. La fonction mercapto est peut être mal positionnée pour coordonner correctement le zinc d'où une perte d'affinité d'un facteur d'environ 3000 par rapport au 5PAH pour ce composé sur la PMI de *C. albicans*. Ce n'est pas le cas par contre avec la PGI : l'ajout d'une chaîne longue au niveau de la partie tête n'entraîne une perte d'inhibition que d'un facteur 33 par rapport au 5PAH. Le 5PAMCystéamine (**2**) se révèle être un inhibiteur moyen de la PGI avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 30 μM (Graphe 3 et Tableau 8), tout en restant moins puissant que le dérivé disulfure.



Grphe 3. Détermination graphique de l'IC<sub>50</sub> du 5PAMCystéamine (**2**) sur RmPGI. Conditions : [F6P] = 100 μM, tampon HEPES 50 mM, 25 °C. La ligne continue correspond à une régression non-linéaire définie pour une inhibition compétitive (voir partie expérimentale).

Le dérivé 5PAMCystéamine (**2**) est 4 fois moins bon inhibiteur que le composé disulfure 5PACystine (**1'**) vis-à-vis de RmPGI. Il apparaît difficile de donner une explication rationnelle à ce résultat. Si on admet qu'une partie de l'inhibiteur 5PACystine (**1'**) s'insère dans le site actif (inhibition compétitive), la chaîne restante pourrait induire des interactions plus favorables avec la protéine que dans le cas de 5PACystéamine (**2**).

### 3.3. Dérivés à groupement imidazole (3-6)

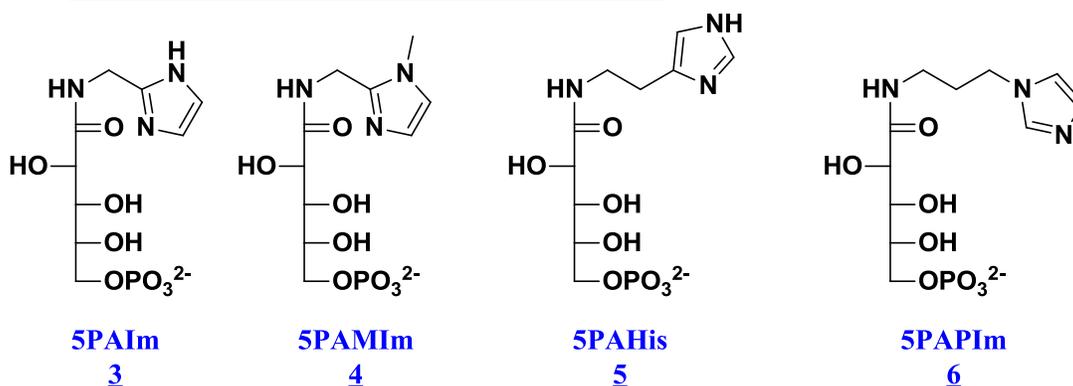


Schéma 38. Structure des dérivés à groupement imidazole.

Les composés de type imidazole (**3-6**, Schéma 38) ont été conçus pour inhiber spécifiquement la PMI par coordination du zinc contenu dans le site actif par le groupement imidazole. En effet, toutes les métalloprotéines à zinc utilisent des groupements spécifiques afin de complexer le métal : l'histidine par son groupement imidazole est le plus connu parmi ces ligands (Figure 33).<sup>192</sup>

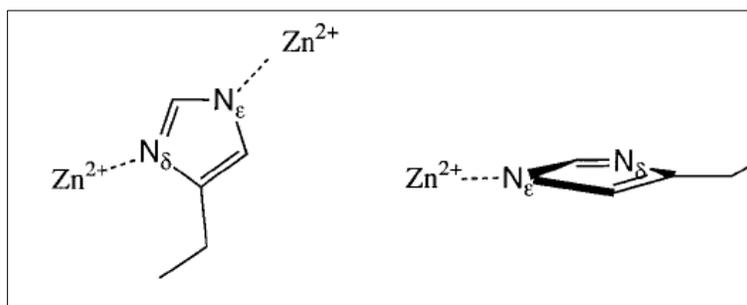


Figure 33. Interaction  $Zn^{2+}$  - imidazole.<sup>192</sup>

Cette série de dérivés imidazole (**3-6**) permet également d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne carbonée entre l'azote de l'amide et le groupement imidazole, ainsi que l'effet de la présence d'un groupe méthyle sur l'azote de l'imidazole, sur les propriétés inhibitrices des composés vis-à-vis des deux types d'enzyme.

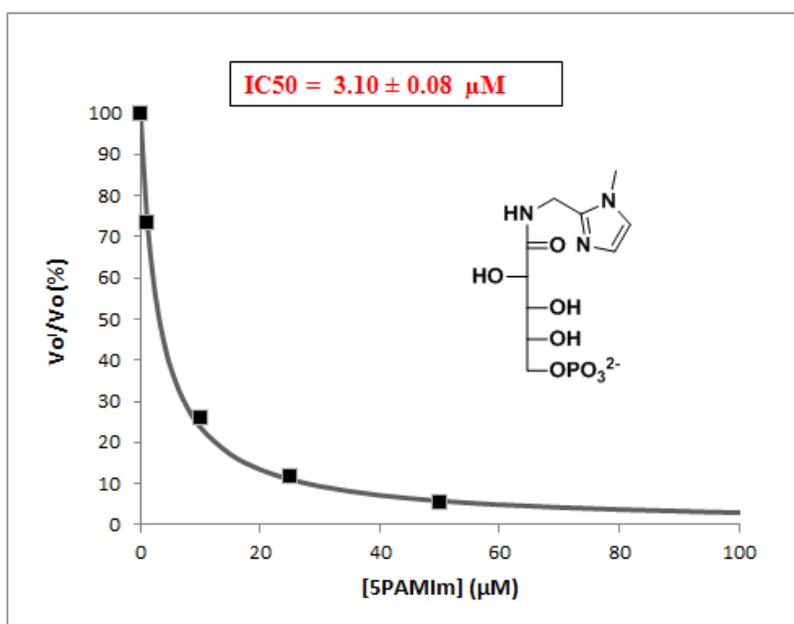
Cependant, des résultats inattendus ont été obtenus après évaluation sur la PGI et la PMI (Tableau 9).

Le 5PAIm (**3**) et le 5PAPIm (**6**) sont tous les deux de très mauvais inhibiteurs de la PMI de *C. albicans* avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre du mM. Ces deux dérivés inhibent un peu mieux la PMI de *E. coli* avec des IC<sub>50</sub> respectives de 470 et 520 µM mais restent cependant de mauvais inhibiteurs. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> observées pour ces deux composés sont très proches montrant ainsi que la longueur de la chaîne entre l'azote de l'amide et l'imidazole n'a pas d'influence sur leurs propriétés inhibitrices. Ce n'est pourtant pas le cas avec le dérivé histamine « 5PAHis » (**5**). Ce dernier est un mauvais inhibiteur de la PMI de *C. albicans* avec une IC<sub>50</sub> de 410 µM, mais il est cependant meilleur que le 5PAIm (IC<sub>50</sub> = 960 µM). Le fait d'allonger la chaîne carbonée d'un carbone dans ce cas entraîne une augmentation de l'affinité d'un facteur 2 à la fois sur CaPMI et EcPMI. Cependant, les propriétés inhibitrices de ces deux composés (**5** et **6**) étant très médiocres, il est difficile de tirer une conclusion quant au rôle de la longueur de la chaîne carbonée greffée sur l'azote de l'amide.

Tableau 9. Résultats d'inhibition obtenus sur la PGI et la PMI avec les dérivés à groupement imidazole.

Inhibiteur	Paramètres	RmPGI	hPGI	EcPMI	CaPMI
<b>5PAH</b>	IC <sub>50</sub> (µM)	0.888 ± 0.006	0.796 ± 0.006	-	0.204 ± 0.006
	K <sub>i</sub> (µM)	0.21 ± 0.06	0.19 ± 0.06	0.084 (Lit. <sup>161</sup> )	0.11 ± 0.05
	K <sub>m</sub> /K <sub>i</sub>	276	263	3952	1181
<b>5PAIm (3)</b>	IC <sub>50</sub> (µM)	11.0 ± 0.3	-	470 ± 20	960 ± 70
<b>5PAMI (4)</b>	IC <sub>50</sub> (µM)	3.95 ± 0.05	3.1 ± 0.08	200 ± 10	170 ± 5
<b>5PAHis (5)</b>	IC <sub>50</sub> (µM)	5.2 ± 0.2	4.93 ± 0.08	175 ± 10	410 ± 30
<b>5PAPIm (6)</b>	IC <sub>50</sub> (µM)	15 ± 0.7	-	520 ± 30	1070 ± 70

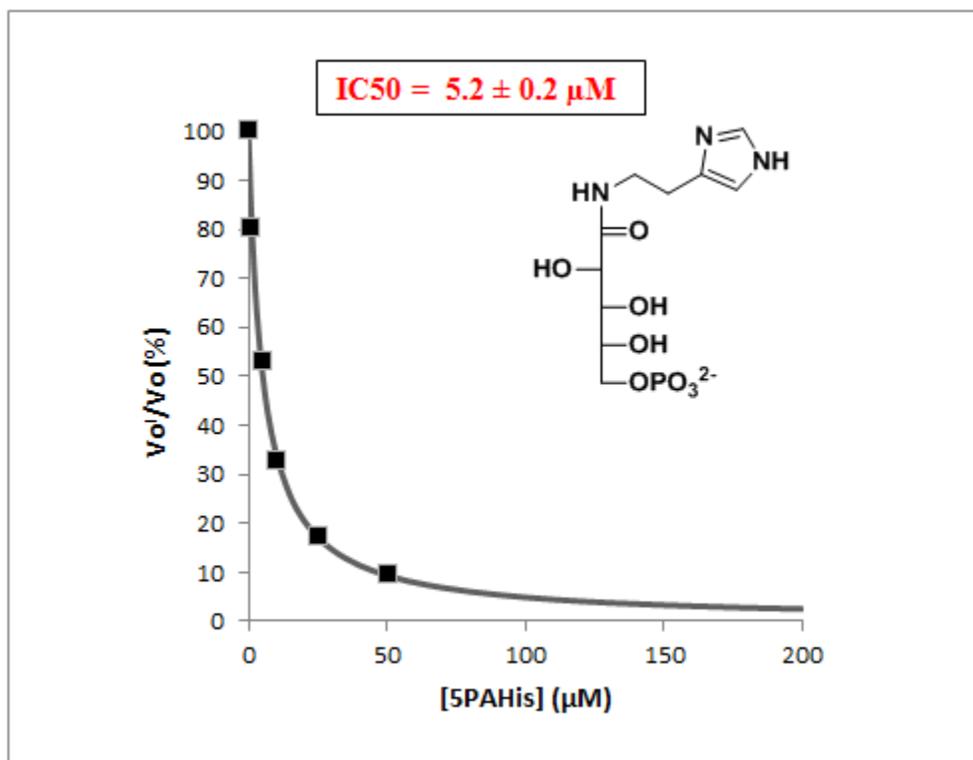
Le 5PAMIm (**4**) est quant à lui un peu meilleur inhibiteur que son analogue non méthylé 5PAIm (**3**) avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 170 μM sur la PMI de *C. albicans*. Il reste cependant un mauvais inhibiteur de l'enzyme avec une affinité en deça de celle du substrat naturel ( $K_m$  M6P = 130 μM). La présence d'un groupe méthyle sur l'azote de l'imidazole entraîne ainsi, par comparaison des IC<sub>50</sub>, une augmentation de l'affinité pour CaPMI d'un facteur 5. Le groupement méthyle accroît le pouvoir coordinant de l'azote de l'imidazole. A nouveau, il reste difficile de juger du rôle du groupe méthyle car dans les deux cas, les propriétés inhibitrices sont médiocres. Les propriétés inhibitrices des dérivés **3** à **6** sont très décevantes et montrent que le site actif des PMI ne tolère pas une augmentation de l'encombrement stérique de la partie tête des inhibiteurs, et ce, même en utilisant un bon ligand du zinc comme le groupe imidazole.



Grappe 4. Détermination graphique de l'IC<sub>50</sub> du 5PAMIm (**4**) sur hPGI. Conditions : [F6P] = 100 μM, tampon HEPES 50 mM, 25 °C. La ligne continue correspond à une régression non-linéaire définie pour une inhibition compétitive (voir partie expérimentale).

Dans le cas des PGI, des résultats intéressants ont été obtenus. L'évaluation des dérivés **3-6** sur la PGI humaine et celle du muscle de lapin (RmPGI) donne des valeurs d'IC<sub>50</sub> comparables (Tableau 9). De façon surprenante, tous les composés de cette série sont de biens meilleurs des PGI que des PMI. Le 5PAMIm (**4**) est le meilleur inhibiteur dans cette série avec une IC<sub>50</sub> de 3.95 et 3.1 μM sur la PGI du muscle de lapin et la PGI humaine (grappe 4), respectivement. Il

reste toutefois moins bon que le 5PAH d'un facteur défavorable de 4 par comparaison des IC50. Tout comme pour la PMI, l'ajout d'un groupe méthyle sur l'imidazole semble également augmenter l'affinité de l'inhibiteur pour la PGI puisqu'on observe un gain d'affinité d'un facteur 3 entre les composés **3** et **4**. Ce gain est difficile à rationaliser en absence des structures 3D correspondants.



Graphe 5 : Détermination graphique de l'IC50 du 5PAHis (**6**) sur RmPGI. Conditions : [F6P] = 100 µM, tampon HEPES 50 mM, 25 °C. La ligne continue correspond à une régression non-linéaire définie pour une inhibition compétitive (voir partie expérimentale).

De même, comme dans le cas de la PMI, l'effet de la longueur de la chaîne carbonée séparant l'azote de l'amide et l'imidazole sur les propriétés inhibitrices de ces composés est difficilement rationalisable : le 5PAHis (**5**) avec un carbone en plus par rapport au 5PAIm (**4**) montre une augmentation de l'affinité d'un facteur 2 avec une IC50 de 5.2 µM (Graphe 5 et Tableau 9), tandis que le 5PAPIm (**6**) avec deux carbones en plus engendre une inhibition moindre avec une IC50 de l'ordre de 15 µM. A noter cependant que le branchement du groupe imidazole sur le

reste de la molécule est différent pour les 3 molécules **3**, **5** et **6**, ce qui peut également influencer les propriétés inhibitrices des 3 composés.

En conclusion, les 4 composés de la série imidazole peuvent être classés comme suit par ordre décroissant d'inhibition de RmPGI : 5PAMIm (**4**) (1 carbone + 1 méthyle sur l'azote) > 5PAHis (**5**) (2 carbones) > 5PAIm (**3**) (1 carbone) > 5PAPIm (**6**) (3 carbones) avec des IC50 très proches entre 5PAMIm (**4**) et 5PAHis (**5**) d'un côté et entre 5PAIm (**3**) et 5PAPIm (**6**) de l'autre.

### 3.4. Dérivés furane, thiophène, pyridine et sulfone (7-10)

Les résultats obtenus avec les dérivés furane 5PAF (**8**), thiophène 5PAT (**9**), pyridine 5PAPy (**7**) et sulfone 5PASulfone (**10**) sont rapportés dans le tableau 10.

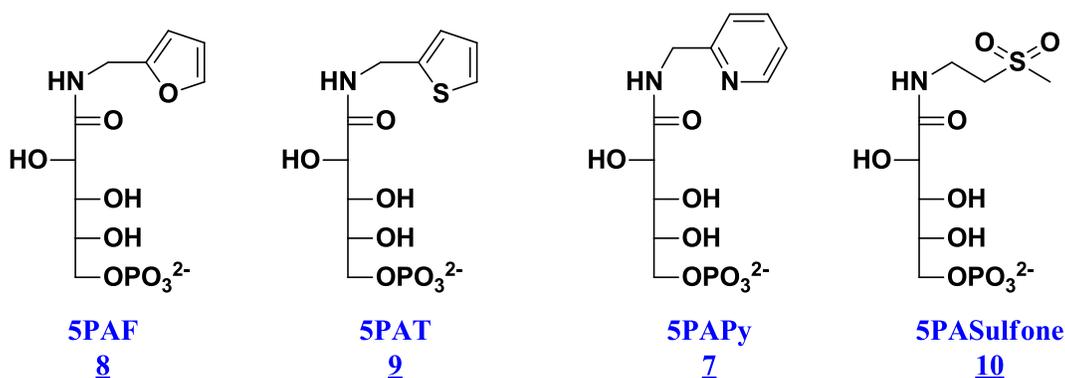


Tableau 10. Résultats d'inhibition obtenus sur la PGI et la PMI avec les dérivés furane (5PAF, **8**) et thiophène (5PAT, **9**).

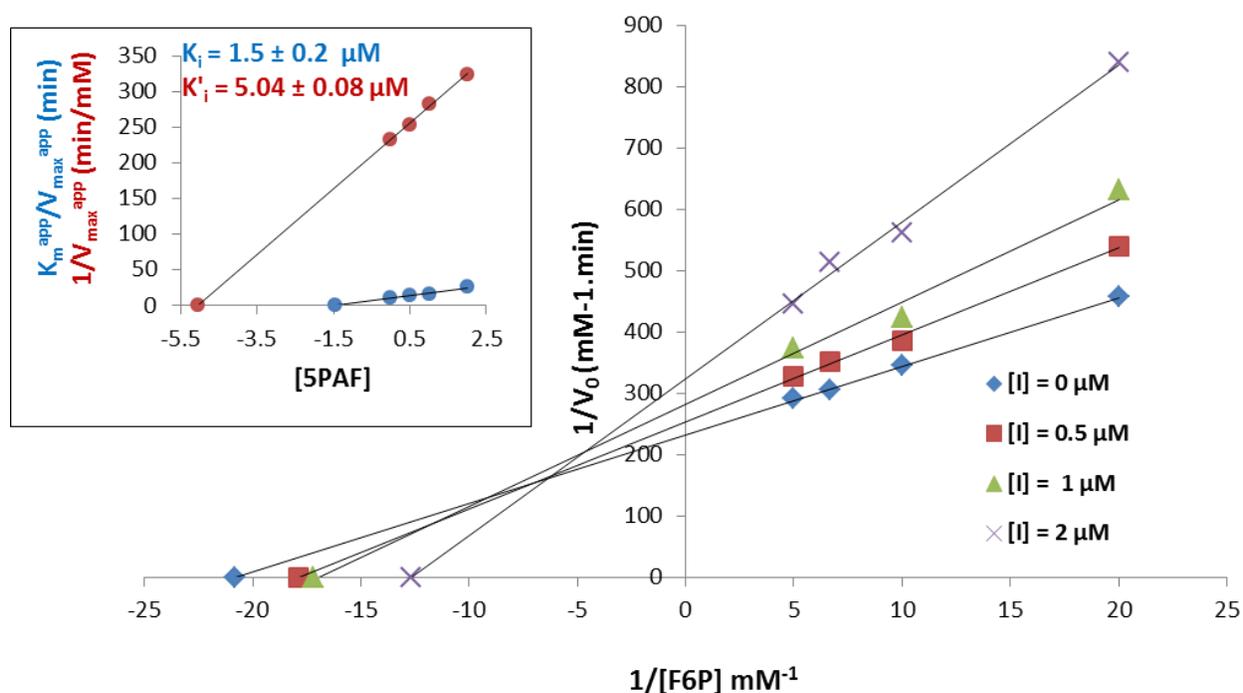
Inhibiteur	Paramètres	RmPGI	hPGI	EcPMI	CaPMI
<b>5PAH</b>	IC50 (μM)	0.888 ± 0.006	0.796 ± 0.006	-	0.204 ± 0.006
	K <sub>i</sub> (μM)	0.21 ± 0.06	0.19 ± 0.06	0.084 (Lit. <sup>161</sup> )	0.11 ± 0.05
	K <sub>m</sub> /K <sub>i</sub>	276	263	3952	1181
<b>5PAF (8)</b>	IC50 (μM)	<b>2.6 ± 0.3</b>	<b>1.5 ± 0.2</b>	410 ± 30	490 ± 50
	K <sub>i</sub> (μM)	<b>3.2 ± 0.6</b>	<b>1.5 ± 0.2</b>		
<b>5PAT (9)</b>	IC50 (μM)	<b>13.9 ± 0.4</b>	-	1600 ± 200	2300 ± 100
<b>5PAPy (7)</b>	IC50 (μM)	<b>5.4 ± 0.3</b>	<b>2.9 ± 0.3</b>	280 ± 10	273 ± 7
<b>5PASulfone (10)</b>	IC50 (μM)	<b>13.2 ± 0.3</b>	-	410 ± 30	470 ± 40

Comme pour les dérivés de type imidazole précédents, l'évaluation cinétique montre à nouveau que les composés 5PAF (**8**), 5PAT (**9**), 5PAPy (**7**) et 5PASulfone (**10**) sont de bons inhibiteurs des PGI et de mauvais inhibiteurs des PMI.

Le dérivé thiophène 5PAT (**9**) est un très mauvais inhibiteur des PMI avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre du mM : 1.6 et 2.3 mM sur la PMI de *E. coli* et la PMI de *C. albicans*, respectivement. Son analogue furane 5PAF (**8**) est un peu meilleur avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> du même ordre de grandeur sur les deux PMI : 490 µM sur la PMI bactérienne et 410 µM sur la PMI fongique. Le 5PAT (**9**) reste cependant un mauvais inhibiteur des PMIs. Le 5PASulfone (**10**) se comporte de façon très similaire au 5PAF (**8**) avec la même valeur d'IC<sub>50</sub> vs la PMI de *E. coli* (410 µM) et une IC<sub>50</sub> très proche dans le cas de la PMI de *C. albicans* (470 µM). Le dérivé 5PAPy (**7**) est quant à lui le meilleur inhibiteur des PMI dans cette série avec des IC<sub>50</sub> de 273 et de 280 µM sur la PMI bactérienne et la PMI fongique, respectivement. Il reste cependant un mauvais inhibiteur de l'enzyme avec un comportement similaire à son substrat ( $K_m = 130 \mu\text{M}$  pour la PMI de *C. albicans*). Ces dérivés s'ajoutent ainsi à la liste des analogues soufrés et des dérivés imidazolés qui eux aussi sont de mauvais inhibiteurs des PMI. Ces résultats confirment que la PMI est très exigeante et ne semble accepter que des analogues de l'IHE ayant à la fois la même taille que le substrat et mimant bien la fonction 1,2-*cis*-ènediolate aussi bien du point de vue coplanéité qu'électrostatique.

Contrairement à la PMI, le 5PAF (**8**) se révèle être un très bon inhibiteur de la PGI avec des  $K_i$  de 2.6 ( $K_m/K_i = 22$ ) et de 1.5 µM ( $K_m/K_i = 33$ ) sur la PGI du muscle de lapin et la PGI humaine, respectivement. La représentation graphique de Lineweaver-Burk sur la PGI humaine (graphe 6), montre que les droites ont tendance à se rencontrer en arrière de l'axe des ordonnées, ce qui est caractéristique d'une inhibition dite « non compétitive mixte » dans laquelle une partie de l'inhibition observée implique l'enzyme libre E ( $K_i$ ) et l'autre partie implique le complexe enzyme-substrat ES ( $K_i'$ ). La constante d'inhibition  $K_i$  est de 1.5 µM : elle est égale à la valeur d'IC<sub>50</sub>, ce qui est tout à fait en accord avec ce type d'inhibition pour laquelle  $\text{IC}_{50} = K_i$  en se plaçant à une concentration en substrat égale au  $K_m$ . La constante  $K_i'$  est estimée à 5.04 µM, correspond à la fixation de l'inhibiteur sur un autre site que le site actif de l'enzyme. Cette fixation induirait peut-être un changement de conformation de l'enzyme réduisant ainsi son activité PGI.

Le 5PAF (**8**) est meilleur inhibiteur que son analogue thiophène 5PAT (**9**) dont l'IC50 est de 13.9  $\mu\text{M}$  sur la PGI du muscle de lapin. Ces résultats suggèrent un rôle pour l'atome d'oxygène du noyau furane étant donné que les deux dérivés ne diffèrent l'un de l'autre que par la nature de leur hétéroatome. L'atome d'oxygène dans le noyau furanique du composé **8** peut être le siège d'une interaction par liaison hydrogène avec un résidu du site actif beaucoup moins probable avec le soufre du groupe thiophène du composé **9**.

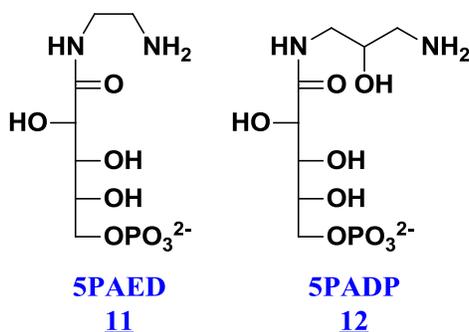


Graph 6. Détermination graphique des constantes d'inhibition  $K_i$  et  $K_i'$  (5PAF « **8** » vs hPGI) selon Lineweaver-Burk.

Le 5PAPy (**7**) est lui aussi un très bon inhibiteur de la PGI avec une IC50 de 2.9  $\mu\text{M}$  sur la PGI humaine et de 5.4  $\mu\text{M}$  sur la PGI du muscle de lapin. Tout comme le dérivé furanique (**8**), l'azote du cycle pyridyle peut jouer le rôle d'accepteur d'une liaison hydrogène au sein du site actif de l'enzyme. La valeur de l'IC50 chute pour le dérivé 5PASulfone (**10**) qui se comporte de manière similaire au dérivé thiophène 5PAT (**9**). Il est cependant un bon inhibiteur de l'enzyme avec une IC50 de 13.2  $\mu\text{M}$  sur la PGI du muscle de lapin.

Bien que nettement inférieures à celles des inhibiteurs analogues d'IHE tels 5PAH et 5PAA, les propriétés inhibitrices des dérivés **7-10** sont plutôt correctes considérant que ces inhibiteurs sont des analogues de substrat dont la partie tête a été modifiée.

### 3.5. Composés à fonction amine terminale



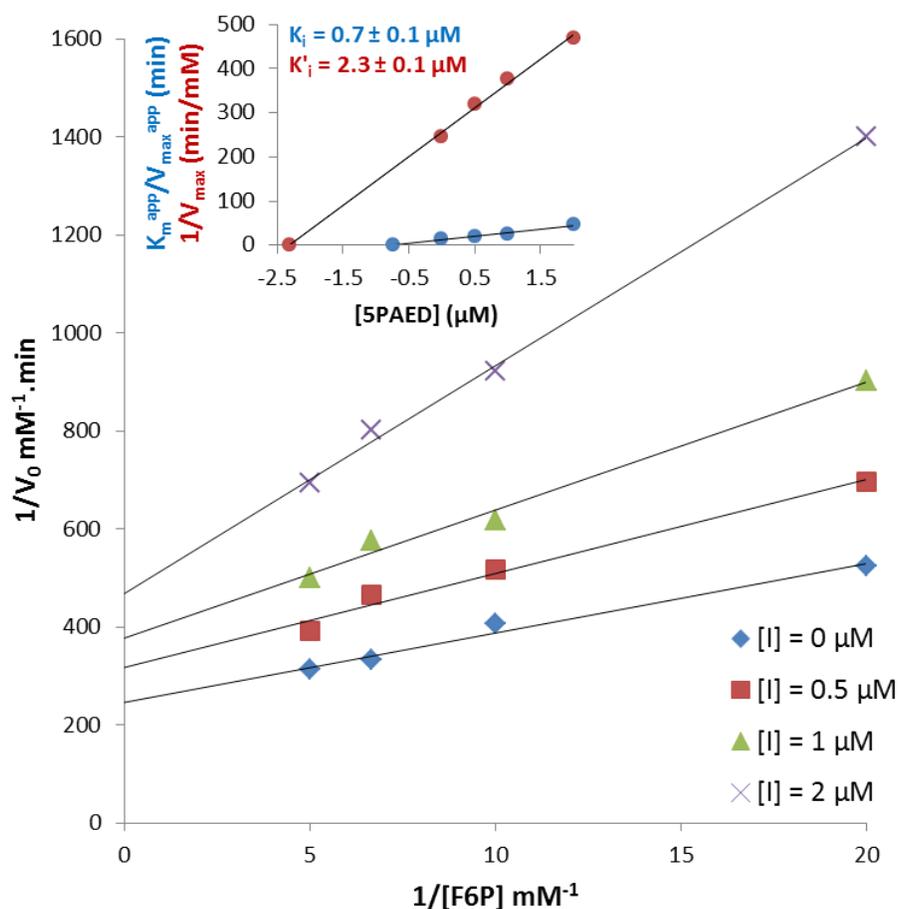
Les composés **11** et **12** ont été conçus pour inhiber spécifiquement la PGI. En effet, nous cherchions à mettre à profit une interaction électrostatique potentiellement favorable avec le Glu357 par protonation de leur fonction amine terminale à pH 7. Cette hypothèse n'a pas été vérifiée initialement par modélisation moléculaire. Les résultats obtenus avec ces dérivés sont rapportés dans le tableau 11.

Tableau 11. Résultats d'inhibition obtenus sur la PGI avec les dérivés 5PAED (**11**) et 5PADP (**12**).

Inhibiteur	Paramètres	RmPGI	hPGI
<b>5PAH</b>	IC50	0.888 ± 0.006	0.796 ± 0.006
	$K_i$	0.21 ± 0.06	0.19 ± 0.06
	$K_m/K_i$	276	263
<b>5PAED</b>	IC50	1.0 ± 0.02	0.91 ± 0.09
	$K_i$	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1
<b>5PADP</b>	IC50	2.86 ± 0.02	0.95 ± 0.05
	$K_i$	-	0.52 ± 0.07

Le dérivé éthylènediamine 5PAED (**11**) apparaît comme un excellent inhibiteur de la PGI avec avec des IC50 de 0.91 et de 1  $\mu$ M sur la PGI humaine et la PGI du muscle de lapin, respectivement. La représentation graphique de Lineweaver-Burk pour le 5PAED (**11**) met en

évidence une inhibition type non compétitive mixte sur les deux types de PGI. La constante d'inhibition  $K_i$  sur la PGI humaine est de  $0.7 \mu\text{M}$  et est presque égale à la valeur de l'IC50 ( $0.95 \mu\text{M}$ ) tandis que la constante d'inhibition  $K_i'$  est de  $2.3 \mu\text{M}$  (Graphe 7). Des valeurs égales de  $K_i$  et d'IC50 ont également été obtenues avec la PGI du muscle de lapin ce qui est en accord avec une inhibition de type mixte.



Grphe 7. Détermination graphique des constantes d'inhibition  $K_i$  et  $K_i'$  (5PAED **11** vs hPGI) selon Lineweaver-Burk.

Le 5PADP (**12**) qui présente un carbone et une fonction hydroxyle en plus par rapport au 5PAED (**11**) est lui aussi, d'après les résultats obtenus, un excellent inhibiteur avec un  $K_i$  de  $0.52 \mu\text{M}$  sur la PGI humaine, très proche de la valeur de  $K_i$  déterminé pour le 5PAED ( $1 \mu\text{M}$ ) sur la même enzyme. La valeur du  $K_i$  vs RmPGI pour le 5PADP (**12**) est par contre trois fois plus élevée que

celle déterminée pour le 5PAED (**11**). Le groupe OH, *donneur d'une liaison hydrogène*, et un carbone de plus, n'ont pas trop influencé l'affinité du composé *vs* de la RmPGI ou de la hPGI.

Les deux composés **11** et **12** constituent deux nouveaux puissants inhibiteurs des PGI. Il est tout à fait remarquable que ces deux composés, simples analogues de substrats à partie tête modifiée, aient des propriétés inhibitrices très proches de celles du 5PAH et même meilleurs que celles du 5PAA, jusqu'alors les deux meilleurs inhibiteurs des PGI. L'étude cristallographique du complexe hPGI-5PAED (Chapitre IV) révélera un tout autre mode d'interaction que celui initialement attendu.

#### **4. Conclusion des évaluations cinétiques**

D'après les résultats de l'évaluation cinétique des différents composés synthétisés dans cette étude (**1'-12**), le site actif de la PGI paraît moins exigeant et capable, au contraire de la PMI, d'accepter des groupements encombrants au niveau de la partie tête des analogues de substrats linéaires.

Tous les composés synthétisés **1'-12** se révèlent être de très mauvais inhibiteurs des PMI. Ces résultats montrent que la PMI est très exigeante et ne tolère que des analogues ayant à la fois la même taille et mimant bien la fonction 1,2-*cis*-ènediolate, comme le 5PAH qui est un excellent analogue de l'IHE du point de vue aussi bien stérique qu'électrostatique. La fonction acide hydroxamique du 5PAH mime au mieux le plan dans lequel est inscrit la fonction 1,2-*cis*-ènediol(ate) et possède également des propriétés chélatantes à l'égard du zinc par ses formes hydroxamate ou hydroxamique. Par contre, les composés (**1'-10**) conçus pour coordonner le zinc par l'approche « ZBG » ont une partie tête plus encombrée, neutre et qui ne miment pas la fonction 1,2-*cis*-ènediolate de l'IHE des PMI. Il serait donc intéressant d'envisager la conception d'un analogue de substrat, non-analogue de l'IHE, comportant un ligand du zinc mais dont l'encombrement stérique global soit similaire à celui du substrat.

De nouveaux inhibiteurs de la PGI humaine autre que le 5PAH et le 5PAA ont été découverts. Ces inhibiteurs ayant une partie tête ne mimant pas, contrairement au 5PAH, la fonction

enediolate de l'IHE, apparaissent néanmoins comme de bons, voire excellents inhibiteurs de la PGI. Ils sont, au contraire du 5PAH, plus stables et sélectifs de la PGI vis-à-vis de la PMI. Leur partie tête contenant un groupement imidazole, furane, thiophène, sulfone ou pyridinique est neutre, augmentant ainsi la valeur de leur coefficient de partage et pouvant donner une meilleure biodisponibilité orale par rapport au 5PAA anionique. En conséquence, il serait intéressant d'envisager la synthèse et l'évaluation des analogues de ces composés contenant un groupe mime du phosphate comme les dérivés phosphonates ou malonates plus stables envers les phosphatases présentes dans la plupart des tissus de l'organisme et dans le sang. A noter que nos composés sous leur forme phosphatés sont de bons candidats pour inhiber l'AMF dont la localisation est extracellulaire sans toutefois inhiber la PGI humaine intracellulaire.

Des études structurales cristallographiques par diffraction des RX de complexes hPGI-inhibiteurs ont été entreprises avec les 3 meilleurs inhibiteurs de l'enzyme synthétisés dans cette étude, le 5PAED (**11**), le 5PADP (**12**) et le 5PAF (**8**), afin de mieux comprendre le comportement et les interactions engendrés par chacun d'entre eux au site actif de la PGI. Les résultats obtenus à l'issue de ces études sont rapportés dans le chapitre IV.



## **CHAPITRE IV**

### **ETUDE CRISTALLOGRAPHIQUE DE COMPLEXES ENZYME- INHIBITEUR**



## **AVANT-PROPOS**

**Dans un premier chapitre, nous présenterons la structure 3D à haute résolution obtenue par diffraction des rayons X de CaPMI complexée avec un inhibiteur analogue de l'IHE 1,2-*cis*-ènediolate, le 5-phospho-D-arabinonhydrazide (5PAHz).** En effet, seule la structure 3D de la protéine native CaPMI a été publiée et déposée dans la PDB (1PMI) en 1996.<sup>27</sup> Depuis, aucune structure de la PMI de *Candida albicans* avec un inhibiteur ou un substrat au site actif n'a été rapportée dans la littérature. Par conséquent, beaucoup d'informations concernant le mécanisme d'action de la réaction catalysée restent à élucider, notamment en ce qui concerne la nature de la base catalytique impliquée dans le transfert de proton entre les deux carbones C1 et C2 du substrat. Bien que certains résidus du site actif de CaPMI aient été postulés à partir de la structure de l'enzyme native et d'études antérieures (mutagénèse dirigée, marquages d'affinité...), la nature et le positionnement précis des résidus du site actif vis-à-vis du substrat ou à l'état de transition sont inconnus. En conséquence, le mécanisme de l'isomérisation M6P-F6P catalysée par les PMI l'est également encore à ce jour. Un inhibiteur analogue de l'IHE, contrairement au substrat, a l'avantage de se lier fortement au site actif de l'enzyme et de fournir une « photographie » du site actif dans un état proche de l'état de transition.

**Dans un deuxième chapitre, la structure 3D à haute résolution du complexe de la phosphoglucose isomérase humaine avec le 5PAED a également été obtenue.** Bien que le mécanisme détaillé de l'isomérisation G6P-F6P catalysée par la PGI soit aujourd'hui bien décrit et que plusieurs structures 3D de complexes enzyme-inhibiteur et enzyme-substrat sont disponibles dans la PDB, il est intéressant de connaître le mode d'interaction de ce nouvel inhibiteur. En effet, malgré le fait que 5PAED ne soit pas un analogue de l'IHE tel 5PAH, mais plutôt un analogue de substrat à partie tête modifiée, 5PAED s'est révélé être un puissant inhibiteur des PGI.

# A- STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE À HAUTE RÉSOLUTION DU COMPLEXE CaPMI-5PAHz (CODE PDB : 5NW7)

## 1. Aspects expérimentaux

La cristallisation, la collection des données, la résolution et l'affinement de la structure du complexe CaPMI-5PAHz ont été réalisées en collaboration avec l'équipe FAAM (Fonction et Architecture des Assemblages Macromoléculaires) à l'I2BC (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule) à Orsay (Université Paris-Sud/Université Paris-Saclay) avec la participation du Prof. Herman Van Tilbeurgh, du Dr. Ines Gally, du Dr. Stéphane Plancqueel et du Dr. Noureddine Lazar (données cristallographiques : voir annexes paragraphe 4).

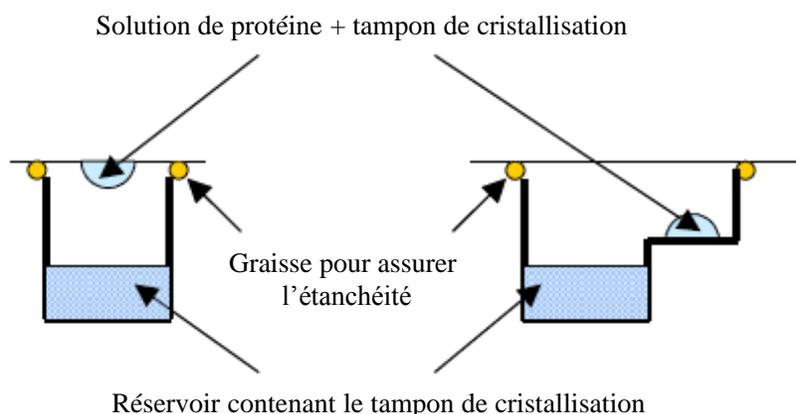


Figure 34. Représentation schématique de la méthode de la diffusion de vapeur en goutte suspendue (à gauche) et assise (à droite) utilisées dans les essais de cristallisation.

De manière à obtenir un cristal du complexe protéique, la méthode de la diffusion de vapeur a été utilisée (Figure 34). Dans cette technique, une goutte contenant la solution de protéine mélangée à la solution de cristallisation est équilibrée contre un réservoir contenant la même solution de cristallisation mais deux fois plus concentrée. La diffusion de vapeur s'effectue de la goutte vers le réservoir, conduisant à une déshydratation de la goutte et donc à un accroissement de la concentration en macromolécule et en agent cristallisant pouvant mener à la cristallisation du

complexe protéique. Deux variantes de cette technique ont été utilisées : 1) la diffusion de vapeur en goutte assise et 2) la diffusion de vapeur en goutte suspendue. La première a été utilisée lors du criblage robotisé des conditions de cristallisation permettant de minimiser les volumes de la goutte (200 nL) et donc de la quantité d'échantillon biologique nécessaire. L'usage de robots permet une recherche plus exhaustive des conditions permettant de cristalliser une protéine. La deuxième méthode a été essentiellement utilisée pour optimiser manuellement une condition de cristallisation préalablement identifiée par un criblage robotisé.

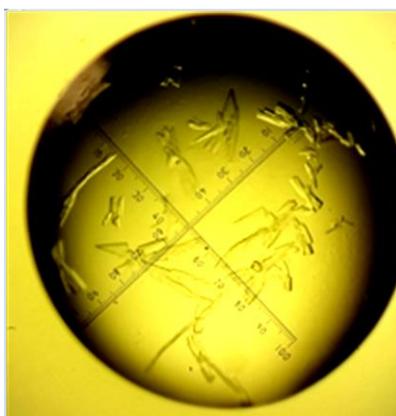


Figure 35. Image de la goutte contenant les cristaux du complexe CaPMI-5PAHz.

Les gouttes suspendues (2  $\mu\text{L}$ ) sont constituées par un égal mélange d'une solution de protéine (10-20 mg/mL de PMI, 20 mM de tampon Tris (pH 8,5), 150 mM de NaCl et 5 mM de 5PAHz) et d'une solution réservoir (20-30% PEG 3350, 200 mM de  $\text{MgCl}_2$  et 100 mM de tampon BIS-TRIS pH 5.5). Les gouttes ont été équilibrées avec 500  $\mu\text{L}$  de la solution réservoir. Les cristaux apparaissent en 3 jours pour une concentration en PMI de 10 mg/mL et en PEG 3350 de 20% (Figure 35). Les données de diffraction d'un seul cristal de dimensions approximatives de  $0.12 \times 0.1 \times 0.03 \text{ mm}^3$ , congelé très rapidement à  $-180 \text{ }^\circ\text{C}$ , ont été recueillies au Synchrotron Soleil. Le cristal a l'aspect d'une petite pyramide avec une symétrie de groupe spatial orthorhombique  $\text{P2}_1\text{2}_1\text{2}$  ( $a = 87.97 \text{ \AA}$ ,  $b = 107.86 \text{ \AA}$ ,  $c = 44.03 \text{ \AA}$ ). Le fichier de données concernant cette structure a été déposé à la Protein Data Bank sous le code **5NW7**.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. CaPMI-5PAHz : première structure cristalline de CaPMI avec un inhibiteur au site actif

Aucun des composés synthétisés au cours de ce travail n'étant un bon inhibiteur de CaPMI, nous avons choisi de déterminer sa structure cristallographique 3D avec un inhibiteur déjà connu. Le 5PAH est le meilleur inhibiteur connu des PMI<sup>161</sup> et notamment de CaPMI avec un  $K_i$  de  $0.11 \pm 0.05 \mu\text{M}$  et un rapport  $K_m/K_i = 1181$ . Des tentatives de co-cristallisation de ce dernier avec l'enzyme ont été effectuées mais n'ont pas abouti à la structure cristalline du complexe. Ce résultat n'est pas très surprenant étant donné que l'inhibiteur est connu pour s'hydrolyser rapidement pour donner le 5PAA, un très mauvais inhibiteur de l'enzyme. D'autre part, nous avons pu observer que la protéine seule cristallise assez mal, ce qui ne nous a pas permis de tenter la méthode dite de trempage. C'est la raison pour laquelle nous avons anticipé, dès le début de ce travail, de co-cristalliser la protéine et le 5PAHz, un excellent inhibiteur stable de l'enzyme. Cette tentative a mené avec grand succès à la première structure tridimensionnelle de l'enzyme contenant un ligand au site actif et à une excellente résolution (1.8 Å).

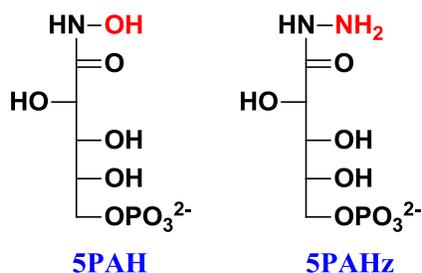


Schéma 39. Structures du 5PAH et du 5PAHz. Les groupements distincts sont marqués en rouge.

Le 5PAHz,<sup>53</sup> comme mentionné dans l'introduction, est un fort inhibiteur compétitif de l'enzyme. L'évaluation cinétique du composé pour la première fois sur CaPMI a donné un  $K_i$  de l'ordre de  $1.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$  avec un rapport  $K_m/K_i = 76$  (en accord avec les valeurs obtenues précédemment sur d'autres PMI<sup>53</sup>), soit 76 fois plus affiné pour l'enzyme que son substrat. En effet, les atomes O1, C1, N1 et N2 de sa partie tête sont coplanaires *ce qui permet de mimer au*

mieux le plan dans lequel est inscrit la fonction 1,2-cis-ènediol(ate) de l'intermédiaire de haute énergie impliqué dans la réaction catalysée par l'enzyme (Schéma 40).

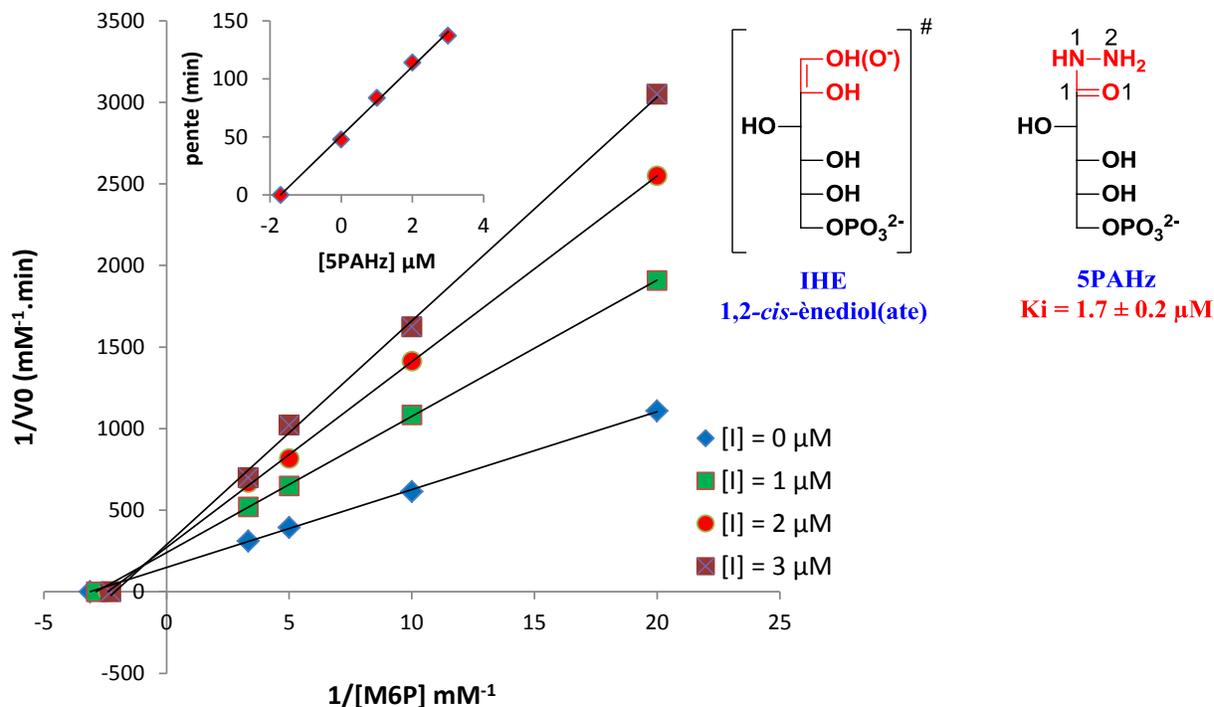


Schéma 40. Détermination graphique de la constante d'inhibition  $K_i$  du 5PAHz vs. CaPMI selon Lineweaver-Burk.

La structure cristalline de la PMI de *Candida albicans* complexée au 5-phospho-D-arabinonhydrazide (5PAHz) a été obtenue et résolue à 1.8 Å.

Excepté des études de modélisation moléculaire<sup>53,54</sup> et la structure X de l'enzyme native (code pdb : 1PMI)<sup>27</sup>, aucune structure d'une CaPMI avec un substrat ou un inhibiteur au site actif n'a été publiée à ce jour. Le complexe CaPMI-5PAHz représente ainsi la première structure cristalline à haute résolution de l'enzyme complexée à un inhibiteur. Les coordonnées de la structure ont été déposées à la PDB (code 5NW7) et un article en cours de rédaction sera soumis à *J. Mol. Biol.*). La carte de densité électronique obtenue est en accord avec la présence de la structure complète de l'inhibiteur où on observe bien une densité correspondant à tous les atomes de 5PAHz (Figure 36). Ce complexe à haute résolution (1.8 Å) répondra sans doute à plusieurs questions actuellement sans réponse, notamment concernant le rôle précis des différents acides

aminés impliqués dans la fixation du ligand, les mouvements de la protéine engendrés par la fixation du ligand, la validation du concept de l'intermédiaire de haute énergie ligandé par le zinc, mais surtout et le plus important, la possibilité d'identifier la base catalytique responsable du transfert de proton entre les deux carbones C1 et C2, jamais identifiée à ce jour.

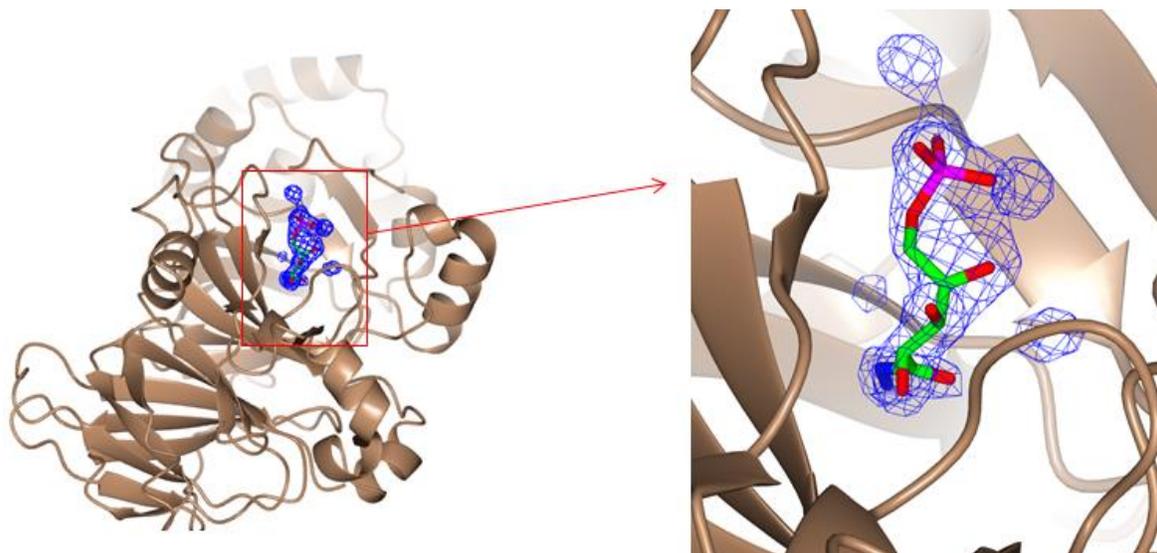


Figure 36. Structure du complexe CaPMI-5PAHz (code pdb : 5nw7) montrant la densité électronique autour du ligand « 5PAHz ».

## **2.2. Structure générale de CaPMI :**

La structure générale de l'enzyme dans le complexe CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7) est tout à fait semblable à celle décrite par Cleasby et al. pour l'enzyme seule (PDB 1PMI).<sup>27</sup> La structure monomérique est formée de 3 domaines principaux (Figure 37) : le domaine hélicoïdal formé par les résidus 153-265, le domaine C-terminal constitué de feuillets  $\beta$  antiparallèles et formé majoritairement par des résidus du côté C-terminal (2-10 et 333-441) et le domaine catalytique central constitué par les résidus 11-152 et 266-332. Ce dernier forme une sorte de crevasse profonde de dimensions suffisantes pour contenir le 5PAHz et l'atome de zinc.

En plus des acides aminés précédemment décrits, d'autres résidus importants impliqués dans la fixation du ligand sont identifiés tels que l'Asp300, la Thr308, la Tyr16 et le Trp18. Les différents résidus constituant le site actif ainsi que les molécules d'eau contenues dans cette poche catalytique sont représentés dans la figure 37.

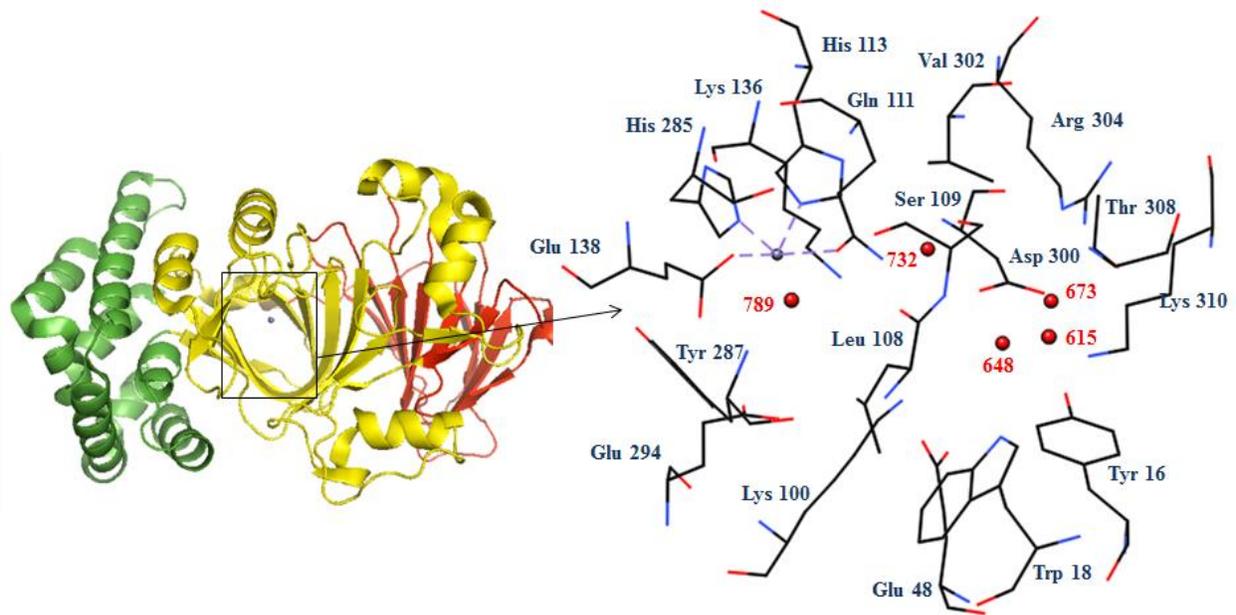


Figure 37. Structure générale de CaPMI-5PAHz (5nw7) avec les différents résidus du site actif (l'inhibiteur n'est pas représenté par souci de clarté). On distingue trois domaines, le domaine hélicoïdal (en vert), le domaine C-terminal (en rouge) et le domaine catalytique contenant le ligand et l'atome de zinc au centre (en jaune). Les résidus du site actif sont représentés à droite de la figure : le zinc en gris et les molécules d'eau en rouge.

Afin de montrer, entre autre, les mouvements des ligands du zinc et des résidus du site actif engendrés par la fixation de l'inhibiteur, la superposition des deux structures, celles de la protéine native CaPMI seule (1PMI) et du complexe CaPMI-5PAHz (5NW7), a été réalisée.

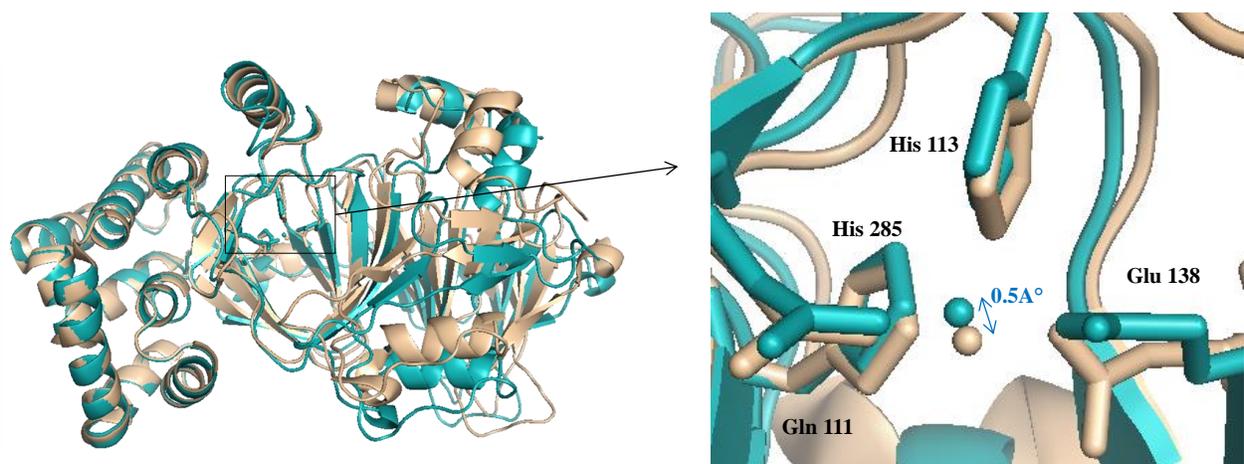


Figure 38. Image globale de la superposition de CaPMI (1PMI, en bleu) et du complexe CaPMI-5PAHz (5NW7, en doré). Le zoom à droite de la figure montre la superposition des ligands du zinc.

Pour cela, le domaine hélicoïdal a été pris comme référence. Ce dernier formé par les résidus 153-265 ne contient aucun résidu appartenant au site actif, ce qui donne une vue précise et pertinente des mouvements de la protéine après fixation du ligand, surtout au niveau du site actif qui est formé à la fois par des résidus des deux côtés C et N-terminaux. 452 atomes sont alignés au total et un rmsd (Root Mean Square Deviation ou racine carré de la moyenne des carrés des déviations) de 0.188 est obtenu. La superposition montre des mouvements importants au niveau des domaines catalytique et C-terminal (Figure 38).

Comme le montre la figure 39, des déplacements remarquables concernent de façon plus ou moins prononcée tous les acides aminés du site catalytique. Ces mouvements seront décrits et analysés en détail dans la suite de ce chapitre.

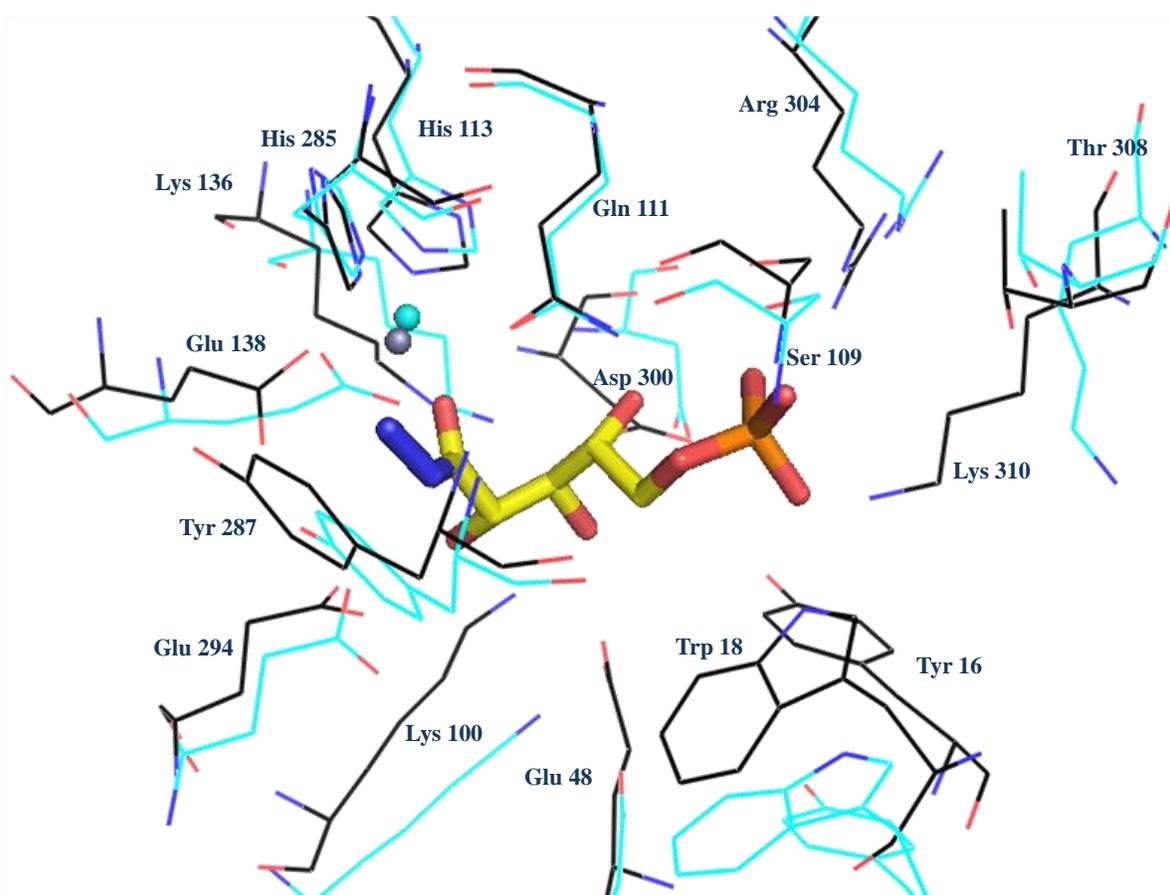


Figure 39. Mouvements des résidus du site de CaPMI engendrés par la fixation du 5PAHz (CaPMI en cyan et CaPMI-5PAHz en noir).

### 2.3. Interaction enzyme-inhibiteur

Un réseau étendu et complexe de liaisons lie l'inhibiteur aux différents acides aminés et molécules d'eau constituant la poche catalytique, expliquant d'une part, la stricte spécificité de l'enzyme pour ses substrats, et d'autre part, le fort pouvoir inhibiteur du 5PAHz.

La figure 40 montre une vue globale de toutes les interactions possibles de l'inhibiteur avec l'enzyme. Les paragraphes suivants décrivent séparément la sphère de coordination du zinc, les interactions impliquées dans l'ancrage du groupement phosphate et le reste des interactions mettant surtout en jeu la base catalytique.

*Remarque : Dans les figures présentées dans ce chapitre, les traits en pointillés rose indiquent les liaisons électrostatiques détectées (liaisons H). Les traits pointillés gris indiquent les liaisons entre le zinc et ses ligands (avec les distances en Å).*

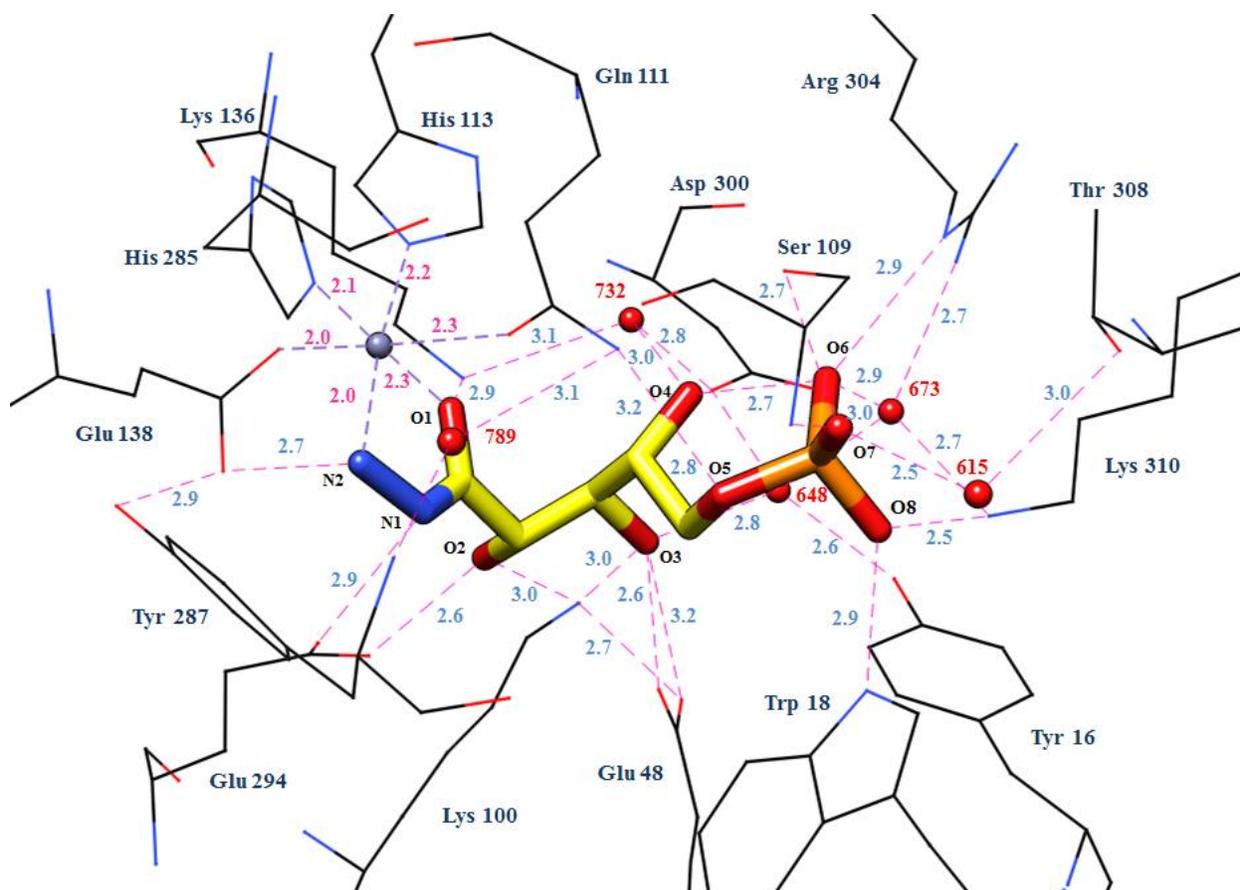


Figure 40. Ensemble des interactions au site actif du complexe 5PAHz-CaPMI (PDB 5NW7).

### 2.3.1. Le site de coordination du zinc

Le zinc est hexacoordiné et adopte une géométrie octaédrique. On retrouve les mêmes acides aminés ligands du zinc que ceux décrits pour l'enzyme native (1PMI)<sup>27</sup> incluant les His285 (2.1 Å) et His113 (2.2 Å), le Glu138 (2.0 Å) et la Gln111 (2.3 Å). La molécule d'eau HOH797 ligand du zinc pour CaPMI native (1PMI) n'existe plus ici. Le 5<sup>ème</sup> ligand du zinc est cette-fois-ci le 5PAHz qui le coordine par l'oxygène O1 (2.1 Å) et l'azote N2 (2.0 Å) de sa fonction hydrazide (Figure 41). Bien que le zinc adopte préférentiellement une géométrie tétraédrique dans les métalloprotéines, une pentacoordination est cependant possible et plus rarement une hexacoordination.<sup>193,194</sup> En effet, d'après la structure rapportée par Cleasby et al. (1PMI)<sup>27</sup>, une coordination du zinc par le second oxygène du Glu138, bien que relativement éloigné (2.9 Å), est envisageable. Une géométrie octaédrique du métal pourrait alors être considérée dans la structure 1PMI. La même géométrie est également obtenue dans notre structure 5NW7.

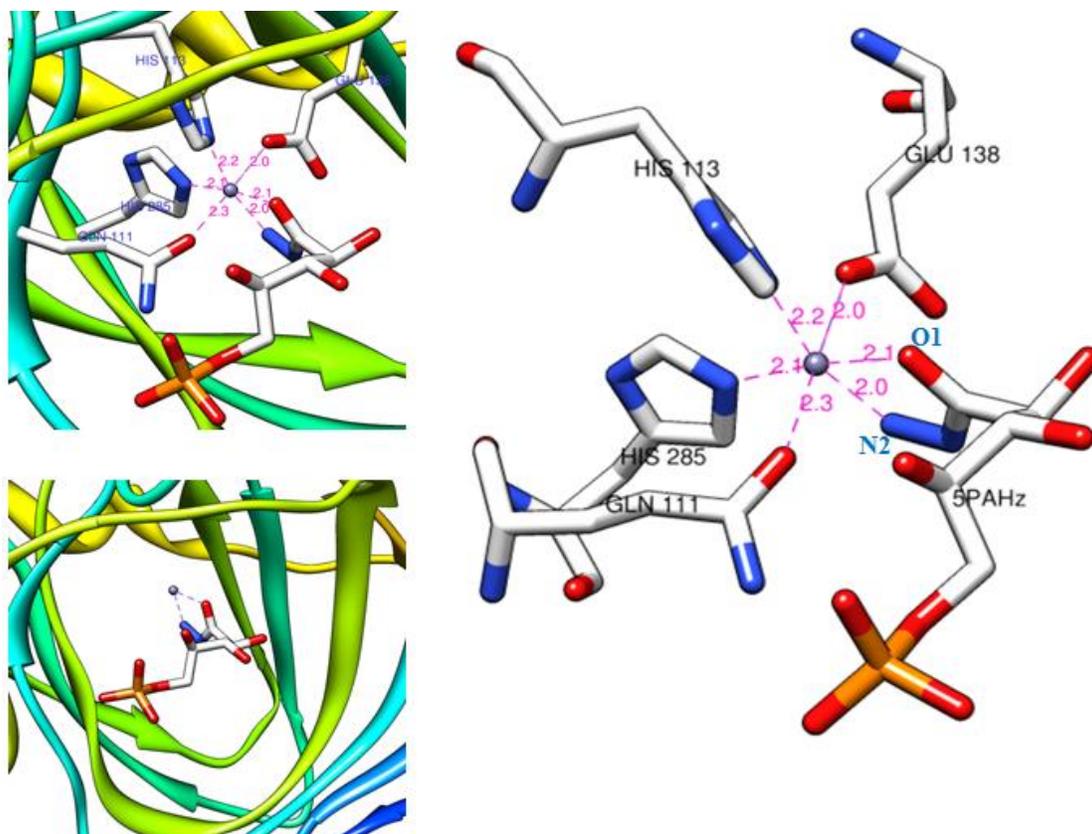


Figure 41. Les ligands du zinc dans le complexe CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7). Le 5PAHz coordine le zinc selon le mode bidentate.

Une coordination de type bidentate pour le 5PAHz est ainsi démontrée et valide le concept de l'existence d'un intermédiaire de haute énergie stabilisé par coordination au zinc via les deux oxygènes de la fonction 1,2-*cis*-ènediol(ate). Le rôle catalytique du zinc est bien illustré : en polarisant la liaison carbonyle du substrat (M6P ou F6P), le zinc facilite la déprotonation de l'hydrogène en alpha du carbonyle par la base catalytique. Cette déprotonation conduit à la formation de l'IHE de type « 1,2-*cis*-ènediolate », lui-même stabilisé par interaction bidentate avec le zinc (Schéma 41).

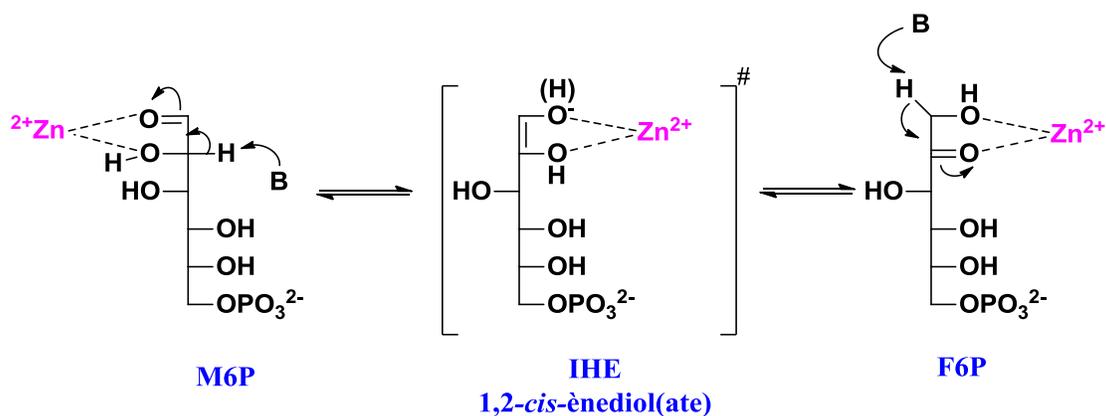


Schéma 41. Rôle catalytique du zinc dans la réaction catalysée par CaPMI via son interaction bidentate avec les substrats de l'enzyme et l'IHE.

La superposition structurale de CaPMI (PDB 1PMI)<sup>27</sup> et de CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7) montre une très bonne coïncidence des ligands du zinc (His285, His113 et Gln111). Cependant, une observation importante peut être notée pour le Glu138 : une fois l'inhibiteur fixé, le groupe carboxylate du Glu138 change d'orientation (Figure 42). D'après la structure du site de coordination du zinc de CaPMI seule (1PMI) montrée dans la figure 42, le Glu138 s'oriente de manière à coordonner le zinc par ses deux atomes d'oxygènes. Une fois le 5PAHz logé dans le site actif, le Glu138 change de positionnement permettant à l'un de ses oxygènes, se situant à 2.9 Å du zinc dans la protéine native, d'entrer en interaction avec l'azote N2 (du NH<sub>2</sub>) de l'inhibiteur à une distance de 2.7 Å.

Le départ de la molécule d'eau HOH797 ligand du zinc dans la structure 1PMI est un autre point remarquable. D'après la superposition effectuée sur la figure 42, cette molécule d'eau se superpose quasiment avec le groupement NH<sub>2</sub> du 5PAHz : une fois ce dernier fixé au zinc, il

déplace la molécule d'eau pour prendre sa place (Figure 42). Cette caractéristique a déjà été rapportée pour d'autres protéines à zinc où l'un des sites de coordination du métal est occupé par une molécule d'eau, déplacée par le substrat entrant pour initier la catalyse.<sup>194</sup>

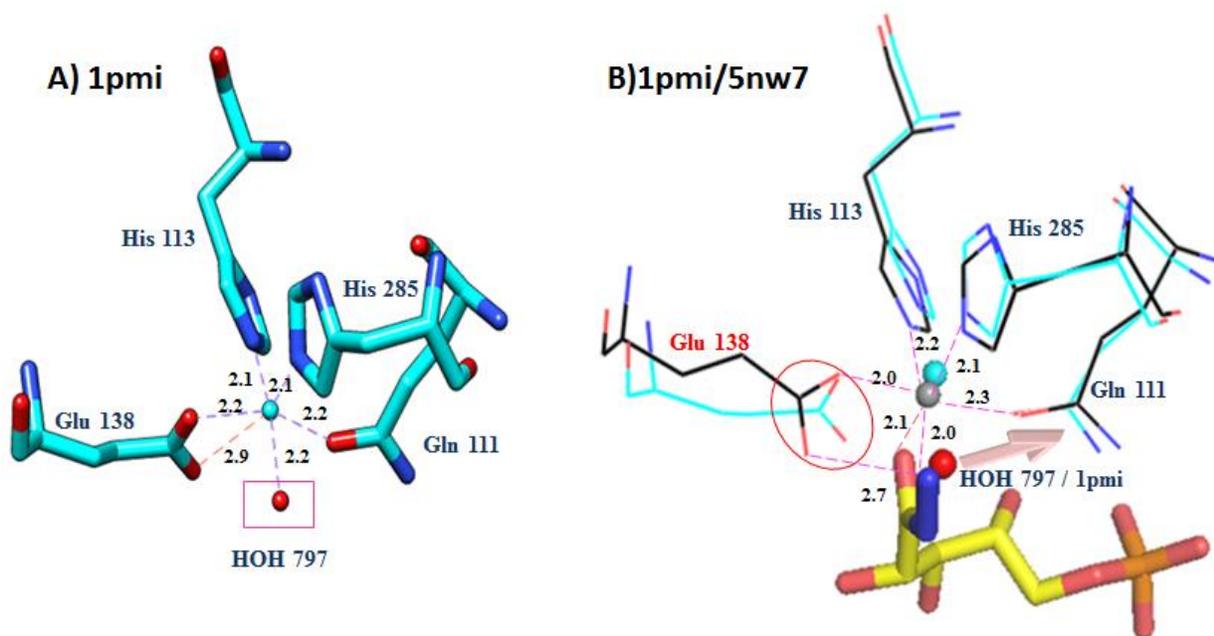


Figure 42. A) Sphère de coordination du zinc dans CaPMI seule (1pmi)<sup>27</sup>. B) Superposition des ligands du zinc de CaPMI seule (1pmi, en bleu) et du complexe CaPMI-5PAHz (5nw7, en noir).

### 2.3.2. Site de fixation du groupe phosphate de 5PAHz

Le groupement phosphate de l'inhibiteur 5PAHz forme un réseau complexe de liaisons au site actif de l'enzyme. La structure obtenue confirme les hypothèses énoncées par Cleasby et al. concernant le rôle probable que peut jouer l'Arg304 dans la fixation du phosphate. Nos résultats sont également en désaccord avec ceux rapportés par Sagurthi et al. qui avaient complètement écarté ce résidu lors de leur étude structurale du complexe de la PMI de *S. typhimurium* avec le F6P.<sup>42</sup> Notre structure résolue à 1.8 Å montre que l'Arg304 participe clairement à l'ancrage de la partie phosphate en interagissant non seulement directement avec lui, mais aussi via la molécule d'eau 673 avec l'oxygène O7 de ce dernier (Figure 43). Le groupe phosphate du 5PAHz est en interaction avec 7 autres résidus : Tyr16, Trp18, Asp300, Lys310, Thr 308, Ser109 et Gln111. Ces résidus participent d'une manière directe ou indirecte via un réseau de molécules d'eau à l'amarrage du phosphate. Parmi ces résidus, la Gln 111, la Ser109 et le Trp18 sont

particulièrement intéressants car ils interagissent directement avec le phosphate. La Ser109 est engagée dans deux liaisons hydrogène avec l'oxygène O6 du phosphate via ses deux groupements hydroxyle et amine. Le Trp18 est quant à lui en interaction directe via son groupe NH avec l'oxygène O8 : ce résidu, qui ne figure pas parmi les résidus du site actif cités dans la publication de Cleasby et al., semble avoir un rôle important dans la fixation du ligand. La Gln111 qui, en plus d'être un ligand du zinc via son groupe carbonyle, participe à l'ancrage du phosphate en interagissant avec l'oxygène O5 de celui-ci (la molécule d'eau 789 lie également la Gln111 et la Tyr287). La présence d'une glutamine dans la sphère de coordination du zinc étant inhabituelle dans les métalloenzymes à zinc, ceci suggère un rôle important pour ce résidu dans la fixation du substrat en plus d'une simple coordination du métal, ce que nous démontrons dans notre étude.

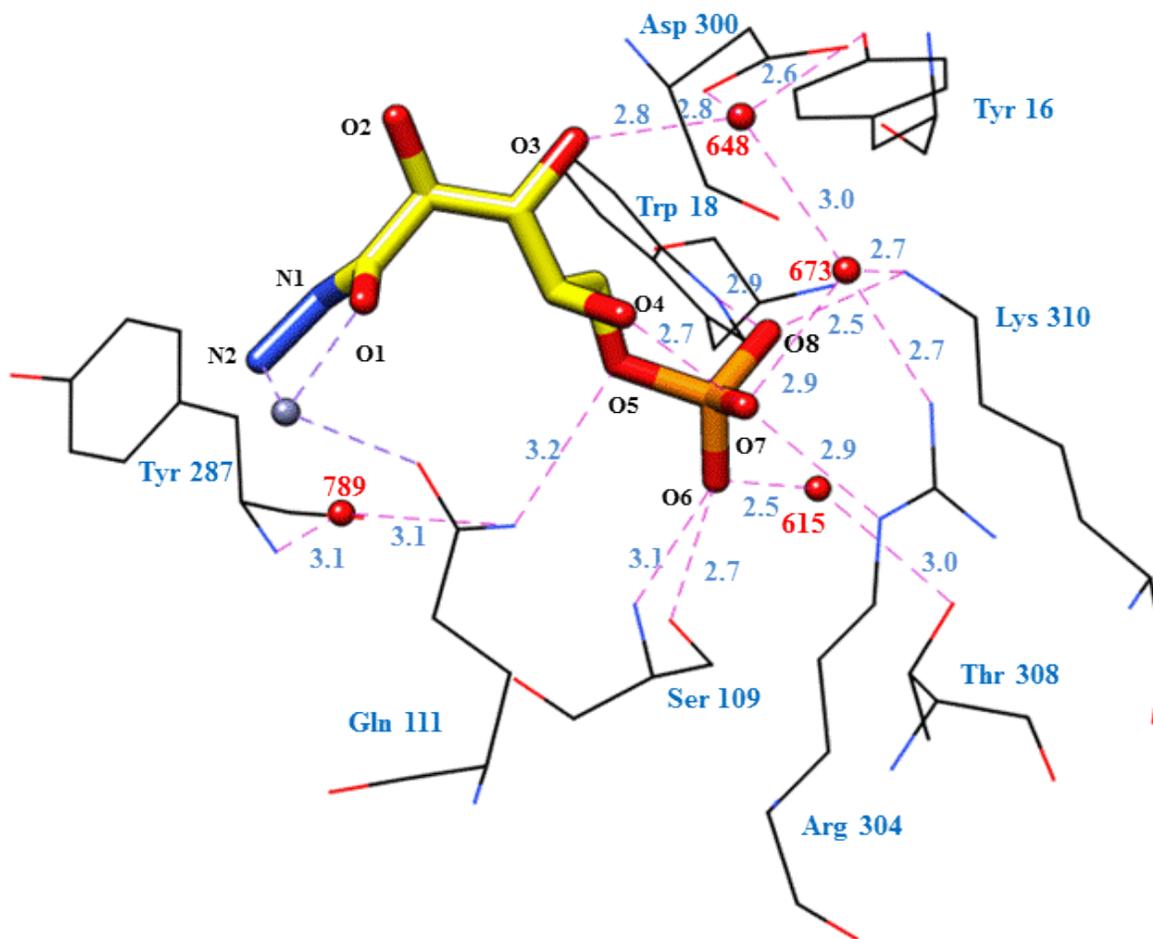


Figure 43. Site de fixation du groupement phosphate.

Une interaction intramoléculaire (2.7 Å) entre l'hydroxyle O4H et l'oxygène O7 du phosphate est à noter. Cette observation est en accord avec l'étude de modélisation moléculaire menée sur le complexe CaPMI-5PAH.<sup>53</sup>

De l'autre côté, un rôle crucial est attribué aux molécules d'eau 615, 648 et 673 qui constituent un lien entre le phosphate et les autres résidus. La molécule d'eau 615 connecte la Thr308 à l'oxygène O6 du phosphate. L'Asp300 et la Tyr16 sont liés à l'oxygène O7 via les deux molécules d'eau 648 et 673 successivement. Cette dernière lie aussi la Lys310 et l'Arg304 à ce même oxygène. La molécule d'eau 648 lie également l'Asp300 et la Tyr16 à l'hydroxyle O3H de de l'inhibiteur.

Ce réseau complexe met en évidence le rôle crucial de l'ancrage du phosphate au site actif. En effet, la présence d'une fonction chélatante du zinc (hydrazide dans le cas du 5PAHz) et des hydroxyles dans le squelette de l'inhibiteur ne suffit pas à assurer une bonne affinité de celui-ci pour l'enzyme. La présence du groupement phosphate est indispensable pour mimer au mieux le substrat ou l'IHE et avoir une bonne inhibition de la PMI. Notre structure permet ainsi d'expliquer les résultats obtenus avec l'acide D-arabinonohydroxamique (DAH, Schéma 42), l'analogie non phosphorylé du 5PAH, qui a montré une très mauvaise inhibition de l'enzyme avec une IC50 de l'ordre de 10 mM sur la PMI d'*E. coli* (thèse de Johanna Foret, 2009).

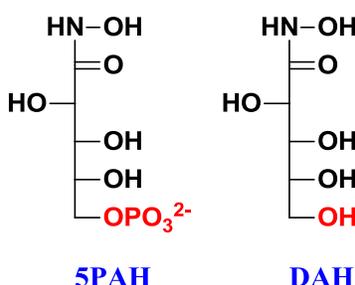


Schéma 42. Structure du DAH, mime non phosphorylé du 5PAH.

Des déplacements importants au niveau des ligands du phosphate sont observés lors de la fixation de 5PAHz (Figure 44). Ceux-ci sont particulièrement remarquables pour la Lys310 (5.0 Å), le Trp18 (2.9 Å) et l'Arg 304 (1.9 Å) qui interagissent directement avec le phosphate, de

même que pour la Tyr16 (4.7 Å) et l'Asp300 (2.7 Å) qui interagissent indirectement via les molécules d'eau 648 et 673 avec celui-ci. Ces dernières sont également en interaction avec l'hydroxyle porté par le carbone 3 de l'inhibiteur. Le déplacement de la Gln111 est relativement faible (0.9 Å), ce qui peut être expliqué par le fait que ce résidu est un ligand du zinc. Tous ces mouvements montrent l'importance du groupement phosphate dans la fixation de l'inhibiteur au sein du site actif de l'enzyme et donc dans la stabilisation de l'IHE (ou de l'état de transition) pour la catalyse de la réaction.

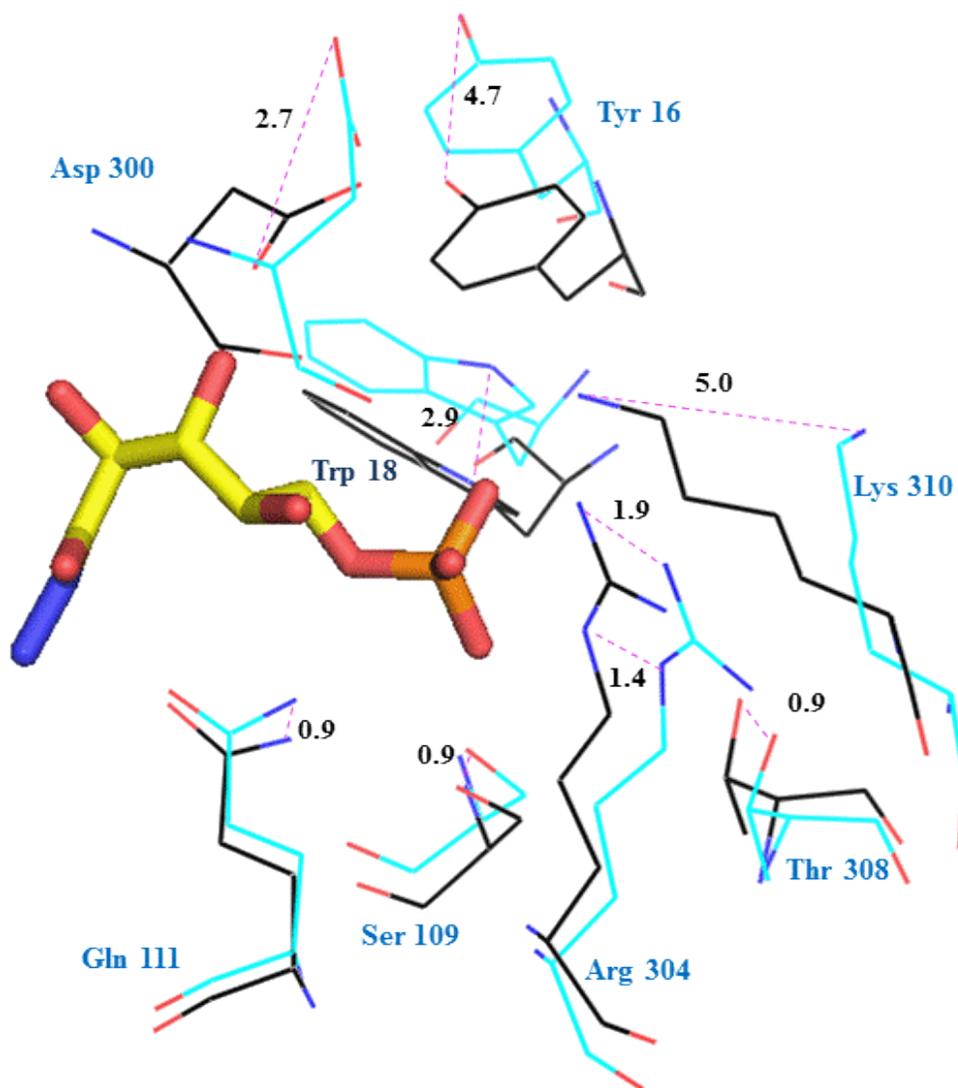


Figure 44. Mouvements au niveau des ligands du phosphate engendrés par la fixation de 5PAHz : CaPMI (PDB 1PMI) en cyan et CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7) en noir. Les traits pointillés rose indiquent les déplacements des résidus ligands du phosphate (distances en Å).

### 2.3.3. Identification de la base catalytique

Outre la coordination bidentate du zinc par la fonction hydrazide et les interactions mises en jeu dans l'ancrage du phosphate, d'autres résidus intéressants sont impliqués dans la fixation de la partie apicale et du squelette polyhydroxylé de l'inhibiteur 5PAHz au site actif de CaPMI. Ces interactions importantes nous ont amené à identifier, pour la première fois, la nature de la base catalytique impliquée dans le mécanisme de transfert du proton entre les carbones C1 et C2 des substrats F6P/M6P de la réaction catalysée par la PMI et qui demeurait inconnue jusqu'à ce jour (Figure 45).

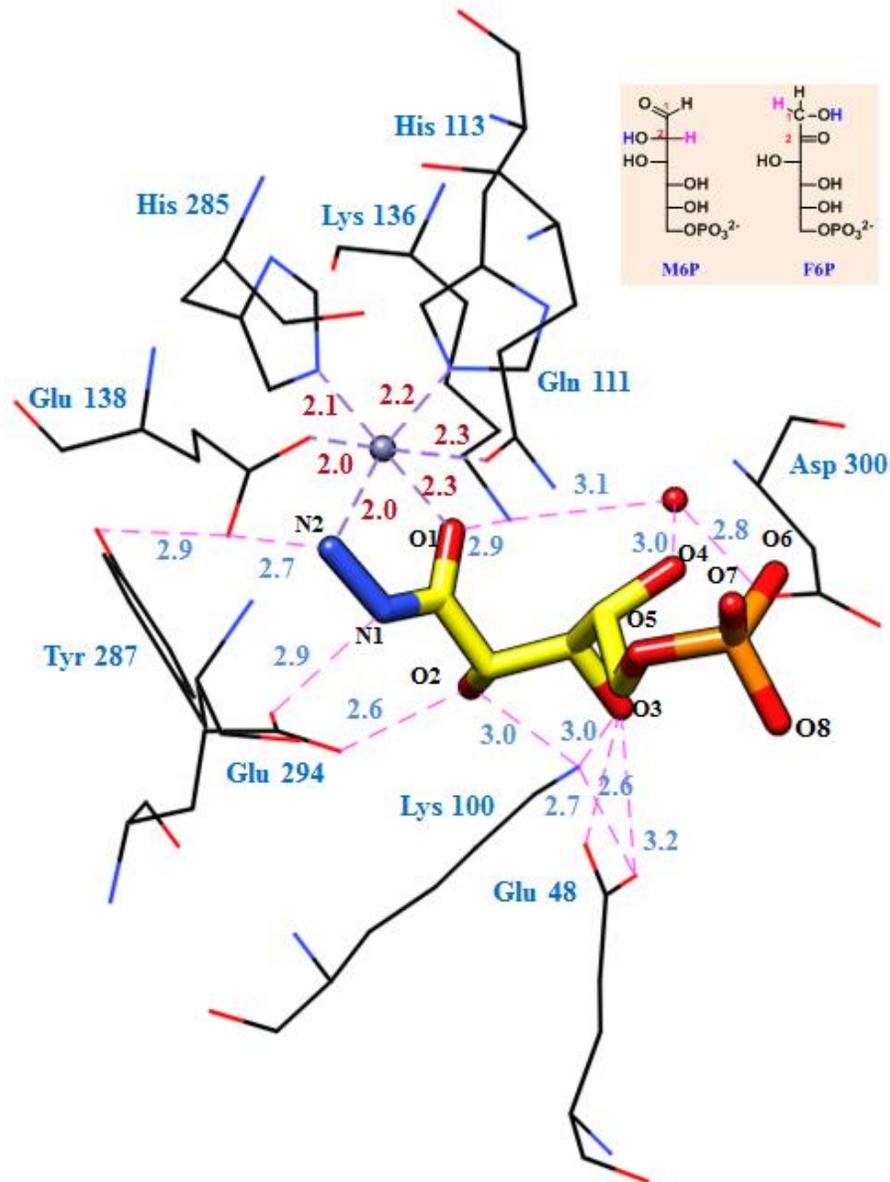


Figure 45. Site de fixation du squelette polyhydroxylé et de la partie tête de l'inhibiteur.

En plus d'être un ligand du zinc, le Glu138 est en interaction, d'une part, avec l'azote N2 de la fonction hydrazide, et d'autre part, avec la Tyr287. Étant ligand du zinc, ce résidu est trop peu basique pour pouvoir arracher le proton en alpha du groupe carbonyle du substrat. La Lys100 est liée, quant à elle, d'une part avec les deux oxygènes O3 et O2 de 5PAHz, et d'autre part, avec le Glu48 qui établit deux liaisons additionnelles avec l'oxygène O3. Les résidus Lys100 et Glu48, par ailleurs mal positionnés pour arracher le proton des carbones C1 et C2 des substrats F6P/M6P, sont donc de mauvais candidats pour jouer le rôle de base catalytique.

D'après la structure du complexe CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7) que nous rapportons, le résidu Glu294 apparaît clairement comme étant la base impliquée dans le transfert de proton entre les carbones C1 et C2 du substrat (Figure 45). En plus d'interagir avec l'hydroxyle O2H, le Glu294 est le seul résidu correctement orienté pour interagir avec l'azote N1 de l'inhibiteur correspondant au carbone C1 du F6P (2.9 Å, Figure 45). Finalement, la Lys136, proposée par Roux et al. comme base catalytique potentielle d'après les études de modélisation moléculaire effectuées sur les complexes CaPMI-5PAH et CaPMI-M6P,<sup>53</sup> est ici en interaction avec l'oxygène du carbonyle de 5PAHz, et également avec l'oxygène O4 et l'Asp300 via la molécule d'eau 732.

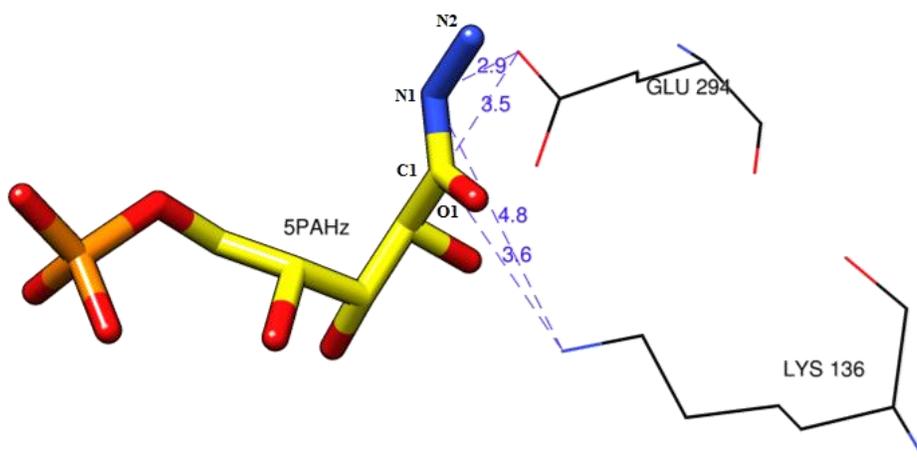


Figure 46. Comparaison des distances séparant la Lys136 et le Glu294 de l'azote N1 et du carbone C1 du 5PAHz.

La Lys136 apparaît donc comme un bon candidat pour jouer un rôle dans la stabilisation de l'IHE 1,2-*cis*-ènediol(ate) formé plutôt que le rôle de base catalytique pour lequel le Glu294 est le seul candidat à nos yeux. En effet, les distances entre l'azote de la Lys136 et les atomes N1 et

C1 de 5PAHz (correspondant respectivement aux atomes C1 et C2 du F6P et du M6P) sont respectivement de 4.8 et 3.6 Å et donc nettement supérieures aux distances correspondantes avec l'oxygène du Glu294 (2.9 et 3.5 Å) qui est bien placé et parfaitement orienté pour arracher le proton du CH en alpha du C=O du substrat (Figure 46).

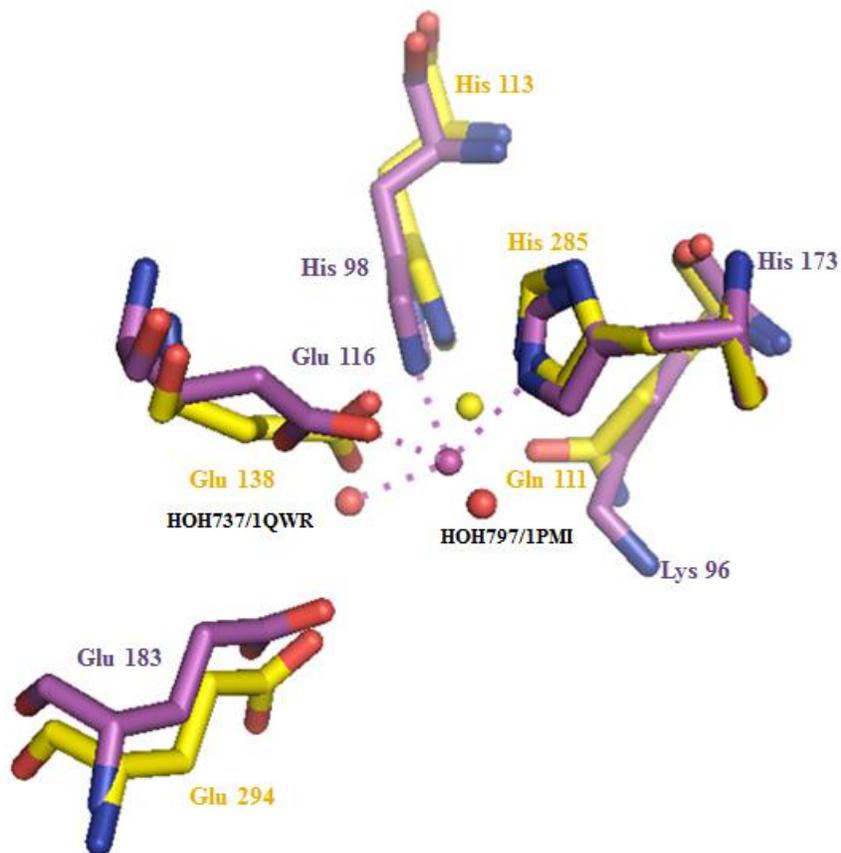


Figure 47. Superposition des structures de CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7) et de BsPMI-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (PDB 1QWR).

Ajoutons le fait que l'alignement de séquences des PMIs de type I présenté dans l'introduction, montre que le résidu Glu294 est bien conservé à travers toutes les PMIs à l'exception de *Bacillus subtilis*. Il est cependant important de noter que la séquence de cette dernière ne comprend que 316 acides aminés, ce qui fausse l'alignement avec la PMI de *Candida albicans* constituée de 441 acides aminés. Pour confirmer ainsi notre observation, il nous apparaît utile de superposer les deux structures, celle de la PMI de *C. albicans* (1PMI) et celle de *Bacillus subtilis* (1QWR) sur la Figure 47. La structure de cette dernière, déposée à la pdb sans aucune publication associée, ne contient que fortuitement un ion sulfate au site actif ainsi que d'autres ions à d'autres

endroits de la protéine. C'est la raison pour laquelle les histidines ligands du zinc qui, *a priori*, ne devraient pas bouger après la fixation de l'ion sulfate, ont été prises comme référence pour faire l'alignement. La superposition structurale a montré effectivement la présence d'un résidu glutamate (Glu173) au même endroit que le Glu294 confirmant ainsi notre hypothèse.

De même que pour les ligands du phosphate, tous les résidus fixant la partie apicale et le squelette polyhydroxylé de l'inhibiteur subissent également des mouvements importants après la fixation du ligand (Figure 48). Ces mouvements sont particulièrement remarquables pour le Glu48 (3.2 Å), la Lys100 (2.7 Å), suivis par le Glu294 (1.2 Å) et la Lys136 (1.4 Å). Quant au Glu138, ce résidu et comme nous l'avons déjà mentionné, change complètement d'orientation pour entrer en interaction avec le groupe NH<sub>2</sub> de l'inhibiteur. La Tyr287, qui dans la protéine native est située à 4.1 Å du Glu138, se déplace de 3 Å pour former une liaison hydrogène avec ce dernier (2.9 Å).

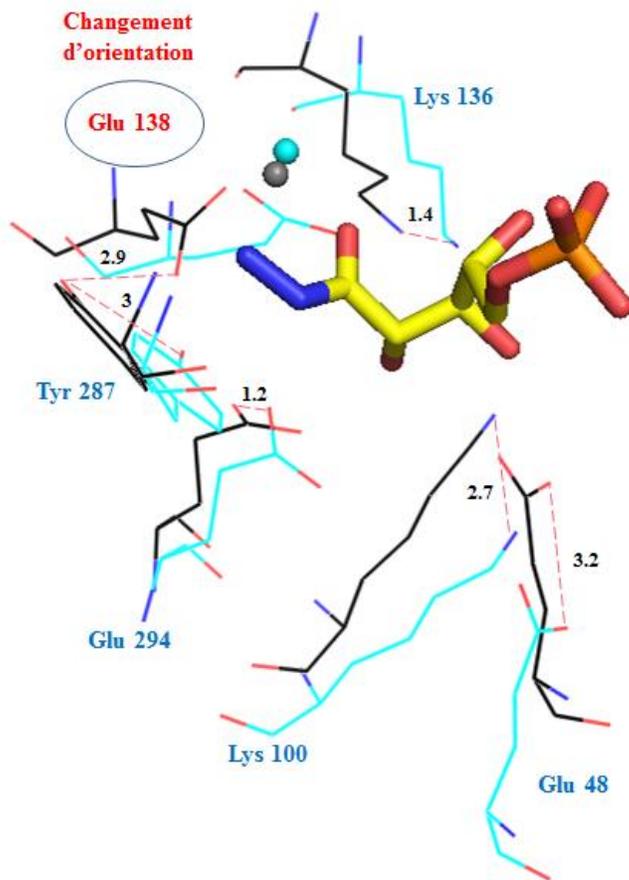


Figure 48. Mouvements au niveau des ligands de la partie tête et du squelette polhydroxylé (CaPMI en cyan et CaPMI-5PAHz en noir). Les traits en pointillés rose indiquent les déplacements des résidus (distances en Å).

## 2.4. Mécanisme de la réaction catalysée par les PMI de type I : catalyse acido-basique mettant en jeu le Glu294

D'après la structure du complexe CaPMI-5PAHz précédemment détaillée, l'isomérisation réversible du M6P en F6P peut être décrit selon le mécanisme présenté dans le Schéma 43. Il est cependant difficile de conclure quant à l'étape d'ouverture du cycle du substrat qui nécessiterait d'obtenir la structure 3D du complexe de l'enzyme avec un de ses deux substrat, le  $\beta$ -D-fructofuranose ( $\beta$ -F6P) ou le  $\beta$ -D-mannopyranose ( $\beta$ -M6P). Par conséquent, l'étape d'ouverture cyclique ne sera pas discuté par manque d'informations suffisantes. Seul le mécanisme détaillé de l'étape d'isomérisation proprement dite est rapporté.

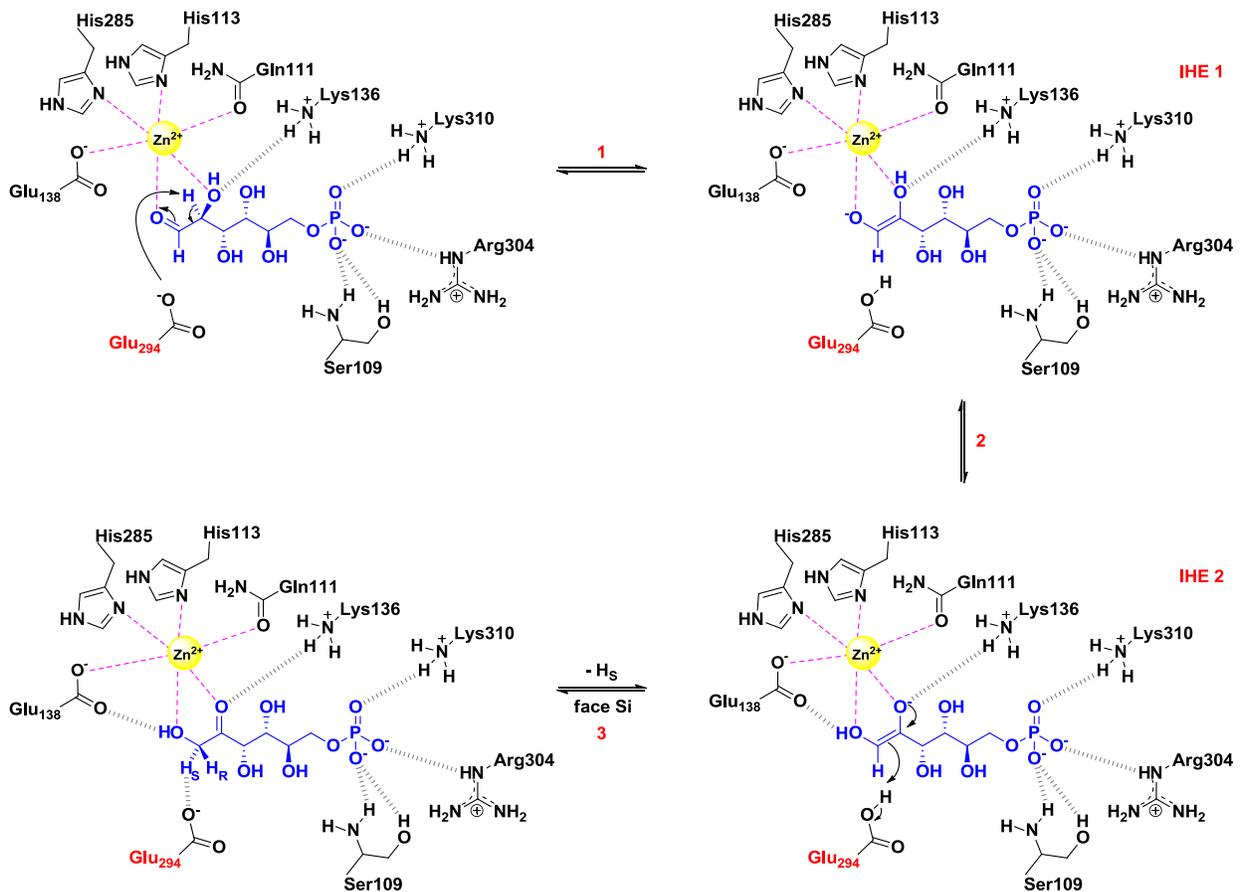


Schéma 43. Mécanisme de l'isomérisation M6P-F6P catalysée par la PMI de *C. albicans*.

Comme montré précédemment, le zinc est coordonné de façon bidentate par les deux oxygènes O1 et O2 du M6P (Schéma 43). En polarisant la liaison C=O de celui-ci, le zinc facilite la déprotonation de l'hydrogène en alpha du carbonyle par le Glu294. Cette déprotonation conduit à la formation du premier IHE de type « 1,2-*cis*-ènediolate », lui-même stabilisé par interaction bidentate avec le zinc et par interaction avec la Lys136 (étape **1**). Le passage du premier IHE au deuxième IHE de type 1,2-*cis*-ènediolate a lieu dans l'étape **2**, soit par prototropie entre les deux oxygènes, soit *via* une molécule d'eau ou un résidu du site actif, la Lys136 pouvant potentiellement jouer ce rôle vu son interaction avec l'oxygène porté par le carbone C2. Le deuxième IHE est ensuite reprotoné par le Glu294 en position proS sur le C1 (face Si) pour conduire au F6P sous sa forme linéaire (étape **3**).

Il est important de noter que la protonation de l'IHE sur la face Re est impossible du fait de la coordination bidentate de la fonction ènediol(ate) au zinc qui empêche toute rotation de la liaison C2-C3. De plus, aucune base catalytique potentielle ne se trouve du côté de la face Re. Dans la réaction inverse, l'isomérisation du F6P ne peut donc conduire qu'au M6P, pas au G6P. Le G6P n'est donc pas substrat de l'enzyme. Cette disposition explique aussi pourquoi la PMI ne possède pas d'activité C2-épimérase (M6P/G6P, rotation C2-C3 bloquée).<sup>195</sup> De même, la PMI est connue pour ne pas posséder d'activité anomérase ( $\alpha$ -M6P/ $\beta$ -M6P ou  $\alpha$ -F6P/ $\beta$ -F6P, rotation C1-C2 bloquée), contrairement à la PGI.<sup>195-198</sup> Ceci pourrait donc s'expliquer par le fait que la forme linéaire du M6P ou du F6P se coordonne au zinc par les atomes O1 et O2, empêchant toute rotation de la liaison C1-C2.

## **2.5. Conclusion**

La structure 3D du complexe CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7) obtenue par diffraction des rayons X nous a permis de mettre à jour plusieurs points déterminants du mécanisme de l'isomérisation réversible du M6P et du F6P catalysée par les PMI de type I, et notamment par la PMI de *C. albicans*. Cette étude a permis :

- 1- D'identifier l'ensemble des acides aminés du site actif de CaPMI et de définir le rôle précis de chacun d'entre eux dans la fixation de l'IHE (et par voie de conséquence des substrats linéaires) de l'enzyme. Un réseau très complexe de liaisons H est mis en jeu expliquant de ce fait la spécificité absolue de l'enzyme pour ses substrats. Un mouvement

important des résidus du site actif est également démontré. Cette dynamique de la protéine a pour conséquence de diminuer l'énergie d'activation de la réaction catalysée par la PMI de *C. albicans*.

- 2- D'expliquer la raison pour laquelle tous nos composés sont de mauvais inhibiteurs de l'enzyme : ceci est sans aucun doute dû à un gêne stérique et au fait que les atomes de la partie tête ne peuvent pas induire une coordination bidentate du zinc qui apparaît comme indispensable.
- 3- De démontrer le mode de coordination bidentate du zinc par le 5PAHz et probablement le 5PAH. Ceci a permis de déduire que les substrats linéaires M6P et F6P, comme les IHE, sont liés de façon bidentate au zinc. La fonction acide hydroxamique du 5PAH a apparemment un pouvoir coordinant plus fort que la fonction hydrazide du 5PAHz, faisant du premier un meilleur inhibiteur.
- 4- De montrer l'importance du groupement phosphate et de la stéréochimie du squelette polyhydroxylé (D-arabino) sur l'affinité des substrats pour l'enzyme.
- 5- **D'identifier la nature de la base catalytique impliquée dans le mécanisme de transfert du proton mis en jeu dans la réaction catalysée par les PMIs de type I, jamais rapportée dans la littérature jusqu'à ce jour.** Le fait que la base catalytique soit un résidu glutamate n'est pas du tout surprenant. En effet, d'autres enzymes de la famille des aldose-cétose isomérases comme la PGI et la TIM utilisent également un résidu glutamate comme base catalytique.
- 6- De montrer la spécificité de CaPMI (PMI de type I) pour le M6P vs G6P. Cette étude a permis également d'expliquer l'absence d'activité épimérase en C2 et d'activité anomérase (en C1) pour les PMI de type I. Ceci est dû à la coordination bidentate du zinc par les oxygènes O1 et O2 du substrat F6P/M6P, bloquant ainsi la rotation des liaisons C1-C2 et C2-C3. Finalement, cette étude structurale a démontré que c'est bien la face Si de l'IHE provenant du M6P qui est protonnée en C1 pour conduire au F6P sous sa forme linéaire avec introduction de l'hydrogène en position proS.

## B- STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE À HAUTE RÉSOLUTION DES COMPLEXES hPGI-5PAED ET hPGI-5PAA

### 1. Aspects expérimentaux

Bien qu'il ne soit pas un mime de l'IHE, le 5PAED (N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-aminoéthanamine / **dérivé éthylènediamine** / **11**) est un fort inhibiteur de la phosphoglucose isomérase humaine avec une constante d'inhibition compétitive de l'ordre de  $0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$  (Schéma 44). Comme décrit précédemment, ce composé a été conçu pour inhiber spécifiquement la PGI vis-à-vis de la PMI : l'hypothèse avancée était de cibler la base catalytique de l'enzyme (le Glu357) via l'amine terminale de l'inhibiteur qui sera protonée à pH physiologique. Il était ainsi intéressant d'obtenir sa structure 3D avec l'enzyme afin d'élucider son mode d'interaction au sein du site actif et notamment son comportement vis-à-vis du Glu357.

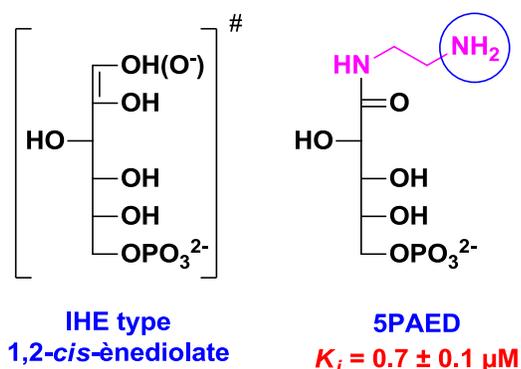


Schéma 44. Structures de l'IHE « 1,2-cis-enediol(ate) » et de 5PAED (**11**) ; valeur de sa constante d'inhibition vs. PGI humaine.

Toujours en collaboration avec l'équipe de FAAM à l'I2BC à orsay, nous avons réussi à obtenir la structure du complexe du 5PAED avec la PGI humaine (données cristallographiques : voir annexes paragraphe 4). Les cristaux ont été obtenus par la méthode de la diffusion de vapeur. Les gouttes suspendues (2  $\mu\text{L}$ ) étaient constituées d'un mélange en proportions égales d'une solution de protéine (8 mg/mL de PGI, 20 mM de tampon Tris (pH 7.5), 50 mM de NaCl, 10% glycérol et 5 mM 5PAED) et d'une solution réservoir (28-32% PEG 4000, 200 mM de  $\text{MgCl}_2$  et 100 mM de

tampon TRIS pH 8.5). Les gouttes ont été équilibrées avec 500  $\mu$ L de solution réservoir. Deux formes de cristaux ont été obtenues : des cristaux de forme cubique sont apparus au bout de 8 à 9 jours alors que d'autres cristaux ayant l'aspect de grosses baguettes sont apparus plus tard (17 jours) (Figure 49). Seules les baguettes ont diffracté correctement les rayons X. La diffraction de l'un de ces cristaux de dimensions de 0.18 x 0.18 x 1.25 mm<sup>3</sup> a généré la structure de notre complexe hPGI-5PAED à une résolution de 2.4 Å.

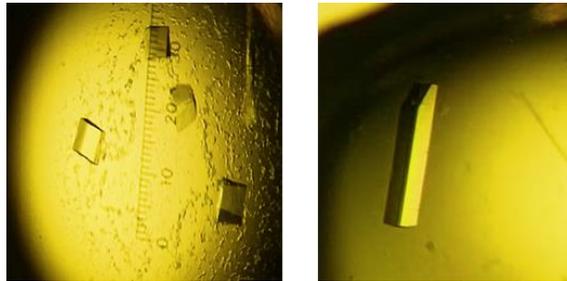


Figure 49. Cristaux de forme cubique (gauche) ou en forme de baguettes (droite) de la PGI humaine co-cristallisée avec le 5PAED.

## **2. Résultats et discussions**

### **2.1. Structure générale de la PGI humaine**

Le cristal obtenu par co-cristallisation de l'enzyme avec le 5PAED a la forme d'une grosse baguette multiple avec une symétrie de groupe spatial quadratique  $P4_3$  ( $a = 96.110$  Å,  $b = 96.110$  Å,  $c = 271.450$  Å). Chaque motif est constitué par un dimère de protéine et deux monomères (Figure 50). Les parties complémentaires de ces monomères se trouvent dans les motifs adjacents étant donné que la protéine n'est active que sous forme dimérique. L'ensemble de ces motifs constitue le réseau cristallin.

La structure générale de l'enzyme est tout à fait semblable à celle décrite dans la littérature (PDB 1IAT et 1IRI).<sup>98,100</sup> On retrouve bien une protéine sous forme dimérique. Chaque monomère, formé de 556 acides aminés, est constitué par un large et un petit domaine (Figure 51). Le grand domaine contenant l'extrémité N-terminale est formé par quatre feuillets  $\beta$  parallèles et deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles, entourés par des hélices  $\alpha$ . Le petit domaine est quant à lui formé par les résidus 115 à 288 : il est également constitué par 5 feuillets  $\beta$  parallèles entourés d'hélices  $\alpha$ . Un troisième domaine formé par les résidus 511-556 s'étend pour s'imbriquer avec l'autre

monomère. Le site actif est situé entre le côté C-terminal et le petit domaine : il ne peut être construit qu'avec l'histidine 388 de l'autre monomère.

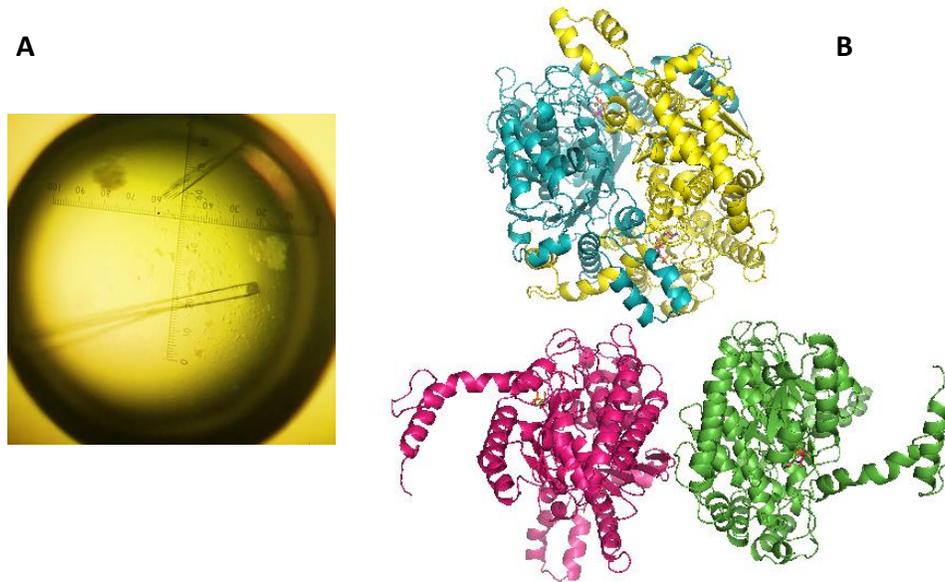


Figure 50. A) Goutte contenant le cristal du complexe hPGI-5PAED (11). B) Ensemble d'unités protéiques composant le motif cristallin.

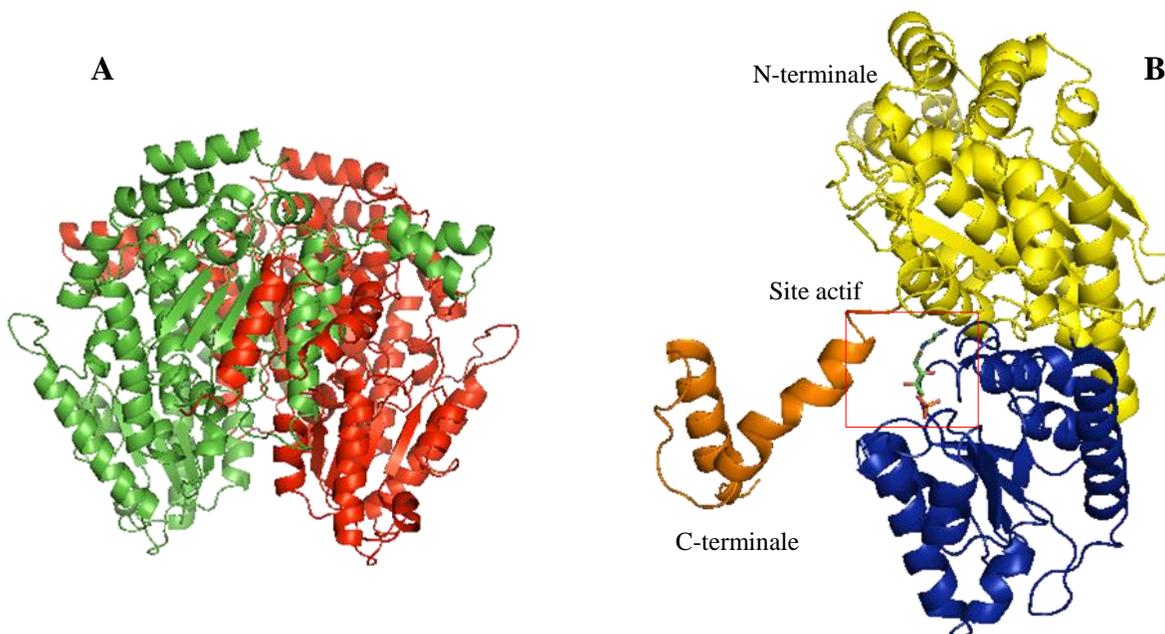


Figure 51. Structure générale de la phosphoglucose isomérase humaine (complexe hPGI-5PAED). (A) Structure d'un dimère de hPGI. (B) Structure d'un monomère de hPGI : on distingue trois domaines, le grand domaine (jaune), le petit domaine (bleu) et le domaine C-terminal (orange).

## 2.2. Structures des complexes

L'analyse de la structure du complexe hPGI-5PAED obtenue par co-cristallisation a révélé un résultat surprenant. Alors qu'une molécule de 5PAED apparaît bien dans l'un des sites actifs de l'homodimère, une molécule de 5-phospho-D-arabinonate « 5PAA » se trouve dans l'autre site actif de l'homodimère. De même, une molécule de 5PAED et une molécule de 5PAA se trouve dans chacun des deux autres monomères. Les densités électroniques correspondent parfaitement avec les deux composés comme le montrent la figure 52.

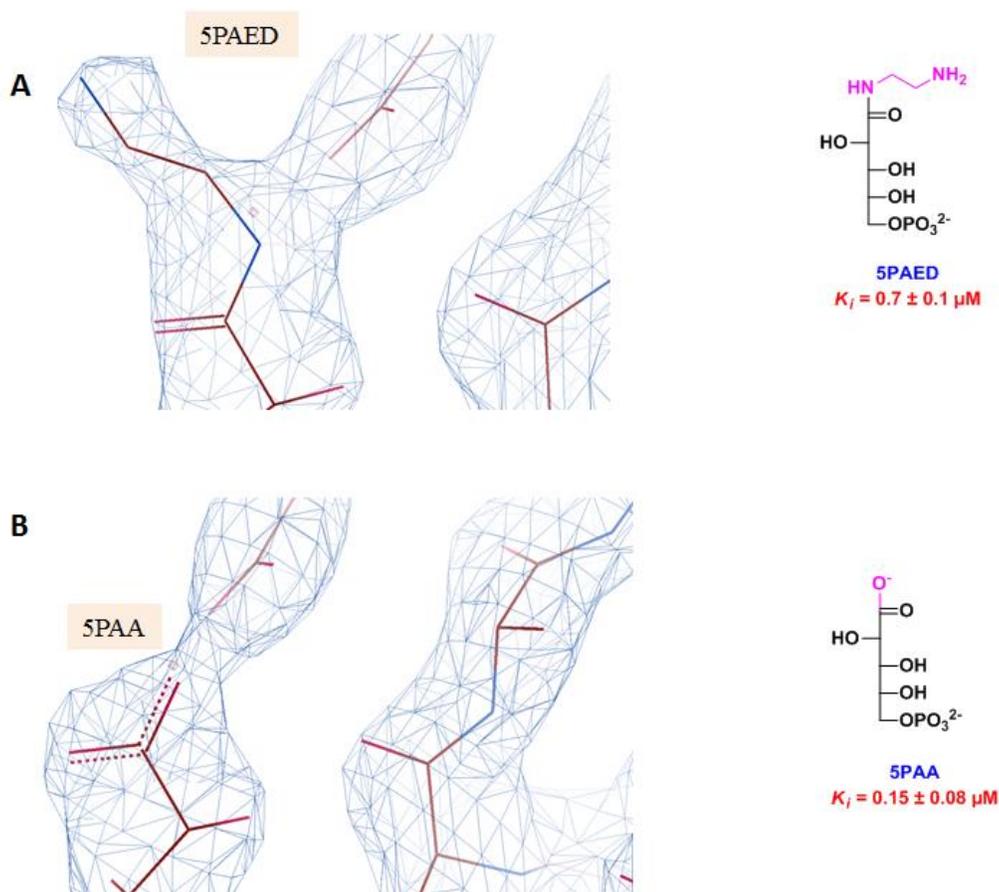


Figure 52. Densité électronique de 5PAED (A) et de 5PAA (B) pour la structure du complexe hPGI-inhibiteur obtenu par co-cristallisation (zoom sur la partie tête).

A noter que des essais de cristallisation utilisant la méthode de trempage ont été réalisés dans le but d'augmenter encore la résolution. Dans cette méthode, une goutte contenant 5 mM d'inhibiteur a été équilibrée contre 500  $\mu\text{L}$  du tampon de cristallisation pendant un jour. Un

crystal de la protéine est rapidement trempé dans la goutte d'inhibiteur. Sept heures après, le cristal est pêché, mis dans la solution de cryoprotectant (32% PEG 4000, 200 mM de  $MgCl_2$ , 100 mM de tampon TRIS pH 8.5 et 5 mM de 5PAED) pendant quelques secondes, puis congelé directement à  $-180\text{ }^{\circ}C$ . Cette méthode a conduit cette fois-ci à l'obtention d'une structure à haute résolution ( $1.95\text{ \AA}$ ) du complexe hPGI-5PAA. Le cristal diffracté a une symétrie de groupe spatial orthohombique  $P2_12_12_1$  ( $a = 80.551\text{ \AA}$ ,  $b = 106.947\text{ \AA}$ ,  $c = 270.405\text{ \AA}$ ) avec 4 molécules de protéines (2 dimères) dans l'unité asymétrique. La structure affinée contient donc 4 molécules de 5PAA, deux molécules de polyéthylène glycol, deux molécules de glycérol et 1472 molécules d'eau. La figure 53 montre une densité électronique correspondant parfaitement à tous les atomes du 5PAA et plus particulièrement au groupement carboxylate qui le différencie du 5PAED.

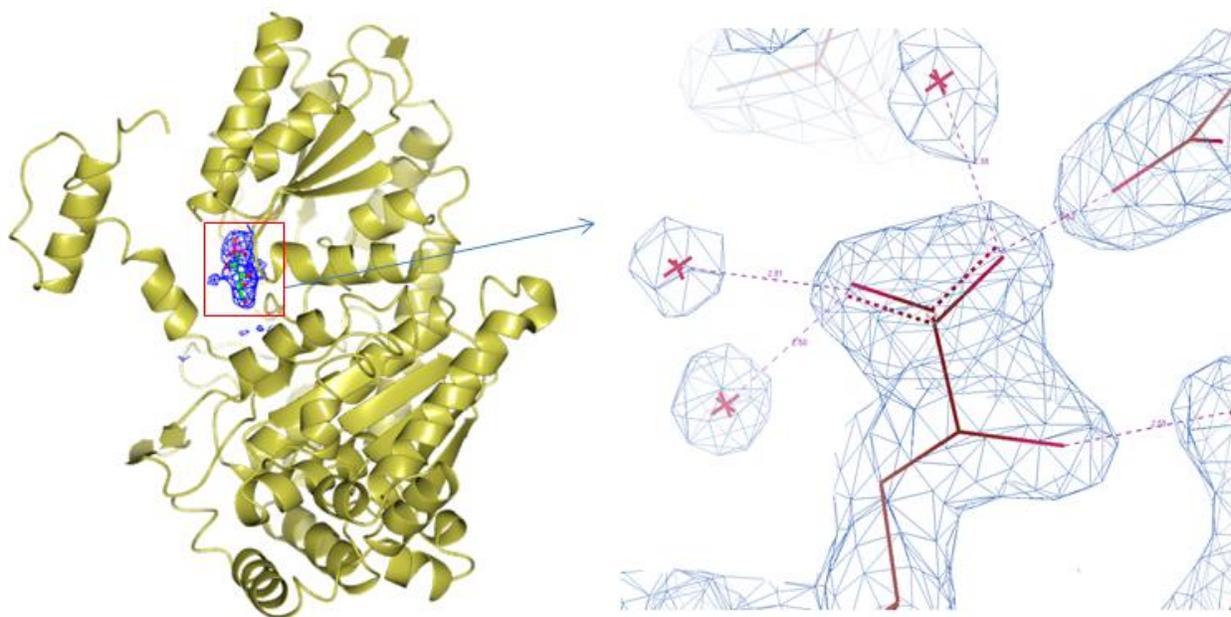


Figure 53. Densité électronique autour du 5PAA dans le complexe hPGI-5PAA (zoom sur la partie tête).

Suite à ces résultats, une étude de la stabilité du 5PAED par spectroscopie de RMN du  $^{13}C$  dans  $D_2O$  du 5PAED (**11**) à été réalisée en enregistrant des spectres à différents intervalles de temps (Figure 54). Un pic correspondant au carbonyle du 5PAA (vers  $179.5\text{ ppm}$ ) est observé après 3 h donnant un mélange du 5PAA et de 5PAED dans des proportions respectives de 33/66. Après 6 h, la proportion 5PAA/5PAED est autour de 40/60. Il semble donc que le 5PAED ne soit pas

stable en solution aqueuse, ce qui expliquerait son hydrolyse partielle pendant la période de temps nécessaire à sa co-cristallisation avec le PGI humaine.

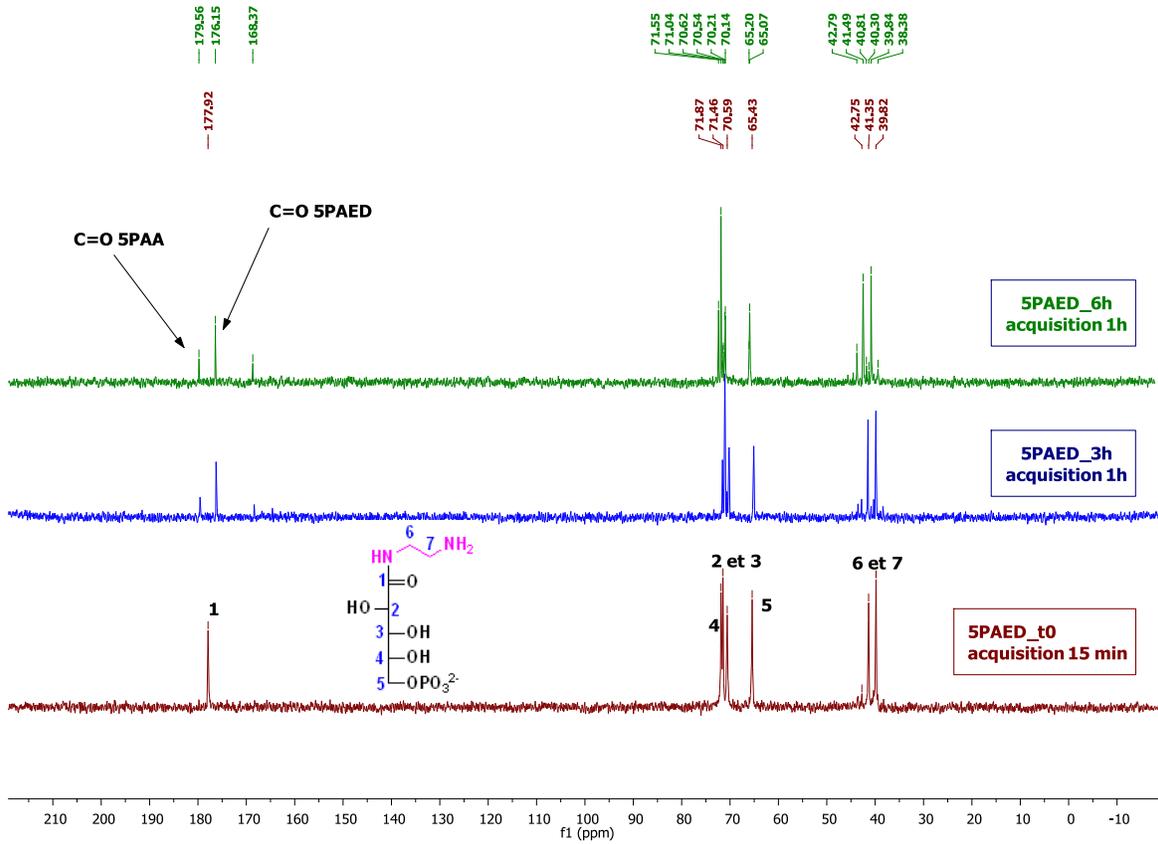


Figure 54. Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  de 5PAED dans  $\text{D}_2\text{O}$  à différents intervalles de temps ( $t = 0, 3$  et  $6$  h).

On peut imaginer une hydrolyse selon le schéma suivant :

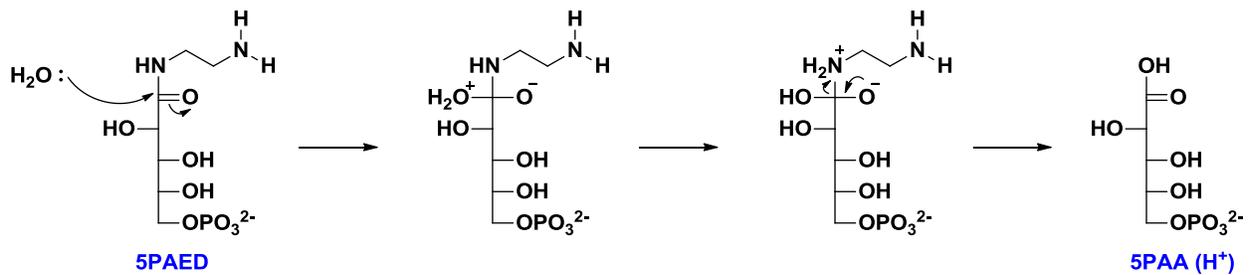


Schéma 45. Mécanisme proposé pour l'hydrolyse du 5PAED.

### **2.3. Site actif du complexe hPGI-5PAED**

La figure 55 montre une vue globale des interactions possibles du 5PAED avec l'enzyme. Les acides aminés du site actif correspondent à ceux identifiés dans d'autres structures de PGI telles RmPGI-5PAA (PDB 1G98), RmPGI-5PAH (PDB 1KOJ) et hPGI-5PAA (PDB 1NUH).<sup>101-103</sup> On retrouve les mêmes résidus du site actif décrits précédemment avec toutefois en plus l'implication de la Gly271. Onze résidus forment le site actif de l'enzyme et donnent un réseau de liaisons hydrogène avec le 5PAED. Parmi ces 11 résidus, 6 résidus (Ser159, Ser209, Lys210, Lys518, Thr211 et Thr214) participent à l'ancrage du groupement phosphate, montrant le rôle important de ce groupement dans la fixation de l'inhibiteur au sein du site actif. La Ser159 est engagée dans une liaison hydrogène avec l'oxygène O8 (2.9 Å) du phosphate via son groupement hydroxyle. Ce même oxygène est en interaction avec l'azote de la Lys210 à une distance de 2.9 Å. L'oxygène O7 établit trois liaisons hydrogène à des distances respectives de 2.9, 2.0 et 3.1 Å avec les groupements hydroxyles de la Ser209 et des deux thréonines Thr214 et Thr211. Cette dernière interagit également via son azote avec l'oxygène O6 du phosphate à une distance de 3.1 Å. La Lys518 est en interaction avec l'oxygène O5 du phosphate. En effet, et d'après la structure de RmPGI avec le F6P (PDB 1HOX),<sup>104</sup> cette lysine, qui n'interagit pas directement avec le substrat sous sa forme cyclique, s'approche après ouverture du cycle pour interagir avec le substrat sous sa forme linéaire. Cette structure vient appuyer les résultats obtenus avec les structures déjà décrites dans la littérature quant à l'importance du phosphate dans l'ancrage de l'inhibiteur.

La structure hPGI-5PAED confirme que le résidu Glu357 est correctement positionné pour jouer le rôle de la base catalytique. Celui-ci est en interaction avec l'azote N1 (2.6 et 2.9 Å) du 5PAED qui correspond au carbone C1 du substrat (F6P) et se trouve à une distance de 3.3 Å de l'atome correspondant au C2 du glucose-6-phosphate : c'est au niveau de ces carbones que la base catalytique arrache l'hydrogène du substrat pour amener à l'IHE de type 1,2-*cis*-ènediolate.

La Gly271 établit, quant à elle, une liaison hydrogène avec l'azote N2 du 5PAED [d(NH-N2) = 2.9 Å]. L'Arg272 se trouve également bien positionnée pour interagir avec ce même azote. Ce dernier est probablement sous forme non protonée (NH<sub>2</sub>, pK<sub>a</sub> ~ 9) afin qu'il puisse interagir avec l'azote de l'arginine qui elle, est très probablement protonée au site actif (pK<sub>a</sub> ~ 12). Cette étude structurale montre que, contrairement à ce que nous avons postulé initialement, la fonction

amine terminale de 5PAED n'interagit pas avec le Glu357 via une liaison ionique, mais établit 3 liaisons hydrogène avec l'Arg272 et la Gly271.

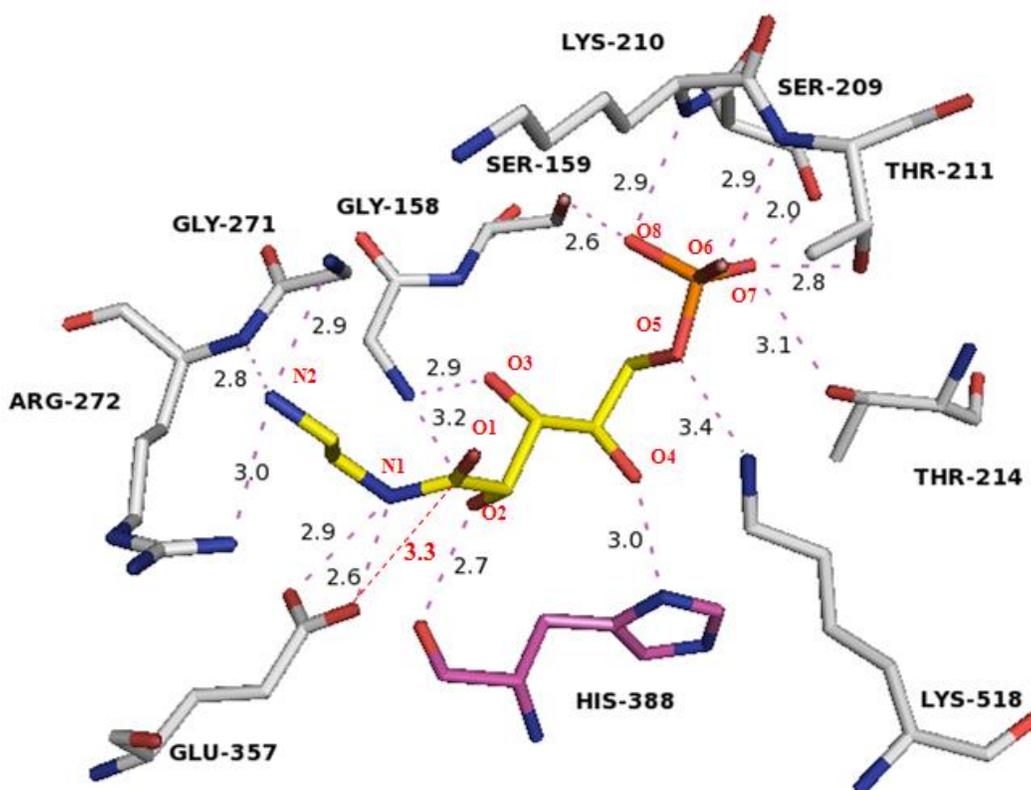


Figure 55. Ensemble des interactions au site actif du complexe hPGI-5PAED. Les traits en pointillés violets indiquent les liaisons électrostatiques (liaisons hydrogène) détectées (distances en Å).

Quant au squelette polyhydroxylé, il participe via 4 liaisons hydrogène à l'amarrage de l'inhibiteur au site actif. L'His388 participe à deux de ces liaisons hydrogène : elle interagit via son carbonyle et l'azote de l'imidazole avec les deux oxygènes O2 (2.6 Å) et O4 (3.0 Å), respectivement, de 5PAED. Ce dernier correspond à l'oxygène cyclique O5 du F6P, ce qui confirme le rôle attribué à l'His388 issu de la structure de RmPGI-F6P (PDB 1HOX) publiée par Jeffery et al.<sup>104</sup> : l'His388 catalyse l'étape d'ouverture du cycle du substrat en protonant l'oxygène furanosique du F6P ou pyranosique du G6P. La Gly158 complète le réseau de liaison hydrogène en interagissant via son azote avec les oxygènes O2 et O3 de l'inhibiteur.

Cette étude montre que le site actif de la PGI, comme le laissait suggérer les tests cinétiques rapportés dans le chapitre III, est relativement tolérant quant à la modification de la partie tête de ses inhibiteurs, contrairement à la PMI de *C. albicans*.

## 2.4. Site actif du complexe hPGI-5PAA

La structure du 5PAA complexé à la PGI humaine (PDB 1NUH) a déjà été publiée en 2003 par Davies et al. à une résolution de 2.5 Å.<sup>101</sup> Notre étude structurale permet de proposer la structure du 5PAA au site actif de l'enzyme (hPGI) avec une meilleure résolution de 1.95 Å, apportant ainsi une vue précise et détaillée de toutes les interactions de l'inhibiteur au site actif de l'enzyme (Figure 56). Un réseau étendu et complexe d'interactions lie l'inhibiteur aux différents acides aminés et molécules d'eau constituant la poche catalytique. En plus des résidus déjà identifiés, on note la présence de 6 molécules d'eau assurant le lien entre l'inhibiteur et différents acides aminés du site actif.

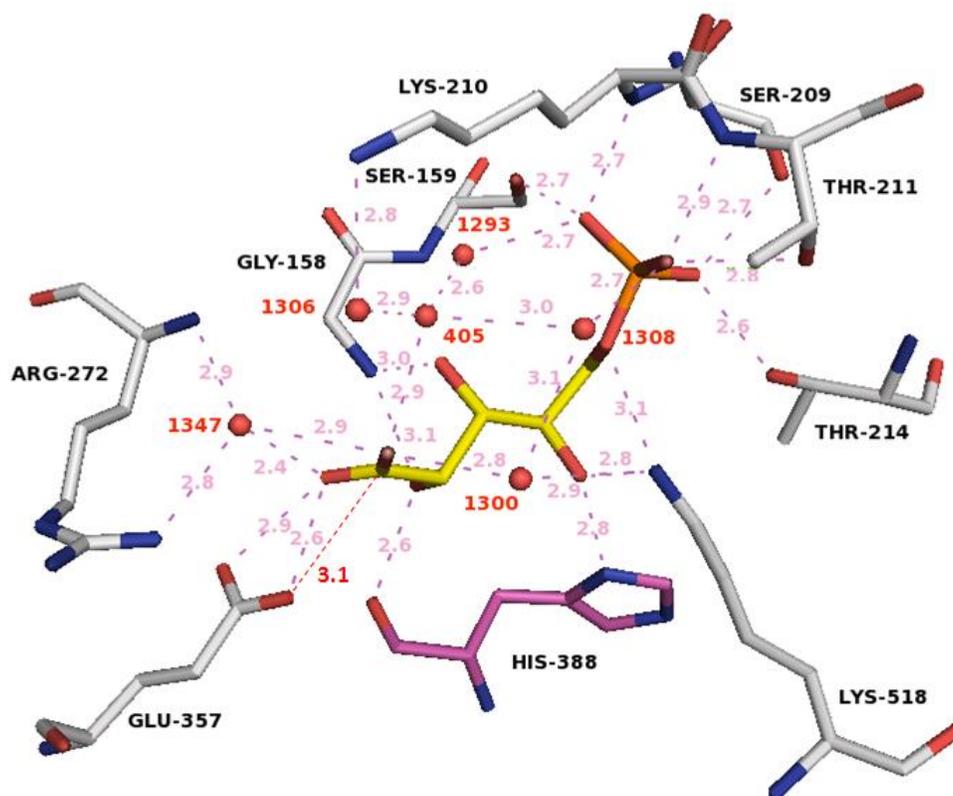


Figure 56. Ensemble des interactions au site actif du complexe hPGI-5PAA. Les traits en pointillés violets indiquent les liaisons électrostatiques (liaisons hydrogène) détectées (distances en Å).

En effet, la comparaison des structures RmPGI-5PAH (PDB 1KOJ)<sup>103</sup> et RmPGI-5PAA (PDB 1G98)<sup>102</sup> avait montré que le couple 5PAA + HOH819 mime très bien la structure du 5PAH, rationalisant le pouvoir inhibiteur très proche de ces deux composés vis-à-vis de l'enzyme. Dans notre structure hPGI-5PAA, la molécule d'eau 1347 lie le carboxylate du 5PAA à l'Arg272. Sa

position correspond parfaitement à l'atome O1 de l'IHE, confirmant ainsi le rôle de l'Arg272 dans la stabilisation de l'IHE 1,2-*cis*-enediolate formé au cours de la réaction.

La structure hPGI-5PAA rapporté ici est bien sûr très analogue à celles décrites précédemment pour les complexes hPGI-5PAA et RmPGI-5PAA et confirme les conclusions émises concernant le rôle des résidus Arg272, Glu357, His388 et Lys518. Quelques informations importantes supplémentaires peuvent cependant être apportées : la Lys 210, en plus d'interagir directement avec le phosphate, se trouve d'après notre structure en interaction indirecte avec celui-ci via un réseau de molécules d'eau 1306, 405, 1308 et 1293. Ce même réseau de molécules d'eau lie le phosphate et la Lys210 à l'oxygène Oε1 du carboxylate de l'inhibiteur, qui est également en interaction via la molécule d'eau 1300 avec la Lys518. Du fait de leur interaction avec l'oxygène du carboxylate qui correspond à l'oxygène O2 de l'IHE, les deux molécules d'eau 1300 et 405 participent, en plus de l'Arg272, à la stabilisation de l'IHE *cis*-enediolate. Ces deux molécules d'eau pourraient également assurer le transfert de proton entre les deux oxygènes O1 et O2 des IHE. Toutes ces liaisons hydrogène additionnelles apportées par ce réseau de molécules d'eau au site actif de hPGI accroissent encore plus l'affinité de l'inhibiteur 5PAA pour l'enzyme hPGI.

### **2.5. Comparaison des deux complexes hPGI-5PAED et hPGI-5PAA**

Afin de comparer le comportement des deux inhibiteurs 5PAED et 5PAA au sein du site actif de l'enzyme hPGI, la superposition structurale des deux complexes hPGI-5PAED (PDB 5NW7) et hPGI-5PAA (notre étude) a été réalisée (Figure 57). La figure 57 montre que la plupart des résidus du site actif se superposent très bien excepté un changement dans l'orientation de la Lys518 (rmsd = 0.227) : celle-ci, bien positionnée pour interagir avec les deux oxygènes O4 et O5 dans la structure hPGI-5PAA (vert), change un peu d'orientation pour interagir préférentiellement avec l'oxygène O5 du 5PAED. Une autre observation importante peut être soulignée : la bonne superposition de la fonction amine terminale du 5PAED de la structure hPGI-5PAED avec la molécule d'eau 1347 (distance 1.1 Å) de la structure du complexe hPGI-5PAA. Cette molécule d'eau est le siège de 4 liaisons hydrogène avec les deux azotes de l'Arg272 et les deux oxygènes du groupe carboxylate du 5PAA. Celle-ci est remplacée par le groupe NH<sub>2</sub> du 5PAED qui, en plus d'interagir avec l'Arg272 via deux liaisons hydrogène, fait intervenir un nouveau résidu du site actif : la Gly271.

Le 5PAED mime ainsi très bien le couple 5PAA + HOH1347, ce qui explique l'affinité comparable du 5PAED ( $K_i = 0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) et du 5PAA ( $K_i = 0.15 \pm 0.08$ ) vis-à-vis de l'enzyme. Le 5PAED reste néanmoins un moins bon inhibiteur que le 5PAA, ceci pouvant être expliqué par la perte de l'interaction de la Lys518 avec l'oxygène O4 de l'inhibiteur.

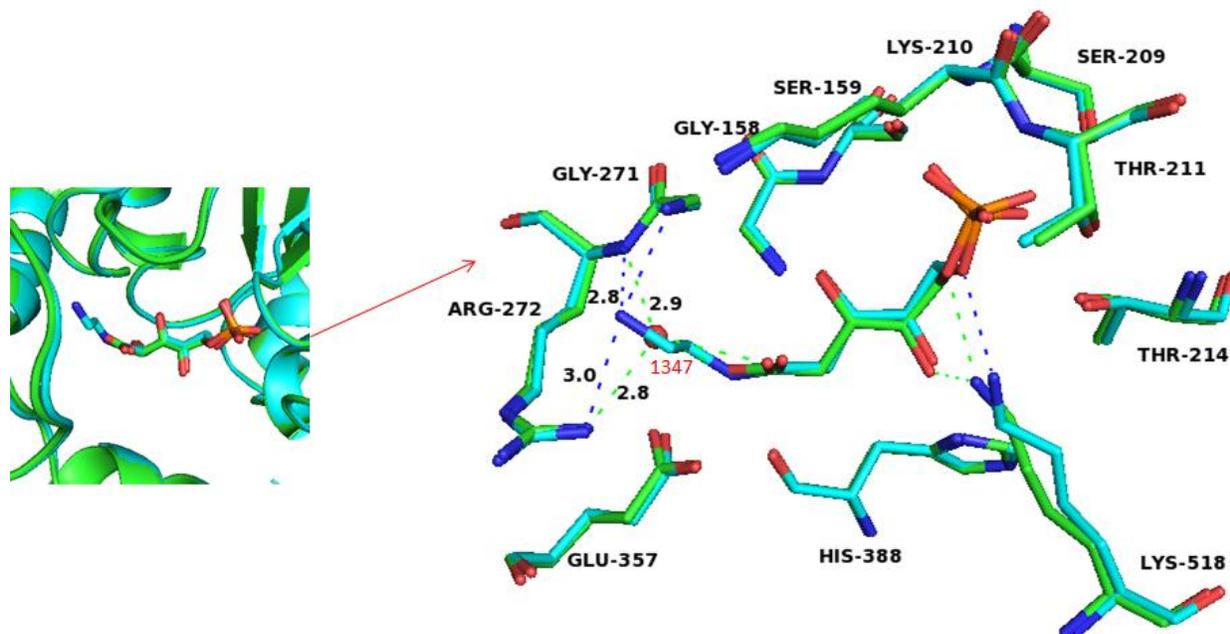


Figure 57. Superposition structurale des deux complexes hPGI-5PAED (en cyan) et hPGI-5PAA (en vert).

## 2.6. Conclusion

Les structures à haute résolution des complexes hPGI-5PAA (1.95 Å) et hPGI-5PAED (2.4 Å) rapportées dans notre étude viennent confirmer et préciser les résultats obtenus à partir des structures déjà décrites dans la littérature des complexes hPGI-5PAA (PDB 1NUH)<sup>101</sup>, RmPGI-5PAA (PDB 1G98)<sup>102</sup> et RmPGI-5PAH (PDB 1KOJ)<sup>103</sup> quant à : i) la nature de la base catalytique (Glu357), ii) l'implication de l'Arg272 dans la stabilisation de l'IHE ènediolate, iii) le rôle de l'His388 dans l'étape d'ouverture cyclique du substrat et iv) le rôle de la Lys518. Une vue plus précise et détaillée des interactions au site actif faisant intervenir un réseau de molécules d'eau est obtenue avec notre complexe hPGI-5PAA dont la résolution est bien meilleure (1.95 Å) que celle obtenue pour la structure correspondante publiée par Davies et al. (2.4 Å).

Nos études structurales montrent que le 5PAED se comporte de façon très similaire au 5PAA au site actif de l'enzyme hPGI. Ce résultat est plutôt surprenant considérant que le 5PAED diffère nettement du 5PAA de part sa partie tête de type éthylènediamine. La superposition structurale des deux complexes explique bien les valeurs proches des  $K_i$  respectifs où l'on observe que le 5PAED mime bien le comportement du couple 5PAA + HOH1347 au sein du site actif de l'enzyme. La fonction amine de 5PAED est essentielle pour une bonne inhibition de l'enzyme de part son interaction avec l'Arg272 et la Gly271.

En conclusion, nous rapportons la synthèse d'un nouveau composé potentiellement anti-métastatique, excellent inhibiteur de hPGI-AMF ne mimant pourtant pas la fonction 1,2-*cis*-ènediolate de l'IHE, aussi bien en terme de coplanéité que du point de vue stérique. La structure 3D à haute résolution obtenue par diffraction des rayons X de cet inhibiteur au sein du site actif de hPGI-AMF a été résolue et nous a permis de mettre en évidence son mode d'interaction inattendu au site actif de l'enzyme et d'expliquer son fort pouvoir inhibiteur.

## C-TENTATIVES DE CRISTALLISATION DES COMPLEXES hPGI-5PADP ET hPGI-5PAF

Des tentatives de co-cristallisation des inhibiteurs 5PADP (**12**) [N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-3-(aminométhyl)ethanolamine,  $K_i = 0.52 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ] et 5PAF (**8**) [(N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-1-(furan-2-yl)methanamine)] avec la PGI humaine dans les mêmes conditions que pour le 5PAED (**11**) ont été menées. L'analyse des différents complexes obtenus à différentes résolutions a cependant révélé la présence unique du 5PAA au sein du site actif. Des essais de cristallisation par trempage ont également été réalisés à des temps de contact très courts avec l'inhibiteur (< 2 min). Pour cette méthode, la goutte contenant l'inhibiteur n'a pas été équilibrée pendant deux jours avec la solution réservoir, mais l'inhibiteur a été ajouté en poudre juste à la fin dans le cryoprotectant contenant le cristal de la protéine pour différents intervalles de temps. Le cristal a été par la suite congelé très rapidement à  $-180 \text{ }^\circ\text{C}$  afin de minimiser le risque

d'hydrolyse. Malgré ces précautions, seul le 5PAA a pu être détecté au site actif. Une étude de stabilité des inhibiteurs en solution aqueuse par spectroscopie de RMN du  $^{13}\text{C}$  a été effectuée. Le 5PADP (**12**) s'hydrolyse lentement : après 13 h dans  $\text{D}_2\text{O}$ , la proportion 5PADP/5PAA est de 65/35. Les résultats des études cinétiques du 5PADP (**12**) comme celles du 5PAED (**11**) que nous avons menées restent cependant valables, considérant que le temps nécessaire à la mesure de l'IC50 est court ( $< 1$  h) et que les solutions d'inhibiteurs sont maintenues à  $0^\circ\text{C}$  avant la mesure, diminuant ainsi le risque d'hydrolyse. **Quant au 5PAF, le composé reste intact en solution aqueuse même 10 h dans  $\text{D}_2\text{O}$  (Figure 58). La non-observation du groupe Méfurane dans la structure 3D hPGI-5PAF est très probablement due à une grande mobilité de ce groupement au site actif, ce qui rend impossible l'obtention d'une densité électronique suffisante autour de la partie tête. Seule le reste de l'inhibiteur, correspondant à la structure du 5PAA, peut alors être détecté.**

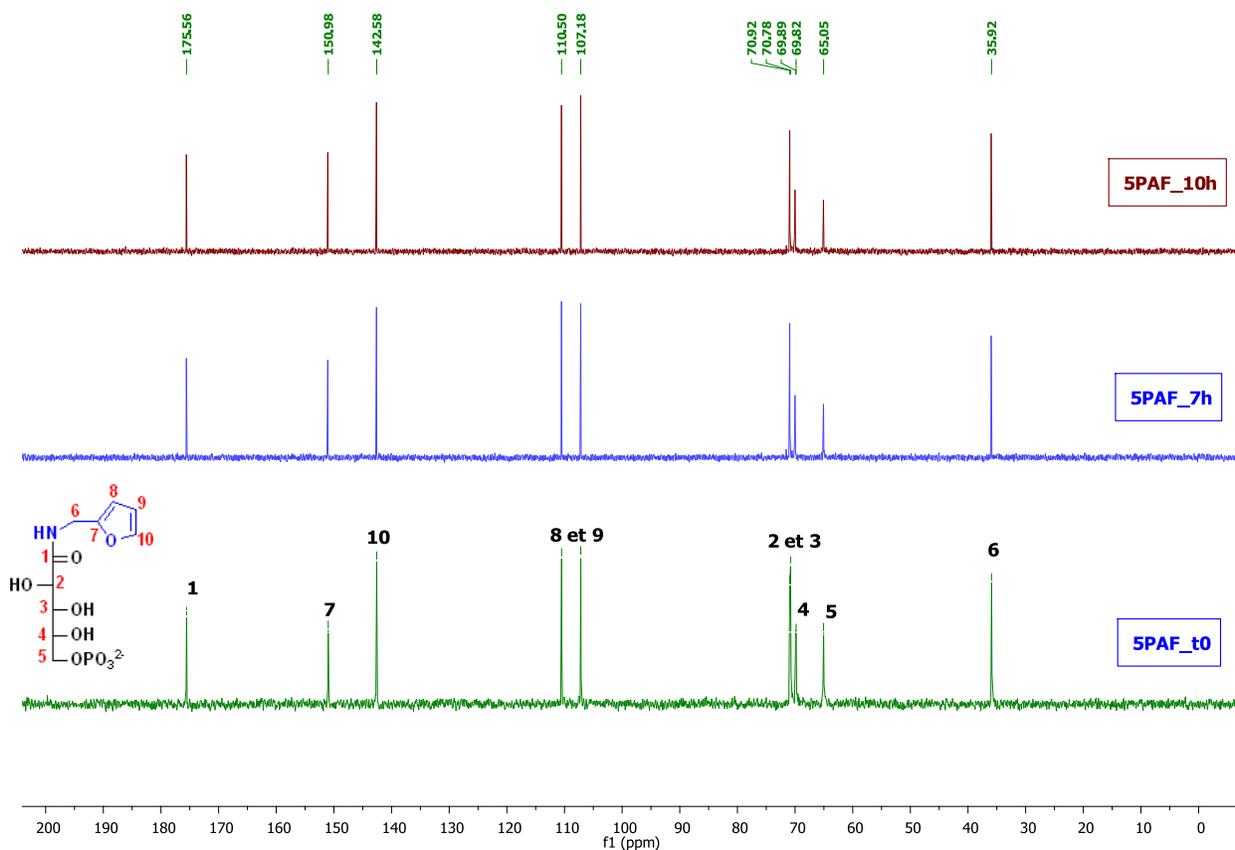


Figure 58. Spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  du 5PAF (**8**) à différents intervalles de temps ( $t = 0, 7$  et  $10$  h).



## **CHAPITRE V**

**CONCEPTION D'UN BIOCAPTEUR ELECTROCHIMIQUE A  
BASE D'UN MONOSACCHARIDE POUR LA DETECTION DE  
L'AMF-PGI**



## 1. Introduction

Le diagnostic précoce d'une pathologie permet de limiter ses effets et de débiter le plus tôt possible le traitement adapté. Le dépistage est donc perçu comme étant la première étape menant au traitement et éventuellement à la guérison, surtout dans le cas de graves maladies comme le cancer. En effet, dès lors que des métastases apparaissent, l'état de santé du patient peut rapidement s'aggraver. Détecter suffisamment tôt les métastases associées à un mauvais pronostic est donc un objectif prioritaire de la recherche en oncologie. Il est ainsi très utile de mettre en oeuvre de nouveaux marqueurs biologiques de la dissémination de la maladie permettant de dépister les patients à haut risque de rechute. Par exemple, le PSA (prostate specific antigen) dans le cancer de la prostate ou l'antigène CA 15-3 dans le cancer du sein constituent un facteur d'évaluation du risque de progression de la maladie.<sup>199,200</sup> Dans le même contexte, la périostine, une protéine sécrétée par un organe cible en réponse à une tumeur peut informer sur le risque de métastase.<sup>201,202</sup> Les marqueurs tumoraux sont utiles non seulement pour le dépistage d'un cancer mais aide également à suivre un patient et à évaluer sa réponse au traitement.

*Connu pour stimuler la perte d'adhésion intercellulaire en diminuant l'expression des E-cadhérines, pour son effet anti-apoptotique, et surtout pour conférer aux cellules tumorales des capacités migratoires et invasives (cf. introduction), le facteur de motilité autocrine (AMF) est strictement relié à la transition épithélio-mésenchymateuse qui constitue l'élément clé dans le développement de métastases. Produite par une grande variété de tumeurs,<sup>105-110,203</sup> l'AMF constitue un marqueur de détection précoce de cancers. Son expression fortement corrélée à des stades avancés et métastatiques de la maladie<sup>112-114</sup> fait de l'AMF un marqueur de progression tumorale pouvant servir pour une détection précoce d'une rechute ou même pour prédire l'effet d'un traitement mis en place après traitement de la tumeur primitive. Développer un outil pour la détection de l'AMF constituerait sans aucun doute une avancée scientifique dans le domaine de la cancérologie.*

En conséquence, ce dernier chapitre est consacré au développement d'un biocapteur à base d'un monosaccharide, *le 5PAED (II)*, pour la détection de l'AMF. La méthodologie, les différentes étapes d'élaboration du biocapteur ainsi que les résultats obtenus à l'issue de ce travail seront présentés dans ce chapitre V.

## 2. Biocapteurs : pour une détection simple et rapide

L'utilisation de biocapteurs est de plus en plus courante depuis plusieurs années en raison de leur grande sensibilité, leur simplicité, leur sélectivité et leur capacité à effectuer des analyses en temps réel. Ils constituent une solution alternative aux techniques d'analyse traditionnelles car ils offrent la possibilité de réaliser des mesures sur site et sans préparation préalable de l'échantillon à analyser. Le grand succès commercial dans ce domaine est illustré par le glucomètre qui permet une meilleure gestion et un suivi optimisé de l'état de santé des patients diabétiques.

### Qu'est ce qu'un biocapteur ?

Un biocapteur est un dispositif simple permettant de convertir une réponse biologique en un signal mesurable. **Ces équipements d'analyse sont constitués d'une partie biosélective appelée « biorécepteur », capable de reconnaître spécifiquement l'espèce à détecter, reliée à un transducteur pouvant transformer les modifications biochimiques induites par cette reconnaissance, en un signal physique exploitable (Figure 59).**

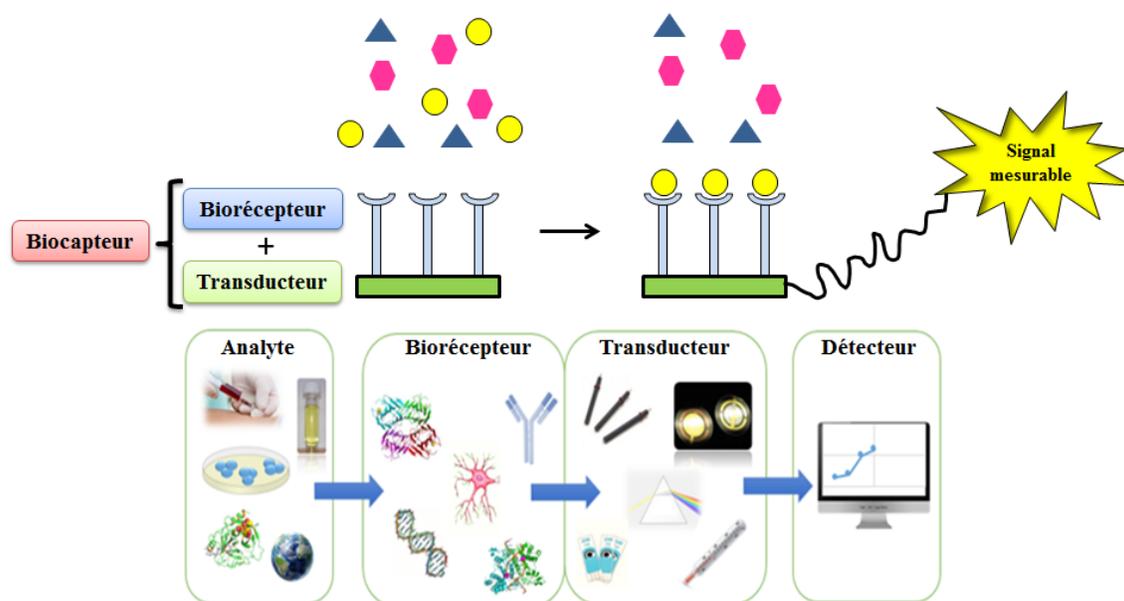


Figure 59. Présentation schématique d'un biocapteur et de ses différents constituants.

Un grand nombre de biomolécules dotées de fonction de reconnaissance peuvent jouer le rôle de biorécepteur. On cite ainsi les capteurs enzymatiques, immunologiques, cellulaires et les capteurs

d'ADN qui utilisent respectivement, des enzymes, des anticorps, des cellules ou des molécules d'ADN en tant que biorécepteur. Quant au signal généré par le transducteur, celui-ci peut être électrochimique (variation de potentiel, de courant, de conductivité ou d'impédance),<sup>204</sup> piézoélectrique (variation de la masse),<sup>205</sup> optique (variation de l'absorption, de la fluorescence ou des plasmons de surface)<sup>206</sup> ou thermique.<sup>207</sup> *Nous nous intéresserons spécialement au cours de notre travail aux biocapteurs électrochimiques et plus particulièrement aux biocapteurs ampérométriques.*

### **3. Biocapteurs ampérométriques**

De tels dispositifs analytiques reposent sur la présence d'une espèce électroactive immobilisée à la surface d'un transducteur, généralement une électrode. Cette dernière est maintenue à un potentiel fixe tel qu'à ce potentiel l'espèce électroactive est électrooxydée (ou réduite) : un courant électrique traduisant la concentration de l'espèce à détecter est ainsi généré et pourra être mesuré. L'ampérométrie constitue le mode le plus utilisé pour développer de biocapteurs et ce pour diverses applications.<sup>204,208</sup> L'électrode à oxygène développée par Clark et al. représente le premier exemple de biocapteurs ampérométriques.<sup>209</sup> Depuis, différents biosenseurs enzymatiques de glucose reposant sur le principe de Clark ont été développés et représentent de nos jours l'exemple typique de ce type de dispositifs.<sup>210</sup>

Étant donné que tous les biorécepteurs ou analytes ne sont pas intrinsèquement capables de servir de partenaires rédox, ces appareils utilisent l'électrochimie principalement médiée.<sup>211</sup> Dans cette transduction de type indirecte, le médiateur rédox peut être soit interne, constitutif du biocapteur, soit externe, comme par exemple une solution de ferri/ferrocyanure de potassium. La première méthode est cependant mieux adaptée pour une application médicale. Les dérivés du ferrocène sont les principaux médiateurs utilisés : leur avantage principal est leur bas potentiel d'oxydo-réduction ce qui limite le risque d'interférence avec d'autres substances oxydables.

### **4. Exemples de biocapteurs à base de sucres**

L'utilisation des sucres dans le domaine de biocapteurs existent depuis longtemps. Dans ces dispositifs, le sucre peut servir soit comme biorécepteur soit comme analyte. La plupart des

travaux utilisant le sucre en tant que récepteur pour la détection de biomolécules (protéines ou glycoprotéines) concerne la détection de lectines<sup>212</sup> et les biopuces à sucres.<sup>213-218</sup> Ces dernières connues également sous le nom de « carbohydrate microarrays » étudient des interactions spécifiques entre protéines et saccharides (mono, oligo ou polysaccharides) immobilisés en surface. Ces dispositifs aident à la compréhension des mécanismes physiologiques et pathologiques faisant intervenir des sucres. Pour tous ces systèmes, la technique basée sur le marquage par une molécule fluorescente de la protéine à détecter est la plus employée, suivie par la technique de détection optique par résonance plasmonique de surface. Cette dernière, au contraire de la première, permet de suivre les interactions directes entre sondes et biomolécules.

*Hormis les biopuces à sucres, peu d'exemples de biocapteurs utilisant un monosaccharide en tant que récepteur existent dans la littérature.* On peut citer cependant un exemple d'un biosenseur optique formé par l'adsorption d'un trisaccharide lié à l'albumine du sérum humain « Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-HSA » sur une plaque d'or.<sup>219</sup> Il sert à détecter les anticorps anti- $\alpha$ -galactose exprimés par un individu au cours des xénogreffes. La détection et la formation du complexe est suivie par résonance plasmonique de surface (SPR). Un tel dispositif permet de prévoir un rejet de greffe lors d'une transplantation d'organes et d'éliminer du sérum humain les anticorps spécifiques aux xénoantigènes par un régime de traitement extracorporel.

*Un peu plus tard, des biocapteurs électrochimiques à base de monosaccharides* ont vu le jour.<sup>220-222</sup> On peut citer l'exemple du biocapteur à base de mannose développé par l'équipe de Zhang et al. qui sert à détecter les glycanes surexprimés sur des cellules cancéreuses provenant de cancers du poumon et de la prostate.<sup>221</sup> Le mannose fonctionnalisé par une chaîne thiolée est greffé par adsorption sur des nanoparticules d'or enchevêtrés dans un film de nanotubes de carbone et déposés sur électrode de carbone. La détection fait appel à un système complexe enzymatique et électrochimique : elle est basée sur la compétition entre les résidus mannose et les glycanes exprimés à la surface des cellules cancéreuses pour la fixation sur des anticorps anti-glycanes couplés à une peroxydase. Cette dernière oxyde l'hydroquinone en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la détection est réalisée en mesurant le signal de réduction du produit d'oxydation formé par voltampérométrie impulsionnelle différentielle (Figure 60).

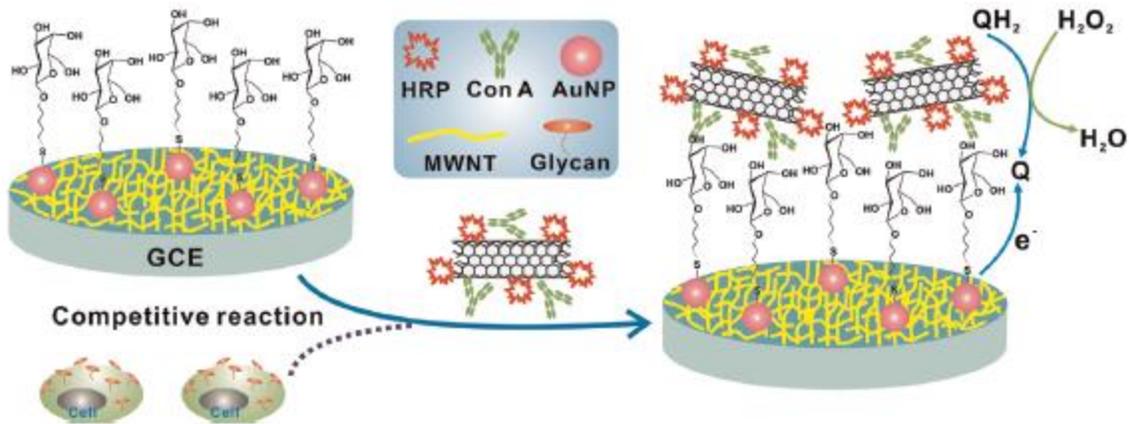


Figure 60. Représentation schématique du biocapteur électrochimique pour le dosage compétitif de l'expression du mannose sur les cellules cancéreuses.  $QH_2$  : hydroquinone, HRP : peroxydase de raifort, Con A : concanavaleine A, GCE : glassy carbon electrode, AuNP : Au nanoparticle/nanoparticules d'or, MWNT : multiwalled carbon nanotube/multicouches de nanotubes de carbone.

Un autre exemple intéressant concerne la détection du peptide  $\beta$ -amyloïde impliqué dans la maladie d'Alzheimer, en utilisant l'acide sialique comme biorécepteur. Ce dernier est immobilisé sur des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des groupements alcynes et déposées sur électrode de carbone, via un lien triazole. La détection électrochimique est réalisée par voltampérométrie cyclique en suivant le signal d'oxydation de l'unique résidu tyrosine contenu dans la protéine pour une gamme de concentrations allant de 1 à 20  $\mu$ M (Figure 61).<sup>222</sup>

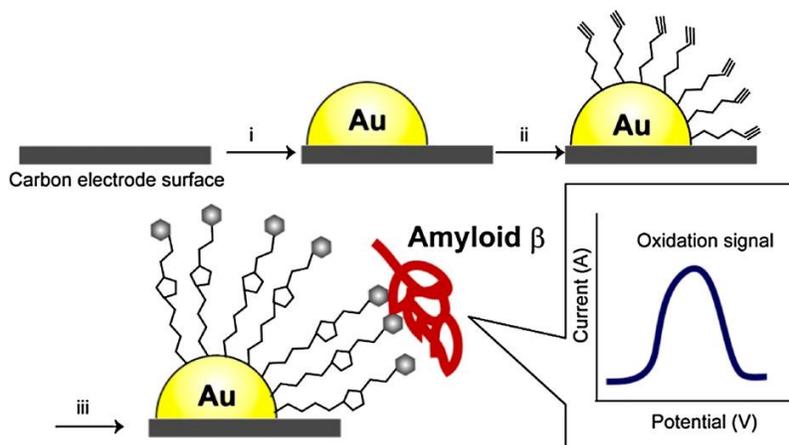


Figure 61. Les différentes étapes de construction du biocapteur électrochimique pour la détection du peptide  $\beta$ -amyloïde d'après Chikae et al.<sup>222</sup>

## 5. Biocapteur à base du F6P pour la détection de la PGI du muscle de lapin

En 2017, le premier biocapteur électrochimique pour la détection de l'AMF à base du fructose 6-phosphate (F6P), fut développé dans notre laboratoire.<sup>172</sup> Cependant, la PGI du muscle de lapin (RmPGI) avait alors servi d'enzyme modèle de l'AMF (hPGI) pour tester le biocapteur. Cette enzyme, possède en effet un haut degré de similitude (92%) avec l'AMF et présente l'avantage d'être commerciale au moment où l'AMF n'était pas encore produite au laboratoire.

La figure 62 résume les différentes étapes de construction du biocapteur. La première étape (1) correspond à la fonctionnalisation de la surface de l'électrode d'or par électrodéposition de l'éthylène diamine. Cette étape sert à former des extrémités amines libres, hautement réactives à la surface de l'électrode. La deuxième étape (2) consiste à éviter les adsorptions non-spécifiques par électrodéposition du polyéthylène glycol aminé. Les deux étapes suivantes consistent à créer une fonction oxyamine libre à la surface de l'électrode par greffage chimique de l'acide(Boc)aminoéthoxyéthanoïque (étape 3) suivi d'une étape de déprotection par hydrolyse acide de son groupement Boc (dicarbonate de di-tert-butyle) (étape 4). La déprotection libère les fonctions oxyamines permettant ainsi le greffage chimique du biorécepteur (F6P, 10 mM) via un lien oxime (étape 5). Afin de minimiser autant que possible les éventuelles interactions non spécifiques, les extrémités oxyamines n'ayant pas réagi ont été bloquées avec de l'acide pentanoïque et les espaces d'or libres comblés par l'albumine de sérum bovin (étapes 6, 7).

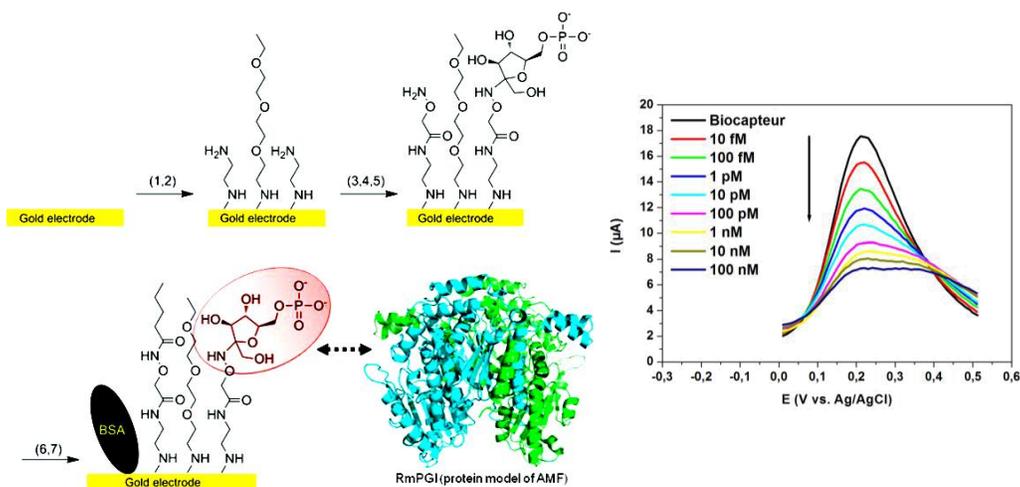


Figure 62. Les différentes étapes de construction du biocapteur à base de F6P pour la détection de RmPGI.<sup>172</sup>

L'électrode est incubée pendant une heure à température ambiante avec la solution de RmPGI pour chaque concentration désirée dans une gamme variant de 10 fM à 100 nM. L'interaction de l'enzyme avec son substrat a été suivie par voltampérométrie à vague carré (figure 4) et impédancemétrie dans une solution de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Le biocapteur a démontré une limite de détection de 6.6 fM et une sélectivité élevée par rapport à la D-glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). La détection de la protéine dans le plasma humain a également été démontrée et une précision de 95% a été obtenue par rapport au résultat obtenu dans le PBS.<sup>172</sup>

*Partant du même principe, l'AMF pourrait également être détecté en utilisant un inhibiteur de l'enzyme. C'est cette approche que nous avons suivie dans notre travail et qui est décrite dans la suite de ce chapitre.*

## **6. Biocapteur à base de 5PAED, inhibiteur de l'AMF**

Notre travail consiste à détecter, cette fois-ci, non plus la PGI du muscle de lapin mais l'AMF/PGI humaine surexprimée et purifiée au laboratoire (cf. Chapitre II). L'objectif maître de ce travail est donc de réaliser un *biocapteur pour la détection de la cible réelle avec un inhibiteur de la protéine* et non plus son substrat comme effectué dans la première approche.<sup>172</sup>

Le biorécepteur choisi est un puissant inhibiteur compétitif de la réaction catalysée par la PGI, le 5PAED (**11**) dont la synthèse a été décrite dans le chapitre III. En effet, avec un  $K_i$  de l'ordre de 0.7  $\mu\text{M}$ , 5PAED affiche une affinité vis-à-vis de la protéine bien supérieure à celle du F6P ( $K_m = 50 \mu\text{M}$ ).

### **6.1. Choix des différents composants du biocapteur**

Pour réaliser ce biocapteur, nous nous sommes inspirées des travaux d'Anna Miodek concernant l'utilisation d'une sonde rédox interne.<sup>223</sup> Dans ce biocapteur, le transducteur est constitué par un matériau conducteur, le polypyrrole, déposé sur une électrode d'or. Ce matériau est modifié par des dendrimères PAMAM (polyamidoamine) de deuxième génération qui permettent d'augmenter le nombre de fonctions amines à la surface de l'électrode. Le ferrocène est greffé covalentement sur ces fonctions amines et sert de sonde rédox intégrée au biocapteur contrairement au précédent travail pour lequel la détection a été faite avec une sonde rédox de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  en

solution. Le schéma général du biocapteur final proposé avec ses différents constituants est rapporté ci-dessous (Schéma 46).

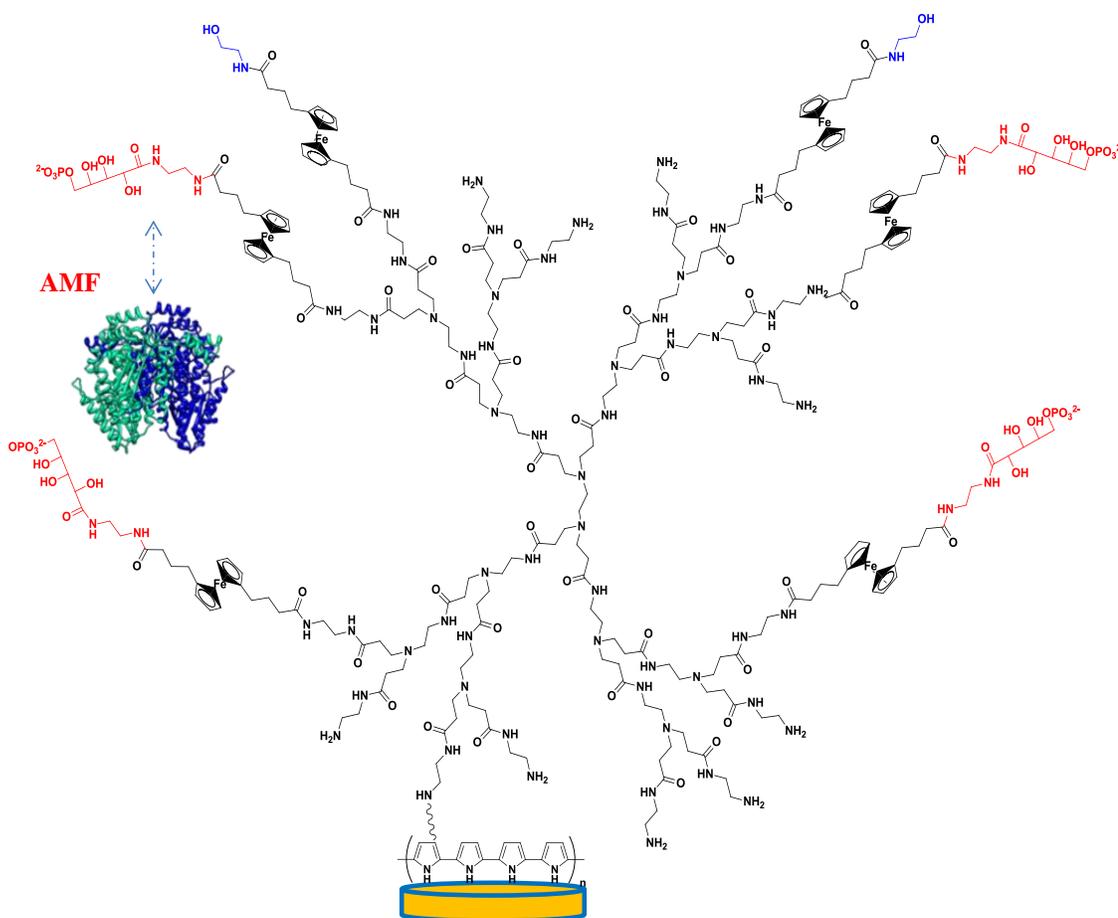


Schéma 46. Schéma général du biocapteur proposé et de ses différents constituants.

Les différents composants du biocapteur ont été choisis en fonction de leurs propriétés.

Le **polypyrrole (Ppy)** est un des polymères électroactifs les plus utilisés pour la réalisation de biocapteurs électrochimiques du fait de sa grande conductivité électrique, sa stabilité à l'air, et, le plus important, son aptitude à être fonctionnalisé.<sup>224,225</sup> Un film uniforme d'épaisseur variable peut être obtenu par simple polymérisation électrochimique du pyrrole en solution aqueuse, ce qui facilite sa synthèse.<sup>226</sup>

Le **PAMAM**, un dendrimère de polyamidoamine, est une macromolécule formée par réaction en chaîne. Il est synthétisé à partir d'éthylène diamine ; pour chaque génération, le nombre d'amines

double en surface du dendrimère (16 pour le PAMAM G2 et 64 pour le PAMAM G4). Le PAMAM offre un double avantage : il permet non seulement d'augmenter considérablement la surface active de l'électrode mais également de servir comme support pour greffer la sonde rédox à l'aide de ses extrémités amines libres.

Le **ferrocène** utilisé au cours de ce travail porte deux fonctions esters activées de type phtalimide (Fc di-NHP) permettant un simple greffage covalent du ferrocène au PAMAM et également au sucre. Celui-ci joue le rôle d'une sonde rédox de part son centre fer qui est le siège d'une réaction d'oxydo-réduction générant un courant mesurable.

Le **monosaccharide (5PAED, 11)** est un inhibiteur compétitif de l'enzyme ayant une grande affinité pour celle-ci ( $K_i = 0.7 \mu\text{M}$ , Schéma 47). Il peut jouer ainsi le rôle de biorécepteur pour la détection de notre protéine cible. Le 5PAED ne diffère de l'IHE que par sa partie tête portant un groupement éthylènediamine. Son extrémité N-terminale permettra son greffage à la deuxième fonction ester du ferrocène.

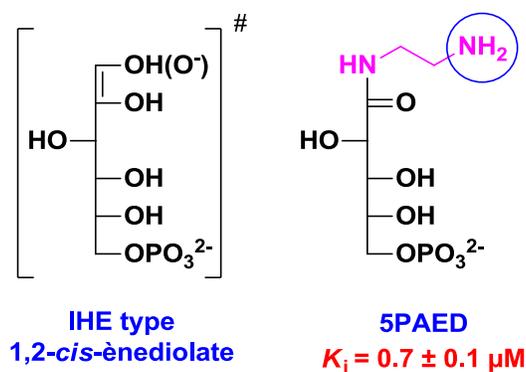


Schéma 47. Structures de l'IHE « 1,2-cis-ènediol(ate) » et de 5PAED (11) ; valeur de sa constante d'inhibition vs. PGI humaine.

Le fait de greffer le 5PAED via la fonction amine terminale entraîne la perte de trois interactions au site actif, deux avec l'Arg272 et une avec la Gly271, et donc une baisse de l'affinité pour l'enzyme. Cependant, d'après la structure du complexe hPGI-5PAED que nous avons obtenu (Chapitre IV), et même des autres structures existantes dans la littérature (RmPGI-5PAA et RmPGI-5PAH), on peut conclure que la partie essentielle pour l'affinité de l'inhibiteur vis-à-vis

de la protéine est la partie formée par le squelette polyhydroxylé et le groupement phosphate. Le fait de greffer la molécule choisie à la surface de l'électrode via la fonction amine terminale ne devrait pas empêcher la détection de celle-ci. De plus, la fonction amine est espacée de deux carbones de la fonction amide, ce qui rend plus accessible le reste du squelette de la molécule pour interagir avec l'enzyme. Afin de valider la faisabilité de notre biocapteur, la structure du site actif du complexe hPGI-5PAED en mode surface a été visualisée en utilisant le logiciel Pymol (Figure 63). Cette figure montre bien que le groupement amine est potentiellement accessible pour un greffage covalent à la surface du biocapteur, alors que le reste du squelette et surtout la partie phosphate sont bien enfouies dans la protéine, validant ainsi notre approche.

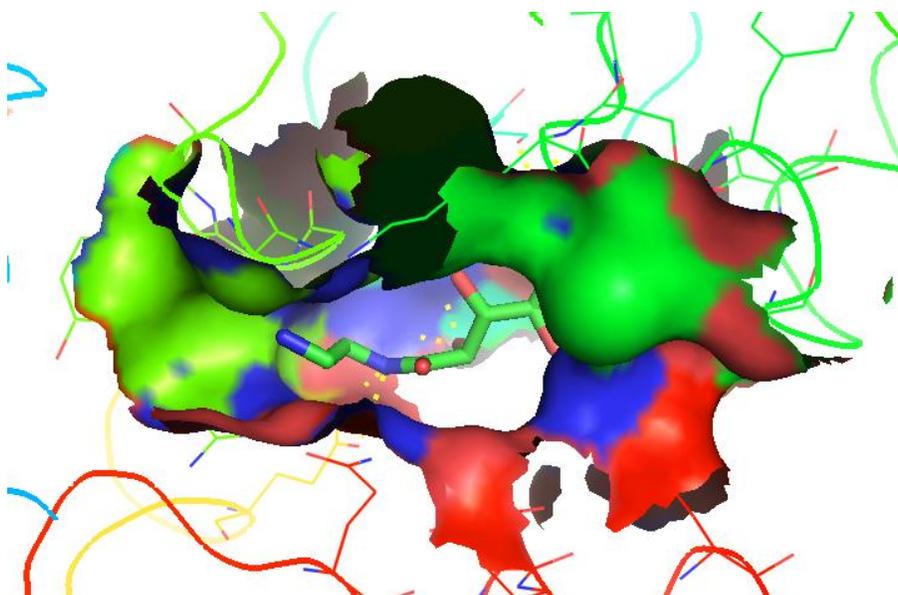


Figure 63. Visualisation du site actif du complexe hPGI-5PAED par le logiciel Pymol.

Le dernier composant du biocapteur est **l'éthanolamine** dont le rôle est d'assurer la stabilité du signal du ferrocène. En effet, les groupements esters de celui-ci sont très réactifs et risquent de s'hydrolyser avec le temps. L'étape finale de la construction du biocapteur consiste alors à remplacer les groupements phtalimido des esters libres du ferrocène par l'éthanolamine de façon à obtenir une surface uniforme et assurer la stabilité du signal mesuré.

## 6.2. Etapes de construction du biocapteur :

La stratégie utilisée pour la construction du biocapteur comporte 5 étapes comme représentée sur le schéma 48. La première étape (1) de l'élaboration du biocapteur correspond à la fonctionnalisation de la surface d'or par électrodéposition du pyrrole. Une polymérisation mettant en jeu un mécanisme de type radicalaire conduit à la formation d'un film mince de polypyrrole à la surface d'or.

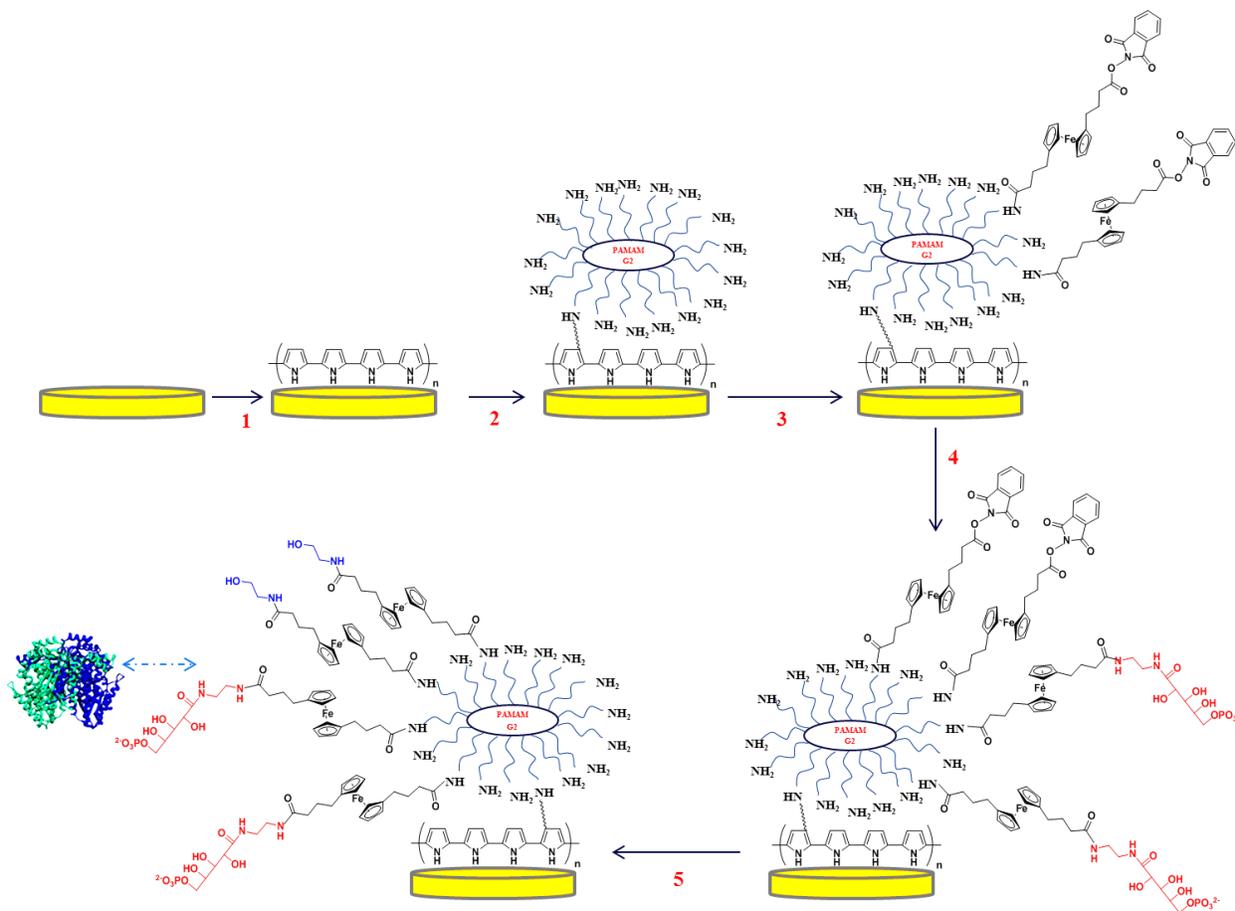


Schéma 48. Les différentes étapes de construction du biocapteur.

La deuxième étape (2) correspond à la fonctionnalisation du polypyrrole par un dendrimère de type polyamidoamine (PAMAM) par voie électrochimique. L'immobilisation du dendrimère par des liaisons covalentes sur le polypyrrole assure la formation de fonctions amines libres à la surface de l'électrode. L'étape suivante (3) consiste à introduire la sonde rédox. Le ferrocène diester est greffé covalentement sur les fonctions amines terminales du PAMAM via un lien amide. Nous procédons par la suite au greffage chimique du biorécepteur (4). Sur le même

principe que le greffage du ferrocène sur le PAMAM G2 de deuxième génération, un couplage entre la fonction amine du 5PAED et la deuxième fonction ester est réalisé. L'étape finale (5) mène au biocapteur final. Elle correspond au remplacement des groupements phtalimido des molécules libres du ferrocène par l'éthanolamine via un simple greffage chimique.

### 6.3. Elaboration du biocapteur et confirmation des modifications des surfaces

#### 6.3.1. Activation de la surface d'or

Avant de procéder à l'élaboration du biocapteur, un nettoyage électrochimique (ou activation) des surfaces d'or a été réalisé systématiquement. Cette étape de nettoyage sert à éliminer tous les contaminants pouvant persister après l'étape de polissage des électrodes et qui pourraient par la suite avoir une influence sur la reproductibilité des résultats ainsi que sur les étapes de greffage ultérieures. Pour ce faire, chaque électrode est activée dans une solution dégazée d'acide sulfurique (0.5 M) par voltamétrie cyclique, en balayant le potentiel de 0 à 1.8 V durant 10 cycles à une vitesse de 100 mV/s. Après chaque activation, les électrodes sont analysées dans une solution contenant 5 mM d'ions ferricyanures  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  et 5 mM d'ions ferrocyanures  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  préparée dans une solution eau/KCl 0.1 M. Les voltammogrammes avant (A) et après traitement avec l'acide sulfurique (B) sont représentés dans la figure 64.

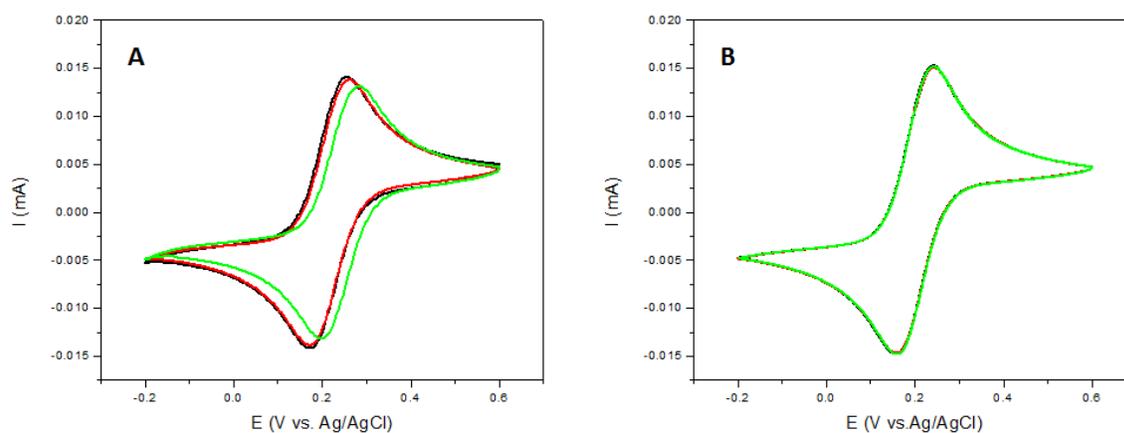


Figure 64. Analyse par voltamétrie cyclique des surfaces d'or avant (A) et après (B) activation par  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M. Conditions :  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5 mM / 5 cycles / vitesse = 50 mV/s.

Les signaux d'oxydo-réduction de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  qui sont différents avant activation deviennent parfaitement superposables après activation. Cette étape est primordiale car elle permet d'avoir des surfaces toutes équivalentes et garantit une bonne reproductibilité des expériences menées sur des électrodes différentes.

### 6.3.2. Dépôt du film de polypyrrole

#### a) Mécanisme de polymérisation du pyrrole

Le film de polypyrrole se forme par électropolymérisation oxydative du monomère pyrrole.<sup>227</sup> L'oxydation du pyrrole donne un radical cation. Deux radicaux cations se couplent par la suite et conduisent par perte de deux protons à la formation du 2,2'-bipyrrole. Le même processus se répète pour former des chaînes plus longues et donner naissance à un film de polypyrrole à la surface de l'électrode d'or (Schéma 49).

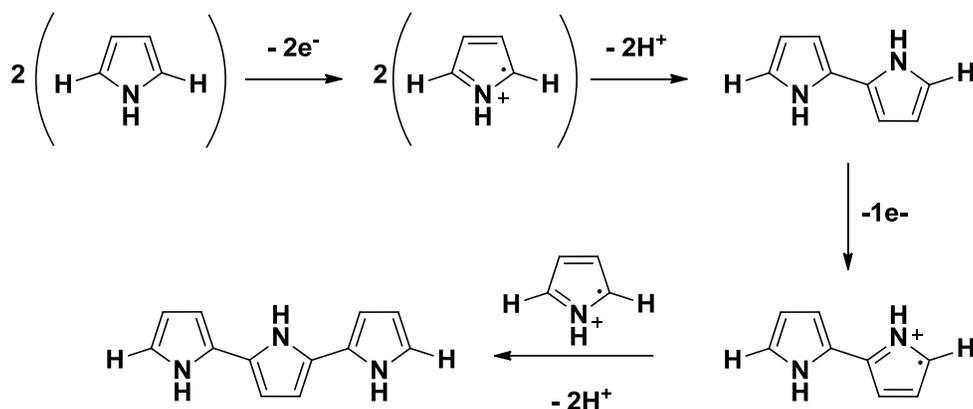


Schéma 49. Mécanisme de formation du film de polypyrrole.

#### b) Electrodéposition du pyrrole

Une solution de pyrrole à 20 mM dans du perchlorate de lithium ( $\text{LiClO}_4$ ) à 0.5 M dans l'eau est utilisée. L'électrodéposition est conduite par voltamétrie cyclique en balayant le potentiel de -0.4 à 0.9 V durant 2 cycles à une vitesse de 50 mV/s. Un film mince de polypyrrole se forme à la surface de l'électrode d'or. Le voltammogramme A présenté sur la figure 65 montre un pic d'oxydation large vers 0.7 V qui correspond à la formation du radical cation du pyrrole. Ce pic

diminue au cours du deuxième cycle témoignant du greffage de polypyrrole à la surface de l'électrode.

Afin de vérifier si la surface a bien été modifiée, une analyse par voltamétrie cyclique a été faite dans PBS. Le voltammogramme B montre une augmentation considérable de l'intensité du courant après greffage du pyrrole par comparaison avec celle de la surface d'or nue. Cette augmentation est due au fait qu'une surface conductrice plus importante améliorant le transfert de charges est obtenue avec le film de polypyrrole.

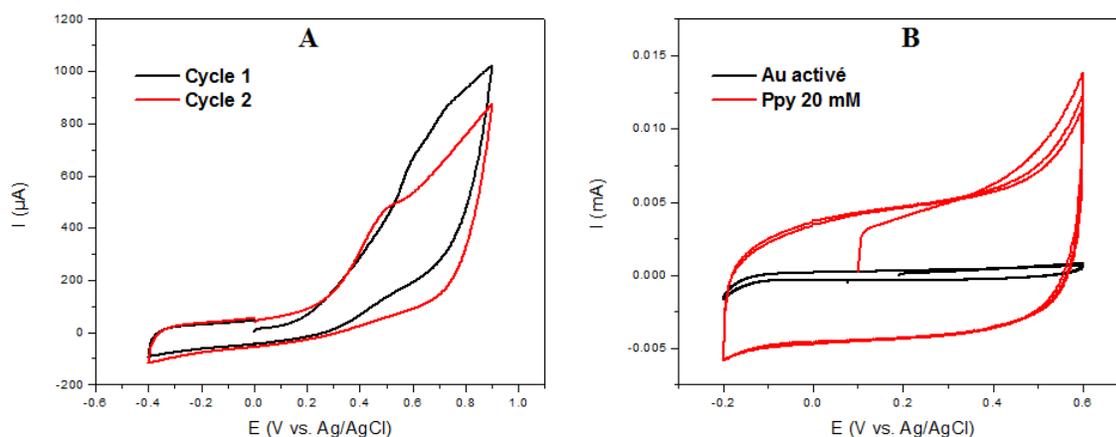


Figure 65. Electrodeposition du polypyrrole. (A) Voltammogramme montrant l'électrodeposition du pyrrole. Conditions : pyrrole 20 mM dans eau/LiClO<sub>4</sub> 0.5 M, 2 cycles, 50 mV/s (B) Analyse de la surface d'or par voltamétrie cyclique avant et après greffage. Conditions : PBS 10 mM / pH 7.4 / 3 cycles à 50 mV.s<sup>-1</sup>.

### **6.3.3. Fonctionnalisation du polypyrrole par le PAMAM G2**

#### **a) Mécanisme de greffage covalent du PAMAM G2 sur le polypyrrole**

Il a été récemment démontré au sein de notre laboratoire que les dendrimères de type polyamidoamine peuvent être attachés à un film de polypyrrole ou des nanotubes de carbone modifiés par du polypyrrole via une simple déposition électrochimique.<sup>223,228,229</sup> Une telle découverte a suscité un intérêt particulier puisqu'aucune modification préalable du pyrrole n'est nécessaire offrant ainsi deux grands avantages : la simplicité et la rapidité.

L'attachement des amines aliphatiques sur du carbone vitreux<sup>230-232</sup> ou sur des surfaces métalliques<sup>233</sup> ou même sur des nanotubes de carbone<sup>234</sup> est déjà décrit dans la littérature. Le mécanisme par lequel les amines s'attachent covalamment à la surface met en jeu la formation d'un radical cation au niveau de l'azote par électrooxydation. Celui-ci pourra s'attacher

facilement en mettant en commun son électron avec la surface. Selon le même principe, on suppose qu'un radical cation du PAMAM peut s'attacher à un radical cation de polypyrrole : on assiste ainsi à la formation d'une liaison covalente entre le carbone du pyrrole et l'azote du PAMAM selon le mécanisme proposé dans le Schéma 50.

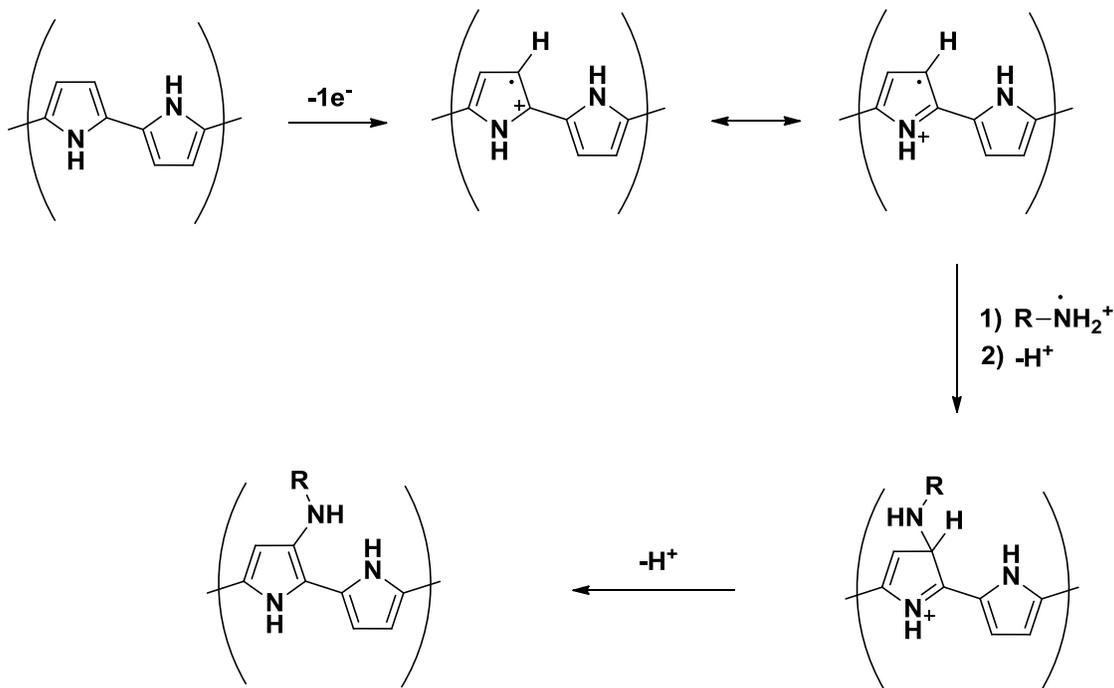


Schéma 50. Mécanisme de greffage covalent du PAMAM G2 sur le polypyrrole.

### **b) Electrodeposition du PAMAM G2**

L'électrodeposition du PAMAM G2 est réalisée dans une solution aqueuse de perchlorate de lithium 0.5 M en effectuant un balayage du potentiel entre 0 et 1.1 V durant 3 cycles à une vitesse de 100 mV/s. Le voltammogramme présenté dans la figure 66 (A) montre un pic d'oxydation large vers 0.7 V correspondant à la formation du radical cation. Le pic disparaît au 2<sup>ème</sup> cycle ce qui montre que le radical cation réagit directement avec la surface au fur et à mesure de sa formation. L'analyse dans une solution de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  (Figure 66, B) montre une extinction du courant après greffage du PAMAM par comparaison au polypyrrole tout seul.

Ceci est dû au blocage du transfert de charges lié à l'encombrement stérique apporté par le dendrimère.

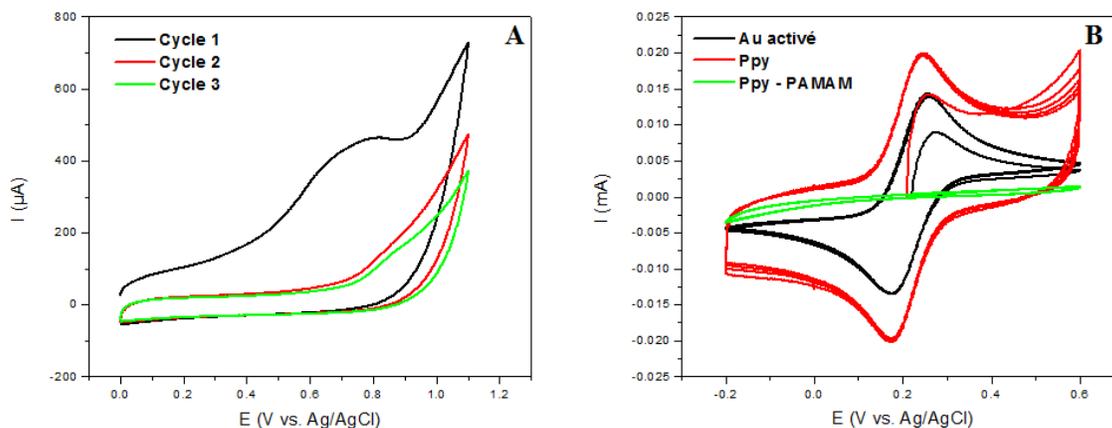


Figure 66. Electrodeposition du PAMAM et analyse par voltamétrie cyclique dans  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ . (A) Voltammogramme montrant le greffage du PAMAM. Conditions : PAMAM 1 mM dans eau/LiClO<sub>4</sub> 0.5 M, 3 cycles, 50 mV/s (B) Analyse de la surface d'or par voltamétrie cyclique avant et après greffage. Conditions :  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  5 mM / 3 cycles / 50 mV.s<sup>-1</sup>.

### 6.3.4. Greffage de la sonde rédox

Le greffage du ferrocène est réalisé par voie chimique. Celui-ci possède deux fonctions esters activées ce qui facilite son couplage aux extrémités amines du PAMAM via un lien amide.

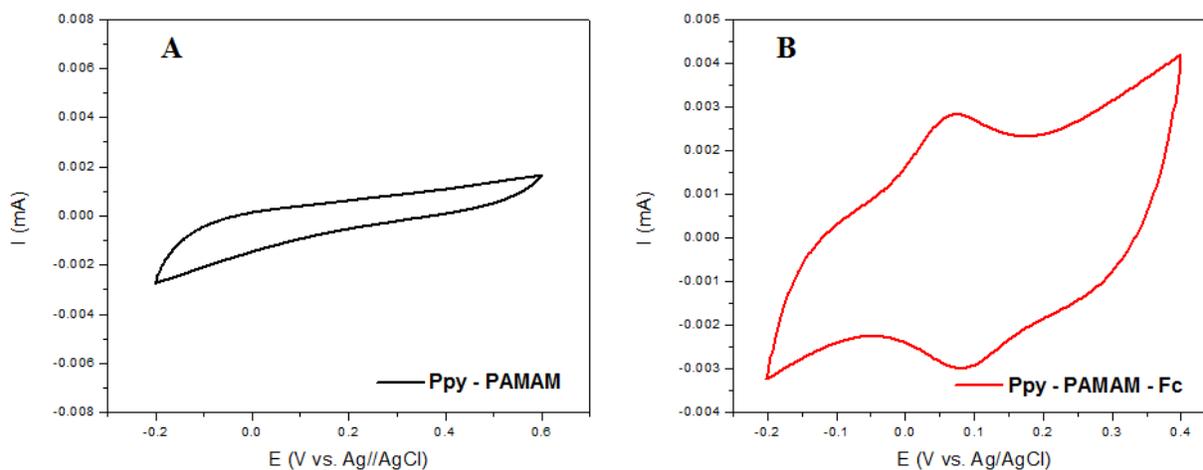


Figure 67. Analyse de la surface d'or par voltamétrie cyclique avant (A) et après (B) greffage du ferrocène. Conditions : PBS 10 mM / pH 7.4 / 50 mV.s<sup>-1</sup>.

Pour ce faire, il suffit d'incuber l'électrode dans une solution de ferrocène dans l'acétonitrile pendant 1 h à température ambiante. Afin de vérifier si le greffage a bien eu lieu, une analyse par voltamétrie cyclique avant et après greffage a été effectuée. Par comparaison avec le voltamogramme obtenu après greffage du PAMAM (Figure 67A), on remarque l'apparition d'un signal rédox uniquement après greffage du ferrocène (Figure 67B), ce qui confirme bien sa présence à la surface du biocapteur.

### 6.3.5. Greffage du biorécepteur

Sur le même principe, la deuxième fonction ester du ferrocène sert au greffage du biorécepteur. L'électrode est incubée dans une solution de 5PAED préparée dans PBS en utilisant les mêmes conditions de greffage (1 h, température ambiante).

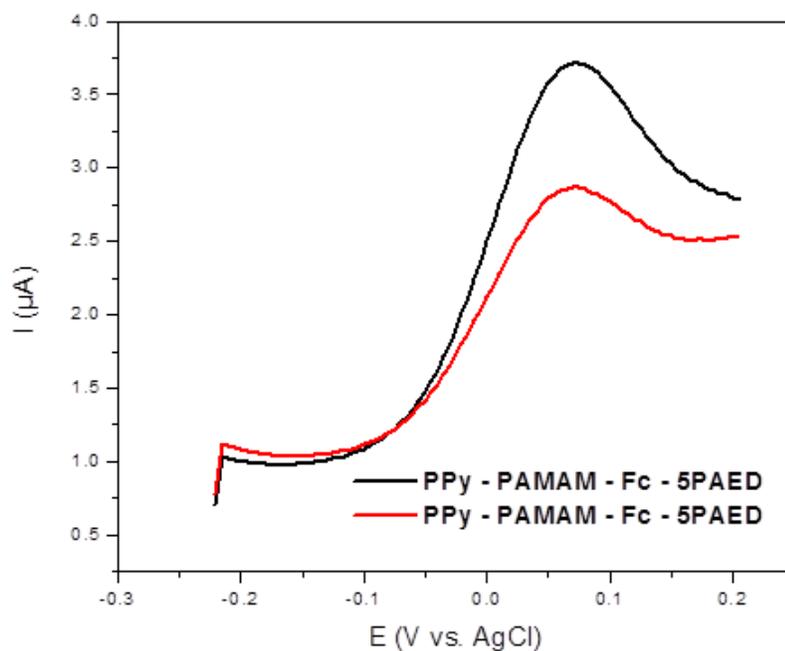


Figure 68. Analyse de la surface d'or par voltamétrie à vague carrée avant (A) et après (B) greffage du 5PAED. Conditions : PBS 10 mM / pH 7.4 / fréquence = 2 Hz.

Un signal rédox par SWV dans PBS est observé, ce qui confirme une deuxième fois la présence de la sonde rédox. Ce signal passe de 3.72 à 2.87  $\mu\text{A}$  lorsque l'on ajoute le sucre (Figure 68). Ceci est dû à l'introduction de charges négatives (groupements phosphate) à la surface de

l'électrode et dans une moindre mesure à un encombrement stérique, gênant le transfert de charges. En effet, le sucre est une petite molécule qui, en remplaçant le groupement phtalimido du ferrocène, ne devra pas trop influencer le transfert de charges. Cependant, une surface chargée négativement gêne évidemment le transfert d'électrons par répulsion électrostatique.

### 6.3.6. Blocage des esters libres du ferrocène par l'éthanolamine

Une fois le sucre greffé, on procède au greffage de l'éthanolamine toujours selon le même principe.

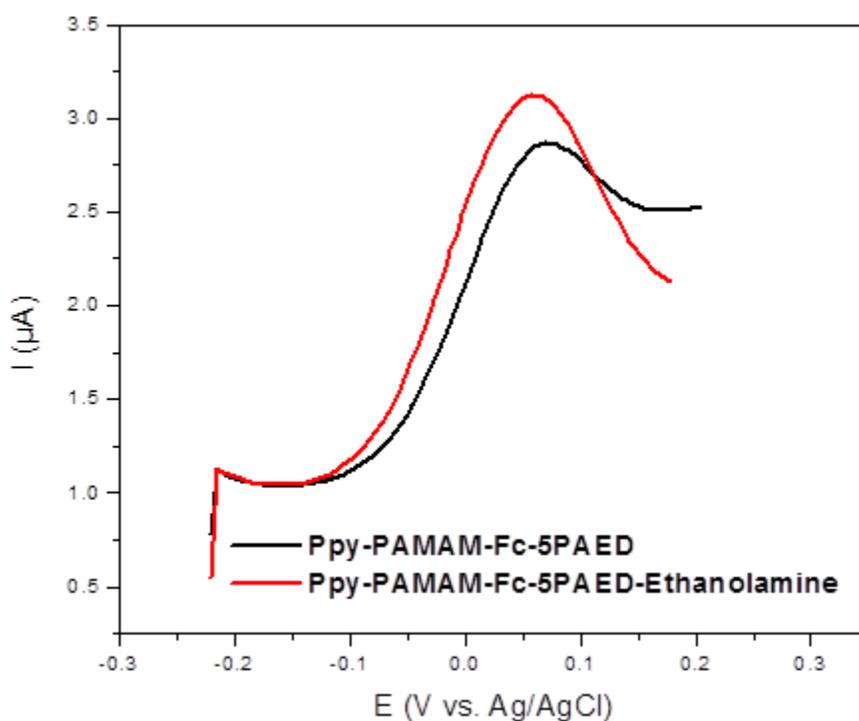


Figure 69. Analyse de la surface d'or par voltamétrie à vague carrée avant (A) et après (B) greffage de l'éthanolamine. Conditions : PBS 10 mM / pH 7.4 / fréquence = 2 Hz.

Cette étape qui correspond à la substitution des groupements phtalimido du ferrocène par l'éthanolamine a pour conséquence de diminuer la gêne stérique et donc de faciliter le transfert de charges. Cela se traduit par une augmentation du courant qui passe de 2.87 à 3.12  $\mu\text{A}$  lorsque l'on ajoute l'éthanolamine et par un déplacement du potentiel de l'ordre de 10 mV (Figure 69).

Cette baisse du potentiel est due à une diminution de l'encombrement stérique autour du ferrocène : étant sensible à son environnement, moins d'énergie est nécessaire pour pouvoir l'oxyder lorsqu'il est couplé à l'éthanolamine que lorsqu'il est sous forme d'ester de type NHP.

#### **6.4. Caractérisation des différentes étapes de construction du biocapteur**

Afin de caractériser les différentes étapes de construction de notre biocapteur, nous avons eu recours à l'analyse par microscopie à force atomique (AFM) et électronique à balayage (MEB), par spectroscopie de photoélectrons (XPS) et par infrarouge. Les échantillons ont été préparés sur des plaques d'or dont la surface ressemble à celle des électrodes tige du point de vue rugosité.

##### **6.4.1. Les résultats de l'analyse par microscopie à force atomique (AFM)**

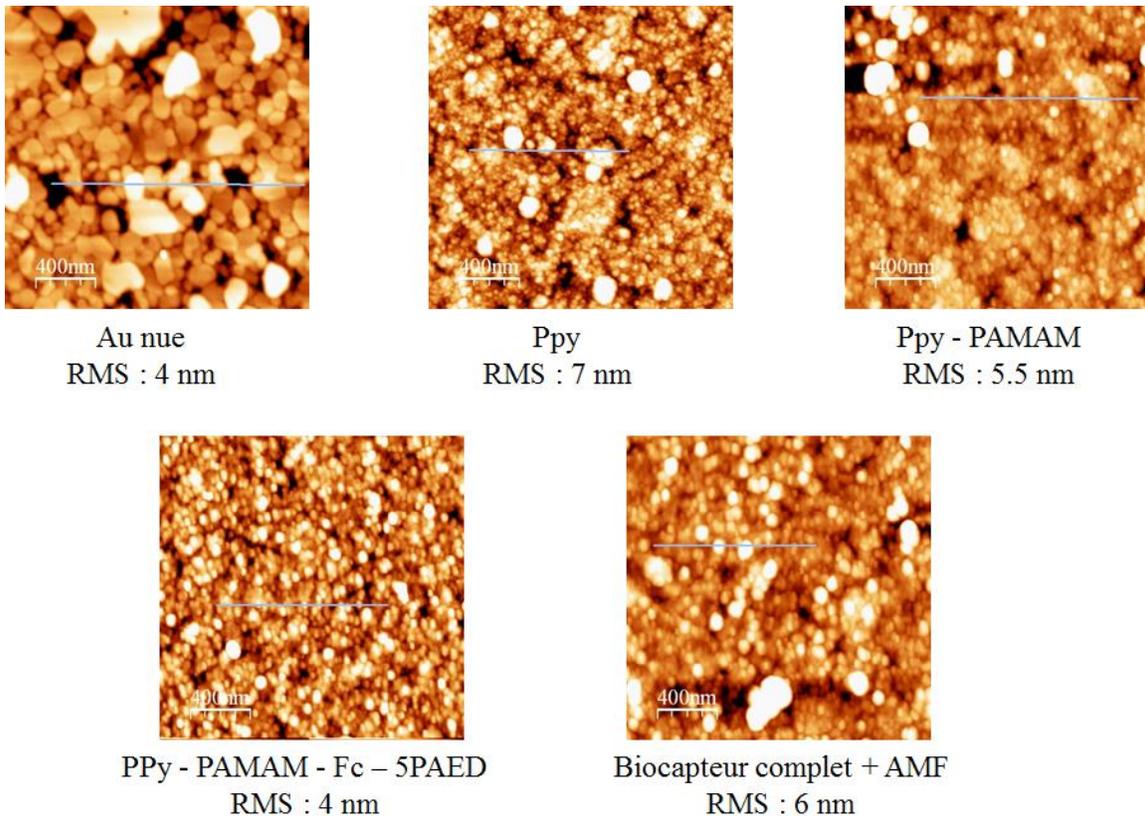


Figure 70. Images obtenues par AFM pour les différentes étapes de construction du biocapteur.

Pour mettre en évidence le dépôt de polypyrrole, une analyse d'une plaque d'or avant et après électrodéposition du pyrrole a été effectuée (Figure 70). La plaque nue sur laquelle les grains d'or sont nettement visibles se tapisse d'une couche de polymère non compacte après immobilisation du polypyrrole. Cette couche prenant un aspect nodulaire typique du polypyrrole met bien en évidence son dépôt à la surface d'or. A cela s'ajoute une augmentation de la rugosité de la surface (RMS roughness) dont la valeur passe de 4 à 7 nm. Une surface moins rugueuse est cependant observée après greffage du PAMAM : la valeur de la rugosité passe de 7 à 5.5 nm et la surface devient plus lisse. Cette valeur diminue encore davantage après greffage du ferrocène et du sucre pour atteindre 4 nm. Une fois l'enzyme déposée à la surface du biocapteur, la rugosité augmente de nouveau jusqu'à une valeur de 6 nm et la surface devient moins homogène. De plus, des agrégats de protéine sont observés : ceci est dû à la tendance de la PGI à avoir une forme multimérique, ce qui également en accord avec les résultats cristallographiques obtenus pour les complexes hPGI-5PAED et hPGI-5PAA où chaque motif est formé par 4 monomères de protéine.

#### 6.4.2. Les résultats de l'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)

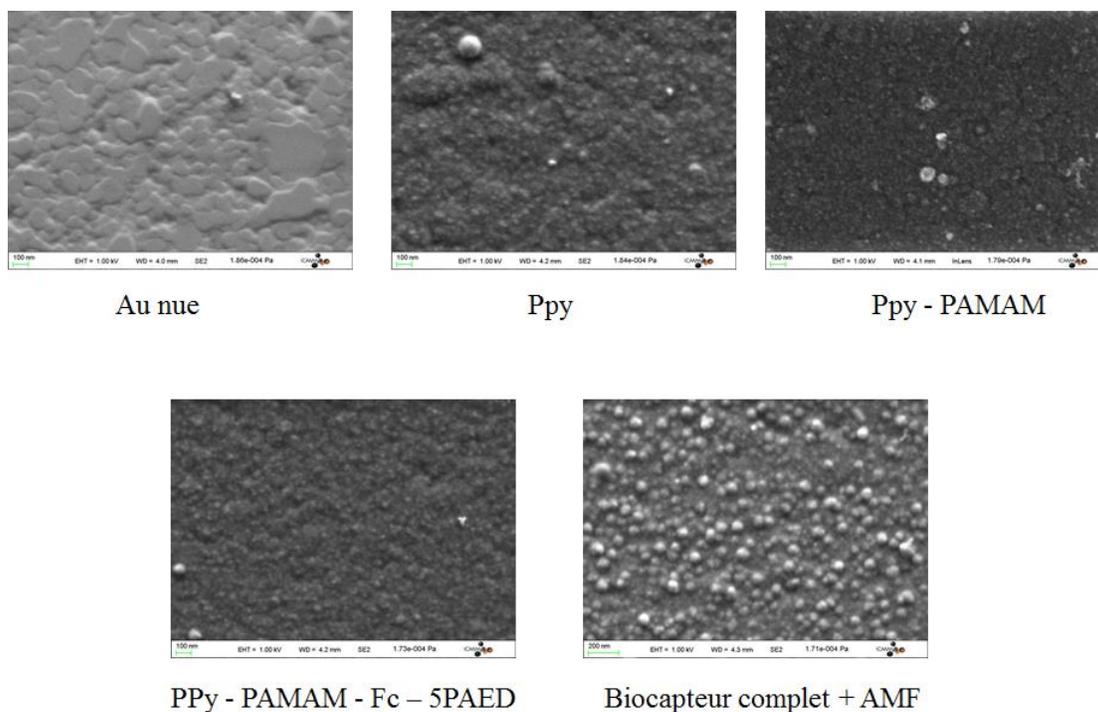


Figure 71. Images obtenues par microscopie électronique à balayage pour les différentes étapes de construction du biocapteur.

Des résultats comparables sont obtenus avec le MEB (Figure 71). Une structure en choux-fleur met en évidence le greffage du Ppy. Peu d'informations sont visibles pour le greffage du PAMAM, ferrocène et sucre, à part l'apparition d'une surface plus lisse. Cependant, un changement très remarquable de la topographie de la surface est obtenu après avoir mis l'enzyme. De petites sphères correspondant à la protéine sont nettement visibles mettant en évidence sa fixation à la surface du biocapteur.

### **6.4.3. Analyse par spectroscopie de photoélectrons**

En plus des analyses de MEB et de l'AFM, l'XPS peut apporter des informations importantes quant aux modifications des surfaces et leur composition chimique. Les spectres XPS obtenus confirment la modification de la surface par le Ppy et la modification de celui-ci par le PAMAM G2. La figure 72 montre les résultats de l'analyse XPS dans les régions carbone et azote pour les plaques d'or modifiées avec le PPy et le PPy-PAMAM. Cinq bandes sont observés après décomposition du spectre correspondant au Ppy avec des pics maximums vers 283.98 (a), 284.98 (b), 285.98 (c), 287.48 (d) et 290.58 (e) eV. Les deux pics à l'énergie la plus basse correspondent aux carbones  $\alpha$  et  $\beta$ .<sup>235</sup> Le pic « c » observé à 285.98 eV correspond aux carbones des groupes C=N ou C-N<sup>+</sup> (polaron). Quant au large pic « d » qui apparaît vers 287.48 eV, celui-ci correspond aux carbones de type C=N<sup>+</sup> (bipolaron) et les carbones des groupes C=O qui peuvent être formés par oxydation des carbones en  $\beta$  de l'azote. De plus, on peut remarquer que l'intensité des pics des carbones  $\alpha$  est supérieure à celle du pic correspondant aux carbones  $\beta$  : c'est au niveau de ces derniers que se produit probablement la fonctionnalisation du polypyrrole. Le dernier pic (e) à 290.94 eV, qui est beaucoup plus faible que les autres pics, pourrait être attribué à la transition  $\pi$ - $\pi^*$  couramment rencontrée avec les structures aromatiques et qui est caractérisée par une énergie de liaison supérieure de 6 eV de celle correspondant à la forme principale du carbone retrouvé dans la structure. D'autre part, la région azote du spectre de Ppy montre un pic principal vers 399.98 eV confirmant la présence des groupements NH et C-N neutres du polypyrrole. Une petite contribution vers 398.08 eV peut correspondre aux azotes chargés négativement N<sup>-</sup> (ou leur forme mésomère =N). Les pics de plus haute énergie vers 401.28 et 402.58 eV correspondent aux formes chargées positivement [-NH<sup>+</sup> ou =NH<sup>+</sup> (polaron / bipolaron)]. Les spectres obtenus après fonctionnalisation du Ppy par le PAMAM montrent des variations importantes au niveau des bandes du carbone et de l'azote. Pour le carbone, on

observe une augmentation de l'intensité des deux pics c et d à 286.28 et 288.28 eV correspondant respectivement aux liaisons C-N et C=O du PAMAM,<sup>236</sup> ce qui confirme sa présence à la surface du biocapteur. Dans la région de l'azote, on observe deux maximums vers 399.78 et 400.48 eV qui peuvent correspondre respectivement aux groupements -NH<sub>2</sub> et aux liaisons C-N du dendrimère. La petite contribution à 401.98 eV correspond habituellement à l'azote chargé positivement. Ces modifications observées par comparaison des spectres obtenus pour le polypyrrole non modifié et ceux obtenus après sa modification par le PAMAM confirment l'attachement covalent de ce dernier au Ppy.

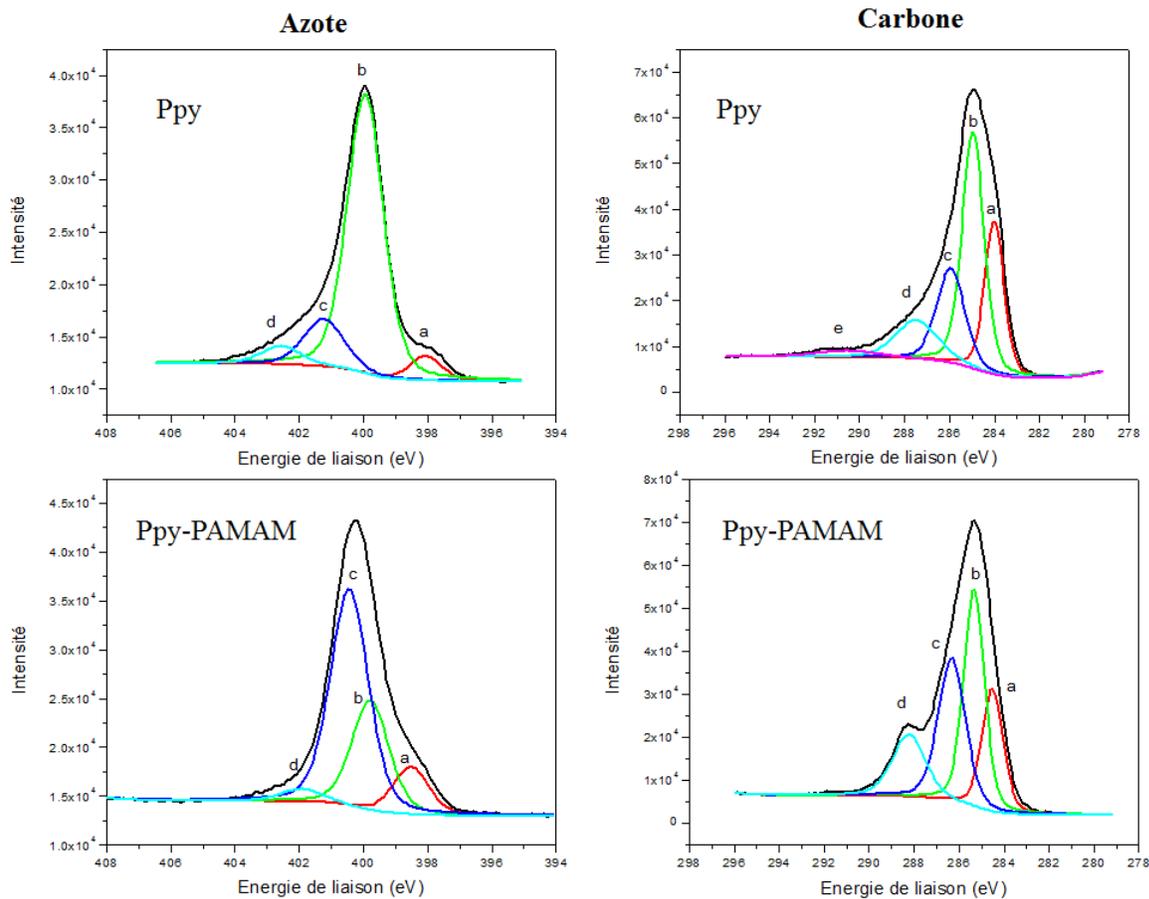


Figure 72. Résultats de l'analyse par spectroscopie de photoélectrons pour les étapes Ppy et Ppy-PAMAM dans les deux régions du carbone et de l'azote.

La figure 73 montre les résultats obtenus après greffage du ferrocène et du sucre : on remarque l'apparition de deux pics vers 708.18 et 720.98 eV caractéristiques du fer<sup>237</sup> et un pic vers 133.58

eV correspondant au phosphate. Ce dernier pic indique que l'atome de phosphore est pentavalent et correspond aux liaisons P-O.<sup>238,239</sup>

On a pu ainsi grâce à l'étude XPS mettre en évidence la présence de toutes les espèces constituant notre biocapteur.

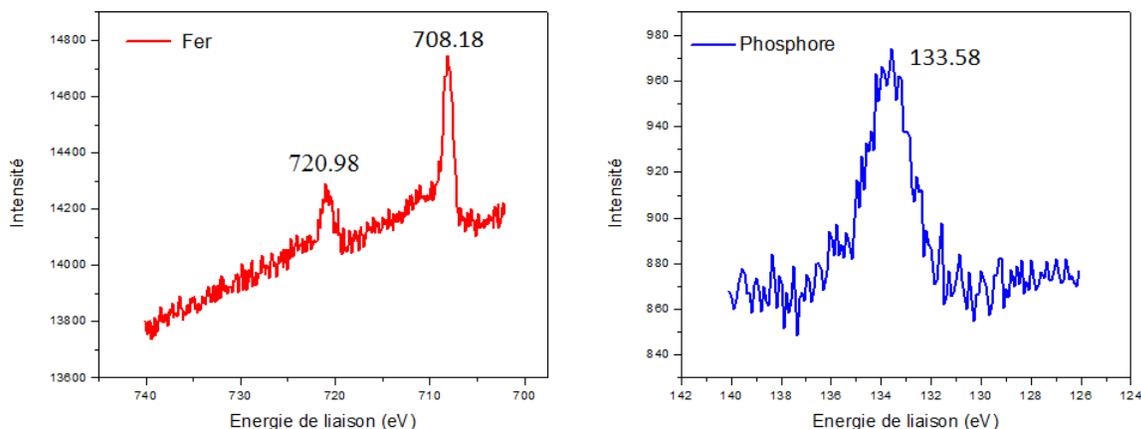


Figure 73. Spectres obtenus par XPS après greffage du ferrocène et du SPAED dans la région du fer et du phosphore.

#### 6.4.4. Analyse par spectroscopie infrarouge

L'analyse de la plaque d'or modifiée par le Ppy montre une bande vers  $1567\text{ cm}^{-1}$  caractéristiques de l'élongation des liaisons C=C ainsi que deux autres bandes vers  $1052$  et  $1299\text{ cm}^{-1}$  correspondantes à la vibration dans le plan des =CH.

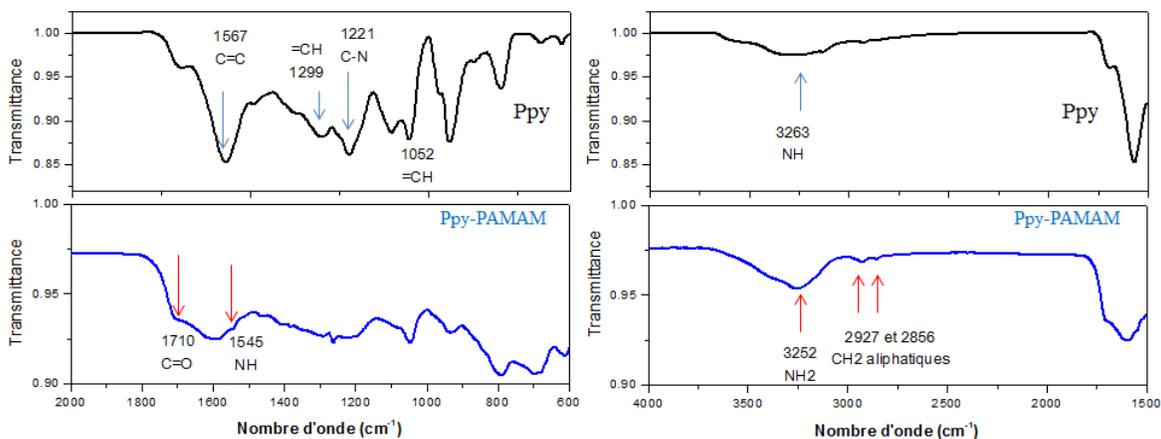


Figure 74. Spectres infrarouge à transformée de Fourier du Ppy et du Ppy modifié par le PAMAM.

Quant à l'élongation des liaisons C-N et des NH, les bandes correspondantes sont observées vers 1221 et 3264  $\text{cm}^{-1}$ . L'apparition des deux bandes amide I (C=O) et amide II (N-H) après greffage du PAMAM vers respectivement 1710 et 1540  $\text{cm}^{-1}$  témoigne de la fonctionnalisation du Ppy par ce dernier. A cela s'ajoute une augmentation de l'intensité de la bande correspondante aux  $\text{NH}_2$  qui sort au même endroit que les NH du polypyrrole. Deux bandes de très faible intensité correspondantes aux liaisons  $\text{CH}_2$  aliphatiques apparaissent après greffage du PAMAM vers 2927 et 2856  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 74).

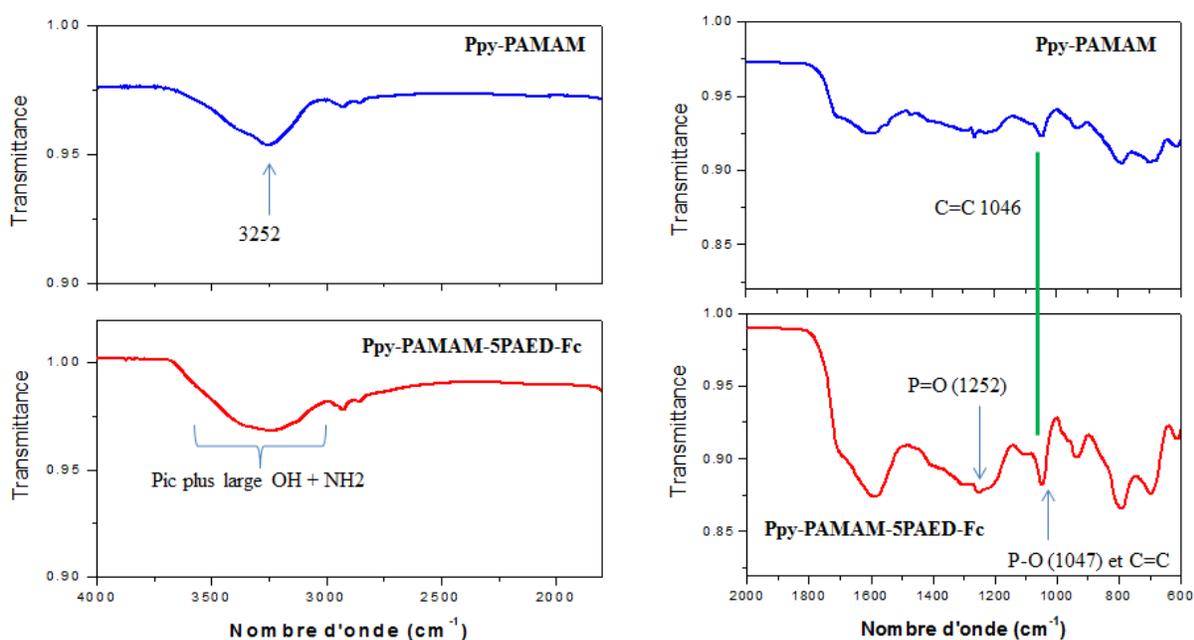


Figure 75. Comparisons du spectre infrarouge à transformée de fourier du PAMAM avec celui obtenu après greffage du ferrocène et du 5PAED (Fc-5PAED).

Peu de changements sont observés après greffage du ferrocène et du sucre qui sont de petites molécules comparativement au PAMAM qui contient tant de fonctions amines et de fonctions amides. On observe cependant un pic plus large dans la zone 3000 à 3700  $\text{cm}^{-1}$  qui peut être dû à la présence des groupements OH du sucre. Un pic vers 1046  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux C=C du polypyrrole existe déjà ce qui rend difficile de juger quant à la présence du phosphate (P-O). Un petit pic vers 1252  $\text{cm}^{-1}$  sortant dans une bande très large peut toutefois être attribué à la liaison

P=O des phosphates (Figure 75). Enfin, la protéine a été déposée sur le biocapteur complet à une concentration de 100 nM et analysée par IR : un spectre de basse qualité a cependant été obtenu, mise à part une bande très large correspondant aux bandes amide I et II caractéristiques des protéines.

## 6.5. Performances analytiques du biocapteur

### 6.5.1. Gamme de détection de l'AMF/PGI

La phosphoglucose isomérase humaine (hPGI) a été détectée dans une gamme de concentrations allant de 1 pM à 1  $\mu$ M.

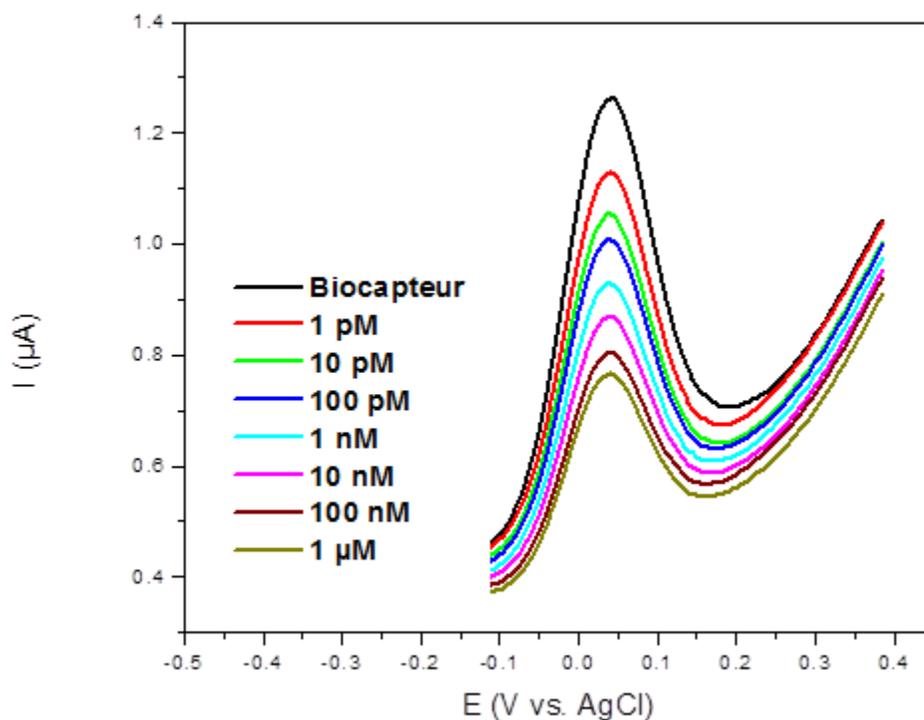


Figure 76. Voltammogramme à vague carrée montrant la gamme de détection de l'AMF.

Toutes les solutions ont été préparées dans du tampon HEPES 50 mM (pH 7.1) et mises en contact avec l'électrode pendant 10 min. Ce pH a été choisi de manière à se rapprocher au

maximum du pH physiologique compris entre 7.3 et 7.4. La détection a été suivie par voltampérométrie à vague carrée (SWV) dans du tampon PBS pH 7.4. Une diminution du signal rédox du ferrocène au fur et à mesure qu'on augmente la concentration de la PGI est observée. Les résultats obtenus sont rapportés dans la figure 76. On remarque que les intensités du courant diminuent au niveau du pic d'oxydation au fur et à mesure que la concentration de l'enzyme augmente. Cette diminution indique que le transfert de charges devient de plus en plus difficile dû à l'encombrement stérique lié à la formation du complexe enzyme-inhibiteur.

### 6.5.2. Limite de détection

La limite de détection est la plus petite concentration d'analyte pouvant être détectée. Pour la calculer et pouvoir estimer la sensibilité du biocapteur, la détection a été réalisée au total sur 5 électrodes donnant des résultats similaires.

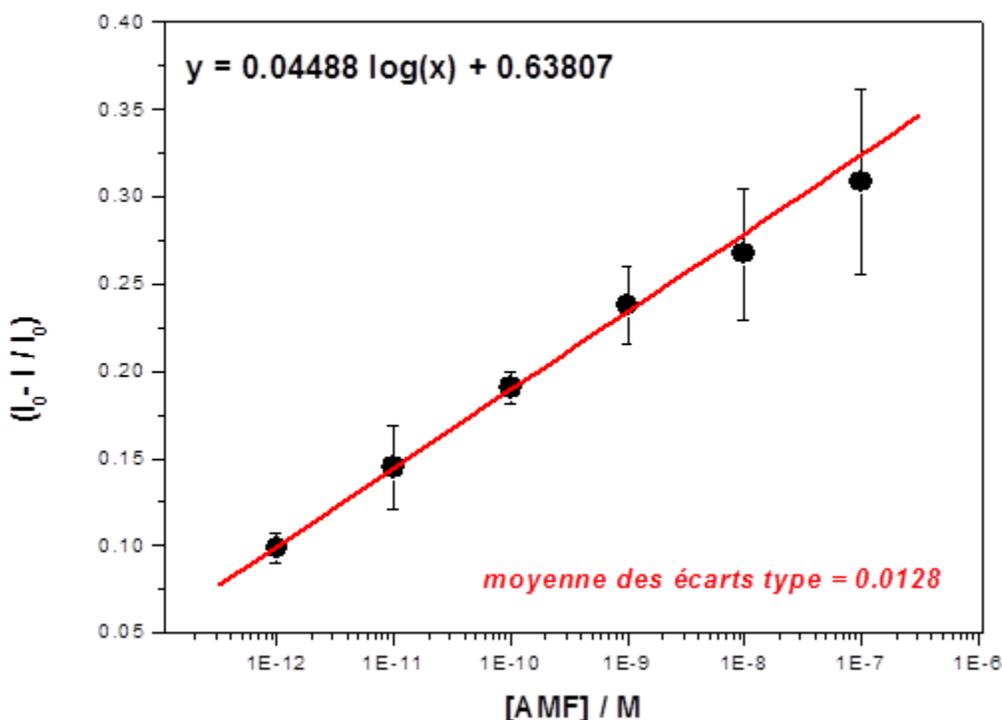


Figure 77. Courbe de calibration en échelle logarithmique établie à partir des résultats de la détection par voltamétrie à vague carrée.

Les variations du courant du pic pour chaque concentration détectée de PGI/AMF (I) par rapport à  $I_0$  ( $\Delta I/I_0$ ) sont calculées. La courbe de calibration (Figure 77) représentant ces variations en fonction de la concentration de la PGI en échelle logarithmique est une droite linéaire d'équation  $y = b(x) + a$ .

En prenant en considération la moyenne des écarts type (Sa) des mesures effectuées et la pente de la courbe de calibration (b), la limite de détection a été calculée selon la formule suivante :

$$x = 10^{(-a+3Sa)/b}$$

Le facteur 3 correspond à un risque de 0.13% de conclure à la présence de la substance à détecter alors qu'elle est absente. Une limite de détection 43fM a été calculée.

## 6.6. Sélectivité du biocapteur

Afin de tester la sélectivité du biocapteur, nous avons utilisé la ScG6PDH (glucose-6-phosphate déshydrogénase de *Saccharomyces cerevisiae*), une enzyme intervenant dans le métabolisme du G6P qui est également un substrat de la PGI.

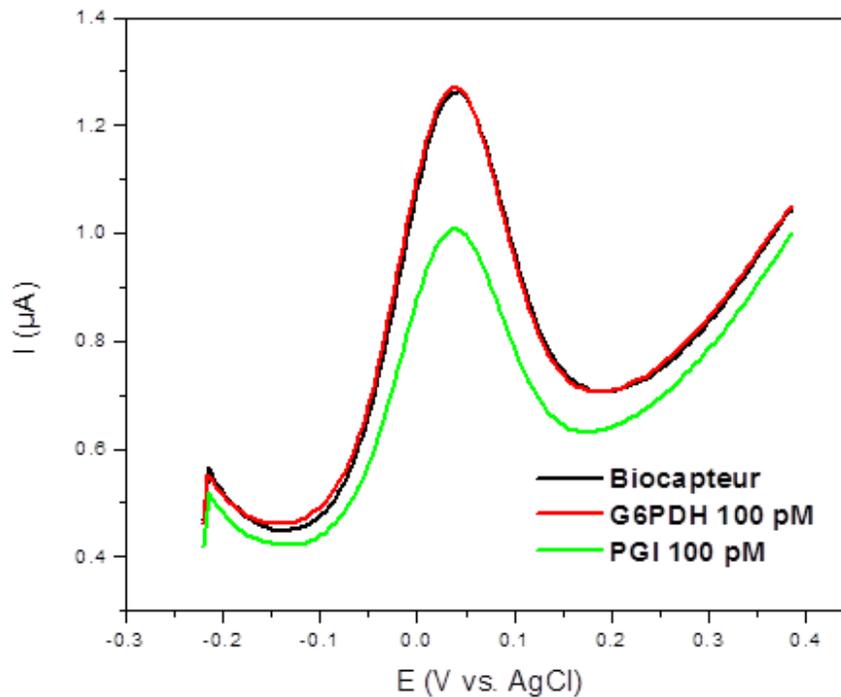


Figure 78. Voltammogramme à vague carré montrant la sélectivité du biocapteur vs. de l'AMF par rapport à la G6PDH utilisées à 100 pM.

Tout comme pour la phosphoglucose isomérase, la solution de la glucose-6-phosphate déshydrogénase a été préparée dans du tampon HEPES / pH 7.1 et mise en contact avec le biocapteur pendant 10 min à température ambiante. Une concentration de 100 pM a été testée. Après incubation, l'électrode est ensuite analysée par voltampérométrie à vague carrée. La figure 78 montre la superposition des courbes obtenues après incubation du biocapteur dans 100 pM de G6PDH et 100 pM de hPGI. Les résultats montrent que le signal du ferrocène n'est pas modifié après incubation de l'électrode avec la G6PDH. Une diminution du signal est cependant observée dans le cas de la PGI mettant en évidence la sélectivité de notre biocapteur.

## **7. Bilan : preuve de concept validé**

Nous avons élaboré pour la première fois, un biocapteur à base d'un inhibiteur de nature saccharidique pour la détection de l'AMF/hPGI, surexprimée et purifiée dans le cadre de ce travail. Ce biocapteur a été élaboré avec un inhibiteur compétitif de la réaction catalysée par la PGI, le 5PAED, ayant une grande affinité vis-à-vis de la protéine. Le transducteur est constitué d'un matériau conducteur, le polypyrrole, déposé sur une électrode d'or, puis fonctionnalisé avec du PAMAM G2. La sonde interne (ferrocène modifié) et le biorécepteur (5PAED) ont été successivement greffés par voie chimique, suivi par un blocage des fonctions esters libres du ferrocène avec de l'éthanolamine. Toutes les étapes de construction du biocapteur ont été caractérisées et ont démontré une haute reproductibilité. Les performances du biocapteur ont été évaluées dans du PBS dans une gamme dynamique de détection s'étendant de 1pM à 1µM. Une limite de détection 43 fM a été démontrée.

Le biocapteur possède une sonde interne, ce qui est plus appropriée pour une application dans le domaine médical. La sonde étant déjà intégrée, il ne suffit que d'ajouter une goutte de sang à analyser.

En comparaison avec le biocapteur réalisé pour la détection de la PGI du muscle de lapin en utilisant le F6P comme biorécepteur (Tableau 12), nous pouvons constater plusieurs différences.

Tableau 12. Comparaison des propriétés des biocapteurs à base du F6P et à base du SPAED pour la détection de RmPGI et de hPGI respectivement.

	Propriétés du biocapteur		Greffage du biorécepteur
	Biorécepteur ( $K_i$ )	Limite de détection	Conditions : concentration, temps et $T^\circ$
<b>Détection de la PGI du muscle de lapin</b> <sup>172</sup>	<b>F6P</b> <b>(substrat)</b>	6.6 fM	6 mM, une nuit 50°C
	$K_m = 50 \pm 10 \mu\text{M}$		
<b>Détection de l'AMF/PGI humaine</b>	<b>SPAED</b> <b>(inhibiteur)</b>	43 fM	1 $\mu\text{M}$ , 1 h, $T^\circ$ ambiante
	$K_i$ (compétitif) $= 0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$ $K_m/K_i = 71$		

La limite de détection est assez proche de celle obtenue avec le biocapteur à base du F6P malgré que le SPAED soit 71 fois plus affin pour l'enzyme que son substrat. Ceci peut être expliqué par la perte de 3 liaisons hydrogène au niveau de l'azote terminal. On souligne cependant l'avantage de la rapidité. En effet, le biocapteur réalisé avec le F6P nécessitait une heure de contact avec l'échantillon contenant la protéine pour pouvoir procéder à la détection. Notre approche ne nécessite que 10 min. De même que pour le temps nécessaire à la conception du biocapteur : deux jours étaient nécessaires pour la réalisation du biocapteur à base de F6P en raison d'un greffage d'une nuit complète à 50 °C pour le sucre. Nous avons réalisé le greffage du SPAED en une heure et à température ambiante. Outre cela, nous n'avons utilisé qu'une faible concentration de sucre (1  $\mu\text{M}$ ), alors que l'approche précédente nécessitait une concentration de 6 mM, soit 6000 fois plus. Ce biocapteur présente un bon potentiel. Il est probablement possible de l'optimiser pour obtenir une meilleure limite de détection.

Concernant les perspectives de développement de ce biocapteur, nous pourrions envisager l'optimisation du greffage du ferrocène en augmentant sa concentration de façon à ce qu'elle soit proportionnelle au nombre de fonctions amines en surface du PAMAM G2. Une autre nécessité sera d'augmenter la concentration du sucre : une concentration de 1  $\mu\text{M}$  est peut-être insuffisante pour fixer une couche dense de sucre et détecter des concentrations très faibles d'enzyme. Dans le but d'augmenter davantage la surface active du biocapteur et d'abaisser la limite de détection, nous pouvons également envisager l'utilisation du PAMAM G4 (64 amines) à la place du PANAM G2 (16 amines).

## **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**



Ce projet de thèse a comporté cinq aspects :

- 1- Une partie synthèse organique : 12 analogues de l'IHE commun des réactions catalysées par les PMIs de type I et les PGIs, mais non mimes de sa fonction ènediolate, ont été synthétisés en une seule étape à partir du même synthon 5PAL. Dans un but de comparaison, le 5PAA et le 5PAH ont été également synthétisés.
- 2- Une partie surexpression et purification de protéines : la PMI de *Candida albicans* et la PGI humaine ont été surexprimées et purifiées.
- 3- Une partie évaluation cinétique : les propriétés inhibitrices des différents composés synthétisés ont été évaluées tout d'abord sur EcPMI et RmPGI commerciales et ensuite sur CaPMI et hPGI surexprimées et purifiées.
- 4- Une partie cristallisation de complexes enzyme-inhibiteur : cette étude a abouti à l'obtention des trois structures 3D à haute résolution des complexes CaPMI-5PAHz, hPGI-5PAED et hPGI-5PAA dont les deux premières sont originales.
- 5- Une partie électrochimie à visée diagnostique : un biocapteur électrochimique à base de 5PAED a été élaboré pour la détection de la PGI humaine , *un biomarqueur de cancer métastatique*.

Tous les inhibiteurs synthétisés ont été obtenus avec un rendement quantitatif. De nouveaux inhibiteurs micromolaires des PGI ont été découverts avec des  $IC_{50}$  allant de 1 à 30  $\mu$ M. Les meilleurs inhibiteurs sont 5PAED (**11**) et 5PADP (**12**) portant une fonction amine terminale au niveau de la partie tête ainsi que le dérivé furane 5PAF (**8**). Ils sont tous toutefois de très mauvais inhibiteurs de la PMI qui ne semble accepter que des analogues strictes du substrat (en terme de taille) ou de l'IHE de type 1,2-*cis*-ènediolate.

Une structure 3D à haute résolution (1.8 Å) du complexe CaPMI-5PAHz a été déposée dans le PDB (5NW7). Elle constitue la première structure décrite de l'enzyme avec un inhibiteur au site actif. Grâce à cette structure, nous avons pu identifier l'ensemble des résidus du site actif, leurs emplacements tridimensionnels et le rôle de chacun d'eux dans l'ancrage du substrat ou de l'IHE. Cette structure a permis également de découvrir le mode de chélation du zinc par le substrat ou l'IHE. Une chélation de type bidentate a été démontrée mettant en évidence le rôle catalytique du zinc. Celui-ci, en polarisant la liaison C=O du substrat, facilite la déprotonation en

C1 ou C2 du substrat F6P/M6P. La nature de la base catalytique impliquée dans la réaction catalysée par la PMI de *C.albicans* (et les PMIs de type I) a pu également être identifiée. Le résidu du site actif impliqué dans la catalyse acido-basique de l'isomérisation F6P-M6P est un glutamate (Glu294). La reprotonation se fait en position proS sur C1 (face Si) de l'IHE pour donner le F6P.

De même, la structure du complexe hPGI-5PAED a été obtenue avec une résolution de 2.4 Å. Cette structure s'ajoute à la structure du complexe hPGI-5PAA existant dans la littérature et constitue une autre preuve quant à la nature de la base catalytique de la réaction catalysée par les PGIs (Glu357). Nous avons pu identifier, d'après cette étude structurale, le mode d'interaction du 5PAED au sein du site actif de hPGI. Le groupement NH<sub>2</sub> du 5PAED est non protoné au site actif et est le siège de trois liaisons hydrogène via l'atome d'azote. Par contre, les études de cristallisation menées sur 5PADP (**12**), 5PAED (**11**) et 5PAF (**8**) ont montré la présence du 5PAA au site actif de la PGI. Une étude de stabilité de ces inhibiteurs en solution aqueuse par spectroscopie de RMN du <sup>13</sup>C a montré que le 5PADP et le 5PAED ne sont pas stables et s'hydrolysent lentement dans D<sub>2</sub>O pour donner le 5PAA. Les études cinétiques du 5PADP, comme celles du 5PAED, que nous avons menées restent cependant valables, considérant que la mesure de l'IC<sub>50</sub> est rapide (< 1 h) et que les solutions d'inhibiteurs sont maintenues à 0 °C avant la mesure, diminuant ainsi le risque d'hydrolyse. Le 5PAF, pourtant stable en solution aqueuse, n'a pas pu être identifié entièrement au site actif de la hPGI, sans doute à cause de la mobilité de sa partie tête méthylfurane.

La structure du complexe hPGI-5PAA a été obtenue avec une résolution meilleure (1.95 Å) que celle rapportée par Davies et al. en 2003 (2.5 Å). Elle a permis d'obtenir une vue plus précise et détaillée des interactions engendrées par celui-ci au site actif qui font intervenir un réseau complexe de molécules d'eau.

Finalement, un biocapteur à base de 5PAED a été élaboré pour la détection du facteur de motilité autocrine AMF (PGI humaine) qui constitue un biomarqueur de cancer métastatique validé. La PGI humaine a été détectée dans un tampon phosphate avec une limite de détection de 43 fM.

Les perspectives à court terme de ce travail sont nombreuses et consisteront à :

- 1- Réaliser des tests biologiques « in vivo » des inhibiteurs de l'AMF-PGI les plus prometteurs sur du sérum de patients sains et métastatiques afin d'évaluer leur potentiel anti-métastatique (collaboration avec l'Institut Gustave Roussy à Villejuif).
- 2- Optimiser le biocapteur élaboré pour la détection de l'AMF-PGI en augmentant la concentration du ferrocène et du 5PAED et/ou en utilisant le PAMAM G4 au lieu du PAMAM G2 dans le but d'abaisser la limite de détection.
- 3- Poursuivre les essais de cristallisation de CaPMI avec l'un de ces substrats ( $\beta$ F6P ou  $\beta$ M6P) afin de valider l'étape d'ouverture cyclique.
- 4- Obtenir le mutant de CaPMI au niveau du Glu294 et tester l'activité enzymatique du mutant afin de confirmer le rôle attribué à ce résidu.
- 5- Concevoir des inhibiteurs efficaces et spécifiques de CaPMI mimes du substrat linéaire et incluant un ligand bidentate du zinc non-analogue de la fonction 1,2-*cis*-enediolate (modélisation moléculaire par SIBFA, collaboration Dr. Nohad Gresh, LCT-UPMC).
- 6- Concevoir des phosphoanalogues (malonates, phosphonates...) des meilleurs inhibiteurs de CaPMI en vue de leur évaluation antifongique.



**PARTIE EXPERIMENTALE**



## 1. Synthèse organique

### 1.1. Matériels et méthodes

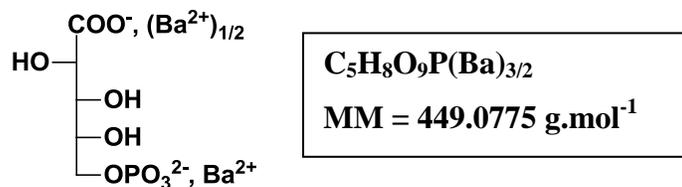
Les spectres de **résonance magnétique nucléaire** du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrés sur trois appareils Bruker DPX 250, DPX 300 et Avance 360 : les fréquences respectives sont de 250, 300 et 360 MHz pour le proton  $^1\text{H}$  et de 62.5, 75 et 90 MHz pour le carbone  $^{13}\text{C}$ . Les spectres de RMN du  $^{31}\text{P}$  ont été enregistrés sur les appareils DPX 250 et DPX 300 à 101.2 MHz et 121.5 MHz respectivement. Les calibrations ont été effectuées en fonction du solvant utilisé ( $\text{D}_2\text{O}$ ) sauf pour les spectres du  $^{31}\text{P}$  pour lesquels la référence est interne à l'appareil. Les spectres **infrarouge** à Transformée de Fourier ont été enregistrés sur un ATR utilisant un cristal de germanium. Les spectres d'absorption **UV-visible** ont été enregistrés à 340 nm (cuves semi-micro PS pour spectrophotométrie à usage unique, volume = 1.5 mL) sur un spectrophotomètre Cary 300. Les analyses par spectrométrie de masse basse résolution (**SM**) ont été réalisées par électrospray en mode d'ionisation négative sur des solutions eau-méthanol (1:1) à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de produit. Les évaporations de l'eau sous pression réduite ont toujours été effectuées à une température inférieure à  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tous les produits finaux ont été lyophilisés et conservés à  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ . Les produits commerciaux ont été utilisés sans purification supplémentaire.

### 1.2. Synthèse des différents composés

Cf. pages suivantes.

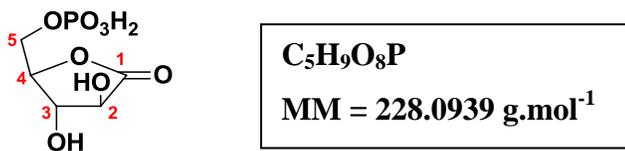
### 1.2.1. Synthèse de la 5-PAL<sup>160,162</sup>

#### a) 5-Phospho-D-arabinonate (5PAA) sous forme de sel de barium



Dans un ballon bicol de 50 mL contenant 1 g (1.96 mmol ; 1 éq) de 6-phosphate D-glucose de sodium sont ajoutés 12 mL de NaOH (0.5 N ; 3 éq). L'ensemble est purgé 5 fois avec de l'oxygène et agité vigoureusement sous O<sub>2</sub> pendant 72 h. La réaction est ensuite arrêtée et le pH de la solution ajusté à 1.5 avec du HCl concentré (12 M). La solution est barbotée avec un courant d'azote pendant 20 min afin de se débarrasser de l'acide formique dissous puis neutralisée à pH = 5 avec une solution saturée d'hydroxyde de barium [Ba(OH)<sub>2</sub>]. Ensuite, le sel de barium est précipité par addition de deux volumes d'éthanol absolu. La solution est laissée une nuit au frigo. Après filtration sur un fritté n°3, le solide blanc est rincé à l'éthanol absolu puis à l'éther diéthylique et laissé sécher à l'air libre. Après dessiccation sous vide sous P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, le produit est obtenu avec un rendement de 79%.

#### b) 5-Dihydrogénophosphate-D-arabinono-1,4-lactone (5PAL)



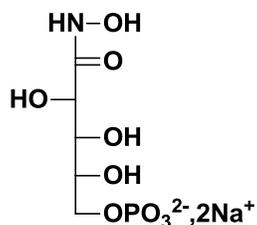
Le 5-phospho-D-arabinonate sous forme de sel de barium est repris dans 2.5 mL d'eau et agité avec 1 g de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme H<sup>+</sup> préalablement rincée à l'eau. Après dissolution complète, la solution est déposée sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme H<sup>+</sup> et éluée avec de l'eau. 100 mL d'éluat sont récupérés et évaporés sous pression réduite. Après dessiccation sous P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, le produit est obtenu avec un rendement global de 77%.

#### RMN <sup>13</sup>C (250 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 175.5 (C-1), 79.1 (d, C-4, J<sub>C<sub>4</sub>,P</sub> = 7.4 Hz), 73.4 (C-3), 72.2 (C-2), 63.2 (d, C-5, J<sub>C<sub>5</sub>,P</sub> = 3.7 Hz)

## 1.2.2. Synthèse du 5PAH<sup>160,186</sup>

### Acide 5-phosphate-D-arabinonohydroxamique



A une solution de 35 mg (0.153 mmol) de 5PAL dans 3 mL d'eau distillée sont ajoutés 94  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse d'hydroxylamine à 50%. Après agitation pendant 10 min, la solution est évaporée sous pression réduite. Le résidu est repris dans de l'eau et échangé sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme sodique. La solution ainsi obtenue est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide beige avec un rendement quantitatif.

#### RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

$\delta$  4.48 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 3.93-3.95 (m, 1H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>), 3.74-3.78 (m, 1H, H<sub>5</sub>) ppm

#### RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

$\delta$  171.5 (C-1), 70.9 (C-3), 70.3 (C-2), 69.8 (d, C-4,  $J_{\text{C}_4,\text{P}} = 5.8 \text{ Hz}$ ), 65.0 (d, C-5,  $J_{\text{C}_5,\text{P}} = 3.8 \text{ Hz}$ ) ppm

RMN <sup>31</sup>P (300 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  4.7 ppm

#### SM-HR (ESI-)

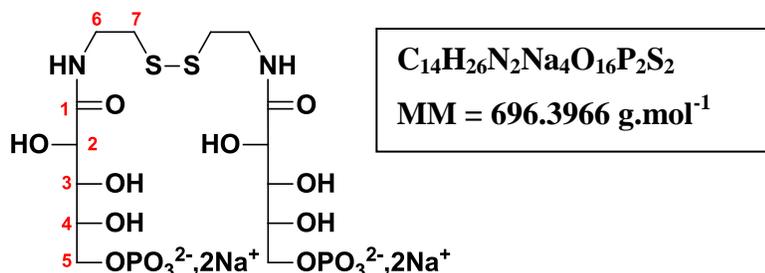
Masse calculée pour  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_9\text{P} [\text{M}-2\text{Na}+\text{H}]^- = 260.0172$ , masse trouvée = 260.0179

#### IR-FT

$\nu$  3200-3500 (OH, NH), 2890 (CH), 1644 (C=O), 1564 (NH), 1080 (P-O et C-O) et 978 (P-O)  $\text{cm}^{-1}$

### 1.2.3. Synthèse du 5PACystine (1')

#### LMA54 : bis[N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-(thio)ethanamine]



A une solution de 70 mg (0.307 mmol) de 5PAL dans 3 mL de méthanol anhydre sont ajoutés 119 mg de 2-(aminoethyl)thiol (1.54 mmol, 5 éq) solubilisés dans 2 mL de MeOH anhydre. L'ensemble est agité à température ambiante pendant 1.5 h. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans 2 mL d'eau. La solution est par la suite échangée sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme Na<sup>+</sup>. La solution ainsi obtenue est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide brun avec un rendement quantitatif.

*In a round-bottom flask placed under argon, containing D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (70 mg, 0.307 mmol) in anhydrous methanol, 119 mg of 2-(aminoethyl)thiol (1.54 mmol, 5 eq) dissolved in 2 mL of anhydrous MeOH were added. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h. Following concentration of the reaction mixture, the residue was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column (Na<sup>+</sup> form) and lyophilized to afford the desired product with quantitative yield.*

#### RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 4.40 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 3.47-3.94 (m, 1H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>5'</sub>+H<sub>6</sub>+H<sub>6'</sub>), 2.84 (t, 2H, J=5.7 Hz, H<sub>7</sub>) ppm

#### RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 176.2 (C-1), 71.1 (C-3 et C-2), 70.1 (d, C-4, J<sub>C<sub>4</sub>,P</sub> = 4.9 Hz), 65.1 (d, C-5), 37.9 (C6) et 36.6 (C7) ppm

RMN <sup>31</sup>P (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : 4.65 ppm

#### SM-HR (ESI-)

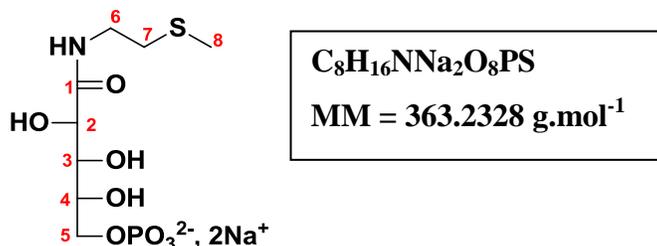
Masse calculée pour C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>16</sub>P<sub>2</sub>S<sub>2</sub> [M-4Na+3H]<sup>-</sup> = 607.0434, masse trouvée = 607.0434

#### IR-FT

ν 3200-3500 (OH, NH), 2800-2897 (CH, CH<sub>2</sub>), 1642 (C=O), 1543 (NH), 1087 (P-O, C-O, C-N) et 977 (P-O) cm<sup>-1</sup>

### 1.2.4. Synthèse du 5PAMCystéamine (2)

#### LMA 84 : N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-(methylsulfanyl)ethanamine



A une solution de 96 mg (0.42 mmol) de 5PAL dans 5 mL de méthanol anhydre sont ajoutés 0.15 mL de 2-(methylsulfanyl)ethylamine (1.6 mmol, 3.8 éq). L'ensemble est agité à température ambiante pendant 1.5 h. Le solvant est évaporé sous pression puis le résidu est repris dans de l'eau et échangé par la suite sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme  $Na^+$ . La solution ainsi obtenue est lyophilisée pour donner quantitativement le produit attendu sous forme d'un solide blanc.

*In a round-bottom flask placed under argon, containing D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (96 mg, 0.42 mmol) in anhydrous methanol (5 mL), 0.15 ml of 2-(methylsulfanyl)ethylamine (1.6 mmol, 3.8 eq) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h. Following concentration of the reaction mixture, the residue was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column ( $Na^+$  form). Then, the solution was lyophilized to afford the desired product with quantitative yield.*

#### **RMN $^1H$ (300 MHz, $D_2O$ )**

$\delta$  4.38 (s, 1H,  $H_2$ ), 3.76-3.93 (m, 1H,  $H_3+H_4+H_5+H_5'$ ), 3.41 (m, 2H,  $H_6$ ), 2.62 (m, 2H,  $H_7$ ), 2.06 (s, 3H,  $H_8$ ) ppm

#### **RMN $^{13}C$ (300 MHz, $D_2O$ )**

$\delta$  175.5 (C-1), 70.9 (C-3), 70.7 (C-2), 69.8 (C-4), 65.1 (C-5), 37.9 (C-6), 32.4 (C7), 14.2 (C-8) ppm

**RMN  $^{31}P$  (300 MHz,  $D_2O$ )** : 4.7 ppm

#### **SM-HR (ESI-)**

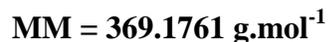
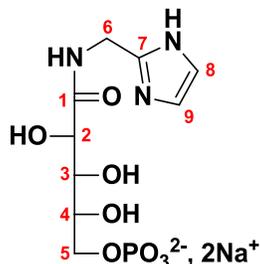
Masse calculée pour  $C_8H_{17}NO_8PS [M-2Na+H]^-$  = 318.0413, masse trouvée = 318.0420

#### **IR-FT**

$\nu$  3200-3500 (OH, NH), 2800-2990 (CH,  $CH_2$ ), 1643 (C=O), 1541 (NH), et 1086 (P-O, C-O) et 976 (P-O)  $cm^{-1}$

### 1.2.5. Synthèse du 5PAIm (3)

#### LMA 82 : N-[(5-phosphate-D-arabinoyl)-1-(imidazol-2-yl)methanamine



A une solution de 55 mg (0.24 mmol) de 5-PAL dans 5 mL de méthanol anhydre sont ajoutés 102 mg de 2-(aminométhyl)imidazole (1.05 mmol, 4.38 éq) dissous dans 1 mL de méthanol. L'ensemble est agité à température ambiante pendant 1.5 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans de l'eau et échangé par la suite sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme Na<sup>+</sup>. La solution ainsi obtenue est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif.

*In a round-bottom flask placed under argon, containing D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (55 mg, 0.24 mmol) in anhydrous methanol (5 mL), 102 mg of 2-(aminomethyl)imidazole (1.05 mmol, 4.38 eq) dissolved in 1 mL of anhydrous methanol were added. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h. Following concentration of the reaction mixture, the residu was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column (Na<sup>+</sup> form). Then, the solution was lyophilized to afford the desired product with quantitative yield.*

#### RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 6.96 (m, 1H, H<sub>8</sub>+H<sub>9</sub>), 4.45 (m, 1H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>+H<sub>6'</sub>), 3.78-3.99 (m, 1H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>5'</sub>) ppm

#### RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 176.0 (C-1), 144.8 (C-7), 122.0 (C-8 et C-9), 71.0 (C-3), 70.9 (C-2), 69.9 (d, J<sub>C<sub>4</sub>,P</sub> = 4.6 Hz), 65.0 (C-5), 36.3 (C6) ppm

RMN <sup>31</sup>P (250 MHz, D<sub>2</sub>O) : 4.9 ppm

#### SM-HR (ESI-)

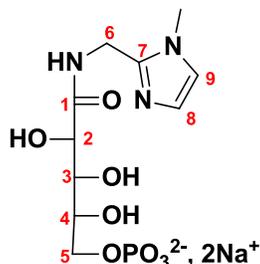
Masse calculée pour C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>P [M-2Na+H]<sup>-</sup> = 324.0597, masse trouvée = 324.0600

#### IR-FT

ν 3200-3500 (OH, NH), 2820-3000 (CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>aromatiques</sub>), 1652 (C=O), 1544 (NH), 1436 (C=C), 1089 (P-O, C-O, C-N), 975 (P-O) cm<sup>-1</sup>

### 1.2.6. Synthèse du 5PAMIm (4)

#### LMA 88 : N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-1-(1-methylimidazol-2-yl)methanamine



A une solution de 21 mg (0.09 mmol) de 5PAL dans 3 mL de méthanol anhydre sont ajoutés 50 mg de (1-méthyl-1*H*-imidazol-2-yl)méthanamine (0.432 mmol, 4.8 éq). L'ensemble est agité à température ambiante pendant 1.5 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite, puis le résidu est repris dans de l'eau et échangé par la suite sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme Na<sup>+</sup>. La solution ainsi obtenue est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide brun avec un rendement quantitatif.

*In a round-bottom flask placed under argon, containing D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (21 mg, 0.09 mmol) in anhydrous methanol (3 mL), 50 mg of (1-methyl-1*H*-imidazol-2-yl)methanamine (0.432 mmol, 4.8 eq) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h. Following concentration of the reaction mixture, the residue was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column (Na<sup>+</sup> form). Then, the solution was lyophilized to afford the desired product with quantitative yield.*

#### RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 6.97 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 6.83 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 4.40-4.43 (m, 1H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>+H<sub>6'</sub>), 3.72-3.88 (m, 1H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>5'</sub>), 3.50 (s, 2H, H<sub>10</sub>) ppm

#### RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 176.6 (C-1), 144.5 (C-7), 126.0 (C-8), 122.8 (C-9), 71.5 (C-3), 71.2 (C-2), 70.3 (d, C-4, J<sub>C<sub>4</sub>,P</sub> = 5.2 Hz), 65.2 (C-5), 35.0 (C-6), 32.5 (C-10) ppm

RMN <sup>31</sup>P (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : 4.8 ppm

#### SM-HR (ESI-)

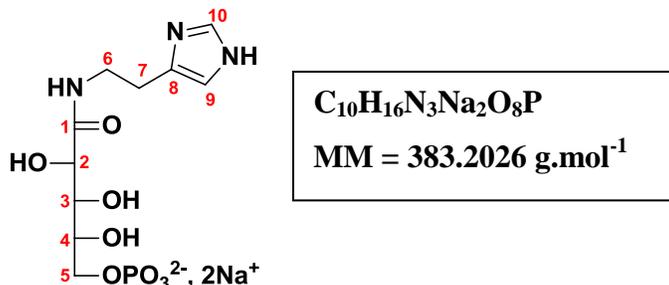
Masse calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>P [M-2Na+1H]<sup>-</sup> = 338.0754, masse trouvée = 338.0756

#### IR-FT

ν 3200-3500 (OH, NH), 2800-3000 (CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>aromatiques</sub>), 1648 (C=O), 1534 (NH), 1417-1451 (C=C), 1091 (P-O, C-O, C-N), 977 (P-O) cm<sup>-1</sup>

### 1.2.7. Synthèse du 5PAHis (5)

#### LMA 77 : N-(5-phosphate-D-arabinoyl)histamine



A une solution de 96 mg (0.42 mmol) de 5PAL dans 5 mL de méthanol anhydre sont ajoutés 184 mg d'histamine (1.68 mmol, 4 éq) dissous dans 1 mL de méthanol anhydre. L'ensemble est agité à température ambiante pendant 1.5 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite, puis le résidu est repris dans de l'eau et échangé par la suite sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme Na<sup>+</sup>. La solution ainsi obtenue est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide beige avec un rendement de 80%.

*In a round-bottom flask placed under argon, containing D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (96 mg, 0.42 mmol) in anhydrous methanol (5 mL), 184 mg of histamine (1.68 mmol, 4 eq) dissolved in 1 mL of anhydrous methanol were added. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h. Following concentration of the reaction mixture, the residue was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column (Na<sup>+</sup> form). Then, the solution was lyophilized to afford the desired product (yield = 80%).*

#### RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 7.64 (s, 1H, H<sub>10</sub>), 6.86 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 4.34 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 3.90-3.92 (m, 1H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>5'</sub>), 3.40 (s, 2H, H<sub>6</sub>), 2.72 (s, 2H, H<sub>7</sub>) ppm

#### RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 175.3 (C-1), 135.7 (C-10), 134.3 (C-8), 117.0 (C-9), 70.9 (C-3), 70.7 (C-2), 69.9 (d, C-4, J<sub>C<sub>4</sub>,P</sub> = 5.2 Hz), 65.0 (C-5), 38.8 (C-6), 25.8 (C-7) ppm

RMN <sup>31</sup>P (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : 4.8 ppm

#### SM-HR (ESI-)

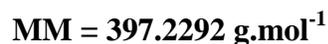
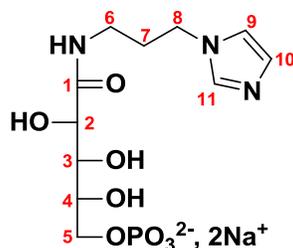
Masse calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>8</sub>P [M-1Na]<sup>-</sup> = 362.073, masse trouvée = 362.0715

#### IR-FT

ν 3200-3500 (OH, NH), 2850-3000 (CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>aromatiques</sub>), 1642 (C=O), 1547 (NH), 1434 (C=C), 1085 (P-O, C-O, C-N), 974 (P-O) cm<sup>-1</sup>

### 1.2.8. Synthèse du 5PAPIm (6)

#### LMA 66 : N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-3-(imidazol-1-yl)propanamine



A une solution de 89 mg (0.39 mmol) de 5PAL dans 5 mL de méthanol anhydre sont ajoutés 0.23 mL de 3-(aminopropyl)imidazole (1.95 mmol, 5 éq). L'ensemble est agité à température ambiante pendant 1.5 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite puis lyophilisé. Le résidu est repris dans 2 mL d'eau et échangé par la suite sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme  $\text{Na}^+$ . On récupère 10 mL d'éluat. La solution est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide beige avec un rendement de 70%.

*In a round-bottom flask placed under argon, containing D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (89 mg, 0.39 mmol) in anhydrous methanol (5 mL), 0.23 ml of 3-(aminopropyl)imidazole (1.95 mmol, 5 eq) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h. Following concentration of the reaction mixture, the residue was lyophilized. Then, the residue was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column ( $\text{Na}^+$  form). 10 mL of eluate was recuperated. Then, the solution was lyophilized to afford the desired product (yield = 70%).*

#### **RMN $^1\text{H}$ (360 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )**

$\delta$  7.63 (s, 1H,  $\text{H}_{11}$ ), 7.08 (s, 1H,  $\text{H}_{10}$ ), 6.95 (s, 1H,  $\text{H}_9$ ), 4.36 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ), 3.92-3.96 (m, 1H,  $\text{H}_3+\text{H}_4+\text{H}_5+\text{H}_7+\text{H}_8+\text{H}_8'$ ), 3.14 (s, 2H,  $\text{H}_6$ ), 1.93 (m, 2H,  $\text{H}_7$ ) ppm

#### **RMN $^{13}\text{C}$ (360 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ )**

$\delta$  175.5 (C-1), 137.8 (C-11), 127.3 (C10), 120.1 (C-9), 70.9 (C-3), 70.7 (C-2), 69.9 (d, C-4,  $J_{\text{C}_4,\text{P}} = 4.9 \text{ Hz}$ ), 65 (C-5), 44.2 (C-8), 35.9 (C6), 29.6 (C-7) ppm

**RMN  $^{31}\text{P}$  (360 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )** : 4.7 ppm

#### **SM-HR (ESI-)**

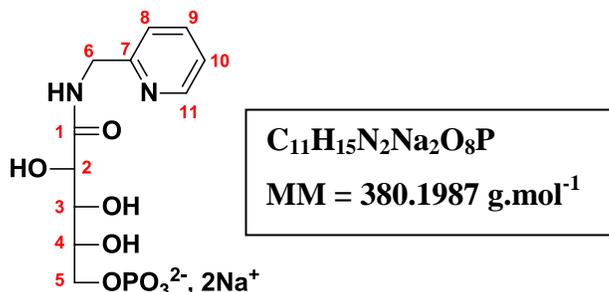
Masse calculée pour  $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_8\text{P} [\text{M}-2\text{Na}+\text{H}]^- = 352.0910$ , masse trouvée = 352.0914

#### **IR-FT**

$\nu$  3200-3500 (OH, NH), 2886-3000 ( $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_{\text{aromatiques}}$ ), 1642 (C=O), 1544 (NH), 1446 (C=C), 1083 (P-O, C-O, C-N), 976 (P-O)  $\text{cm}^{-1}$

### 1.2.9. Synthèse du 5PAPy (7)

#### LMA48 : N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-1-(pyridin-2-yl)methanamine



A une solution de 70 mg (0.307 mmol) de 5PAL dans 1 mL de DMF anhydre sont ajoutés 0.11 mL de 2-(aminométhyl)pyridine (1.07 mmol, 3.5 éq). Après agitation à température ambiante pendant une heure, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans de l'eau et échangé sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme  $Na^+$ . La solution ainsi obtenue est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide beige avec un rendement quantitatif.

*In a round-bottom flask placed under argon, containing D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (70 mg, 0.307 mmol) in anhydrous DMF (1 mL), 0.11 ml of 2-(aminomethyl)pyridine (1.07 mmol, 3.5 eq) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h. Following concentration of the reaction mixture, the residue was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column ( $Na^+$  form) and lyophilized to afford the desired product with quantitative yield.*

#### **RMN $^1H$ (250 MHz, $D_2O$ )**

$\delta$  8.20 (d, 1H,  $J = 6.75$  Hz,  $H_{11}$ ), 7.58 (t, 1H,  $J = 7.25$  Hz,  $H_9$ ), 7.08-7.20 (m, 1H,  $H_8+H_{10}$ ), 4.28-4.38 (m, 1H,  $H_2+H_6+H_6'$ ), 3.61-3.88 (m, 1H,  $H_3+H_4+H_5+H_5'$ ) ppm

#### **RMN $^{13}C$ (250 MHz, $D_2O$ )**

$\delta$  177 (C-1), 156.3 (C-7), 148.2 (C-11), 138.2 (C9), 122.8 (C-10), 121.3 (C-8), 71.3 (C-3 et C-2), 70.2 (d, C-4,  $J_{C_4,P} = 4.6$  Hz), 65.2 (C-5), 43.8 (C6) ppm

**RMN  $^{31}P$  (250 MHz,  $D_2O$ )** :  $\delta$  4.8 ppm

#### **SM-HR (ESI-)**

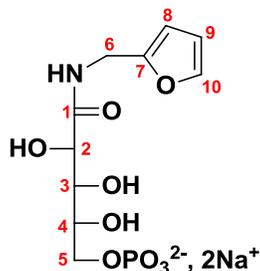
Masse calculée pour  $C_{11}H_{16}N_2O_8P [M-2Na+H]^-$  = 335.0645, masse trouvée = 335.0629

#### **IR-FT**

$\nu$  3257 (OH, NH), 2820-3000 (CH,  $CH_2$ ,  $CH_{aromatiques}$ ), 1653 (C=O), 1540 (NH), 1400-1595 (C=C) et 1097 (P-O, C-O, C-N), 978 (P-O)  $cm^{-1}$

### 1.2.10. Synthèse du 5PAF (8)

#### LMA 63 : N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-1-(furan-2-yl)methanamine



A une solution de 77 mg (0.34 mmol) de 5PAL dans 5 mL de méthanol anhydre sont ajoutés 0.16 mL de 2-(aminométhyl)furane (1.7 mmol, 5 éq). L'ensemble est agité à température ambiante pendant 1.5 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite puis lyophilisé. Le résidu est repris dans de l'eau et échangé sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme Na<sup>+</sup>. La solution ainsi obtenue est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide beige avec un rendement quantitatif.

*In a round-bottom flask placed under argon, containing D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (77 mg, 0.34 mmol) in anhydrous methanol (5 mL), 0.16 ml of 2-(aminomethyl)furan (1.7 mmol, 5 eq) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h. Following concentration of the reaction mixture, the residue was lyophilized. Then, the residue was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column (Na<sup>+</sup> form) and lyophilized to afford the desired product with quantitative yield.*

#### RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 7.43 (s, 1H, H<sub>10</sub>), 6.37 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 6.28 (d, 1H, J=3.6 Hz, H<sub>8</sub>), 4.44 (s, 2H, H<sub>6</sub>+H<sub>6'</sub>), 4.40 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 3.80-3.98 (m, 1H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>5'</sub>) ppm

#### RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 175.6 (C-1), 151 (C-7), 142.6 (C10), 110.5 et 107.2 (C-9 et C-8), 70.9 (C-3), 70.8 (C-2), 69.8 (d, C-4, J<sub>C<sub>4</sub>,P</sub> = 6.34 Hz), 65.1 (d, C-5, J<sub>C<sub>5</sub>,P</sub> = 4.1 Hz), 35.9 (C6) ppm

RMN <sup>31</sup>P (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : 4.5 ppm

#### SM-HR (ESI-)

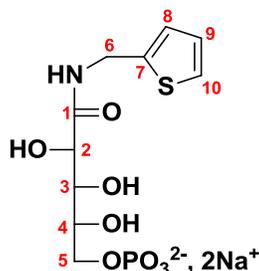
Masse calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>9</sub>P [M-2Na+H]<sup>-</sup> = 324.0485, masse trouvée = 324.0491

#### IR-FT

ν 3200-3500 (OH, NH), 2886-3000 (CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>aromatiques</sub>), 1652 (C=O), 1537 (NH), 1400 (C=C), 1096 (P-O, C-O), 976 (P-O) cm<sup>-1</sup>

### 1.2.11. Synthèse du 5PAT (9)

#### LMA 57 : N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-1-(thien-2-yl)methanamine



A une solution de 73 mg (0.32 mmol) de 5PAL dans 5 mL de méthanol anhydre sont ajoutés 0.197 mL de 2-(aminométhyl)thiophène (6 éq). L'ensemble est agité à température ambiante pendant 1.5 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite puis lyophilisé. Le résidu est repris dans de l'eau et échangé sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme Na<sup>+</sup>. La solution ainsi obtenue est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif.

*In a round-bottom flask placed under argon, containing D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (73 mg, 0.32 mmol) in anhydrous methanol (5 mL), 0.197 ml of 2-(aminomethyl)thiophene (6 eq) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h. Following concentration of the reaction mixture, the residue was lyophilized. Then, the residue was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column (Na<sup>+</sup> form) and lyophilized to afford the desired product with quantitative yield.*

#### **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)**

δ 7.28 (d, 1H, *J*=4.2 Hz, H<sub>10</sub>), 6.95-6.98 (m, 1H, H<sub>8</sub>+H<sub>9</sub>), 4.55 (s, 2H, H<sub>6</sub>), 4.43 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 3.81-4.00 (m, 1H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>5'</sub>) ppm

#### **RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O)**

δ 175.4 (C-1), 140.8 (C-7), 127 (C10), 125.8 et 125.4 (C-9 et C-8), 71.0 (C-3), 70.8 (C-2), 69.9 (d, C-4, *J*<sub>C<sub>4</sub>,P</sub> = 4.9 Hz), 65.0 (C-5), 37.6 (C6) ppm

**RMN <sup>31</sup>P (300 MHz, D<sub>2</sub>O)** : 4.7 ppm

#### **SM-HR (ESI-)**

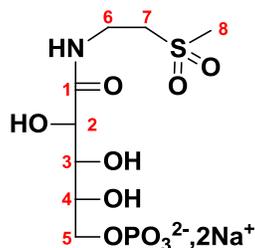
Masse calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>8</sub>PS [M-2Na+H]<sup>-</sup> = 340.0256, masse trouvée = 340.0264

#### **IR-FT**

ν 3200-3500 (OH, NH), 2879-3000 (CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>aromatiques</sub>), 1646 (C=O), 1530 (NH), 1428 (C=C), 1094 (P-O, C-O), 978 (P-O) cm<sup>-1</sup>

### 1.2.12. Synthèse du 5PASufone (10)

#### LMA 74 : N-(5-phosphate-D-arabinovyl)-2-(methylsulfonyl)ethanamine



Une solution de méthanolate de sodium est préparée sous argon en dissolvant 129 mg de NaOMe (2.38 mmol, 5 éq) dans 2 mL de méthanol anhydre. Cette solution est ensuite additionnée à une solution méthanolique (5 mL) de 2-(methylsulfonyl)ethanamine hydrochloride (380 mg, 5 éq) dissous à 35 °C. Un précipité blanc apparaît (NaCl). Après retour à temp. amb. et décantation de la solution, on transfère le surnageant sur une solution méthanolique (3 mL) de 5PAL (108 mg, 0.47mmol) à l'aide d'une seringue purgée à l'argon. L'ensemble est agité à temp. amb. pendant 1.5 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans de l'eau et échangé sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme Na<sup>+</sup>. La solution est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide beige (rendement = 89%).

*An anhydrous methanolic solution (2 mL) of NaOMe (129 mg, 2.38 mmol) was prepared under argon. This solution was added to a methanolic solution (5 mL) of 2-(methylsulfonyl)ethanamine hydrochloride (380 mg, 5 éq) dissolved at 35 °C through an argon-purged syringe. A white solid precipitated (NaCl). Following decantation, the clear methanolic solution of 2-(methylsulfonyl)ethanamine hydrochloride was then transferred dropwise to a MeOH solution (3 mL) of D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (108 mg, 0.47 mmol) using a second argon-purged syringe. The reaction was allowed to proceed for 1.5 h at rt. Following concentration of the reaction mixture, the residue was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column (Na<sup>+</sup> form). The solution was lyophilized to afford the desired product (yield = 89%).*

#### **RMN <sup>1</sup>H (250 MHz, D<sub>2</sub>O)**

δ 4.65 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 3.97-4.16 (m, 1H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>5'</sub>+H<sub>7</sub>+H<sub>7'</sub>), 3.72 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 3.35 (s, 3H, H<sub>8</sub>) ppm

#### **RMN <sup>13</sup>C (250 MHz, D<sub>2</sub>O)**

δ 175.9 (C-1), 71.2 (C-3), 71 (C-2), 70.0 (C-4), 65.0 (C-5), 53.0 (C-7), 41.0 (C8), 33.0 (C-6) ppm

**RMN <sup>31</sup>P (250 MHz, D<sub>2</sub>O)** : 4.7 ppm

#### **SM-HR (ESI-)**

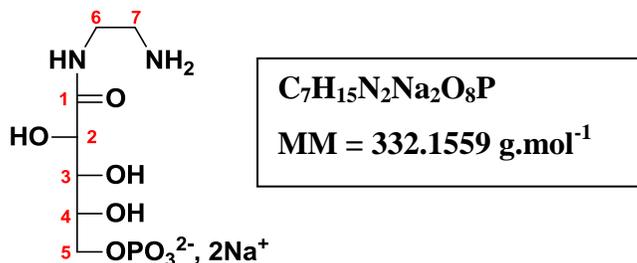
Masse calculée pour C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>10</sub>PS [M-2Na+H]<sup>-</sup> = 350.0311, masse trouvée = 350.0320

#### **IR-FT**

ν 3200-3500 (OH, NH), 2879-3000 (CH, CH<sub>2</sub>), 1650 (C=O), 1543 (NH), 1090 (P-O, C-O), 974 (P-O) cm<sup>-1</sup>

### 1.2.13. Synthèse du 5PAED (11)

#### LMA 47 : N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-2-(amino)ethanamine



A une solution de 128 mg (0.56 mmol) de 5PAL dans 5 mL de méthanol anhydre sont ajoutés 0.13 mL d'éthylenediamine (2.0 mmol, 3.5 éq). Un précipité blanc apparaît immédiatement. Après agitation à température ambiante pendant 1 h, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans de l'eau et échangé sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme  $Na^+$ . La solution ainsi obtenue est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide beige avec un rendement quantitatif.

*In a round-bottom flask placed under argon, containing D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (128 mg, 0.56 mmol) in anhydrous methanol (5 mL), 0.13 ml of ethylenediamine (2.0 mmol, 3.5 eq) were added. A white precipitate appeared immediately. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h. Following concentration of the reaction mixture, the residue was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column ( $Na^+$  form) and lyophilized to afford the desired product with quantitative yield.*

#### RMN $^1H$ (300 MHz, $D_2O$ )

$\delta$  4.28 (s, 1H,  $H_2$ ), 3.70-3.85 (m, 1H,  $H_3+H_4+H_5+H_5'$ ), 3.18 (m, 2H,  $H_6$ ), 2.58 (t, 2H,  $J = 5.4$  Hz,  $H_7$ ) ppm

#### RMN $^{13}C$ (300 MHz, $D_2O$ )

$\delta$  177.9 (C-1), 71.9 (C-3), 71.5 (C-2), 70.6 (d, C-4,  $J_{C_4,P} = 5.5$  Hz), 65.4 (C-5), 47.4 (C-7), 39.8 (C-6) ppm

RMN  $^{31}P$  (300 MHz,  $D_2O$ ) :  $\delta$  4.6 ppm

#### SM-HR (ESI-)

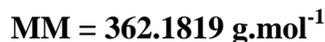
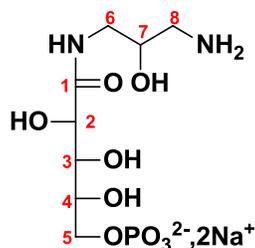
Masse calculée pour  $C_7H_{16}N_2O_8P [M-2Na+H]^- = 287.0645$ , masse trouvée = 287.0650

#### IR-FT

$\nu$  3200-3500 (OH, NH), 2820 et 2900 (CH et  $CH_2$ ), 1638 (C=O), 1547 (NH) et 1090 (P-O et C-O), 976 (P-O)  $cm^{-1}$

### 1.2.14. Synthèse du 5PADP (12)

#### LMA 99 : N-(5-phosphate-D-arabinoyl)-3-(aminométhyl)éthanolamine



A une solution de 54 mg (0.237 mmol) de 5PAL dans 3 mL de MeOH anhydre sont ajoutés 107 mg de 1,3-diaminopropan-2-ol (1.2 mmol, 5 éq) dissous dans du méthanol. L'ensemble est agité à temp. amb. pendant 1.5 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit est repris dans de l'eau et échangé sur une colonne de résine Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme Na<sup>+</sup>. Après évaporation, le résidu est additionné de méthanol jusqu'à précipitation. Le solide blanc est filtré, repris dans de l'eau et repassé sur une colonne Dowex 50WX4 (100-200 mesh) sous forme sodique. La solution ainsi obtenue est lyophilisée pour donner le produit attendu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 81%.

*In a round-bottom flask placed under argon, containing D-arabinono-1,4-lactone 5-phosphate (54 mg, 0.237 mmol) in anhydrous methanol (3 mL), 107 mg of 1,3-diaminopropan-2-ol (1.2 mmol, 5 éq) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h. Following, the residue was eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column (Na<sup>+</sup> form). After concentration of the solution, methanol was added until the product precipitates. The solution was filtered and the residue was further eluted with water on a Dowex 50WX4 ion-exchange column (Na<sup>+</sup> form). After lyophilization, the desired product was obtained with a yield of 81%.*

#### RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 4.40 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 3.75-3.93 (m, 1H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>7</sub>), 3.34 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 2.60 (m, 2H, H<sub>8</sub>) ppm

#### RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 176.7 (C-1), 71.6 (C-7), 71.2 (C-3 et C-2), 70.3 (d, C-4, J<sub>C<sub>4</sub>,P</sub> = 5.3 Hz), 65.2 (d, C-5, J<sub>C<sub>5</sub>,P</sub> = 4.1 Hz), 43.8 (C-6), 42.4 (C-8) ppm

RMN <sup>31</sup>P (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : 4.8 ppm

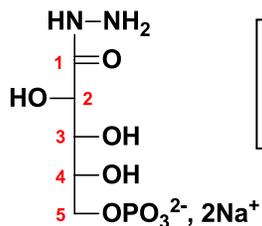
#### SM-HR (ESI-)

Masse calculée pour C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>P [M-2Na+1H]<sup>-</sup> = 317.0750, masse trouvée = 317.0754

#### IR-FT

ν 3200-3500 (OH, NH), 2820 et 2900 (CH et CH<sub>2</sub>), 1640 (C=O), 1540 (NH) et 1089 (P-O et C-O), 977 (P-O) cm<sup>-1</sup>

### 1.2.15. Synthèse du 5PAHz<sup>160,186</sup>



Ce produit a été déjà synthétisé au laboratoire selon la procédure suivante : 468  $\mu\text{L}$  d'hydrazine monhydratée (9,64 mmol, 10 éq) sont ajoutés à 220 mg (0,96 mmol) de 5PAL dans 1 mL d'eau bidistillée. Après agitation pendant 30 min, la solution est lyophilisée. Le produit est repris dans de l'eau et passé sur une colonne Dowex Na<sup>+</sup> 200-400 mesh puis lyophilisé. Celui-ci est repris dans 2 mL d'eau et additionné de MeOH jusqu'à précipitation. Le solide blanc est filtré, repris dans l'eau et lyophilisé. Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 61%.

#### RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)

4,48 (d, 1 H, H<sub>2</sub>,  $J_{2,3} = 1,5$  Hz), 4,04-3,85 (m, 4 H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>5'</sub>) ppm

#### RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)

174,8 (C-1), 71,8 et 71,4 (C-2 et C-3), 70,8 (C-4,  $J_{C_4,P} = 6,2$  Hz), 65,7 (C-5,  $J_{C_5,P} = 4,3$  Hz) ppm

## **2. Tests enzymatiques**

### **2.1. Préparation des solutions**

#### **2.1.1. Préparation du tampon HEPES 50 mM pH 7.1**

3.0086 g (12.6 mmol) d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)piperazine-1-éthanesulfonique,  $M = 238.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) sont dissous dans 200 mL d'eau bidistillée. Le pH est ajusté à 7.1 par ajout de soude 1 M. La solution est transférée dans une fiole jaugée de 250 mL, puis de l'eau bidistillée est ajoutée jusqu'au trait de jauge. La solution tampon obtenue est purifiée sur un filtre de  $0.22 \mu\text{M}$  et conservée à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **2.1.2. Préparation des solutions de substrats**

Le M6P, fourni sous forme de sel de baryum ( $M = 395.45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , pureté 98%), est agité avec 4 g de résine Dowex 50WX4 échangeuse de cations sous forme sodique ( $\text{Na}^+$ ), puis passé sur une colonne de la même résine afin d'obtenir le sel de sodium ( $M = 304.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) correspondant, puis lyophilisé. Le F6P sous forme de sel de sodium ( $2 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $M = 340.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , pureté 98%) et le G6P sous forme de sel de sodium ( $M = 304.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , pureté 98%) sont fournis par Sigma Aldrich et utilisés tels quels. Les solutions de M6P 100 mM, F6P 100 mM et G6P 100 mM sont obtenues par dissolution respectivement de 30.4 mg de M6P, 34.01 mg de F6P et 30.4 mg de G6P dans 1 mL de tampon Hepes 50 mM pH 7.1. Des dilutions sont ensuite effectuées pour obtenir les solutions à 10 mM.

#### **2.1.3. Préparation des solutions d'inhibiteurs**

Les solutions d'inhibiteurs 10 mM sont obtenues par dissolution de l'inhibiteur dans du tampon HEPES 50 mM pH 7.1, puis éventuellement diluées pour obtenir les solutions 1 mM et 0.1 mM.

#### **2.1.4. Préparation des solutions d'enzymes**

Toutes les enzymes commerciales sont fournies par Sigma Aldrich.

##### **PGI de muscle du lapin :**

La solution commerciale est conservée à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . 500  $\mu\text{L}$  d'eau bidistillée sont ajoutés à la solution commerciale d'enzyme. Cette solution nommée II est aliquotée par 15  $\mu\text{L}$  et par 10  $\mu\text{L}$ . Les aliquots sont conservés au congélateur à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . A partir de ces aliquots, des solutions II/100 et II/1000 sont ensuite préparées avec du tampon HEPES 50 mM pH 7.1. Les solutions II/100 sont utilisées pour le test d'activité PMI à trois enzymes alors que celles de II/1000 servent pour les tests d'activité PGI et les mesures d'activité spécifique de l'enzyme.

##### **G6PDH de levure :**

La solution commerciale est conservée à 4 °C . 500 µL d'eau bidistillée sont ajoutés à la solution commerciale d'enzyme. Cette solution nommée III est aliquotée par 15 µL et par 10 µL. Les aliquots sont conservés au congélateur à -20 °C. A partir de ces aliquots, des solutions III/100 sont ensuite préparées avec du tampon HEPES 50 mM pH 7.1. Ces solutions sont utilisées pour les tests d'activité PMI et PGI. Une solution III/1000 est également préparée et sert pour déterminer l'activité spécifique de l'enzyme.

#### PMI d'*E. coli* :

La solution commerciale est conservée à 4 °C. Cette solution nommée I est aliquotée par 10 µL. Les aliquots sont conservés à -18 °C. Une solution fille I/10 est obtenue en ajoutant 90 µL de tampon HEPES 50 mM pH 7.1 à un aliquot de I. La solution I/1000 utilisée dans les cinétiques enzymatiques est finalement obtenue en diluant 10 µL de I/10 dans 990 µL de tampon HEPES 50 mM pH 7.1.

La PMI de *Candida albicans* et la PGI humaine ont été aliquotées selon exactement le même protocole.

#### **2.1.5. Préparation de la solution de MgCl<sub>2</sub> 500 mM**

101.65 mg (0.5 mmol) de MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O (M = 203.3 g.mol<sup>-1</sup>) sont dissous dans 1 mL de tampon HEPES 50 mM pH 7.1.

#### **2.1.6. Préparation de la solution d'EDTA 50 mM**

18.61 mg (0.05 mmol) d'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA, 2H<sub>2</sub>O, 372.2 g.mol<sup>-1</sup>) sont dissous dans 1 mL de tampon HEPES 50 mM pH 7.1.

#### **2.1.7. Préparation de la solution de NADP<sup>+</sup> 40 mM**

15.3 mg (0.02 mmol) de β-nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP<sup>+</sup>) sous forme de sel de sodium (M = 765.39 g.mol<sup>-1</sup>, pureté 98%) sont dissous dans 500 µL de tampon HEPES 50 mM pH 7.1.

## **2.2. Mode opératoire des différents tests cinétiques**

### **2.2.1. Méthode générale pour les tests PMI/PGI/G6PDH et PGI/G6PDH**

Pour l'étude de l'inhibition de la PMI, les mesures de cinétique utilisant le test à trois enzymes PMI/PGI/G6PDH sont réalisées en présence du substrat M6P (concentration égale au  $K_m$  en cas de mesure d'IC<sub>50</sub> et autour de  $K_m$  en cas de mesure de  $K_i$ ), de 6 mU de PMI (enzyme I), 0.6 U de PGI (enzyme II), 0.6 U de G6PDH (enzyme III), de MgCl<sub>2</sub> à une concentration de 5 mM et de NADP<sup>+</sup> à une concentration de 0.4 mM et éventuellement avec et sans inhibiteur. Toutes les

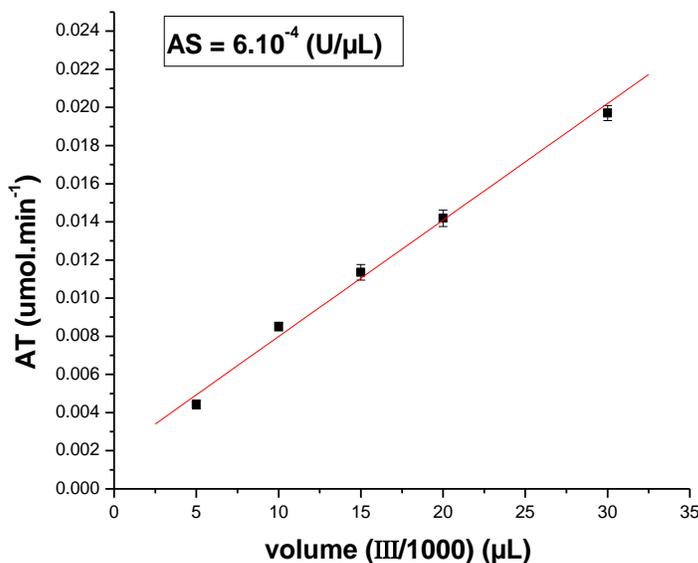


saturante,  $V_0$  ne peut être que proportionnelle à  $[ES]$ , c'est-à-dire à  $[E]$  elle-même ou autrement dit au volume d'enzyme ajouté. La représentation des activités totales ( $AT = \Delta n/\Delta t = \Delta DO/6.22$  avec  $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) en fonction du volume de solution d'enzyme ajouté (Tableau 13, Graphe 8) donne accès à l'activité spécifique de la solution étudiée ( $AT = AS_{\text{solution}} \cdot V_{\text{solution}}$ ).

Tableau 13. Volumes utilisés pour la mesure des activités spécifiques des solutions I/1000, II/2000, III/2000.

	<b>G6PDH 'III/1000'</b>	<b>RmPGI 'II/1000' (ou hPGI)</b>	<b>EcPMI 'I/1000' (ou CaPMI)</b>
<b>V(M6P) en <math>\mu\text{L}</math> (solution 0.1 M)</b>			20
<b>V (F6P) en <math>\mu\text{L}</math> (solution 0.1 M)</b>		50	
<b>V (G6P) en <math>\mu\text{L}</math> (solution 0.1 M)</b>	50		
<b>V (MgCl<sub>2</sub>) en <math>\mu\text{L}</math> (solution 0.5 M)</b>	10	10	10
<b>V (NADP<sup>+</sup>) en <math>\mu\text{L}</math> (solution 40 mM)</b>	10	10	10
<b>V (III/100) en <math>\mu\text{L}</math></b>		100	100
<b>V (II/100) en <math>\mu\text{L}</math></b>			40
Tampon HEPES 50 mM pH 7.1 qsp 1 mL			
5, 10, 15, 20, 30 $\mu\text{L}$ de la solution d'enzyme étudiée ( $V_{\text{solution}}$ )			

Les volumes de II/100 et III/100 varient d'une cinétique à une autre selon l'activité spécifique des lots d'enzymes I et II utilisés, de manière à avoir exactement 0.6 U. Pour chaque mesure, la quantité du tampon HEPES est ajustée pour avoir un volume total de 1 mL.



Graph 8. Mesure de l'activité spécifique d'une solution de G6PDH (III/1000).

### 2.2.3. Mesure des $IC_{50}$

La détermination des  $IC_{50}$  est réalisée en se plaçant à une concentration fixe en substrat, en général proche du  $K_m$ . Des quantités croissantes d'inhibiteur sont introduites, et on mesure le pourcentage d'activité enzymatique résiduelle pour ces différentes concentrations. La représentation du % du rapport des vitesses initiales  $V_0'/V_0$  en fonction de la concentration en inhibiteur donne une courbe exponentielle descendante : la concentration d'inhibiteur pour laquelle la vitesse apparente  $V_0'$  est égale à la moitié de la vitesse initiale  $V_0$  est appelée  $IC_{50}$ . Un exemple des quantités utilisées pour la mesure d'une  $IC_{50}$  est présenté dans le Tableau 14.

Tableau 14. Protocole expérimental suivi pour la mesure de l' $IC_{50}$  du 5PAMIm vs PGI du muscle de lapin.

[5PAMIm]	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	50 $\mu$ M
V (F6P) en $\mu$ L (solution 10 mM)	10	10	10	10	10	10
V (5PAMIm) en $\mu$ L (solution 0.01 mM)	0	10	50	100	300	500
V (MgCl <sub>2</sub> ) en $\mu$ L (solution 0.5 M)	10	10	10	10	10	10
V (NADP <sup>+</sup> ) en $\mu$ L (solution 40 mM)	10	10	10	10	10	10
V (EDTA) en $\mu$ L (solution 50 mM)	20	20	20	20	20	20
V (III/100) en $\mu$ L (solution 0.1 mM)	100	100	100	100	100	100
V (II/100)	6	6	6	6	6	6
V(tampon) en $\mu$ L	844	834	794	744	544	344
$V_0'/V_0$ (%)	100	79.46	43.56	28.66	13.05	7.03

### 2.2.4. Mesures de $K_i$ et détermination de la nature de l'inhibition

Pour une concentration fixe d'inhibiteur, des cinétiques sont réalisées en faisant varier la concentration en substrat sur des valeurs autour du  $K_m$  (Tableau 15).

Tableau 15. Exemple d'une série de mesures pour la détermination du  $K_i$  du 5PAF vs. PGI du muscle de lapin.

<b>[Inhibiteur 5PAF] = 1 <math>\mu</math>M</b>				
<b>[Substrat F6P]</b>	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	<b>150 <math>\mu</math>M</b>	<b>200 <math>\mu</math>M</b>
V(F6P) en $\mu$ L (sol. 10 mM)	5	10	15	20
V(inhib) en $\mu$ L (sol. 0.1 mM)	10	10	10	10
V(MgCl <sub>2</sub> ) en $\mu$ L (sol. 0.5 M)	10	10	10	10
V(NADP <sup>+</sup> ) en $\mu$ L (sol. 40 mM)	10	10	10	10
V(III/100) en $\mu$ L	100	100	100	100
V(II/1000) en $\mu$ L	6	6	6	6
<b>Tampon</b>	859	854	849	844

Cette opération est répétée pour différentes concentrations d'inhibiteur. Pour chaque concentration, la droite de Lineweaver-Burk  $1/V_0 = f(1/[S])$  est tracée et donne une pente. L'abscisse à l'origine du graphe  $\text{pente} = f([I])$  donne accès à la valeur du  $K_i$  ( $-K_i$ ).

### 2.2.5. Contrôle de la validité du test à trois enzymes

Lorsque l'on est en présence d'un inhibiteur de PGI, il convient de vérifier que la vitesse observée est bien celle de la réaction catalysée par la PMI et non celle de la réaction catalysée par la PGI. Pour cela des contrôles sont réalisés : pour une concentration donnée en inhibiteur, la quantité d'enzyme de couplage (PGI) ou de PMI est augmentée, et la pente mesurée (Tableau 16). La vitesse ne doit pas varier avec la quantité d'enzyme de couplage. En revanche, elle doit varier avec la quantité de PMI introduite.

Tableau 16. Mesures de contrôle réalisées dans le cas de l'inhibition de la PMI d'*E. coli* par le dérivé SPAT.

<b>[Inhibiteur SPAT] = 300 <math>\mu\text{M}</math></b>			
<b>V M6P 10 mM (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	40	40	40
<b>Vinhibiteur 10 mM (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	30	30	30
<b>VMgCl<sub>2</sub> 0.5 M (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	10	10	10
<b>V NADP<sup>+</sup> 40 mM (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	10	10	10
<b>V I/100 (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	15	15	<b>60</b>
<b>V II/100 (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	40	<b>160</b>	40
<b>V III/1000 (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	100	100	100
<b>V(tampon) en <math>\mu\text{L}</math></b>	755	635	710
<b>Pente (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	0.01758	0.01744	0.04696

## 3. Surexpression de protéines

### 3.1. Milieux de culture

Les souches *E. coli* sont cultivées en milieu riche :

- Liquide Luria Bertina (LB) : contenant 10 g de Tryptone, 5 g d'extrait de levure, et 10 g de NaCl par litre de solution. (milieu destiné aux précultures).
- Liquide Terrific Broth (TB) : contenant 12 g de Tryptone, 24 g d'extrait de levure et 4 mL de glycérol par litre (milieu destiné aux cultures).

- Liquide SOC stérile prêt à l'emploi (Thermofisher scientific): contenant 2% de tryptone, 0.5% d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> et 20 mL de glucose (milieu utilisé pour les cultures bactériennes fraîchement transformées).
- Solide : LB supplémenté de 15 g d'agar. Après stérilisation à l'autoclave, l'ampicilline est ajouté pour une concentration finale de 100 µg/mL.

Les milieux de culture liquide LB, et TB sont stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

### 3.2. Souches bactériennes

- La souche *E. coli* DH5α (Invitrogen®) : cette souche est utilisée pour l'ensemble des manipulations de biologie moléculaire. Elle est déficiente en endonucléases (endA), ce qui améliore la qualité des préparations d'ADN. D'autre part, la mutation sur le gène *recA*, la rendant déficiente pour la recombinaison homologue, évite les risques de mutations du plasmide au cours de sa préparation.
- La souche *E. coli* BL21(DE3) est commercialisée par Sigma Aldrich. Cette souche a la particularité, comme toutes les souches *E. coli*, d'être dépourvue de la protéase majoritaire, codée par le gène *lon*, qui catalyse le clivage endoprotéolytique des protéines recombinantes de la cellule. Ce système est donc particulièrement adapté pour la production de protéines hétérologues intègres.

### 3.3. Tampons / hPGI

- Tampon de lyse : 50 mM Tris HCl pH 7.39, 300 mM NaCl, 10% glycérol, 1% triton X-100.
- Tampons d'éluion :
  - A : 50 mM Tris HCl pH 7.39, 300 mM NaCl, 100 mM imidazole.
  - B : 50 mM Tris HCl pH 7.39, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole.
  - C : 50 mM Tris HCl pH 7.39, 300 mM NaCl, 400 mM imidazole.
- Tampon de lavage : 50 mM Tris HCl pH 7.39, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole.
- Tampon final de la protéine : 20 mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10% glycérol.

### 3.4. Tampons / CaPMI

- Tampon de lyse : 50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10% glycérol, 1% triton X-100.
- Tampon d'éluion : 50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole.

- Tampon de lavage : 50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole.
- Tampon final de la protéine : 20 mM Tris HCl pH 8.5, 150 mM NaCl.

### **3.5. Stocks de plasmides**

- **Transformation des bactéries DH5 $\alpha$  par le plasmide contenant le gène de CaPMI (ou hPGI) :**

Le plasmide ou l'ADN fourni en poudre est sorti du congélateur et mis directement dans la glace puis dissous dans 50  $\mu$ L du tampon TE-EF (10 mM Tris.HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA). Sa concentration est mesurée en utilisant Nanodrop 2000 (volume = 2  $\mu$ L) pour s'assurer qu'il est bien en solution (le blanc est effectué avec 2  $\mu$ L de tampon TE-EF).

On sort le tube contenant les bactéries DH5 $\alpha$  du congélateur (-80 °C), et on le met directement dans la glace jusqu'à décongélation. À côté de la flamme, on prend 50  $\mu$ L de la solution de bactéries dans un Eppendorf que l'on met directement dans la glace. Toujours dans un milieu stérile, 2  $\mu$ L de la solution du plasmide sont transférés à la surface de la suspension bactérienne (sans faire le va-et-vient). On mélange par un coup de main et on remet l'Eppendorf dans la glace pour 30 min. La solution de bactéries est retournée à -80 °C et la solution de plasmide à -18 °C. Dans ce temps, on commence à préchauffer le bain marie (42 °C) et le milieu « SOC » nutritif à 37 °C. Après 30 min dans la glace, le choc thermique est initié lorsque les bactéries sont placées pendant 20 s à 42 °C (**ne pas remuer ou agiter les tubes**). Après ce laps de temps, l'Eppendorf est immédiatement remis dans la glace. 200  $\mu$ L du milieu SOC sont ajoutés puis le mélange est incubé pendant 1 h à 37 °C sous agitation à 225 rpm. On sélectionne les bactéries ayant intégré le plasmide en étalant les cellules (200  $\mu$ L) sur une boîte de Pétri constituée du milieu autoclavé LB agar (Luria bertani agar) additionné d'ampicilline (100  $\mu$ g/mL). Leur croissance est maintenue pendant une nuit à 37 °C. Les colonies obtenues sont repiquées, mises en culture liquide dans du milieu LB autoclavé (100 mL) contenant de l'ampicilline à une concentration de 100  $\mu$ g/mL, pendant encore une nuit à 37 °C, sous agitation. Une solution trouble indique que les bactéries ont bien poussé.

### **3.6. Purification de l'ADN**

La purification de l'ADN a été réalisée selon le Kit « Nucleobond® Xtra EF plasmid purification » (high copy plasmid purification ; Midi pour une culture de 100 mL). L'ADN est extrait par lyse des bactéries avec une solution alcaline (SDS, NaOH < 2%). La purification se fait sur une colonne Nucleobond® échangeuse d'anions (l'ADN par la charge négative de ses phosphates se fixe sur la résine puis l'élution se fait avec un tampon d'élution « ELU-EF » contenant de sels et d'isopropanol). L'ADN est précipité par ajout d'isopropanol puis mis en solution dans le tampon TE-EF (le volume est ajouté progressivement jusqu'à ce que l'ADN

devient soluble, on commence habituellement par ajouter 50 µL de tampon, si on voit que l'ADN n'est pas bien solubilisé, on rajoute encore de tampon).

### **3.7. Surexpression des protéines recombinantes - culture de 100 mL**

On se sert du stock de plasmide préalablement préparé pour réaliser la transformation de la souche d'*E.coli* BL21(DE3) dont le protocole est similaire à celui utilisé pour la souche DH5α sauf que le choc thermique est réalisé pendant 45 s au lieu de 20 s.

Une colonie de bactéries BL21(DE3) transformées par le plasmide pRSET-C/CaPMI recombinante est cultivée (37 °C, 225 rpm) dans du milieu LB (50 mL) complémenté en ampicilline (100 µg/ml). À partir de cette préculture, une culture au 1/100<sup>ème</sup> dans un milieu TB (1 mL du milieu LB dans 100 mL de milieu TB) supplémenté toujours en ampicilline (50 µg/mL) est lancée. La surexpression est induite par ajout d'IPTG (0.3 mM dans le cas de CaPMI et 0.5 mM dans le cas de hPGI) lorsque la D.O. à 600 nm de la culture atteint une valeur entre 0.6 et 0.8. Les bactéries sont ensuite mises 3 h sous agitation à 30 °C puis à 25 °C toute la nuit.

*Selon le même protocole, un stock de bactéries ayant intégré le plasmide est préparé : 200 µL de glycérol stérile sont ajoutés à 1 mL de la culture bactérienne et les bactéries sont stockées à -80 °C.*

#### **3.7.1. Lyse des bactéries**

Après induction, les bactéries sont centrifugées à 6000 rpm pendant 15 min. Le culot est récupéré et repris dans le tampon de lyse (50 mL de tampon de lyse pour 100 mL de culture) puis 650 µL (1/10 du volume du lysat) d'une solution de lysozyme (10 mM) sont ajoutés. Une fois la solution devenue visqueuse, 2 µL de benzonase sont ajoutés (solution commerciale, on ajoute normalement 15 µL pour 50 mL de lysat). La solution est ensuite soniquée aux ultrasons pendant 8 min (15 s sonication / 30 s repos, sonde de taille moyenne 1/2, amplitude 50%). Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation (10000 g, 45 min, 4 °C).

#### **3.7.2. Purification des protéines surexprimées**

##### **3.7.2.1. Purification de CaPMI**

CaPMI a été purifiée par chromatographie d'affinité au nickel sur une colonne HisTrap HP de 5 mL (GE healthcare life sciences) sur AKTA prime plus. La colonne est lavée tout d'abord à l'eau afin d'enlever l'éthanol, équilibrée avec 25 mL de tampon d'élution puis lavée de nouveau avec 25 mL de tampon de lavage (50 mM Tris HCl pH 8, 20 mM imidazole et 300 mM NaCl). Le surnageant est ensuite déposé et l'élution est réalisée par un gradient croissant d'imidazole de 0 à 100% avec le tampon d'élution (50 mM Tris HCl pH 8, 250 mM imidazole et 300 mM NaCl). Les éluions de purification sont analysées par électrophorèse sur gel polyacrylamide en

conditions dénaturantes (SDS-PAGE 12%). Les fractions contenant les protéines d'intérêt sont rassemblées et dialysées contre un tampon 20 mM Tris HCl pH 8 et 20 mM NaCl, puis concentrées et déposées sur la colonne mono Q® HR 16/10 échangeuse d'anions. La colonne a été préalablement préparée avec du NaCl 1M et lavée par la suite avec un tampon contenant 20 mM Tris HCl pH 8.5. L'élution est réalisée avec un gradient de NaCl de 0 à 1 M. La protéine est sortie quand la concentration en NaCl a atteint une valeur de 150 mM (14,8%). La protéine est alors dans un tampon final contenant du NaCl à une concentration de 150 mM et du Tris 20 mM à pH 8.5. La protéine a été ensuite analysée par électrophorèse sur gel polyacrylamide : le gel révèle la présence d'une protéine pure de poids moléculaire autour de 50 kDa. Les fractions ont été rassemblées, concentrées (7000 g, 30 min), puis aliquotées et conservées à -80 °C.

### **3.7.2.2. Purification de hPGI**

Le surnageant contenant les protéines totales bactériennes est passé sur une colonne contenant une résine Ni-NTA préalablement équilibrée avec du tampon de lyse. La résine (3 mL) est lavée à l'eau et ensuite équilibrée avec 15 mL (5 fois le volume de la résine) de tampon de lyse. Le surnageant est déposé, puis la résine est lavée de nouveau avec 15 mL de tampon de lyse et 40 mL de tampon de lavage. La protéine recombinante est éluée successivement avec les tampons d'élutions A, B et C (15 mL chacun). Les éluions de purification sont analysées par électrophorèse (SDS-PAGE) sur gel d'acrylamide 12%. Les fractions contenant la protéine (tampons d'élution A et B) sont collectées et concentrées. Une dernière étape de chromatographie d'exclusion (S200 Superdex HR 16/60, GE Healthcare) est réalisée dans le tampon final de la protéine (20 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 10% glycérol). Les fractions contenant la protéine sont collectées, concentrées (7000 g, 30 min), aliquotées et conservées à -80 °C.

## **3.8. Gel SDS-PAGE**

### **3.8.1. Gel de séparation**

Les deux protéines que nous avons produites ayant des tailles comprises entre 45 et 65 kDa, les gels de séparation utilisés étaient à 12% d'acrylamide. Pour ce faire, dans une fiole à vide munie d'un barreau aimanté sont placés : 4 mL de solution A (solution stock d'acrylamide : 30% (m/v), 0.8% (m/v) bis-acrylamide), 2.5 mL de solution B (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.4 %), et 3.5 mL d'eau bidistillée. La solution est dégazée par agitation sous vide. Puis 5 µL de TEMED (sous la hotte) et 50 µL de persulfate d'ammonium à 10% (m/v) sont ajoutés pour que le gel polymérise. Une fois le gel coulé entre les plaques de verre et avant sa polymérisation, il est mis à l'abri de l'air par dépôt d'une fine couche d'eau bidistillée au-dessus.

### **3.8.2. Gel de concentration**

Ce gel à 4% d'acrylamide sert, comme son nom l'indique, à conserver les échantillons déposés avant la migration résolutive. Pour ce faire, toujours dans une fiole à vide munie d'un barreau

aimanté sont placés : 1.32 mL de solution A (solution stock d'acrylamide : 30% (m/v) acrylamide, 0.8% (m/v) bis-acrylamide), 2.5 mL de solution C (Tris HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.4%), 100 µL SDS 0.4%) et 6 mL d'eau bidistillée. La solution est dégazée, puis 10 µL de TEMED (sous la hotte) et 50 µL d'APS (m/v) sont ajoutés. Avant que le gel ne polymérise, le peigne permettant de former les différents puits de dépôt est introduit.

### **3.8.3. Migration et révélation**

Les échantillons protéiques sont déposés sur le gel, préalablement installé dans la cuve d'électrophorèse. La migration est réalisée sous une tension de 180 V à un ampérage maximum de 110 mA. En fin de migration, le gel est placé pendant 30-45 min dans une solution colorante de bleu de Coomassie. Puis la décoloration s'effectue dans une solution composée de 100 mL de méthanol, 100 mL d'acide acétique glacial et 800 mL d'H<sub>2</sub>O bidistillée.

Dans une électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE = sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis), la migration des protéines ne dépend que de leur masse. Si les protéines sont préalablement chauffées en présence du détergent SDS et du β-mercaptoéthanol, les sous-unités des oligomères sont dissociées et dénaturées. Toutes les protéines qui ont subi ce traitement se retrouvent sous forme de monomères solvatés par le SDS, et sont donc chargés négativement. Les protéines, ainsi traitées, possèdent globalement toutes la même charge, et elles se séparent alors en fonction de la masse moléculaire du monomère. Les protéines migrent sous l'influence d'un champ électrique, les plus petites sont les moins freinées et migrent donc plus vite. Les protéines sont par la suite colorées au bleu de Coomassie.



**ANNEXES**



## 1. Notions de cinétique enzymatique

En 1903, Victor Henri suggère que dans une réaction enzymatique, l'hypothèse de la formation d'un complexe transitoire enzyme-substrat est nécessaire pour interpréter la spécificité d'action des enzymes. Les résultats des expériences de cinétique mettent en évidence la forme hyperbolique des variations de la vitesse initiale  $V_0$  en fonction de  $[S]$ . Le modèle de base de la cinétique enzymatique s'écrit alors:



En 1913, suite aux travaux de Victor Henri, Maud Menten et Leonor Michaelis, le système réactionnel est simplifié pour finalement décrire la réaction enzymatique à « un seul substrat » selon le modèle suivant :



L'analyse des propriétés cinétiques de nombre d'enzymes a conduit à l'équation de **Michaelis-Menten** qui relie  $V_0$  à  $[S]$  et aux constantes de vitesse des étapes individuelles :

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Cette équation, dite de Michaelis-Menten, exprime la vitesse de réaction  $V_0$  en fonction de la concentration du substrat  $[S]$  selon une relation hyperbolique où figurent deux constantes, la vitesse maximale  $V_{max}$  et la constante de Michaelis  $K_m$ . En effet,  $K_m$  est définie par le rapport  $(k_{-1} + k_{cat})/k_1$ . On remarque que lorsque  $[S] = K_m$ ,  $V_0 = V_{max}/2$ .  $K_m$  correspond donc à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse atteint la moitié de la vitesse maximale (Schéma 53). Les constantes de vitesse  $k_1$  et  $k_{-1}$  gouvernent les vitesses d'association de S et de E et de dissociation de S de ES, respectivement. La constante de vitesse de la seconde étape  $k_{cat}$ , la constante catalytique ou turnover maximal de l'enzyme, détermine la vitesse de la réaction enzymatique.

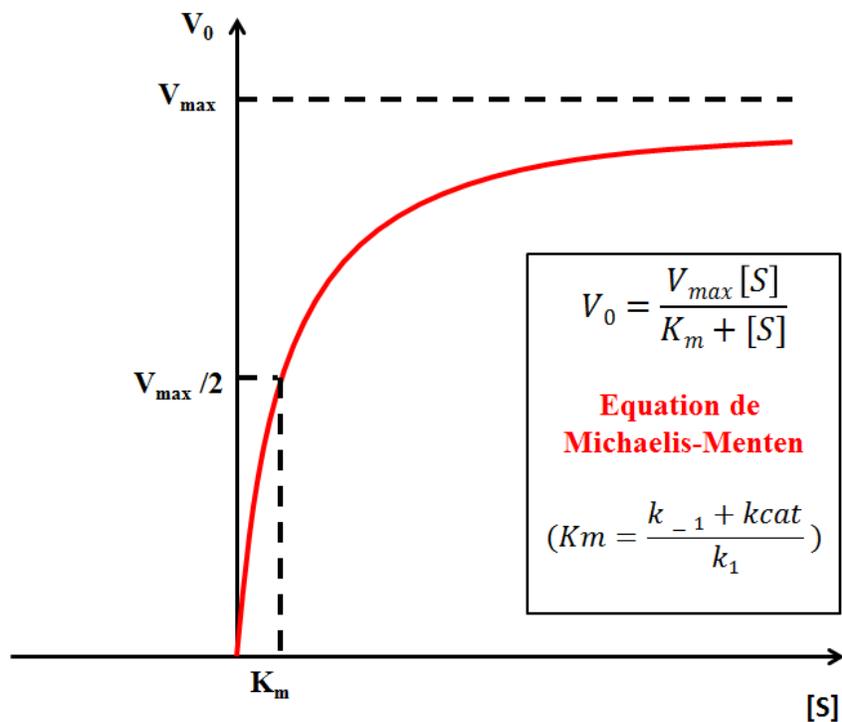


Schéma 53. Représentation de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration initiale du substrat.

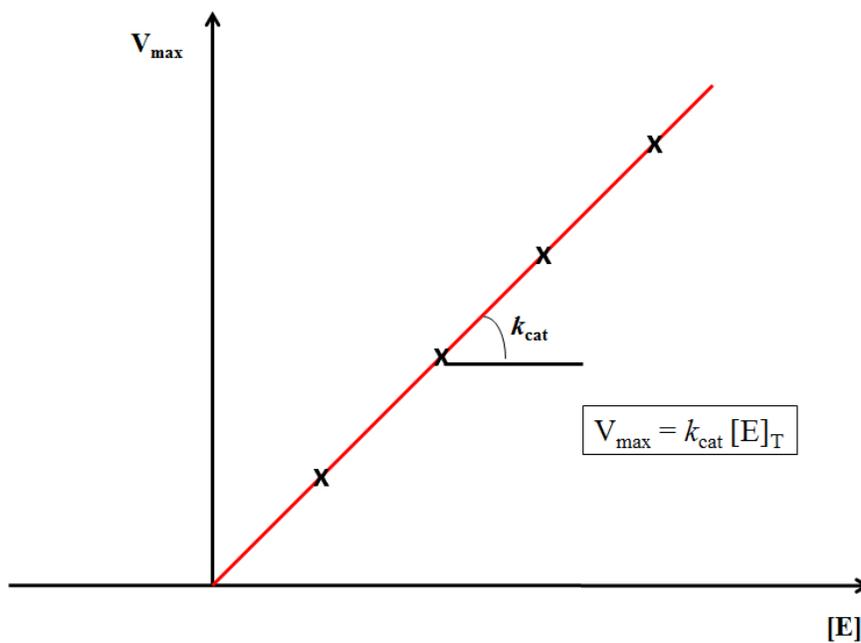


Schéma 54. Représentation de la vitesse maximale d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration d'enzyme à concentration saturante du substrat.

Aux très faibles concentrations de substrat S, une fraction seulement des centres catalytiques de l'enzyme E est engagée dans la formation du complexe ES. Lorsque [S] croît, le nombre de centres catalytiques engagés dans la formation de ES croît selon une relation hyperbolique et  $V_0$  augmente de même. Lorsque tous les centres catalytiques sont engagés, l'enzyme est saturée,  $V_0$  ne peut plus augmenter et atteint une valeur maximale  $V_{max}$ , ce qu'exprime l'asymptote du schéma 53. Enfin, lorsque le substrat est en concentration toujours saturante,  $V_0$  ne peut être que proportionnelle à [ES], c'est-à-dire à  $[E]_T$  elle-même (Schéma 54).

- **Détermination expérimentale des valeurs de  $K_m$  et de  $V_{max}$  :**

Une mesure des vitesses initiales pour une série de concentrations de substrat, à concentration fixe d'enzyme nous donne une variation hyperbolique de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration initiale du substrat (Schéma 53) et dont  $V_{max}$  correspond à l'asymptote de la courbe. Ainsi, leurs valeurs précises peuvent être déterminées par des méthodes graphiques à partir de transformations de l'équation de Michaelis-Menten qui conduisent à des relations linéaires. La plus couramment utilisée est celle de Lineweaver-Burk.

En prenant la réciproque des deux membres de l'équation de Michaelis-Menten, on arrive à :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$$

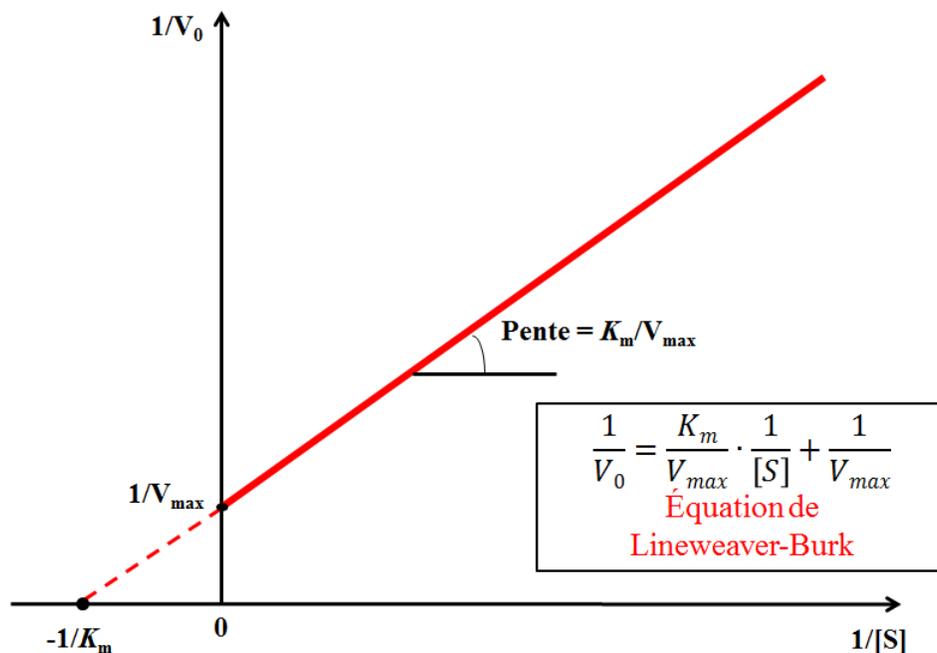


Schéma 55. Représentation de Lineweaver-Burk d'une cinétique de type de Michaelis-Menten.

Dans cette relation, dite de Lineweaver-Burk, la représentation de  $1/V_0$  en fonction de  $1/[S]$  est linéaire (Schéma 55). L'intersection de la droite représentative avec l'abscisse détermine  $-1/K_m$  et son intersection avec l'ordonnée  $1/V_{max}$ .

- **Signification de la valeur de  $K_m$ ,  $k_{cat}$  et du rapport  $k_{cat}/K_m$  :**

Dans la majorité des systèmes enzymatiques, les vitesses de formation et de dissociation de ES sont grandes par rapport à celle de sa conversion en P.  $k_{cat}$  devient alors négligeable par rapport à  $k_{-1}$  et  $K_m$  sera équivalent à la constante de dissociation  $K_d$  de ES :  $K_m = k_{-1} / k_1 = K_d$ .  $K_m$  est alors une mesure de la force de liaison du complexe et donc de l'affinité du substrat pour l'enzyme. Un  $K_m$  faible signifie que  $k_1$  est plus grand que  $k_{-1}$  et que le substrat se lie fortement à l'enzyme pour lequel il a une forte affinité.

La constante catalytique  $k_{cat}$  ou turnover de l'enzyme, est le nombre de molécules de substrat converties en produit par molécule d'enzyme et par unité de temps, habituellement la seconde, dans des conditions expérimentales données, lorsque l'enzyme est totalement saturée par le substrat. Plus grand est  $k_{cat}$ , plus rapides sont les événements catalytiques au sein du complexe enzyme-substrat.

Les deux constantes  $K_m$  et  $k_{cat}$  reflètent donc les propriétés catalytiques d'une enzyme. Le rapport  $k_{cat}/K_m$  donne une mesure directe des deux caractéristiques de la catalyse enzymatique, la spécificité et l'efficacité.

- **Régulation de l'activité enzymatique :**

L'activité enzymatique peut être affectée par de nombreux agents chimiques ou effecteurs. On distingue ainsi deux types d'effecteurs, les inhibiteurs et les activateurs. Lorsque l'effet de l'agent chimique se traduit par une diminution de l'activité enzymatique, on parle d'inhibition si l'effet est réversible ou d'inactivation s'il est irréversible. L'analyse cinétique permet l'étude des effets réversibles qui se traduisent par des variations des constantes d'activité de l'enzyme et de son affinité pour le substrat.

Plusieurs types d'inhibition réversible peuvent ainsi être distingués :

Dans un système où l'enzyme peut se combiner de façon réversible avec son inhibiteur I ou son substrat S formant ainsi des complexes ES ou EI exclusifs, l'inhibition est dite compétitive et se traduit ainsi par une diminution de l'affinité de l'enzyme pour son substrat (soit une augmentation du  $K_m$ ) sans modifier le  $V_{max}$ . Lorsque l'inhibiteur ne peut se fixer que sur le complexe de Michaelis-Menten, on parle d'inhibition incompétitive qui se traduit par une diminution du  $K_m$  et de  $k_{cat}$  et donc de  $V_{max}$ . Enfin, si l'inhibiteur peut se fixer à la fois sur l'enzyme libre et sur le complexe ES, l'inhibition est dite non compétitive et se traduit par une diminution du  $k_{cat}$  et donc de  $V_{max}$  sans modification du  $K_m$ .

Nos inhibiteurs ont été conçus pour être des inhibiteurs compétitifs potentiels. Dans ce type d'inhibition, seul le complexe ES évolue vers la formation d'un produit P. Le complexe EI est inactif et ne peut pas donner un composé qui résulterait de la transformation de I. Il ne s'établit

donc que deux équilibres entre l'enzyme libre E, le substrat S, l'inhibiteur I, le complexe enzyme-substrat ES et le complexe enzyme-inhibiteur EI selon le schéma 56.  $K_i$  étant la constante de dissociation du complexe EI, plus elle est petite, plus l'inhibiteur est efficace

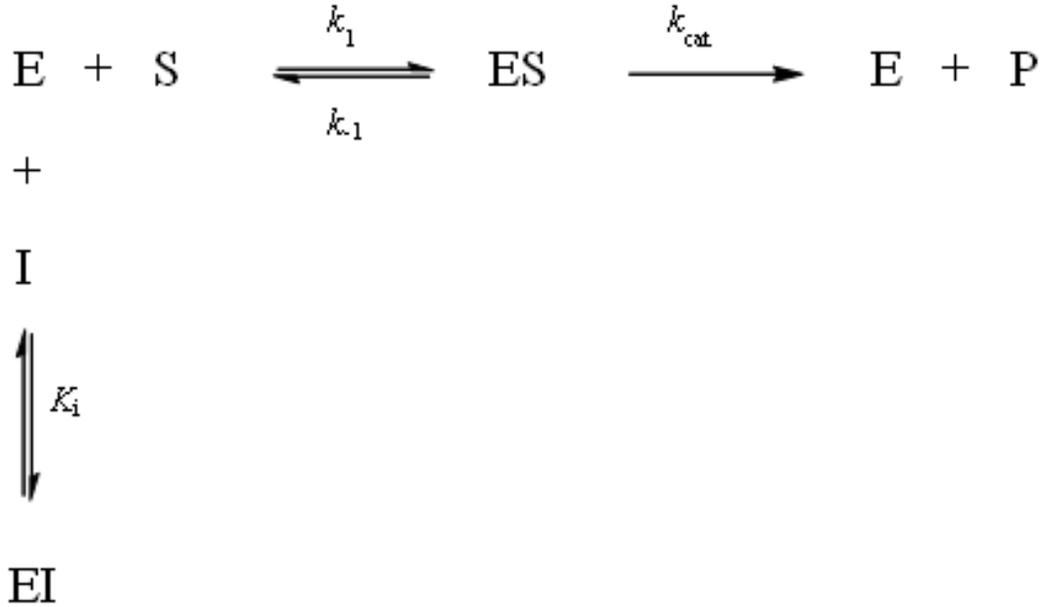


Schéma 56. Schéma de la cinétique enzymatique dans le cas d'une inhibition compétitive selon Michaelis-Menten.

La vitesse de la cinétique enzymatique s'écrit alors:

$$V_0 = V_{\text{max}} \frac{[S]}{[S] + K_{\text{mapp}}} = K_{\text{cat}}[E]_T \frac{[S]}{[S] + K_{\text{mapp}}} \text{ où } K_{\text{mapp}} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

Pour des concentrations croissantes d'inhibiteurs, selon la représentation de Lineweaver-Burk, la variation de  $1/V_0$  en fonction  $1/[S]$  est linéaire. Les droites obtenues coupent toutes l'axe des ordonnées au même point  $1/V_{\text{max}}$ , ce qui confirme que l'augmentation de la concentration du substrat vient à annuler l'effet de l'inhibiteur. Par contre, elles coupent l'axe des abscisses en des points  $-1/K_m^{\text{app}}$  dont les valeurs absolues décroissent lorsque la concentration de I augmente (Schéma 57).

La représentation de la pente de ces différentes droites en fonction de la concentration en inhibiteur I est une droite linéaire qui permet de déterminer la valeur de  $K_i$  (Schéma 58). L'efficacité de l'inhibiteur peut alors être appréciée à partir du rapport  $K_m/K_i$ . Plus ce rapport est important, plus l'inhibiteur est efficace.

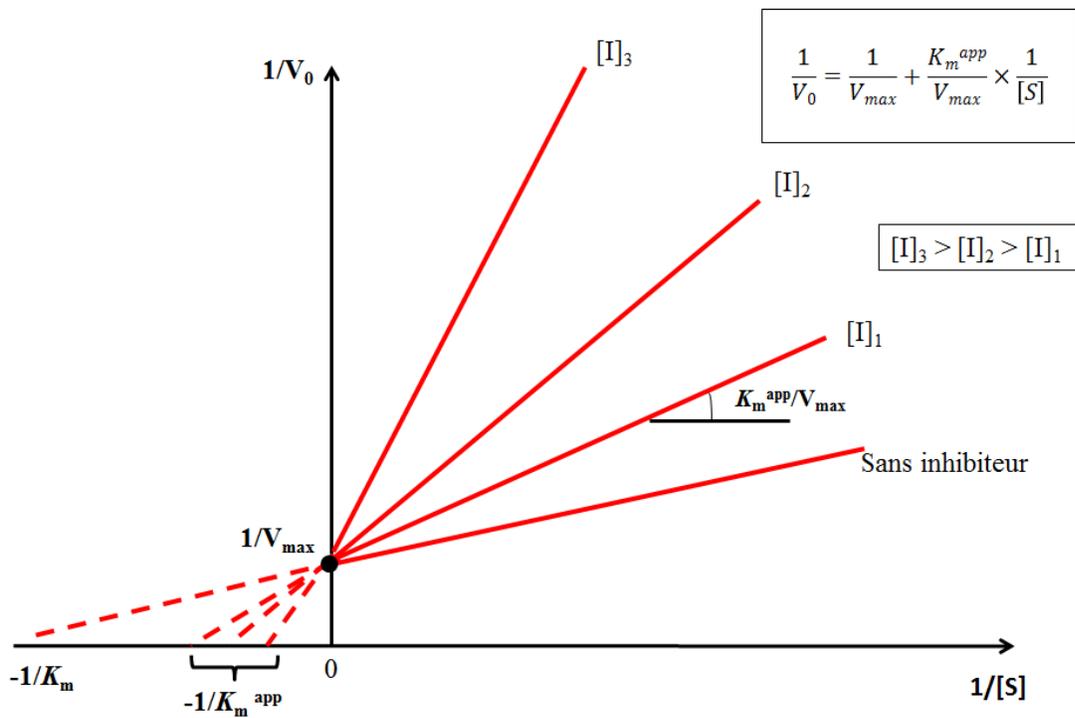


Schéma 57. Représentation de Lineweaver-Burk d'une inhibition compétitive.

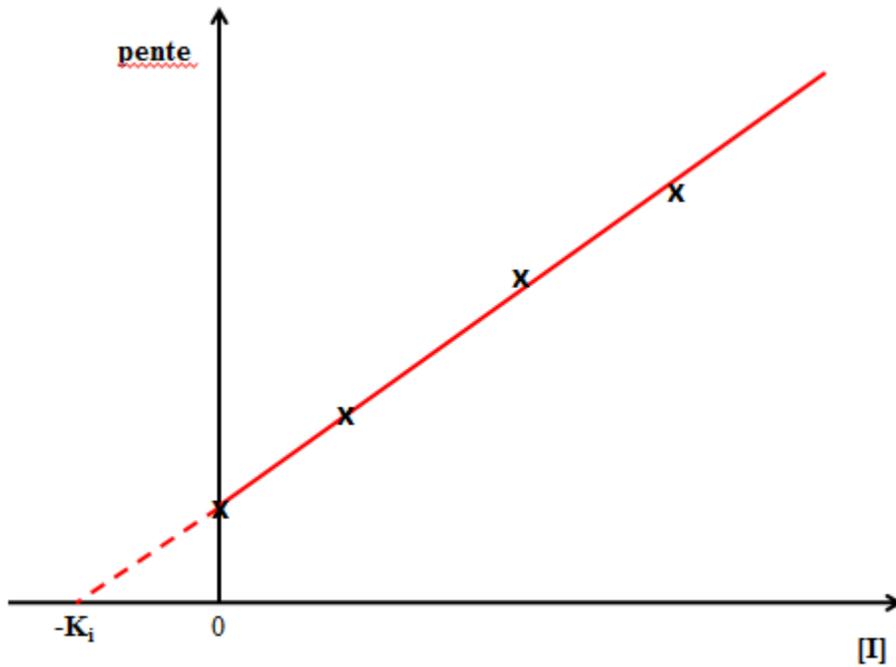


Schéma 58. Représentation graphique secondaire de la pente  $K_{mapp}/V_{max}$  en fonction de la concentration en inhibiteur  $[I]$ .

## 2. Les méthodes électrochimiques utilisées

Deux techniques voltampérométriques ont été principalement utilisés : la voltampérométrie cyclique et la voltampérométrie à vague carrée. Ces méthodes étudient la variation du courant résultant de l'oxydation ou de la réduction d'une espèce électroactive en réponse à une différence de potentiel appliquée entre une électrode de travail et une électrode de référence. Le montage voltampérométrique classique repose sur l'utilisation d'un système à 3 électrodes comme montre la figure 79. L'électrode de référence (Ag/AgCl ou électrode au calomel saturées en KCl) dont le potentiel est constant et connu ne sert qu'à imposer un potentiel bien précis à l'électrode de travail qui est le siège de la réaction d'oxydo-réduction. Cette différence de potentiel est fourni par un potentiostat et le courant traversant le circuit est mesuré entre l'électrode de travail et une troisième électrode inerte appelée contre-électrode ou électrode auxiliaire (généralement un fil de platine). En effet, aucun courant ne doit circuler à travers l'électrode de référence afin de maintenir fixe son potentiel, d'où le recours à l'électrode auxiliaire.

Au cours de notre travail, une électrode d'or a servi comme électrode indicatrice ou de travail, un fil de platine comme électrode auxiliaire et Ag/AgCl/KCl<sub>saturé</sub> comme électrode de référence. Le tout est mis dans une cellule électrolytique classique fermée pour éviter la dissolution de l'oxygène ambiant dans le milieu.

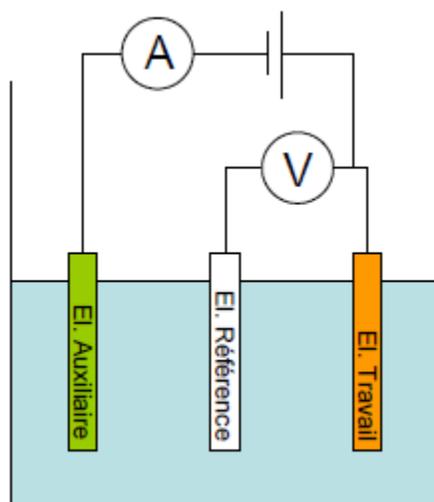


Figure 79. Montage d'une cellule voltampérométrique à trois électrodes.

### 2.1. Les voltampérométries cyclique et à vague carrée

Dans un premier temps la voltampérométrie cyclique (CV : *cyclic voltammetry*) est utilisée. Cette méthode consiste à balayer linéairement le potentiel entre deux bornes  $E_1$  et  $E_2$  dans un sens et dans l'autre et d'enregistrer les courbes intensité-potential [I = f(E)]. La CV est la technique la plus couramment utilisée car elle est facile à mettre en œuvre, rapide et permet d'obtenir des

informations sur les processus rédox (réversibilité, rapidité), le nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction de transfert de charge, les valeurs du potentiel anodique et cathodique, les phénomènes d'adsorption ainsi que la stabilité électrochimique du système étudié.

Dans un second temps, la voltampérométrie à onde carrée (SWV : *Square wave voltametry*) est utilisée. Dans cette méthode, dérivée de la voltamétrie cyclique, la variation de potentiel en fonction du temps consiste en une progression par palier, synchronisée à chaque marche avec deux impulsions carrées de même amplitude, de même durée et de sens opposé. Le signal mesuré est la différence entre les courants mesurés à la fin de chaque impulsion montante et descendante de l'onde carrée, permettant ainsi de minimiser le courant capacitif et d'avoir une meilleure sensibilité par rapport à la CV. Un autre avantage de cette méthode est la possibilité d'utiliser des vitesses de balayage très élevées permettant de diminuer le temps de mesure.

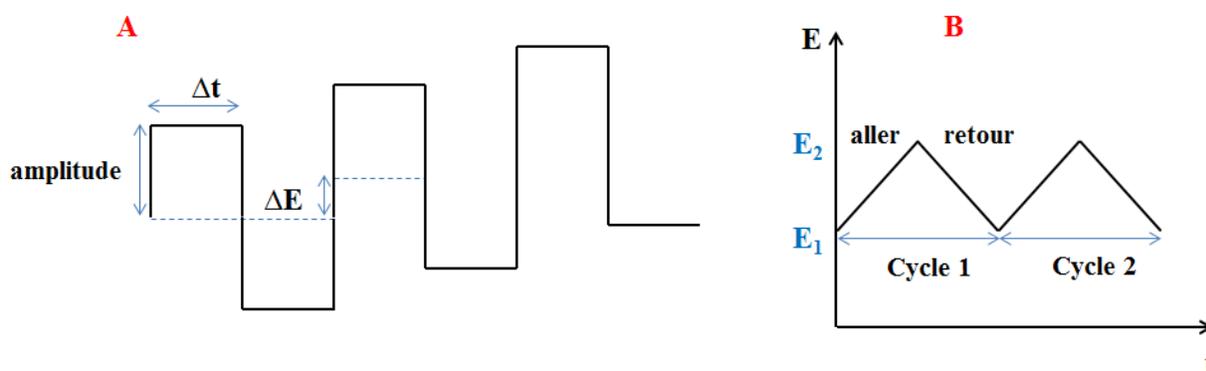


Figure 80. Allure du potentiel imposé en voltampérométrie à onde carrée (A) et cyclique (B).

### 3. Méthodes d'analyse de surface

Bien que les méthodes électrochimiques permettent d'étudier le changement de l'état de surface lors des différentes étapes de modifications électrochimiques et chimiques, elles ne permettent pas d'avoir une connaissance exacte de la composition de la couche organique ni de sa morphologie. Il est souvent utile d'avoir recours à plusieurs techniques d'analyse afin d'élucider les différents phénomènes de surface. Pour caractériser les différentes étapes de construction de notre biocapteur, trois techniques d'analyse de surface ont été principalement utilisées : la microscopie à force atomique (AFM pour *atomic force microscopy*), la microscopie électronique à balayage (MEB) et la spectrométrie de photoélectrons couramment désignée par XPS (*X-Ray photoelectron spectroscopy*). Nous aborderons brièvement les principes de fonctionnement de ces différentes méthodes d'analyse.

#### 3.1. Spectroscopie de photoélectrons ou XPS

La spectroscopie de photoélectrons XPS consiste en l'analyse de l'énergie cinétique des électrons issus de l'ionisation des éléments d'un solide irradié par un faisceau monochromatique

de rayons X. L'analyse des énergies cinétiques de ces électrons permet d'obtenir leurs énergies de liaison et donc de remonter à la composition chimique d'une surface sur une profondeur variant de 1 à 10 nm. Tous les éléments sauf l'hydrogène et l'hélium sont détectables.

### **3.2. Microscope électronique à balayage (MEB)**

Cette technique est très semblable à la microscopie optique, mais utilise un faisceau d'électrons plutôt que la lumière (photons) permettant ainsi d'obtenir une plus grande résolution spatiale. Comme son nom l'indique, le fonctionnement est basé sur le bombardement d'une surface par un faisceau d'électrons et la détection des signaux provenant de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon (flux d'électrons secondaires). Les électrons sont attirés vers une grille chargée positivement où ils sont traduits en signal pour donner des images. Donnant des images d'une résolution nanométrique, la microscopie électronique à balayage permet d'effectuer une analyse qualitative et de fournir des informations utiles sur la morphologie de surface des dépôts.

### **3.3. Microscope à force atomique (AFM)**

Le microscope à force atomique ou AFM pour « atomic force microscopy » est un outil pertinent pour fournir des informations sur la topographie d'une surface ainsi que la distribution des molécules greffées sur un support. Son principe repose sur la détection des interactions attractives de type Van der Waals, ou répulsives, entre une pointe effilée fixée au bout d'un levier et la surface. Lorsque la pointe rencontre un atome ou une molécule, la force appliquée sur la pointe change, ce qui se traduit par un changement de position verticale de la pointe. Comme on peut le voir sur la figure 81, les variations de hauteur de la pointe sont détectées par un faisceau laser réfléchi par la surface plane du bras flexible vers une photodiode à quatre quadrants.

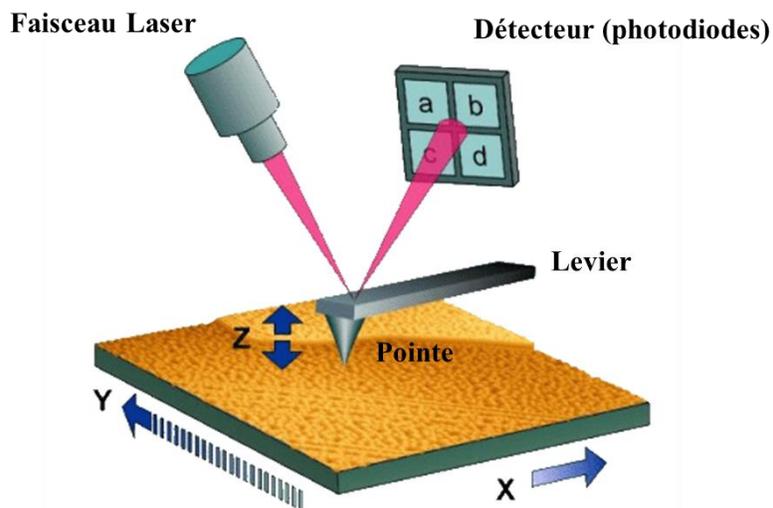


Figure 81. Principe de la microscopie à force atomique.

C'est cette variation de la hauteur qui permet d'imager la surface étudiée. En effet, en l'absence d'une déviation, le faisceau frappe le centre du détecteur et illumine les 4 photodiodes de manière uniforme. Lorsqu'une déviation a lieu, certains quadrants de photodiodes reçoivent plus d'intensités que d'autres ; il apparaît ainsi une différence de tension directement liée aux forces d'interaction et à la hauteur de l'échantillon. L'avantage principal de cette technique est la possibilité d'analyser des échantillons non conducteurs étant donné que la pointe est en contact direct avec la surface.

Les deux techniques MEB et AFM sont complémentaires et offrent une bonne résolution à l'échelle nanométrique. Cependant, avec des images générées par le MEB, il peut parfois être difficile de déterminer la pente d'une surface, ce qui est possible avec l'AFM, une technique capable de construire une image tridimensionnelle de la surface analysée.

#### **4. Données cristallographiques des structures obtenues**

Cf. pages suivantes.

Tableau 17. Les données cristallographiques de la structure 3D du complexe CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7).

X-ray source	PROXIMA 1
Wavelength (Å)	0.9786
Temperature (K)	100
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 88.0, b = 107.9, c = 44.0, \alpha = \beta = \gamma = 90.0$
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Resolution limits <sup>†</sup> (Å)	45.98 - 1.85 (1.96 - 1.85)
Number of observations <sup>†</sup>	194489(30982)
Number of unique reflections	36611(5752)
R-meas <sup>†</sup> (%)	11.7(110.3)
Completeness <sup>†</sup> (%)	99.5(98.4)
I/ $\sigma$ <sup>†</sup> (I)	8.92(1.16)
CC (1/2)	99.7(57.1)

<sup>†</sup> Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

<sup>\$</sup> Values for resolution limits: (1.96 - 1.85).

Tableau 18. Les données de raffinement de la structure 3D du complexe CaPMI-5PAHz (PDB 5NW7).

Number of non-hydrogen atoms (Protein/other)	3431/264
R/R <sub>free</sub> (%)	0.173/0.207
R.M.S.D. Bonds (Å)/angles (°)	0.018/1.022
Average temperature factors (Protein/other)	33.65/38.61

Tableau 19. Les données cristallographiques de la structure 3D du complexe hPGI-5PAED.

X-ray source	PROXIMA 2
Wavelength (Å)	0.9801
Temperature (K)	100
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 96.11, b = 96.11, c = 271.45, \alpha = \beta = \gamma = 90.0$
Space group	P4 <sub>3</sub>
Resolution limits <sup>†</sup> (Å)	47.32 – 2.38 (2.52 -2.38)
Number of observations <sup>†</sup>	339425(53656)
Number of unique reflections	97562(15379)
R-meas <sup>†</sup> (%)	11.9(97.4)
Completeness <sup>†</sup> (%)	99.2(97.0)
I/ $\sigma$ <sup>†</sup> (I)	8.12(1.57)
CC (1/2)	99.5(82.1)

<sup>†</sup> Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

<sup>§</sup> Values for resolution limits: (2.52 -2.38).

Tableau 20. Les données de raffinement de la structure 3D du complexe hPGI-5PAED.

Number of non-hydrogen atoms (Protein/other/water)	18019/66/271
R/R <sub>free</sub> (%)	26.34/31.69
R.M.S.D. Bonds (Å)/angles (°)	0.01/1.44
Average temperature factors (Protein/other)	74.77/64.6/42.5

## **PUBLICATIONS**

**Carbohydrate-based electrochemical biosensor for detection of a cancer biomarker in human plasma.**

Marion Devillers, Lama Ahmad, Hafsa Korri-Youssoufi, Laurent Salmon

*Biosens. Bioelectron.* **2017**, *96*, 178-185.

**The Crystal Structure of Phosphomannose Isomerase from *Candida albicans* Complexed with 5-Phospho-D-Arabinonhydrazide Identifies the Role of Glu294 in Catalysis.**

Lama Ahmad, Stéphane Plancqueel, Virginie Dubosclard, Noureddine Lazar, Wadih Ghattas, Inès Li de la Sierra-Gallay, Herman van Tilbeurgh, Laurent Salmon

*J. Mol. Biol.* **2017**, soumise.



## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Zeikus, J. G.; Savchenko, A.; Sriprapundh, D.; Vieille, C. *Recent Adv. Carbohydr. Bioeng. Proc. 3rd Carbohydr. Bioeng. Meet. Univ. Newctle. Tyne UK 11-14 April 1999*, 1999, 253–262.
2. Komericki, P.; Akkilic-Materna, M.; Strimitzer, T.; Weyermair, K.; Hammer, H. F.; Aberer, W. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, *36*, 980–987.
3. Lohmann K. *Biochem. Z.* **1933**, *262*, 137–142.
4. Gottschalk, A. *Biochem. J.* **1947**, *41*, 276–280.
5. Slein, M. W. *J. Biol. Chem.* **1950**, *186*, 753–761.
6. Noltmann, E.; Bruns, F. H. *Biochem. Z.* **1958**, *330*, 514–520.
7. Rose, I. A.; O'connell, E. L. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 3086–3092.
8. Rose, I. A. *Brookhaven Symp. Biol.* **1962**, *15*, 293–309.
9. Malaisse-Lagae, F.; Liemans, V.; Yaylali, B.; Sener, A.; Malaisse, W. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *998*, 118–125.
10. Rose, I. A. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1975**, *43*, 491–517.
11. Rieder, S. V.; Rose, I. A. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 1007–1010.
12. Davenport, R. C.; Bash, P. A.; Seaton, B. A.; Karplus, M.; Petsko, G. A.; Ringe, D. *Biochemistry (Mosc.)* **1991**, *30*, 5821–5826.
13. Allen, K. N. [b1] (analytic); Lavie, A. [b1] (analytic); Farber, G. K. (analytic); Glasfeld, A. (analytic); Petsko, G. A. [b1] (analytic); Ringe, D. [b1] (analytic) *Biochem. Easton* **1994**, *33*, 1481–1487.
14. Whitlow, M.; Howard, A. J.; Finzel, B. C.; Poulos, T. L.; Winborne, E.; Gilliland, G. L. *Proteins* **1991**, *9*, 153–173.
15. Rose, I. A.; O'Connell, E. L.; Schray, K. J. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 2232–2234.
16. Schray, K. J.; Waud, J. M.; Howell, E. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, *189*, 106–108.
17. Malaisse-Lagae, F.; Willem, R.; Penders, M.; Malaisse, W. J. *Mol. Cell. Biochem.* **1992**, *115*, 137–142.
18. Duan, Y.; Zhai, C.; Li, H.; Li, J.; Mei, W.; Gui, H.; Ni, D.; Song, F.; Li, L.; Zhang, W.; Yang, J. *Plant Cell Rep.* **2012**, *31*, 1611–1624.
19. Thiruvengadam, M.; Hsu, W.-H.; Yang, C.-H. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* **2010**, *104*, 239–246.
20. Joersbo, M.; Donaldson, I.; Kreiberg, J.; Petersen, S. G.; Brunstedt, J.; Okkels, F. T. *Mol. Breed.* **1998**, *4*, 111–117.
21. Bruns, F. H.; Noltmann, E. *Nature* **1958**, *181*, 1467–1468.
22. Gracy, R. W.; Noltmann, E. A. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 3161–3168.
23. Gracy, R. W.; Noltmann, E. A. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 4109–4116.
24. Wells, T. N. C.; Coulin, F.; Payton, M. A.; Proudfoot, A. E. I. *Biochemistry (Mosc.)* **1993**, *32*, 1294–1301.
25. Proudfoot, A. E. I.; Payton, M. A.; Wells, T. N. C. *J. Protein Chem.* **1994**, *13*, 619–627.
26. Smith, D. J.; Payton, M. A. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 6030–6038.
27. Cleasby, A.; Wonacott, A.; Skarzynski, T.; Hubbard, R. E.; Davies, G. J.; Proudfoot, A. E.; Bernard, A. R.; Payton, M. A.; Wells, T. N. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 470–479.
28. Smith, D. J.; Proudfoot, A. E. I.; Detiani, M.; Wells, T. N. C.; Payton, M. A. *Yeast* **1995**, *11*, 301–310.

29. Proudfoot, A. E.; Turcatti, G.; Wells, T. N.; Payton, M. A.; Smith, D. J. *Eur. J. Biochem. FEBS* **1994**, *219*, 415–423.
30. Collins, L. V.; Hackett, J. *Gene* **1991**, *103*, 135–136.
31. Griffin, A. M.; Poelwijk, E. S.; Morris, V. J.; Gasson, M. J. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *154*, 389–396.
32. Jensen, S. O.; Reeves, P. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1382*, 5–7.
33. Wu, B.; Zhang, Y.; Zheng, R.; Guo, C.; Wang, P. G. *FEBS Lett.* **2002**, *519*, 87–92.
34. Shinabarger, D.; Berry, A.; May, T. B.; Rothmel, R.; Fialho, A.; Chakrabarty, A. M. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2080–2088.
35. Ideguchi, T.; Hu, C.; Kim, B. H.; Nishise, H.; Yamashita, J.; Kakuno, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1172*, 329–331.
36. Papoutsopoulou, S. V.; Kyriakidis, D. A. *Mol. Cell. Biochem.* **1997**, *177*, 183–191.
37. Schmidt, M.; Arnold, W.; Niemann, A.; Kleickmann, A.; Pühler, A. *Gene* **1992**, *122*, 35–43.
38. Garami, A.; Ilg, T. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6566–6575.
39. Guest, J. R.; Roberts, R. E. *J. Bacteriol.* **1983**, *153*, 588–596.
40. Jensen, S. O.; Reeves, P. R. *Microbiol. Read. Engl.* **2001**, *147*, 599–610.
41. Wills, E. A.; Roberts, I. S.; Del Poeta, M.; Rivera, J.; Casadevall, A.; Cox, G. M.; Perfect, J. R. *Mol. Microbiol.* **2001**, *40*, 610–620.
42. Sagurthi, S. R.; Gowda, G.; Savithri, H. S.; Murthy, M. R. N. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 724–732.
43. Roux, C.; Gresh, N.; Perera, L. E.; Piquemal, J.-P.; Salmon, L. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 938–957.
44. Sá-Correia, I.; Darzins, A.; Wang, S. K.; Berry, A.; Chakrabarty, A. M. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 3224–3231.
45. Franklin, M. J.; Nivens, D. E.; Weadge, J. T.; Howell, P. L. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*.
46. Islam, M. A.; Tchigvintsev, A.; Yim, V.; Savchenko, A.; Yakunin, A. F.; Mahadevan, R.; Edwards, E. A. *Microb. Biotechnol.* **2016**, *9*, 47–60.
47. Kim et al. **2004**.
48. Cuff et al. **2005**.
49. Wasserman et al. **2007**.
50. Wells, T. N.; Scully, P.; Magnenat, E. *Biochemistry (Mosc.)* **1994**, *33*, 5777–5782.
51. Topper, Y. J. *J. Biol. Chem.* **1957**, *225*, 419–425.
52. Gracy, R. W.; Noltmann, E. A. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 5410–5419.
53. Roux, C.; Bhatt, F.; Foret, J.; de Courcy, B.; Gresh, N.; Piquemal, J.-P.; Jeffery, C. J.; Salmon, L. *Proteins* **2011**, *79*, 203–220.
54. Gresh, N.; Perahia, D.; de Courcy, B.; Foret, J.; Roux, C.; El-Khoury, L.; Piquemal, J.-P.; Salmon, L. *J. Comput. Chem.* **2016**, *37*, 2770–2782.
55. Panneerselvam, K.; Freeze, H. H. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9417–9421.
56. Panneerselvam, K.; Etchison, J. R.; Freeze, H. H. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23123–23129.
57. Alton, G.; Hasilik, M.; Niehues, R.; Panneerselvam, K.; Etchison, J. R.; Fana, F.; Freeze, H. H. *Glycobiology* **1998**, *8*, 285–295.
58. Ruiz-Herrera, J.; Elorza, M. V.; Valentín, E.; Sentandreu, R. *FEMS Yeast Res.* **2006**, *6*, 14–29.
59. Chaffin, W. L.; López-Ribot, J. L.; Casanova, M.; Gozalbo, D.; Martínez, J. P. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 130–180.
60. Netea, M. G.; Brown, G. D.; Kullberg, B. J.; Gow, N. A. R. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 67–78.

61. Netea, M. G.; Gow, N. A. R.; Munro, C. A.; Bates, S.; Collins, C.; Ferwerda, G.; Hobson, R. P.; Bertram, G.; Hughes, H. B.; Jansen, T.; Jacobs, L.; Buurman, E. T.; Gijzen, K.; Williams, D. L.; Torensma, R.; McKinnon, A.; MacCallum, D. M.; Odds, F. C.; Van der Meer, J. W. M.; Brown, A. J. P.; Kullberg, B. J. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1642–1650.
62. López-Ribot, J. L.; Casanova, M.; Murgui, A.; Martínez, J. P. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2004**, *41*, 187–196.
63. Klis, F. M.; de Groot, P.; Hellingwerf, K. *Med. Mycol.* **2001**, *39 Suppl 1*, 1–8.
64. Sandin, R. L.; Rogers, A. L. *Mycopathologia* **1982**, *77*, 23–26.
65. Sandin, R. L.; Rogers, A. L.; Patterson, R. J.; Beneke, E. S. *Infect. Immun.* **1982**, *35*, 79–85.
66. Lee, J. C.; King, R. D. *Infect. Immun.* **1983**, *41*, 1024–1030.
67. Martínez-Duncker, I.; Díaz-Jiménez, D. F.; Mora-Montes, H. M. *Int. J. Microbiol.* **2014**, *2014*, 267497.
68. Shahana, S.; Mora-Montes, H. M.; Castillo, L.; Bohovych, I.; Sheth, C. C.; Odds, F. C.; Gow, N. A. R.; Brown, A. J. P. *Fungal Genet. Biol. FG B* **2013**, *56*, 107–115.
69. Fan, J.; Chaturvedi, V.; Shen, S.-H. *J. Mol. Evol.* **2002**, *55*, 336–346.
70. Luo, L.; Tong, X.; Farley, P. C. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2007**, *51*, 14–17.
71. Horn, D. L.; Neofytos, D.; Anaissie, E. J.; Fishman, J. A.; Steinbach, W. J.; Olyaei, A. J.; Marr, K. A.; Pfaller, M. A.; Chang, C.-H.; Webster, K. M. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2009**, *48*, 1695–1703.
72. Kreuzsch, A.; Karstaedt, A. S. *Int. J. Infect. Dis.* **2013**, *17*, e621–e623.
73. Morgan, J. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2005**, *7*, 429–439.
74. Tumbarello, M.; Tacconelli, E.; de Gaetano Donati, K.; Morace, G.; Fadda, G.; Cauda, R. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **1999**, *18*, 478–483.
75. Ramage, G.; Mowat, E.; Jones, B.; Williams, C.; Lopez-Ribot, J. *Crit. Rev. Microbiol.* **2009**, *35*, 340–355.
76. Blankenship, J. R.; Mitchell, A. P. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 588–594.
77. Lamb, D. C.; Kelly, D. E.; White, T. C.; Kelly, S. L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 63–67.
78. White, T. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1488–1494.
79. Nolte, F. S.; Parkinson, T.; Falconer, D. J.; Dix, S.; Williams, J.; Gilmore, C.; Geller, R.; Wingard, J. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 196–199.
80. Ramage, G.; Bachmann, S.; Patterson, T. F.; Wickes, B. L.; López-Ribot, J. L. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, 973–980.
81. Marchaim, D.; Lemanek, L.; Bheemreddy, S.; Kaye, K. S.; Sobel, J. D. *Obstet. Gynecol.* **2012**, *120*, 1407–1414.
82. tropicales, F. G. S. de M. infectieuses et; Quesnay, C. F.; fr, 78200 Mantes-la-jolie e-mail : f granier@ch-mantes-la-jolie rss /data/revues/12945501/00050001/39/ **2008**.
83. Fang, W.; Yu, X.; Wang, B.; Zhou, H.; Ouyang, H.; Ming, J.; Jin, C. *Microbiology* **2009**, *155*, 3281–3293.
84. Smith, D. J.; Proudfoot, A.; Friedli, L.; Klig, L. S.; Paravicini, G.; Payton, M. A. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 2924–2930.
85. Salas, M.; Vinuela, E.; Sols, A. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 561–568.
86. Willem, R.; Biesemans, M.; Hallenga, K.; Lippens, G.; Malaisse-Lagae, F.; Malaisse, W. J. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 210–217.
87. Seeholzer, S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 1237–1241.
88. Fothergill-Gilmore, L. A.; Michels, P. A. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1993**, *59*, 105–235.

89. Watanabe, H.; Takehana, K.; Date, M.; Shinozaki, T.; Raz, A. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2960–2963.
90. Jeffery, C. J.; Bahnson, B. J.; Chien, W.; Ringe, D.; Petsko, G. A. *Biochemistry (Mosc.)* **2000**, *39*, 955–964.
91. Sun, Y. J.; Chou, C. C.; Chen, W. S.; Wu, R. T.; Meng, M.; Hsiao, C. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 5412–5417.
92. PARR, C. W. *Nature* **1956**, *178*, 1401–1401.
93. Hansen, T.; Wendorff, D.; Schönheit, P. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 2262–2272.
94. Swan, M. K.; Hansen, T.; Schönheit, P.; Davies, C. *Biochemistry (Mosc.)* **2004**, *43*, 14088–14095.
95. Shaw, P. J.; Muirhead, H. *FEBS Lett.* **1976**, *65*, 50–55.
96. Shaw, P. J.; Muirhead, H. *J. Mol. Biol.* **1977**, *109*, 475–485.
97. Cordeiro, A. T.; Godoi, P. H. C.; Delboni, L. F.; Oliva, G.; Thiemann, O. H. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2001**, *57*, 592–595.
98. Read, J.; Pearce, J.; Li, X.; Muirhead, H.; Chirgwin, J.; Davies, C. *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 447–463.
99. Grazi, E.; De Flora, A.; Pontremoli, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1960**, *2*, 121–125.
100. Tanaka, N.; Haga, A.; Uemura, H.; Akiyama, H.; Funasaka, T.; Nagase, H.; Raz, A.; Nakamura, K. T. *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 985.
101. Davies, C.; Muirhead, H.; Chirgwin, J. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 1111–1113.
102. Jeffery, C. J.; Hardré, R.; Salmon, L. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40*, 1560–1566.
103. Arsenieva, D.; Hardré, R.; Salmon, L.; Jeffery, C. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 5872–5877.
104. Lee, J. H.; Chang, K. Z.; Patel, V.; Jeffery, C. J. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40*, 7799–7805.
105. Patel, P. S.; Rawal, G. N.; Balar, D. B. *Tumor Biol.* **1994**, *15*, 45–51.
106. Baumann, M.; Brand, K. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 7018–7021.
107. Baumann, M.; Kappl, A.; Lang, T.; Brand, K.; Siegfried, W.; Paterok, E. *Cancer Invest.* **1990**, *8*, 351–356.
108. Schwartz, M. K. *Cancer* **1976**, *37*, 542–548.
109. Schwartz, M. K. *Cancer* **1975**, *36*, 2334–2336.
110. Voigt, W.; Rothauge, C. F.; Schäffer, R. *Urol. Aug A* **1994**, *33*, 235–242.
111. Watanabe, H.; Carmi, P.; Hogan, V.; Raz, T.; Silletti, S.; Nabi, I. R.; Raz, A. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 13442–13448.
112. Verma et al. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery* **2001**, *53*.
113. Bodansky, O. *Cancer* **1954**, *7*, 1200–1226.
114. Schwartz, M. K. *Clin. Chem.* **1973**, *19*, 10–22.
115. Liotta, L. A.; Mandler, R.; Murano, G.; Katz, D. A.; Gordon, R. K.; Chiang, P. K.; Schiffmann, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 3302–3306.
116. Nabi, I. R.; Watanabe, H.; Raz, A. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 409–414.
117. Silletti, S.; Watanabe, H.; Hogan, V.; Nabi, I.; Raz, A. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 3507–3511.
118. Gurney, M. E.; Heinrich, S. P.; Lee, M. R.; Yin, H. S. *Science* **1986**, *234*, 566–574.
119. Gurney, M. E.; Apatoff, B. R.; Spear, G. T.; Baumel, M. J.; Antel, J. P.; Bania, M. B.; Reder, A. T. *Science* **1986**, *234*, 574–581.
120. Xu, W.; Seiter, K.; Feldman, E.; Ahmed, T.; Chiao, J. W. *Blood* **1996**, *87*, 4502–4506.
121. Matsumoto, I.; Staub, A.; Benoist, C.; Mathis, D. *Science* **1999**, *286*, 1732–1735.
122. Yakirevich, E.; Naot, Y. *Biol. Reprod.* **2000**, *62*, 1016–1023.
123. Jeffery, C. J. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 8–11.

124. Sumizawa, T.; Furukawa, T.; Haraguchi, M.; Yoshimura, A.; Takeyasu, A.; Ishizawa, M.; Yamada, Y.; Akiyama, S. *J. Biochem. (Tokyo)* **1993**, *114*, 9–14.
125. Ishikawa, F.; Miyazono, K.; Hellman, U.; Drexler, H.; Wernstedt, C.; Hagiwara, K.; Usuki, K.; Takaku, F.; Risau, W.; Heldin, C. H. *Nature* **1989**, *338*, 557–562.
126. Stracke, M. L.; Kruttsch, H. C.; Unsworth, E. J.; Arestad, A.; Cioce, V.; Schiffmann, E.; Liotta, L. A. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2524–2529.
127. Nabi, I. R.; Raz, A. *Int. J. Cancer* **1987**, *40*, 396–402.
128. Nabi, I. R.; Raz, A. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 1258–1264.
129. Korman, H. J.; Peabody, J. O.; Cerny, J. C.; Farah, R. N.; Yao, J.; Raz, A. *J. Urol.* **1996**, *155*, 347–349.
130. Kara, M.; Ohta, Y.; Tanaka, Y.; Oda, M.; Watanabe, Y. *Ann. Thorac. Surg.* **2001**, *71*, 944–948.
131. Kaynak, K.; Kara, M.; Oz, B.; Akgoz, B.; Sai, M.; Raz, A. *Acta Chir. Belg.* **2005**, *105*, 378–382.
132. Takanami, I.; Takeuchi, K. *Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. Off. Publ. Jpn. Assoc. Thorac. Surg. Nihon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* **2003**, *51*, 368–373.
133. Takanami, I.; Takeuchi, K.; Watanabe, H.; Yanagawa, T.; Takagishi, K.; Raz, A. *Int. J. Cancer* **2001**, *95*, 384–387.
134. Otto, T.; Birchmeier, W.; Schmidt, U.; Hinke, A.; Schipper, J.; Rübber, H.; Raz, A. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 3120–3123.
135. Maruyama, K.; Watanabe, H.; Shiozaki, H.; Takayama, T.; Gofuku, J.; Yano, H.; Inoue, M.; Tamura, S.; Raz, A.; Monden, M. *Int. J. Cancer* **1995**, *64*, 316–321.
136. Hirono, Y.; Fushida, S.; Yonemura, Y.; Yamamoto, H.; Watanabe, H.; Raz, A. *Br. J. Cancer* **1996**, *74*, 2003–2007.
137. Nakamori, S.; Watanabe, H.; Kameyama, M.; Imaoka, S.; Furukawa, H.; Ishikawa, O.; Sasaki, Y.; Kabuto, T.; Raz, A. *Cancer* **1994**, *74*, 1855–1862.
138. Jiang, W. G.; Raz, A.; Douglas-Jones, A.; Mansel, R. E. *J. Histochem. Cytochem.* **2006**, *54*, 231–241.
139. Wang, W.; Yang, L.-Y.; Yang, Z.-L.; Peng, J.-X.; Yang, J.-Q. *Dig. Dis. Sci.* **2007**, *52*, 770–775.
140. Nagai, Y.; Ishikawa, O.; Miyachi, Y.; Watanabe, H. *Dermatol. Basel Switz.* **1996**, *192*, 8–11.
141. Haga, A.; Niinaka, Y.; Raz, A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, *1480*, 235–244.
142. Nabi, I. R.; Watanabe, H.; Raz, A. *Cancer Metastasis Rev.* **1992**, *11*, 5–20.
143. Shimizu, K.; Tani, M.; Watanabe, H.; Nagamachi, Y.; Niinaka, Y.; Shiroishi, T.; Ohwada, S.; Raz, A.; Yokota, J. *FEBS Lett.* **1999**, *456*, 295–300.
144. Haga, A.; Tanaka, N.; Funasaka, T.; Hashimoto, K.; Nakamura, K. T.; Watanabe, H.; Raz, A.; Nagase, H. *J. Mol. Biol.* **2006**, *358*, 741–753.
145. Watanabe, H.; Nabi, I. R.; Raz, A. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2699–2705.
146. Stracke, M. L.; Guirguis, R.; Liotta, L. A.; Schiffmann, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *146*, 339–345.
147. Timar, J.; Silletti, S.; Bazaz, R.; Raz, A.; Honn, K. V. *Int. J. Cancer* **1993**, *55*, 1003–1010.
148. Kanbe, K.; Chigira, M.; Watanabe, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1222*, 395–399.
149. Kohn, E. C.; Liotta, L. A.; Schiffmann, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *166*, 757–764.
150. Tsutsumi, S.; Gupta, S. K.; Hogan, V.; Collard, J. G.; Raz, A. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4484–4490.
151. Yanagawa, T.; Watanabe, H.; Takeuchi, T.; Fujimoto, S.; Kurihara, H.; Takagishi, K. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **2004**, *84*, 513–522.

152. Tsutsumi, S.; Yanagawa, T.; Shimura, T.; Kuwano, H.; Raz, A. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7775–7784.
153. Funasaka, T.; Haga, A.; Raz, A.; Nagase, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 118–128.
154. Funasaka, T.; Haga, A.; Raz, A.; Nagase, H. *Int. J. Cancer* **2002**, *101*, 217–223.
155. Yanagawa, T.; Funasaka, T.; Tsutsumi, S.; Watanabe, H.; Raz, A. *Endocr. Relat. Cancer* **2004**, *11*, 749–759.
156. Haga, A.; Funasaka, T.; Niinaka, Y.; Raz, A.; Nagase, H. *Int. J. Cancer* **2003**, *107*, 707–714.
157. Li, Y.; Wei, Z.; Dong, B.; Lian, Z.; Xu, Y. *Int. J. Mol. Med.* **2016**.
158. Niinaka, Y.; Harada, K.; Fujimuro, M.; Oda, M.; Haga, A.; Hosoki, M.; Uzawa, N.; Arai, N.; Yamaguchi, S.; Yamashiro, M.; Raz, A. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9483–9493.
159. Tsutsumi, S.; Fukasawa, T.; Yamauchi, H.; Kato, T.; Kigure, W.; Morita, H.; Asao, T.; Kuwano, H. *Int. J. Oncol.* **2009**, *35*, 1117–1121.
160. Hardré, R.; Salmon, L. *Carbohydr. Res.* **1999**, *318*, 110–115.
161. Roux, C.; Lee, J. H.; Jeffery, C. J.; Salmon, L. *Biochemistry (Mosc.)* **2004**, *43*, 2926–2934.
162. Hardré, R.; Bonnette, C.; Salmon, L.; Gaudemer, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3435–3438.
163. Chirgwin, J. M.; Noltmann, E. A. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 7272–7276.
164. Chirgwin, J. M.; Parsons, T. F.; Noltmann, E. A. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 7277–7279.
165. Gracy, R. W.; Tilley, B. E. *Methods Enzymol.* **1975**, *41*, 392–400.
166. Bergmeyer H U et al. *Phosphoglucose in Methods of enzymatic Analysis*; 3rd edition.; **1983**; Vol. 2.
167. Bodansky, O. *Cancer* **1954**, *7*, 1191–1199.
168. Dobashi, Y.; Watanabe, H.; Sato, Y.; Hirashima, S.; Yanagawa, T.; Matsubara, H.; Ooi, A. *J. Pathol.* **2006**, *210*, 431–440.
169. Dai, L.; Zhu, L.-J.; Zheng, D.-H.; Mo, Y.-Q.; Wei, X.-N.; Su, J.-H.; Pessler, F.; Zhang, B.-Y. *J. Rheumatol.* **2010**, *37*, 2452–2461.
170. Fan, L. Y.; Zong, M.; Wang, Q.; Yang, L.; Sun, L. S.; Ye, Q.; Ding, Y. Y.; Ma, J. W. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2010**, *411*, 2049–2053.
171. Zong, M.; Lu, T.; Fan, S.; Zhang, H.; Gong, R.; Sun, L.; Fu, Z.; Fan, L. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, *17*.
172. Devillers, M.; Ahmad, L.; Korri-Yousoufi, H.; Salmon, L. *Biosens. Bioelectron.*
173. Lewis, D. J.; Lowe, G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 713–715.
174. Collins, K. D. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 136–142.
175. Hall, D. R.; Leonard, G. A.; Reed, C. D.; Watt, C. I.; Berry, A.; Hunter, W. N. *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 383–394.
176. Natesh, R.; Schwager, S. L. U.; Evans, H. R.; Sturrock, E. D.; Acharya, K. R. *Biochemistry (Mosc.)* **2004**, *43*, 8718–8724.
177. Rowsell, S.; Hawtin, P.; Minshull, C. A.; Jepson, H.; Brockbank, S. M. V.; Barratt, D. G.; Slater, A. M.; McPheat, W. L.; Waterson, D.; Henney, A. M.; Pauptit, R. A. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 173–181.
178. Chantrain, C.; DeClerck, Y. A. *médecine/sciences* **2002**, *18*, 565–575.
179. Beaudeau, J.-L.; Giral, P.; Bruckert, E.; Foglietti, M.-J.; Chapman, M. J. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **2003**, *61*, 147–58.
180. Lombardi, P. M.; Cole, K. E.; Dowling, D. P.; Christianson, D. W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 735–743.

181. Puerta, D. T.; Cohen, S. M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1551–1573.
182. Jacobsen, J. A.; Major Jourden, J. L.; Miller, M. T.; Cohen, S. M. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2010**, *1803*, 72–94.
183. Pal Chaudhuri, U.; Whiteaker, L. R.; Mondal, A.; Klein, E. L.; Powell, D. R.; Houser, R. P. *Inorganica Chim. Acta* **2007**, *360*, 3610–3618.
184. Pal Chaudhuri, U.; Yang, L.; Whiteaker, L. R.; Mondal, A.; Fultz, M. R.; Powell, D. R.; Houser, R. P. *Polyhedron* **2007**, *26*, 5420–5431.
185. Fyfe, P. K.; Rao, V. A.; Zemla, A.; Cameron, S.; Hunter, W. N. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48*, 9176–9179.
186. L, S.; E, P.; C, M.; R, H.; G, M. *Carbohydr. Res.* **2001**, *335*, 195–204.
187. *Thèse de Renaud Hardré.*; **2001**.
188. Gowda, G.; Sagurthi, S. R.; Savithri, H. S.; Murthy, M. R. N. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2008**, *64*, 81–84.
189. Gracy, R. W.; Noltmann, E. A. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 3161–3168.
190. Lin, H.-Y.; Kao, Y.-H.; Chen, S.-T.; Meng, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794*, 315–323.
191. Bernard, A. R.; Wells, T. N. C.; Cleasby, A.; Borlat, F.; Payton, M. A.; Proudfoot, A. E. I. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 111–118.
192. McCall, K. A.; Huang, C.; Fierke, C. A. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1437S–46S.
193. Sousa, S. F.; Lopes, A. B.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Dalton Trans.* **2009**, 7946–7956.
194. Laitaoja, M.; Valjakka, J.; Jänis, J. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 10983–10991.
195. Seeholzer, S. H. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**, *90*, 1237–1241.
196. Rose, I. A.; O’Connell, E. L.; Schray, K. J. *J Biol Chem* **1973**, *248*, 2232–2234.
197. Schray, K. J.; Waud, J. M.; Ehrhardt Howell, E. *Arch Biochem Biophys* **1978**, *189*, 106–108.
198. Malaisse-Lagae, F.; Willem, R.; Penders, M.; Malaisse, W. J. *Mol Cell Biochem* **1992**, *115*, 137–142.
199. Duffy, M. J. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2001**, *38*, 225–262.
200. Sokoll, L. J.; Chan, D. W. *Urol. Clin. North Am.* **1997**, *24*, 253–259.
201. Contié, S.; Voorzanger-Rousselot, N.; Litvin, J.; Clézardin, P.; Garnero, P. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 352–360.
202. Malanchi, I.; Santamaria-Martínez, A.; Susanto, E.; Peng, H.; Lehr, H.-A.; Delaloye, J.-F.; Huelsken, J. *Nature* **2012**, *481*, 85–89.
203. Baumann, M.; Brand, K.; Giedl, J.; Hermanek, P.; Ruf, S.; Scheele, J.; Hoferichter, S.; Gall, F. P. *Oncology* **1988**, *45*, 153–158.
204. Heller, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 50–54.
205. Davis, K. A.; Leary, T. R. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1227–1230.
206. Daniels, P. B.; Deacon, J. K.; Eddowes, M. J.; Pedley, D. G. *Sens. Actuators* **1988**, *15*, 11–18.
207. Zhang, Y.; Tadigadapa, S. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1733–1743.
208. Turner, A. P.; Chen, B.; Piletsky, S. A. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1596–1601.
209. Clark, L. C.; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29–45.
210. Yoo, E.-H.; Lee, S.-Y. *Sensors* **2010**, *10*, 4558–4576.
211. Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 441–456.
212. Zeng, X.; Andrade, C. A. S.; Oliveira, M. D. L.; Sun, X.-L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3161–3176.
213. Fukui, S.; Feizi, T.; Galustian, C.; Lawson, A. M.; Chai, W. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1011–1017.
214. Houseman, B. T.; Mrksich, M. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 443–454.

215. Bryan, M. C.; Plettenburg, O.; Sears, P.; Rabuka, D.; Wacowich-Sgarbi, S.; Wong, C.-H. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 713–720.
216. Fazio, F.; Bryan, M. C.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397–14402.
217. Köhn, M.; Wacker, R.; Peters, C.; Schröder, H.; Soulère, L.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2003**, *42*, 5830–5834.
218. Bryan, M. C.; Fazio, F.; Lee, H.-K.; Huang, C.-Y.; Chang, A.; Best, M. D.; Calarese, D. A.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; Burton, D.; Wilson, I. A.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8640–8641.
219. Otamiri, M.; Nilsson, K. G. I. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *26*, 263–268.
220. Dechtrirat, D.; Gajovic-Eichelmann, N.; Wojcik, F.; Hartmann, L.; Bier, F. F.; Scheller, F. W. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *58*, 1–8.
221. Zhang, X.; Lu, W.; Shen, J.; Jiang, Y.; Han, E.; Dong, X.; Huang, J. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 291–298.
222. Chikae, M.; Fukuda, T.; Kerman, K.; Idegami, K.; Miura, Y.; Tamiya, E. *Bioelectrochemistry* **2008**, *74*, 118–123.
223. Miodek, A.; Mejri-Omrani, N.; Khoder, R.; Korri-Youssoufi, H. *Talanta* **2016**, *154*, 446–454.
224. Richad, C.; Korri-Youssoufi, H.; Yassar, A. In *Synthetic metals*; Elsevier, **2001**; Vol. 121, pp. 1261–1262.
225. Ramanavičius, A.; Ramanavičienė, A.; Malinauskas, A. *Electrochimica Acta* **2006**, *51*, 6025–6037.
226. Han, D.-H.; Lee, H. J.; Park, S.-M. *Electrochimica Acta* **2005**, *50*, 3085–3092.
227. Genies, E. M.; Bidan, G.; Diaz, A. F. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1983**, *149*, 101–113.
228. Miodek, A.; Castillo, G.; Hianik, T.; Korri-Youssoufi, H. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *56*, 104–111.
229. Miodek, A.; Mejri, N.; Gomgnimbou, M.; Sola, C.; Korri-Youssoufi, H. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9257–9264.
230. Ghanem, M. A.; Chrétien, J.-M.; Pinczewska, A.; Kilburn, J. D.; Bartlett, P. N. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4917–4927.
231. Chrétien, J.-M.; Ghanem, M. A.; Bartlett, P. N.; Kilburn, J. D. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2008**, *14*, 2548–2556.
232. Zhang, L.; Jiang, X.; Wang, E.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 337–345.
233. Adenier, A.; Chehimi, M. M.; Gallardo, I.; Pinson, J.; Vilà, N. *Langmuir* **2004**, *20*, 8243–8253.
234. Miodek, A.; Castillo, G.; Hianik, T.; Korri-Youssoufi, H. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7704–7712.
235. Carquigny, S.; Sanchez, J.-B.; Berger, F.; Lakard, B.; Lallemand, F. *Talanta* **2009**, *78*, 199–206.
236. Dang, G.; Shi, Y.; Fu, Z.; Yang, W. *Particuology* **2013**, *11*, 346–352.
237. Woodbridge, C. M.; Pugmire, D. L.; Johnson, R. C.; Boag, N. M.; Langell, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3085–3093.
238. Splinter, S. J.; Rofagha, R.; McIntyre, N. S.; Erb, U. *Surf. Interface Anal.* **1996**, *24*, 181–186.
239. Raj, K. J. A.; Shanmugam, R.; Mahalakshmi, R.; Viswanathan, B. *IJC- Vol49A01 January 2010* **2010**.

**Titre :** inhibiteurs à visée thérapeutique de la phosphomannose isomérase de *Candida albicans* et du facteur de motilité autocrine : études cinétiques, structurales, mécanistiques et diagnostiques.

**Mots clés :** inhibiteurs, *C. albicans* phosphomannose isomérase, facteur de motilité autocrine, complexes enzyme-inhibiteur, biocapteur électrochimique.

**Résumé :** La phosphomannose isomérase de type I (PMI), une métalloenzyme à zinc, et la phosphoglucose isomérase (PGI), catalysent l'isomérisation réversible du  $\beta$ -D-fructose-6-phosphate (F6P), respectivement en  $\beta$ -D-mannose-6-phosphate (M6P) et en  $\alpha$ -D-glucose-6-phosphate (G6P). Ces deux enzymes sont des cibles thérapeutiques potentielles.

La phosphoglucose isomérase humaine (hPGI), connu également sous le nom de **facteur de motilité autocrine (AMF)**, stimule, en plus de son activité glycolytique intracellulaire, la migration des cellules in vitro et le développement de métastases in vivo. D'autre part, *Candida albicans* est la principale levure impliquée en pathologie humaine. Ces dernières années, un problème de résistance du germe aux antifongiques classiques est apparu. En conséquence, la recherche se dirige vers de nouvelles cibles thérapeutiques, dont la **PMI de *C. albicans* (CaPMI)** qui joue un rôle important dans la biosynthèse de structures mannosylées nécessaires à la survie du pathogène. Les réactions catalysées par ces deux enzymes mettent en jeu le même intermédiaire de haute énergie (IHE) de type 1,2-*cis*-ènediolate, sauf qu'il est coordonné au zinc dans le cas de la PMI. La surexpression ainsi que la purification de CaPMI et de hPGI ont été réalisées au laboratoire.

Une petite chimiothèque a été créée à partir du 5-phospho-D-arabinono-1,4-lactone (5-PAL) en modulant la partie tête de l'IHE. Un groupe chélatant du zinc (zinc binding group, ZBG) a été introduit dans plusieurs composés dans le but d'inhiber sélectivement CaPMI. De plus, deux composés possédant en partie tête une fonction amine terminale ont été synthétisés pour inhiber spécifiquement la PGI humaine en ciblant un résidu glutamate du site actif de l'enzyme (Glu357). Toutes ces molécules ont d'abord été testées sur la PGI du muscle de lapin et la PMI de *E. coli* commerciales, et par la suite sur la CaPMI et la hPGI surexprimées. Une série de bons voire très bons inhibiteurs de hPGI, et donc potentiellement anti-métastatiques, a été découverte. Ces composés ne sont cependant pas inhibiteurs de la CaPMI. Deux structures tridimensionnelles à haute résolution de complexes enzyme-inhibiteur ont été obtenues. Au delà des aspects thérapeutiques, mécanistiques et structuraux, un biocapteur électrochimique à base d'un des inhibiteurs synthétisés a été réalisé pour la détection de hPGI qui est un biomarqueur validé de cancers métastatiques. Ce biocapteur a démontré une limite de détection de 43 fM dans du tampon phosphate (PBS).



**Title :** inhibitors of *Candida albicans* phosphomannose isomerase and autocrine motility factor for therapeutic purposes : kinetic, structural, mecanistic and diagnostic studies.

**Keywords :** inhibitors, *C. albicans* phosphomannose isomerase, autocrine motility factor, enzyme-inhibitor complexes, electrochemical biosensor.

**Abstract :** Phosphoglucose isomerase (PGI) and type I phosphomannose isomerase (PMI), a zinc metalloenzyme, catalyze the reversible isomerization of  $\beta$ -D-fructose 6-phosphate (F6P) to  $\alpha$ -D-glucose 6-phosphate (G6P) and  $\beta$ -D-mannose 6-phosphate (M6P), respectively. These two enzymes are potential therapeutic targets.

Human PGI (hPGI) often called as **AMF-PGI (autocrine motility factor-PGI)**, in addition to its intracellular glycolytic activity, stimulates cell migration *in vitro* and metastasis *in vivo*. Inhibition of its extracellular activity is obviously interesting in oncology. On the other hand, *Candida albicans* is the main yeast involved in human pathology. During recent years, resistance of this pathogenic fungus to conventional antifungal drugs appeared. Consequently, research is moving towards new therapeutic targets, including *C. albicans* **PMI (CaPMI)** that plays an important role in the biosynthesis of mannosylated structures required for pathogen survival. The reactions catalyzed by these two enzymes involve the same high energy intermediate (HEI) type 1,2-*cis*-enediolate, except that it is coordinated to the zinc active site in the case of PMI.

Overexpression and purification of both CaPMI and hPGI were performed in our laboratory. A small chemical library was created from the synthon 5-phospho-D-arabinono-1,4-lactone (5-PAL) by modulating the head part of the HEI. A zinc binding group (ZBG) was introduced in several compounds in order to selectively inhibit the CaPMI enzyme. Moreover, two compounds with a terminal amine function were designed to selectively inhibit hPGI by targeting a glutamate residue of the enzyme (Glu357). All these molecules were first tested on rabbit muscle PGI and PMI from *E. coli*, and later on CaPMI and hPGI. None of these compounds are good inhibitors of CaPMI. However, a series of strong inhibitors of hPGI, and therefore potentially anti-metastatic drugs, was discovered. High-resolved 3D structures of the two enzymes complexed with inhibitors have been successfully obtained. Beyond the therapeutic, mechanistic and structural aspects, an electrochemical biosensor based on one of the synthesized inhibitors was carried out for the detection of hPGI, which is a validated biomarker of metastatic cancers. This biosensor demonstrated a detection limit of 43 fM in phosphate buffer (PBS).

