



Recherche de nouveaux inhibiteurs d'arginase, d'origine naturelle et hémisynthétique, inspirés de l'acide chlorogénique et du picéatannol

Thanh Nhat Pham

► To cite this version:

Thanh Nhat Pham. Recherche de nouveaux inhibiteurs d'arginase, d'origine naturelle et hémisynthétique, inspirés de l'acide chlorogénique et du picéatannol. Pharmacologie. Université de Franche-Comté, 2016. Français. <NNT : 2016BESA3010>. <tel-02003490>

HAL Id: tel-02003490

<https://theses.hal.science/tel-02003490v1>

Submitted on 1 Feb 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.



HAL Authorization

THÈSE

Recherche de nouveaux inhibiteurs d'arginase, d'origine naturelle et hémisynthétique, inspirés de l'acide chlorogénique et du picéatannol

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

École doctorale Environnements-Santé

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement

Par

Thanh-Nhat PHAM

Le 14 décembre 2016

JURY

Prof. Corine GIRARD-THERNIER
Université de Franche-Comté

Directeur de thèse

Prof. Thierry LOMBERGET
Université de Claude Bernard Lyon 1

Rapporteur

Prof. Angèle Lengo MAMBU
Université de Limoges

Rapporteur

Prof. Roland BARRET
Université de Claude Bernard Lyon 1

Examineur

Prof. Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO
Université de Reims

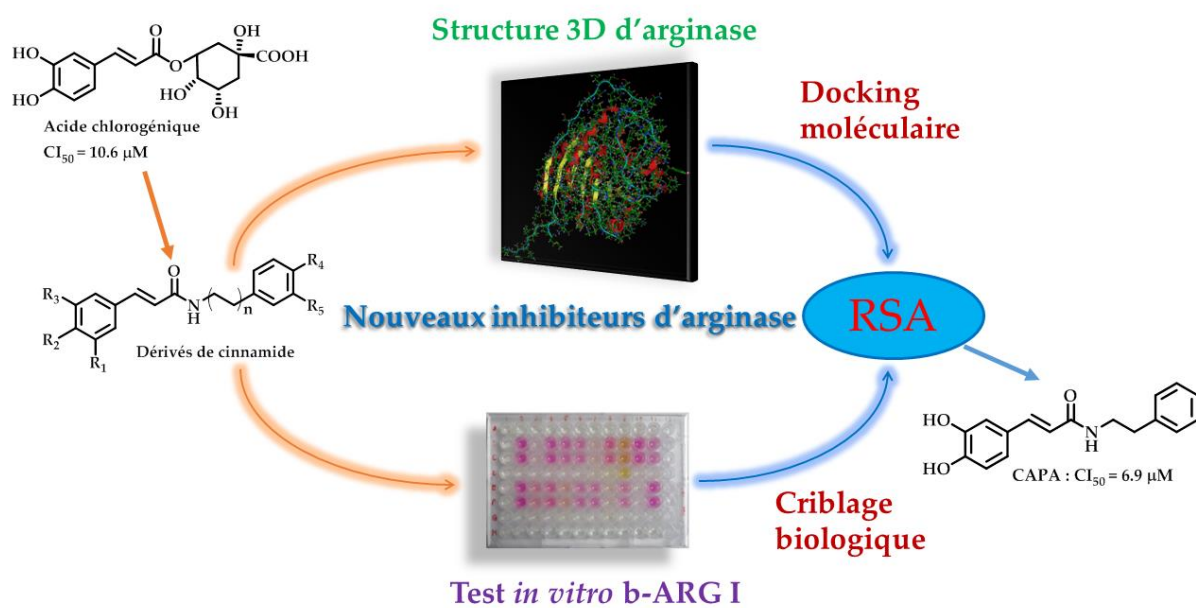
Examineur

Prof. Christophe RAMSEYER
Université de Franche-Comté

Examineur

« Le monde de la réalité a ses limites, le monde de l'imagination est sans frontières. »

Jean-Jacques Rousseau



À la mémoire de mon père PHAM Van-Hien.

À ma chère maman MANG Thi-Kim-Thuan.

À mes frères : PHAM Duy et PHAM The-Vu.

À mon amour LE Hai-Ha.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier profondément ma directrice de thèse, Madame le Professeur *Corine GIRARD-THERNIER*, pour m'avoir donné la chance de travailler sur ce projet de thèse. Merci à toi de m'avoir donné tes conseils précieux, ta disponibilité, ta confiance, ta patience, ta gentillesse, sans oublier le respect de mon autonomie au cours de ma thèse. J'ai appris de toi plein de choses, sans toi pas de « *petit pêcheur* ».

Je tiens à remercier Madame le Professeur *Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO* et Monsieur le Professeur *Roland BARRET* d'avoir accepté de faire partie du Comité de suivi de ma thèse et des membres du jury de soutenance. Merci de m'avoir donné vos conseils constructifs et vos encouragements durant mes trois années de thèse.

À Madame le Professeur *Angèle Lengo MAMBU* et Monsieur le Professeur *Thierry LOMBERGET*, je suis très honoré que vous ayez accepté d'évaluer ces travaux de thèse en tant que rapporteurs. Je vous prie d'accepter mes remerciements respectueux.

Je tiens à exprimer une grande gratitude à Monsieur le Professeur *Christophe RAMSEYER*. Je vous remercie de vous être intéressé à cette thèse et d'avoir accepté de juger ce travail.

À Madame le Professeur *Céline DEMOUGEOT*, directrice de l'EA4267, « Fonction et Dysfonction Epithéliale » je te remercie beaucoup de m'avoir chaleureusement accueilli au sein cette équipe. Un grand MERCI pour ta disponibilité et pour avoir toujours appuyé mes demandes de mobilités tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur *Khac-Minh THAI* d'avoir accepté de m'encadrer sur les études *in silico*, et de m'avoir accueilli pendant mon stage de recherche au sein de son équipe de Pharmacoinformatique à l'Université de Médecine et de Pharmacie de Hô Chi Minh-ville, au Vietnam. Je te remercie beaucoup de m'avoir inspiré pour aller dans le domaine de la conception du médicament.

À Monsieur le Docteur *Marc PUDLO*, je te remercie beaucoup pour toutes nos discussions intéressantes, tes conseils précieux portant sur les synthèses des produits chimiques, et également pour tes encouragements chaleureux.

À Monsieur le Docteur *Kamel ARRAKI*, je te remercie pour ta présence au laboratoire, ta bonne humeur et pour ton implication dans l'obtention des glycosides de stilbènes naturels qui ont pu être testés sur l'arginase.

Je souhaite remercier également Madame le Docteur *Kornakanok INGKANINAN* et Madame le Docteur *Krongkarn CHOOTIP* pour leur accueil chaleureux au sein du laboratoire Bioscreening à l'Université Naresuan de Phitsanulok, en Thaïlande pendant mon stage de recherche, dans le cadre d'un partenariat Hubert Curien SIAM.

Je tiens à exprimer ma grande gratitude à Monsieur le Professeur *Thierry LOMBERGET* et l'EA4446 « Biomolécules, Cancer et Chimiorésistances » de l'Université Claude Bernard Lyon 1 d'avoir accepté une collaboration en fournissant des dérivés de stilbénoïdes pour une évaluation biologique sur l'arginase.

Je souhaite remercier Madame le Docteur *Stéphanie KRISA* et l'Institut de la vigne et du vin à Bordeaux d'avoir accepté une collaboration en fournissant des dérivés de glucosides de picéatannol pour une évaluation biologique sur l'arginase.

À Monsieur *Andy ZEDET*, technicien du laboratoire de pharmacognosie, je te remercie profondément pour ton support technique constant et de qualité, ainsi que ton aide pour les évaluations enzymatiques portant sur certains de mes produits. Merci d'être patient à

m'écouter, de m'expliquer le sens des jolis mots français que je n'ai pas bien compris. Merci pour les joyeux moments partagés ensemble lors des séances de travaux pratiques.

Je tiens à remercier Madame le Docteur *Mélanie BOURJOT*, pour les moments passés ensemble au labo et Monsieur le Docteur *Simon BORDAGE* pour nos discussions intéressantes concernant les essais d'inhibition enzymatique sur l'arginase.

À Monsieur *Vincent LUZET*, assistant ingénieur au laboratoire de chimie thérapeutique, je te remercie de m'avoir aidé à réaliser les techniques de distillation des solvants organiques. Merci à toi de m'avoir hébergé pendant mes premiers jours à Besançon.

À Madame *Stéphanie BOULLANGER*, pour son efficacité et ses compétences pour la réalisation des spectres de RMN.

Je souhaite remercier aussi Madame *Anne-Marie WINNINGER* pour toutes les procédures administratives au sein de l'EA4267. Merci à toi pour ton sourire chaleureux au passage.

Je tiens à exprimer mes remerciements distingués aux autres membres de l'EA4267 pour leur soutien : Madame *Maude TOURNIER*, le Docteur *Yann PELLEQUER*, le Docteur *Arnaud BEDUNEAU*, le Docteur *Sylvie DEVAUX*, Monsieur *Alexandre BONET*,...

Merci à mes ami(e)s au labo pour nos bons moments passés ensemble et pour votre soutien : *Céline, Mohamed, Perle, Claire, Rita, Mona, Oscar, Krai, Paul, Moo, Deaw, Ryma*,...

Je souhaite remercier l'école doctorale Environnement-Santé (ED ES) de m'avoir sélectionné pour l'attribution d'une bourse de recherche, ainsi que celle d'une bourse de mobilité pour participer à un congrès international à Tours (2015). Je tiens à remercier également l'université de Bourgogne Franche-Comté de m'avoir attribué une bourse pour aller faire mon stage de recherche au Vietnam. Un grand merci pour votre soutien concernant ma préparation au concours de « Ma thèse en 180s ».

Je tiens à exprimer ma grande gratitude à l'Association Francophone de l'Enseignement et de la Recherche en Pharmacognosie (AFERP), qui m'a attribué des bourses

de mobilité pour que je puisse participer aux congrès internationaux de Guimarães (2014) et de Copenhague (2016).

Toute ma gratitude à ma famille : ma chère maman, mes deux frères pour leur immense soutien, leurs encouragements chaleureux. Ma famille me donne le courage et la force pour que je puisse surmonter les moments difficiles dans la vie.

À Madame et Monsieur *CABANES*, *chi Aïcha* et *anh Jean-Luc*, je vous remercie profondément pour votre soutien, vos conseils, vos partages. Vous avez égayé ma vie bisontine au travers de multiples activités: randonnées, sorties, repas chaleureux, et bien sûr votre bonne humeur. Je vous considère comme mes « *parents bisontins* ».

À mes amis étudiants vietnamiens en France, je vous remercie beaucoup pour les moments joyeux et partagés que nous avons passé ensemble à travers des activités et des voyages. Merci pour tout votre soutien et votre aide depuis le début de mon séjour en France.

Et à toi, *Hai-Ha LE*, la vie est tellement inspirée et passionnée d'être à côté de toi. Je te remercie de tout mon cœur de tout ce que tu as fait pour moi, de ton soutien, de tes encouragements et bien sûr de ton amour.

Table des matières

<i>Table des matières</i>	9
<i>Liste des abréviations</i>	15
<i>Liste des figures</i>	18
<i>Liste des tableaux</i>	21
<i>Liste des annexes</i>	22
<i>Introduction générale</i>	23
<i>1^{ère} Partie : Données bibliographiques</i>	25
Chapitre I : L'arginase : Intérêt comme cible thérapeutique	26
I-1. L'enzyme arginase	26
I-1.1. Rôle et structure de l'arginase	26
I-1.2. Mécanisme de la réaction hydrolytique catalysée par l'arginase	32
I-2. Intérêt thérapeutique de l'arginase dans les maladies cardiovasculaires	33
I-2.1. Monoxyde d'azote (NO) et NO synthase (NOS).....	34
I-2.2. Compétition Arginase/NOS et conséquences.....	35
Chapitre II : Les inhibiteurs d'arginase	38
II-1. Inhibiteurs d'arginase synthétiques.....	38
II-1.1. Les dérivés de N ^o -hydroxy-L-arginine (NOHA)	38
II-1.2. Les analogues d'acide boronique de la L-arginine.....	42
II-2. Inhibiteurs d'arginase d'origine naturelle	47
II-2.1. Les inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase mammifère	47
II-2.2. Les inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase de <i>Leishmania</i>	55
Chapitre III : Evaluation biologique de l'activité inhibitrice d'arginase.....	62
III-1. Principes d'enzymologie et inhibitions enzymatiques	62
III-1.1. La cinétique enzymatique	62
III-1.2. Inhibition enzymatique	65
III-1.2.1. Inhibition réversible	65

III-1.2.1.1. Inhibition compétitive	66
III-1.2.1.2. Inhibition incompétitive	68
III-1.2.1.3. Inhibition non compétitive	69
III-1.2.1.4. Inhibition mixte	71
III-1.2.2. Inhibition irréversible	72
III-1.3. Etudes de la cinétique enzymatique et de la potentialité inhibitrice des inhibiteurs réversibles	73
III-1.3.1. Détermination du type d'inhibition et de K_i	73
III-1.3.2. La concentration inhibitrice médiane (CI_{50})	78
III-2. Evaluations <i>in vitro</i> de l'activité inhibitrice d'arginase	80
III-2.1. Introduction	80
III-2.2. Méthodes d'évaluation <i>in vitro</i>	80
III-2.3. Conclusion	87
Chapitre IV : Modélisation moléculaire - Etude de Docking sur arginase	89
IV-1. Introduction sur la modélisation moléculaire	89
IV-2. Principes de l'étude de docking et méthodologie	89
IV-3. Outil de docking FlexX	93
IV-4. Applications des études de docking à l'arginase	95
IV-5. Conclusion	98
2 ^{ème} Partie	99
Travaux réalisés au cours de la thèse	99
Chapitre V : Optimisation d'un test <i>in vitro</i> pour évaluer l'activité de l'arginase	100
V-1. Optimisation du test d'évaluation de l'activité arginase	100
V-2. Cinétique enzymatique de l'arginase en présence ou en absence d'un inhibiteur de référence	102
V-3. Automatisation partielle du test d'évaluation de l'activité arginase	106
V-4. Conclusion	107

Chapitre VI : Evaluations <i>in vitro</i> et <i>in silico</i> de l'activité inhibitrice des polyphénols sur l'arginase mammifère	108
VI-1. Activité inhibitrice d'arginase de polyphénols ubiquitaires	108
VI-1.1. Introduction : choix des polyphénols	108
VI-1.2. Résultats et discussion.....	108
VI-1.3. Conclusion.....	114
VI-2. Modélisation moléculaire de b-ARGI et études de docking des polyphénols dans le site actif de l'enzyme	115
VI-2.1. Introduction.....	115
VI-2.2. Prédiction de la structure 3D de b-ARG I par homologie	115
VI-2.3. Études de docking des polyphénols sur l'arginase	117
VI-2.4. Conclusion	121
Chapitre VII : Synthèse et évaluations <i>in vitro</i> et <i>in silico</i> de l'activité inhibitrice des dérivés amides de l'acide caféique sur l'arginase mammifère	122
VII-1. Etudes de dérivés amides de l'acide caféique	122
VII-1.1. Synthèse chimique des dérivés cinnamides.....	123
VII-1.2. Evaluation de l'activité inhibitrice des dérivés cinnamides sur b-ARG I	127
VII-1.3. Etudes de la cinétique enzymatique de CAPA (44) sur b-ARG I	129
VII-1.4. Modélisation moléculaire (études de docking) de CAPA (44) sur arginase .	131
VII-1.5. Conclusion.....	135
Chapitre VIII : Etudes de dérivés d'esters de l'acide caféique.....	136
VIII-1. Synthèse chimique et évaluation de l'activité inhibitrice de dérivés esters de l'acide caféique	136
VIII-1.1. Introduction	136
VIII-1.2. Résultats et discussion.....	136
VIII-1.3. Conclusion.....	141
VIII-2. Synthèse chimique et évaluation de l'activité inhibitrice de (<i>E</i>)-acétoxybenzyl-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (66)	141
VIII-2.1. Introduction	141
VIII-2.2. Résultats et discussion.....	142

VIII-2.3. Conclusion.....	146
VIII-3. Synthèse chimique et évaluation de l'activité inhibitrice du 2,3,4,6- <i>O</i> -acétyl- <i>caféoyl-β-D-glucose</i> (68)	146
VIII-3.1. Introduction	146
VIII-3.2. Résultats et discussion.....	147
VIII-3.4. Conclusion.....	152
Chapitre IX : Synthèse chimique des dérivés de picéatannol et évaluation de l'activité inhibitrice sur b-ARG I.....	153
IX-1. Synthèse chimique des glucosides de picéatannol	153
IX-1.1. Introduction.....	153
IX-1.2. Résultats et discussion	154
IX-1.3. Conclusion	158
IX-2. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité inhibitrice de dérivés de picéatannol sur b-ARG I	159
IX-2.1. Introduction.....	159
IX-2.2. Résultats et discussion	159
IX-2.3. Conclusion	163
<i>Conclusion générale et perspectives</i>	164
<i>Partie expérimentale</i>	167
Chapitre X : Optimisation du test enzymatique <i>in vitro</i> sur b-ARG I et évaluation de l'activité inhibitrice.....	168
X-1. Matériels	168
X-2. Détermination de $V_{\max}$ et K_m	168
X-3. Évaluation de la capacité inhibitrice d'arginase <i>in vitro</i>	169
X-4. Détermination de K_i et du type d'inhibition.....	170
X-6. Pipetage automatisé appliqué au test d'évaluation de l'activité arginase.....	171
Chapitre XI : Chimie	172
XI-1. Synthèse des dérivés amides de l'acide caféique	173
XI-1.1. (<i>E</i>)- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-3,4-dihydroxycinnamide (44).....	173

XI-1.2. (E)-N-(2-phényléthyl)-3-méthoxy-4-hydroxycinnamide (45)	174
XI-1.3. (E)-N-(2-phényléthyl)-4-hydroxycinnamide (46)	174
XI-1.4. (E)-N-(2-phényléthyl)-3,4,5-triméthoxycinnamide (47)	175
XI-1.5. (E)-N-(2-phényléthyl)cinnamide (48)	176
XI-1.6. (E)-N-(2-(4-hydroxyphényl)éthyl)-3,4-dihydroxycinnamide (49)	176
XI-1.7. (E)-N-(4-hydroxyphénéthyl)-3-méthoxy-4-hydroxycinnamide (50)	177
XI-1.8. (E)-N-(4-hydroxyphénéthyl)-4-hydroxycinnamide (51)	177
XI-1.9. (E)-N-(4-hydroxyphénéthyl)-3,4,5-triméthoxycinnamide (52)	178
XI-1.10. (E)-N-(4-hydroxyphénéthyl)-cinnamide (53)	179
XI-1.11. (E)-N-(3,4-dihydroxyphénéthyl)-3,4-dihydroxycinnamide (54)	179
XI-1.12. (E)-N-(3,4-dihydroxyphénéthyl)-3-méthoxy-4-hydroxycinnamide (55)	180
XI-1.13. (E)-N-(3,4-dihydroxyphénéthyl)-4-hydroxycinnamide (56)	180
XI-1.14. (E)-N-(3,4-dihydroxyphénéthyl)-3,4,5-triméthoxycinnamide (57)	181
XI-1.15. (E)-N-(3,4-dihydroxyphénéthyl)cinnamide (58)	181
XI-1.16. (E)-N-(4-hydroxyphényl)-3,4-dihydroxycinnamide (59)	182
XI-1.17. N-(4-hydroxyphénéthyl)-3,4-dihydroxybenzamide (60)	183
XI-1.18. 3-(3,4-Dihydroxyphényl)-2-[3-(3,4-dihydroxyphényl)-acryloylamino]- propionique méthyl ester (61)	183
XI-1.19. (E)-N-(3,4-dihydroxycinnamoyl)-L-cystéine méthyl ester (62)	184
XI-2. Synthèse des dérivés esters de l'acide caféique	184
XI-2.1. (E)-phénéthyl 3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (63)	185
XI-2.2. (E)-4-hydroxyphénéthyl-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (64)	186
XI-2.3. (E)-4-hydroxybenzyl-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (65)	186
XI-3. Synthèse de (E)-acétoxybenzyl-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (66)	187
XI-3.1. Acide 3,4-di-O-acétylcaféique	187
XI-3.2. Chlorure d'acide 3,4-O-diacétylcaféique	187
XI-3.3. Alcool 4-O-acétylbenzylique	188
XI-3.4. (E)-acétoxybenzyl-3-(3,4-diacétoxyphényl)acrylate	189
XI-3.5. (E)-acétoxybenzyl-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (66)	189
XI-4. Synthèse du 2,3,4,6-O-tétraacétyl-caféoyl-β-D-glucose (68)	190

<i>XI-4.1. Penta-O-acétyl-β-D-glucose</i>	191
<i>XI-4.2. Bromure de tétra-O-acétyl-α-D-glucose</i>	192
<i>XI-4.3. 2,3,4,6-O-tétraacétyl-(3,4-diacétoxycaféoyl)-β-D-glucose</i>	193
<i>XI-4.4. 2,3,4,6-O-tétraacétyl-caféoyl-β-D-glucose (68)</i>	193
<i>XI-5. Hémi-synthèse des glucosides du picéatannol (PGs)</i>	194
<i>XI-5.1. Glycosylation par la méthode de Knoenigs-Knorr</i>	194
<i>XI-5.1.1. Première procédure utilisant Ag_2CO_3 / THF</i>	194
<i>XI-5.1.2. Deuxième procédure utilisant KOH / EtOH</i>	195
<i>XI-5.2. Glycosylation par la méthode de catalyseur transfer des phases</i>	195
<i>XI-5.2.1. Première procédure utilisant $BnEt_3N^+ Br^-$ / K_2CO_3</i>	195
<i>XI-5.2.2. Deuxième procédure utilisant $BnEt_3N^+ Br^-$ / NaOH</i>	196
<i>Chapitre XII : Modélisation moléculaire – Études de docking</i>	197
<i>XII-1. Modélisation moléculaire : prédiction de la structure de b-ARG I par homologie</i>	197
<i>XII-2. Modélisation moléculaire : étude de docking sur l'arginase</i>	198
<i>XII-2.1. Préparation du récepteur</i>	198
<i>XII-2.2. Préparation des ligands</i>	199
<i>XII-2.3. Simulation de docking par LeadIT 2.1.1</i>	199
<i>Références bibliographiques</i>	200
<i>Annexes</i>	231

Liste des abréviations

^{13}C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance (Résonance Magnétique Nucléaire du C13)
^1H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance (Résonance Magnétique Nucléaire du proton)
2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
3D QSAR	Tridimensional Quantitative Structure-Activity Relationship (Relation quantitative structure à activité tridimensionnelle)
ABH	Acide 2-(S)-amino-6-boronoheptanoïque
ACG	Acide chlorogénique
ADC	Arginine Décarboxylase
AGAT	Arginine/Glycine Amidinotransferase
ARG	Arginase
ARG I	Arginase type I
ARG II	Arginase type II
ASL	Argininosuccinate Lyase
ASS	Argininosuccinate Synthetase
b-ARG I	Arginase I purifiée du foie bovin
BEC	S-(2-boronoethyl)-L-cystéine
BnEt₃N⁺Br	Bromure de benzyltriéthylammonium
BOP	Benzotriazol-1-yloxytris (diméthylamino)-phosphonium
CAPA	Caffeic Acid Phenyl Amide
CAPE	Caffeic Acid Phenyl Ester
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CE₅₀	Concentration Efficace Médiane
CI₅₀	Concentration Inhibitrice Médiane
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
COX	Enzyme Cyclooxygénase
CV	Criblage Virtuel
DDAH	Diméthylarginine Diméthylaminohydrolase
DIAD	Diisopropylazodicarboxylate
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E	Enzyme
EB	Extrait Butanolique
E_{max}	Efficacité maximale
ENB	Extrait Non-Butanolique
Et₃N	Triéthylamine
EtOAc	Acétate d'éthyle

EUP	Eau ultra-pur
FDE	Fonction et Dysfonction Epithéliale
h-ARG I	Arginase I humaine
h-ARG II	Arginase II humaine
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation NMR Spectroscopy (Corrélation des déplacements chimiques des ^1H et ^{13}C par les couplages à longue distance)
HMPA	Hexaméthylphosphorotriamide
HOBt	Hydroxybenzotriazole
Hp-ARG	Arginase de <i>Helicobacter pylori</i>
HRMS-ESI	Spectres de masse à haute résolution, réalisés en mode ionisation par électrospray
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation NMR Spectroscopy (Corrélation des déplacements chimiques des ^1H et ^{13}C par les couplages directs)
HUVEC	Cellules Endothéliales de la Veine Omphalique Humaine
I	Inhibiteur
IR	Spectroscopie infrarouge
ISPF	α -isonitrosopropiophénone
k_{cat}	la constante catalytique
K_i	la constante d'inhibition/constante de dissociation
K_m	la constante de Michaelis
L-ARG	Arginase de <i>Leishmania amazonensis</i>
MCV	Maladies Cardiovasculaires
n.d.	non déterminée
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Déshydrogénase Oxydée
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Déshydrogénase Réduite
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NO	Nitric Oxyde (Monoxyde d'azote)
NOHA	N^{ω} -hydroxy-L-arginine
nor-NOHA	N^{ω} -hydroxy-nor-L-arginine
NOS	NO-Synthase
OAT	Ornithine Aminotransferase
ODC	Ornithine Décarboxylase
OPA	O-phthalaldéhyde
OTC	Ornithine Transcarbamylase
P	Produit
P5C	L- Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate
PCT	Picéatannol
PG	Picéatannol Glucoside
PNPG	p-nitrophénylglyoxale
PPh₃	Triphénylphosphine
PRMT	Protéine-Arginine Méthyltransférase
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytri (pyrrolidino)-phosphonium

r-ARG I	Arginase I de foie de rat
R_f	Rapport frontal (CCM)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species (Espèces Réactives de l'Oxygène)
RSA	Relations de Structure-Activité
S	Substrat
SBDD	Structure-Based Drug Design (Conception du médicament basée sur la Structure)
TBSA	Albumine de sérum bovin
THF	Tétrahydrofurane
TPP	Triphénylphosphine
TPPA	Triamide d'Acide Tripyrrolidinophosphorique
v_0	Vitesse initiale de la réaction enzymatique
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
V_{max}	Vitesse maximale de la réaction enzymatique

Liste des figures

Figure 1 : Réaction catalysée par l'arginase.....	26
Figure 2: Catabolisme de la L-arginine (1) par l'arginase.	28
Figure 3 : Structure tridimensionnelle et diagramme topologique d'une sous-unité de l'arginase I de rat.....	29
Figure 4 : Les clusters binucléaire de manganèse dans les sites actifs de chaque monomère de r-ARG I et h-ARG I	30
Figure 5 : Modèle en trois dimensions (3D) du substrat L-arginine dans la poche du site actif de r-ARG I	31
Figure 6 : Mécanisme hydrolytique de la L-arginine par l'arginase.	32
Figure 7 : Équilibre des activités de la NOS et de l'arginase en conditions physiologiques. ..	35
Figure 8 : Conséquences d'une suractivité de l'arginase.	36
Figure 9 : Mécanisme d'inhibition de l'activité d'arginase des dérivés de NOHA (3).	39
Figure 10 : Mécanisme d'inhibition de l'activité d'arginase par des analogues d'acide boronique de la L-arginine (1).	43
Figure 11 : Structures de molécules naturelles à propriétés inhibitrices d'arginase mammifère.	50
Figure 12 : Structures des inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase recombinante de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	58
Figure 13 : Relations structure-activité (RSA) de flavonols et flavan-3-ols pour l'activité inhibitrice d'arginase de <i>Leishmania</i>	60
Figure 14 : Equation de la réaction catalysée par l'enzyme.	62
Figure 15 : Courbe hyperbolique de la vitesse initiale (v_0) en fonction de la concentration du substrat ([S]) dans une réaction enzymatique.....	63
Figure 16 : Courbe de Lineweaver-Burk, issue de la transformation linéaire de l'équation de Michaelis-Menten.....	64
Figure 17 : Illustration d'une inhibition compétitive.	66
Figure 18 : Inhibition compétitive. Schéma illustrant la formation du complexe EI et Graphe de Lineweaver-Burk.....	67
Figure 19 : Illustration d'une inhibition incompétitive.	68

Figure 20 : Inhibition incompétitive. Schéma illustrant la fixation de l'inhibiteur (I) au complexe (ES) et Graphe de Lineweaver-Burk.	69
Figure 21 : Illustration d'une inhibition non compétitive.	70
Figure 22 : Inhibition non compétitive. Schéma illustrant la fixation de l'inhibiteur (I) sur E ou ES et Graphe graphe de Lineweaver-Burk.....	70
Figure 23 : Schéma et équation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition mixte	71
Figure 24 : Courbes de Lineweaver-Burk obtenues avec différentes concentrations en inhibiteur [I] en fonction des différents types d'inhibition..	74
Figure 25 : Méthode graphique de Dixon pour déterminer la constante K_i	75
Figure 26 : Courbes caractéristiques de différents types d'inhibition	76
Figure 27 : Graphe de vitesse quotientée pour les différents types d'inhibition	77
Figure 28 : Représentation graphique de la détermination de CI_{50} et E_{max}	79
Figure 29 : Illustration de la modélisation moléculaire docking.....	90
Figure 30 : Méthodologie et étapes typiques d'une étude de docking.	92
Figure 31 : Processus de minimisation d'énergie d'une molécule dans l'étude docking.	93
Figure 32 : La construction incrémentale dans le processus de docking par FlexX.	94
Figure 33 : Algorithme de placement de fragment « <i>Triangle matching</i> »	95
Figure 34 : La meilleure pose de docking du verbascoside dans le site actif de l'arginase de <i>Leishmania</i>	97
Figure 35 : Effets de la quantité d'arginase et de la durée d'incubation sur la production d'urée.....	102
Figure 36 : Profil cinétique de Michaelis-Menten et courbe de Lineweaver-Burk pour b-ARG I.....	103
Figure 37 : Courbe de concentration-réponse de BEC.....	105
Figure 38 : Courbes sigmoïdes concentration-réponse de BEC avec pipetage manuel et automatisé.....	106
Figure 39 : Courbes de concentration-réponse de ACG.	111
Figure 40 : Courbes de concentration-réponse de PCT.....	112
Figure 41 : Alignement de la structure de b-ARG I et h-ARG I réalisé par le logiciel Sybyl X 2.0.....	116

Figure 42 : Modes de liaison en 3D et 2D de ACG dans le site actif de b-ARG I.....	118
Figure 43 : Modes de liaison en 3D et 2D de PCT dans le site actif de b-ARG I.....	119
Figure 44 : Modes de liaison en 3D et 2D de ACG dans le site actif de h-ARG I.....	120
Figure 45 : Conception rationnelle de dérivés cinnamides inspirés par ACG.	123
Figure 46 : Procédure générale de synthèse des dérivés cinnamides..	124
Figure 47 : Mécanisme de l'amidation utilisant PyBOP.	124
Figure 48 : Relations structure-activité (RSA) des dérivés de cinnamides sur b-ARG I.....	129
Figure 49 : Cinétique de l'inhibition d'arginase par 44 (CAPA).....	130
Figure 50 : Modes de liaison en 3D et 2D de CAPA dans le site actif de b-ARG I.	132
Figure 51 : Modes de liaison en 3D et 2D de CAPA dans le site actif de h-ARG I.	133
Figure 52 : Modes de liaison en 3D et 2D de 58 dans le site actif de b-ARG I.	134
Figure 53 : Procédure générale de synthèse des dérivés esters de l'acide caféique par la réaction de Mitsunobu.	137
Figure 54 : Mécanisme de la réaction de Mitsunobu.	138
Figure 55 : Modes de liaison en 3D et 2D de CAPE dans le site actif de b-ARG I.....	140
Figure 56 : Procédure de synthèse multi-étapes pour le composé 66	142
Figure 57 : Structure du dérivé ester caféique acétylé et corrélations HMBC précisant la position de l'acétyle.	144
Figure 58 : Modes de liaison en 3D et 2D de 66 dans le site actif de b-ARG I.	145
Figure 59 : Procédure de synthèse multi-étapes pour le composé 68	147
Figure 60 : Analyses CLHP à différents temps de réaction de la réaction de désacétylation du composé 66 à l'aide du catalyseur NaOMe/MeOH..	151
Figure 61 : Structure du Picéatannol-3'-O-β-D-glucopyranoside (PG)	153
Figure 62 : Procédure d'hémisynthèse des glucosides de picéatannol (PGs).	154
Figure 63 : Mécanisme de la glycosylation de Koenigs-Knorr.....	155
Figure 64 : Chromatogramme d'analyse CLHP du brut réactionnel de la réaction de glycolysation.	157
Figure 65 : Schéma du principe de la catalyse par transfert de phase en solution.	158
Figure 66 : Structures de l'astringine (70) et du picéide (71).	159

Liste des tableaux

Tableau I : Inhibition de l'arginase par la NOHA (3), la nor-NOHA (5) et leurs dérivés.	41
Tableau II : Inhibition de ABH et BEC sur les arginases	44
Tableau III : Exemples d'analogues d'aminoéthylène de ABH (9) avec leurs activités inhibitrices sur les deux isoformes d'arginase humaine.....	45
Tableau IV: Inhibition de l'arginase mammifère, ARG-I ou II, par des produits naturels. ...	48
Tableau V: Inhibition de l'arginase recombinante de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> par des produits naturels.....	56
Tableau VI: Récapitulatif des différents types d'inhibition réversible	72
Tableau VII : Tests enzymatiques <i>in vitro</i> décrits dans la littérature pour évaluer l'activité de l'arginase	81
Tableau VIII: Pourcentages d'inhibition, CI_{50} et E_{max} des polyphénols évalués sur b-ARG I.	109
Tableau IX : Structures des dérivés de cinnamide et leur potentialité inhibitrice sur b-ARG I.	125
Tableau X : Comparaison des valeurs de K_i pour l'inhibition d'arginase par CAPA, ACG et nor-NOHA.....	131
Tableau XI : Structures des esters étudiés et leur activité inhibitrice sur b-ARG I.	139
Tableau XII : Attributions des protons et carbonnes de 66 à partir des données RMN ^1H , ^{13}C , HSQC et HMBC.....	144
Tableau XIII : Attributions des protons et carbonnes de 68 à partir des données RMN ^1H , ^{13}C , HSQC et HMBC.....	149
Tableau XIV : Structure et'activité inhibitrice de dérivés de stilbénoides sur b-ARG I.....	161

Liste des annexes

<i>Annexe 1 : Données analytiques des nouveaux composés</i>	231
<i>Annexe 2 : Courbes CI_{50} des composés étudiés sur b-ARG I.....</i>	248
<i>Annexe 3 : Modes de liaisons et scores de docking des molécules étudiées sur b-ARG I</i>	263

Introduction générale

L'arginase est une métalloenzyme, catalysant l'hydrolyse de la L-arginine en L-ornithine et urée, et dont la suractivité est impliquée dans un nombre important de pathologies regroupant des maladies des sphères cardiovasculaire (hypertension, dysfonction érectile, athérosclérose, maladies coronaires, etc) ou non cardiovasculaire (diabète, asthme, maladies chroniques inflammatoires de l'intestin et certains cancers), ainsi que certaines infections, en particulier parasitaires (leishmanioses, trypanosomoses). Le site actif, assez particulier, de cette enzyme, est composé d'un domaine catalytique proprement dit contenant un noyau bimanganèse et d'une poche hydrophile accueillant le motif acide aminé du substrat. Une inhibition de l'arginase, testées sur différents modèles *in vivo*, incluant des études cliniques avec une administration locale, a apporté la preuve de concept de l'intérêt de cette stratégie de traitement. Trois inhibiteurs sont actuellement commercialisés (nor-NOHA, ABH et BEC) mais en dépit de leur potentiel, ces molécules sont incompatibles avec un usage médical *per os* (faible demi-vie de la nor-NOHA et faible biodisponibilité de l'ABH et du BEC). L'obtention de nouveaux inhibiteurs est donc d'un intérêt substantiel, pour le développement de candidats médicaments.

Dans notre projet de recherche de thèse, nous nous sommes, par conséquent, donnés pour objectif l'obtention de nouveaux inhibiteurs d'origine naturels et hémisynthétiques.

Ainsi, dans la première partie de ce travail, dédiée à une analyse de la littérature sur le sujet, nous présentons l'enzyme arginase et son intérêt comme cible thérapeutique puis recensons l'ensemble des composés naturels présentant des propriétés inhibitrices d'arginase, ainsi que les différents essais biologiques connues pour évaluer la capacité inhibitrice d'une molécule, de même que les différents aspects de modélisation moléculaire pouvant être mis en œuvre.

Dans la seconde partie de ce travail, dédiée aux travaux expérimentaux, nous nous sommes, en premier lieu, attachés au développement d'un essai biologique reproductible et fiable ainsi qu'à l'évaluation de plusieurs composés naturels de nature polyphénolique. Ceci nous a conduit à identifier l'acide chlorogénique (acide caféoylquinique) et le picéatannol (stilbène) comme deux têtes de série prometteuses pour le développement de nouveaux inhibiteurs. Ainsi, la conception de molécules dérivés de l'acide caféique (cinnamides) et de molécules dérivés de stilbène a été envisagée dans un deuxième temps avec l'objectif de caractériser l'effet inhibiteur des molécules les plus actives par des études de cinétiques et la liaison enzyme-inhibiteur par des études de modélisation moléculaire par docking.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet sont consignés dans ce mémoire.

1^{ère} Partie : Données bibliographiques

Chapitre I : L'arginase : Intérêt comme cible thérapeutique

Comme expliqué en introduction générale, le rôle de l'arginase et son lien avec la disponibilité en monoxyde d'azote (NO) sont actuellement très étudiés dans de nombreuses pathologies, notamment celles provoquant ou résultant d'une dysfonction endothéliale, comme c'est le cas pour certaines maladies inflammatoires ou cardiovasculaires. Dans ce chapitre recensant les données de la littérature, nous nous intéresserons à l'enzyme arginase, et plus particulièrement à l'arginase mammifère, de sa structure et son rôle physiologique, à son intérêt comme nouvelle cible pour le traitement de diverses pathologies. Nous aborderons ensuite les différents inhibiteurs d'arginase connus en considérant leurs avantages et inconvénients pour une application en clinique, ainsi que les pistes de recherche de nouveaux inhibiteurs.

I-1. L'enzyme arginase

I-1.1. Rôle et structure de l'arginase

L'arginase (amidinohydrolase, EC 3.5.3.1) a été découverte pour la première fois dans le foie de mammifère par Kossel et Dakin en 1904 [1]. Cette enzyme est une métalloenzyme trimère à manganèse qui hydrolyse la L-arginine (1) en L-ornithine (2) et urée (**Figure 1**) [2,3].

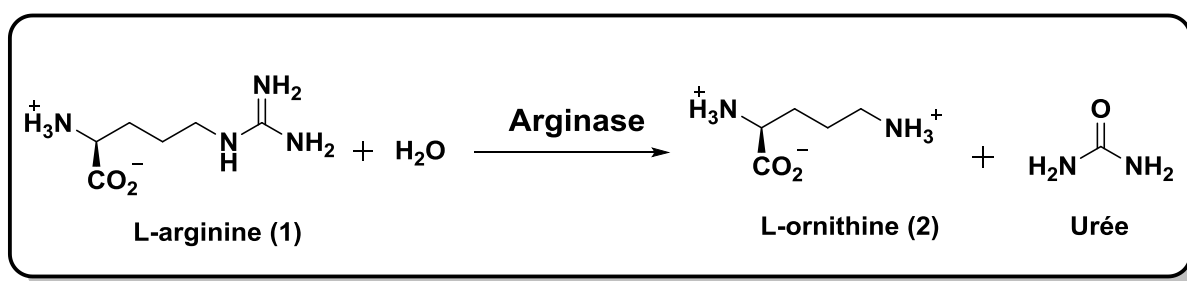


Figure 1 : Réaction catalysée par l'arginase.

Chez les microorganismes, les plantes et les invertébrés, une seule forme d'arginase est présente, et elle est localisée dans les mitochondries. Les vertébrés et les autres animaux, qui métabolisent l'excès d'azote sous forme d'urée, expriment en plus une seconde isoforme, de localisation cytosolique [4,5]. Ces deux isoenzymes, cytosolique et mitochondriale, sont respectivement nommées arginase I (ARG I) et II (ARG II). Cette dernière est considérée comme la forme ancestrale car ARG I est retrouvée uniquement chez un sous ensemble d'espèces les plus évoluées [6].

Chez les mammifères, ARG I se trouve à un taux élevé dans le foie, tandis qu'ARG II s'exprime dans divers tissus extra-hépatiques tels que le rein, la prostate, l'intestin et la glande mammaire [6]. ARG II semble être l'isoforme prédominante dans les cellules endothéliales [7]. Les deux isoenzymes mettent en oeuvre des mécanismes similaires et possèdent le même cofacteur de manganèse et des métabolites identiques [5].

Dans l'organisme, l'arginase joue un rôle important dans le catabolisme de la L-arginine (**Figure 2A**) [8]. En fait, cette enzyme possède deux rôles homéostatiques majeurs: le premier consiste à débarrasser l'organisme de l'ammoniac par la synthèse de l'urée, et le second est la production d'ornithine, précurseur de polyamines et de prolines. Les polyamines produites par l'ornithine décarboxylase (ODC) sont notamment nécessaires à la prolifération cellulaire. Quant à la proline, produite par l'ornithine amino-transférase (OAT), elle est indispensable à la production de collagène. Ces deux actions conjuguées favorisent la réparation des tissus et la cicatrisation (**Figure 2B**) [5].

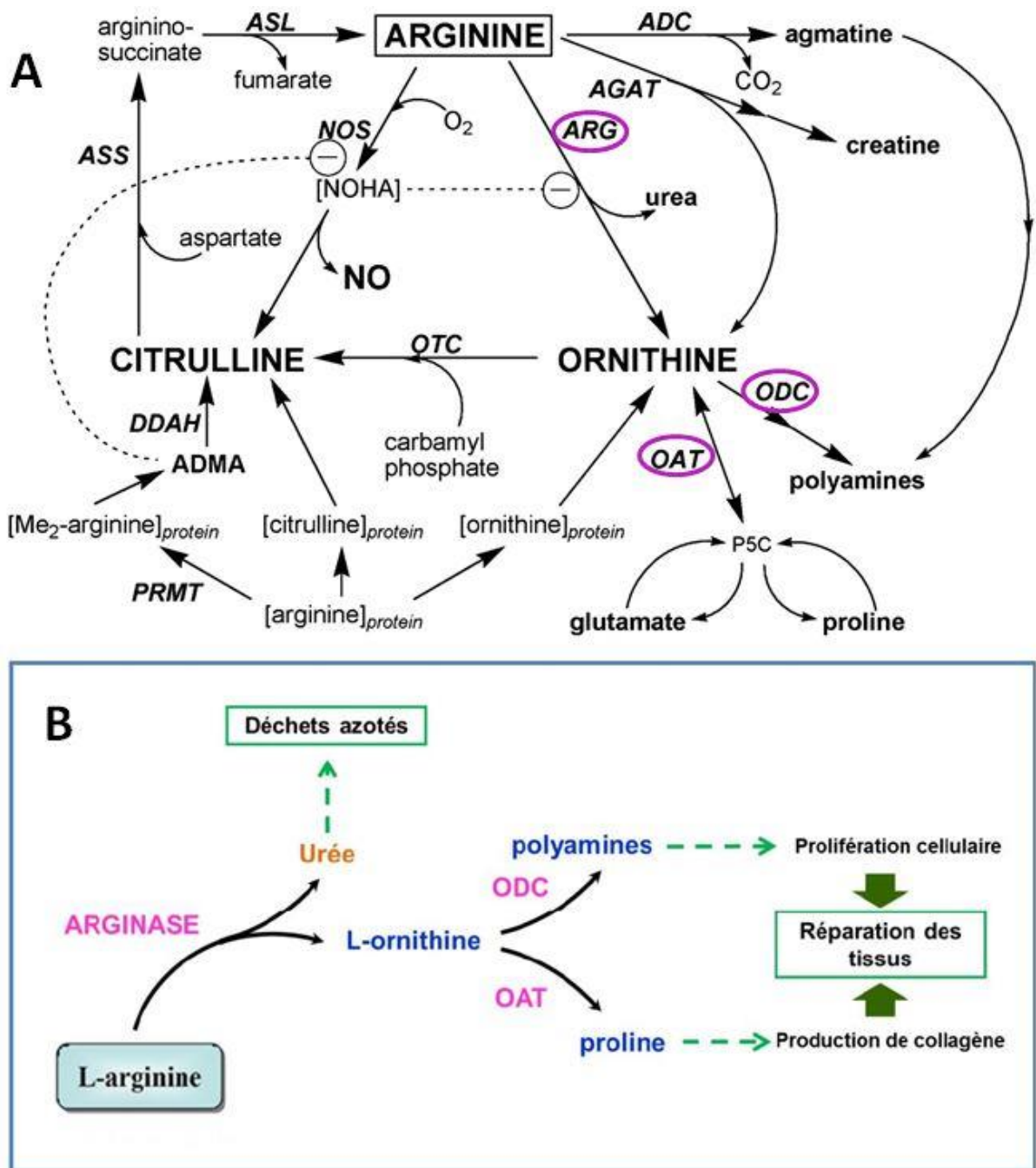


Figure 2: Catabolisme de la L-arginine (1) par l'arginase. **(A)** Aperçu du métabolisme de la L-arginine chez les mammifères : Seules les enzymes utilisant ou produisant directement l'arginine, l'ornithine et la citrulline sont présentées. L'inhibition des enzymes spécifiques est matérialisée par des courbes en pointillés. Abréviations : ADC, arginine décarboxylase ; AGAT, arginine/glycine amidinotransferase ; ARG, arginase ; ASL, argininosuccinate lyase ; ASS, argininosuccinate synthetase ; DDAH, diméthylarginine diméthylaminohydrolase ; Me₂, diméthyl ; OAT, ornithine aminotransferase ; ODC, ornithine décarboxylase ; OTC, ornithine transcarbamylase ; P5C, L-Δ¹-pyrroline-5-carboxylate ; PRMT, protéine-arginine méthyltransférase (Figure repris de [8]). **(B)** Deux rôles homéostatiques majeurs de l'arginase.

L'arginase I humaine (h-ARG I) possède 322 acides aminés et est codée sur le chromosome 6q23 [9]. Alors que l'arginase II humaine (h-ARG II) est composée de 354 résidus et liée au gène localisé sur le chromosome 14q24.1-24.3 [10].

Les arginases I, humaine (h-ARG I) et de rat (r-ARG I), atteignent environ 87% d'homologie entre leurs séquences d'acides aminés [11], tandis que les deux isoformes humaines (h-ARG I et h-ARG II) ont plus de 58% d'acides aminés communs [12]. Et toutes ces enzymes présentent 100% d'homologie dans le domaine critique pour l'activité hydrolytique [13].

La structure cristalline de r-AGR I a été déterminée pour la première fois chez les mammifères par Kanyo et ses collègues, qui ont démontré une structure homo-trimétrique (**Figure 3A**) [2,14]. Des études de cristallographie par rayons X ont ensuite déterminé les structures de h-ARG I [15] et h-ARG II [16]. Ces structures tertiaires sont presque identiques [14].

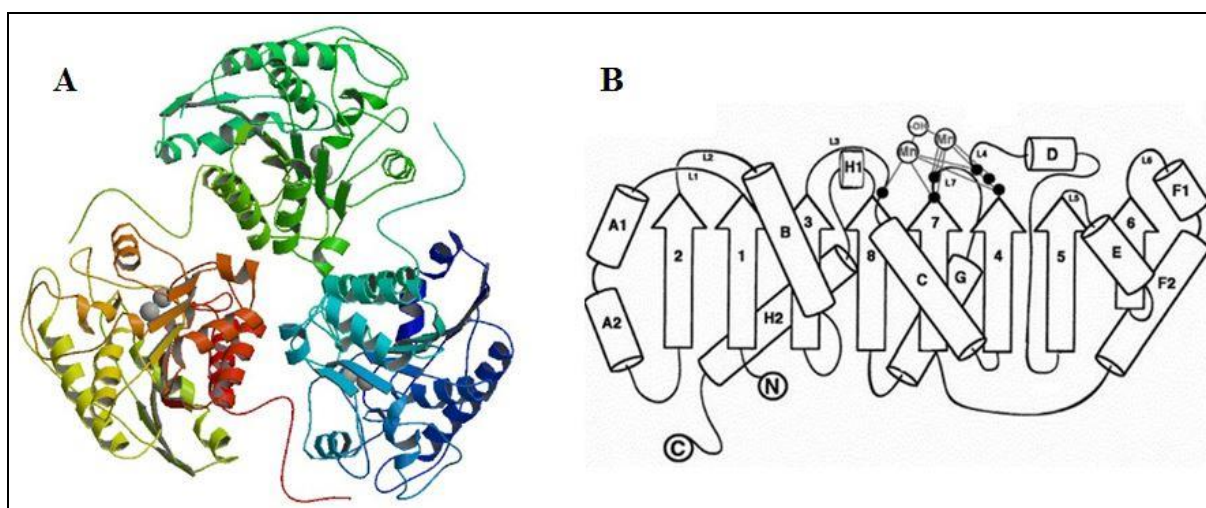


Figure 3 : Structure tridimensionnelle [2] (**A**), et diagramme topologique d'une sous-unité (**B**) de l'arginase I de rat [14].

La structure globale de chaque monomère de r-ARG I a pour dimensions approximatives 40 x 50 x 50 Å. La conformation de ce segment est stabilisée par de

nombreuses interactions inter-monomériques de type van der Waals, des liaisons hydrogènes et ioniques [2]. Kanyo *et al.* ont démontré que chaque sous-unité d'arginase est constituée de huit brins parallèles en feuillets plissés α/β (ordre 21387456) entourés par plusieurs hélices α (A1, A2, B, C, D, E, F1, F2, G, H1, H2) (**Figure 3B**). Dans le site actif de chaque sous-unité, les chaînes latérales d'acides aminés qui coordonnent les deux ions manganèse Mn^{2+} sont situées sur le bord du feuillet- β central dans des segments de boucle à proximité de l'hélice C et les brins 8, 7, 4 (**Figure 3B**) [2,14]. Le cluster binucléaire de manganèse se situe au fond d'une fente de 15 Å de profondeur [2]. Ce cluster possède deux ions Mn^{2+} séparés de 3,36-3,57 Å dans la structure cristalline sans ligand [17]. La structure de r-ARG I démontre que Mn_A^{2+} , situé en position la plus profonde dans le site actif, est chélaté par les acides aminés His101, Asp128, Asp124, Asp232, et un ion hydroxyde (-OH) crée une géométrie pyramidale à base carrée (**Figure 4A**) [2]. En revanche, la structure cristalline de h-ARG I présente une molécule d'eau supplémentaire liée à Mn^{2+}_A , ce qui forme un polyèdre de coordination métallique octaédrique déformé [18]. Mn^{2+}_B , quant à lui, est coordonné par His126, Asp234, Asp124, Asp232 et l'ion hydroxyde forme une géométrie octaédrique déformée, dans les deux cas de r-ARG I et h-ARG I (**Figure 4**) [2,18].

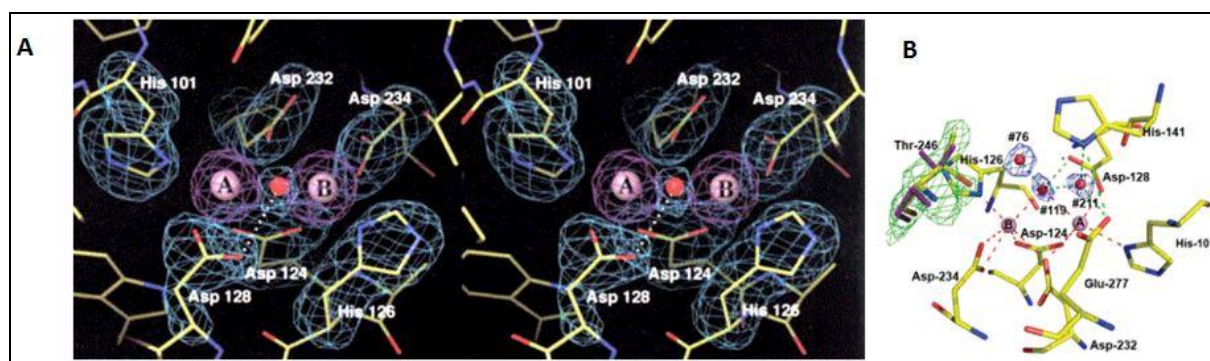


Figure 4 : Les clusters binucléaires de manganèse dans les sites actifs de chaque monomère de r-ARG I [2] (**A**) et h-ARG I [18] (**B**) (atomes en couleurs : C = jaune, O = rouge, N = bleu ; les molécules d'eau et les ions manganèses sont respectivement présentés en sphères roses et roses).

On peut noter deux acides aminés importants retrouvés au milieu du site actif de r-ARG I : Glu227 et His141 (**Figure 5**). Pour le premier, sa chaîne latérale est située profondément dans le sillon du site actif, à une distance de 4,5 Å de Mn^{2+} . Une rotation d'environ 20° de cette chaîne latérale entraîne la formation d'une liaison ionique avec le groupement guanidinium du substrat L-arginine (**1**), et peut positionner le carbone électrophile du guanidinium directement auprès de l'ion hydroxyde liant Mn^{2+} [2]. Concernant le résidu His141, si celui-ci est substitué par l'asparagine, l'arginase ne conserve qu'environ 10% de son activité enzymatique par rapport à son état normal [19]. En outre, la structure de h-ARG I montre que l'ion hydroxyde liant Mn^{2+} interagit avec His141 grâce à une molécule d'eau [18]. Ces interactions permettent de proposer l'hypothèse que His141 joue le rôle d'une navette de proton dans la régénération de l'ion hydroxyde nucléophile liant Mn^{2+} au cours de l'hydrolyse [2,14].

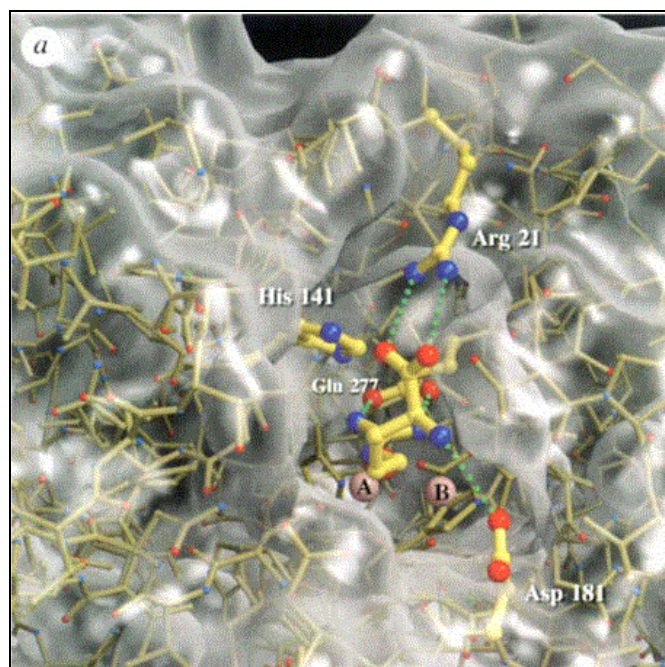


Figure 5 : Modèle en trois dimensions (3D) du substrat L-arginine dans la poche du site actif de r-ARG I : Une liaison ionique entre Glu277 et le groupement guanidinium du substrat peut orienter le substrat pour une attaque

nucléophile par le solvant de pontage métallique. His141 joue le rôle de transporteur de proton. Les autres liaisons ioniques peuvent contribuer à la spécificité du substrat. (Figure repris de [2])

A l'entrée du site actif de r-ARG I, certains acides aminés chargés peuvent aider l'enzyme à reconnaître spécifiquement le substrat ou l'inhibiteur [2]. Dans le cas du substrat naturel L-arginine (**1**), la chaîne latérale de Arg21, chargée positivement, peut interagir avec le groupement α -carboxylate, chargé négativement, du substrat, et la chaîne latérale de Asp181, chargée négativement, peut interagir avec le groupement α -amino du substrat [2] (**Figure 5**).

I-1.2. Mécanisme de la réaction hydrolytique catalysée par l'arginase

Grâce aux analyses sur la structure 3D cristallographique de r-ARG I, Kanyo *et al.* (1996) [2] ont proposé un mécanisme d'action enzymatique de l'arginase. Ce dernier est jusqu'à présent le plus compatible avec les données biochimiques, enzymologiques et structurales disponibles. Ce mécanisme est représenté sur la **Figure 6**.

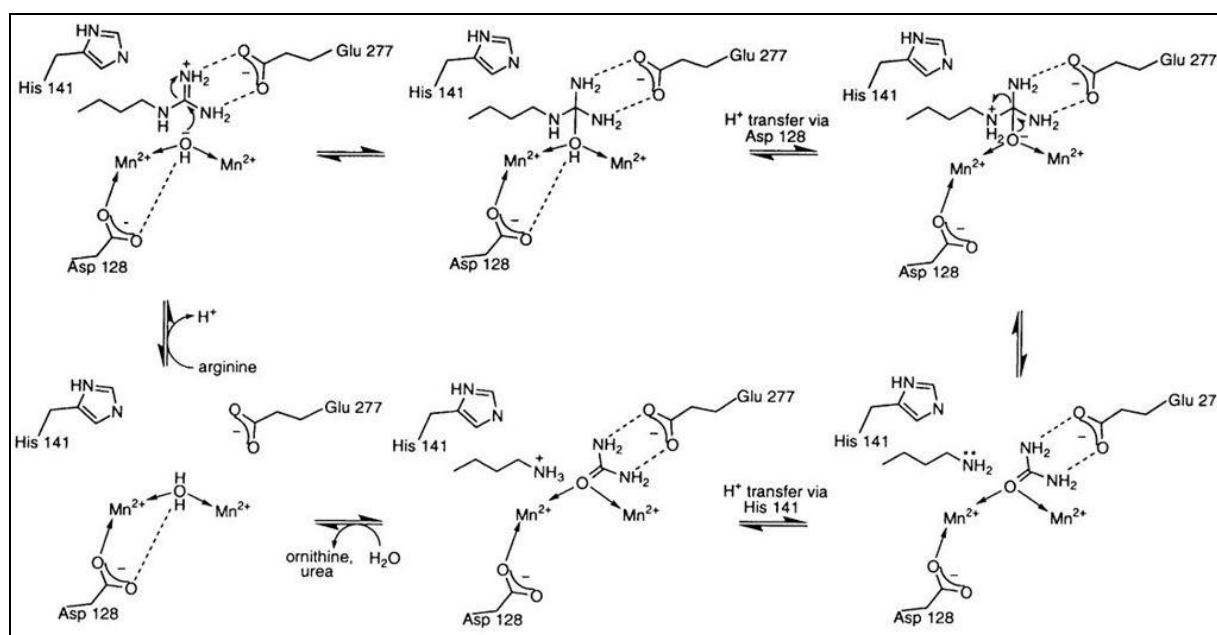


Figure 6 : Mécanisme hydrolytique de la L-arginine par l'arginase (figure repris de [2]).

Au début de ce mécanisme, Asp128 stabilise l'ion hydroxyde lié à Mn^{2+} par une liaison hydrogène au cours de l'attaque nucléophile sur le carbone du groupement guanidinium de la L-arginine (1). Ensuite, l'intermédiaire tétraédrique formé s'effondre suite à un transfert de proton, probablement réalisé par le résidu Asp128, pour le groupement amino de la L-ornithine. Ensuite, le résidu His141 transporte un proton de la molécule d'eau au groupement ϵ -amino de la L-ornithine avant la dissociation du produit. Au cours de cette dissociation, une molécule d'eau remplace l'urée. Par la suite, la coordination du métal facilite l'ionisation de cette molécule d'eau pour régénérer un ion d'hydroxyde nucléophile. Ici, le proton transféré dans le milieu du solvant peut être régénéré à nouveau par le biais de His141.

I-2. Intérêt thérapeutique de l'arginase dans les maladies cardiovasculaires

Comme nous l'avons détaillé dans la partie précédente, plus d'une centaine d'années après la découverte de l'enzyme arginase, et grâce aux efforts des chercheurs, les connaissances sur la structure, la localisation, le mécanisme d'action, et les fonctions de cette enzyme se sont considérablement enrichies. En outre, depuis les années 1990, un regain d'intérêt pour l'arginase a été stimulé, d'une part, par la découverte des différentes fonctions biologiques du monoxyde d'azote (NO) produit par la NO synthase (NOS) et, d'autre part, par la mise en évidence d'une interaction réciproque entre cette enzyme et l'arginase. En effet, le fait que l'arginase entre en compétition avec la NOS pour leur substrat commun L-arginine (1), et puisse ainsi réguler la production de NO, a ouvert de nouvelles voies d'étude concernant le rôle de l'arginase dans diverses maladies.

Cette base de données nous a permis d'identifier cette enzyme comme une cible prometteuse pour le traitement de plusieurs maladies telles que l'hypertension [20], la

dysfonction érectile [21], l'athérosclérose [22], le diabète [23], l'infarctus du myocarde [24], la cicatrisation [25], les maladies parasitaires [26] et le cancer [27].

Par conséquent, dans le contexte de ce projet de thèse, nous allons nous concentrer sur l'inhibition d'arginase et ses liens avec des maladies cardiovasculaires (MCV), surtout sur la compétition entre l'arginase et la NOS jouant un rôle important pour la production du NO.

I-2.1. Monoxyde d'azote (NO) et NO synthase (NOS)

Le monoxyde d'azote (NO) est une substance gazeuse de courte demi-vie. C'est un facteur vasorelaxant, sécrété par l'endothélium, et dont le rôle majeur a été démontré dans le contrôle du tonus vasculaire par le biais d'une relaxation du muscle lisse. Il est donc impliqué dans le maintien de la santé des vaisseaux [28]. Le NO est synthétisé par la NO synthase (NOS), qui fait partie de la famille des cytochromes P450, agissant comme monooxygénase. Cette enzyme, dans les conditions physiologiques normales, utilise la L-arginine (**1**) comme substrat pour produire le NO et la L-citrulline. A forte concentration, le NO peut aussi se révéler cytotoxique. Dans les conditions physiologiques, cette cytotoxicité est mise à profit dans la réponse des macrophages contre certains pathogènes, notamment des parasites tels que ceux des genres *Leishmania* ou *Trypanosoma* [29]. En outre, dans certaines conditions, la NOS peut également produire l'anion superoxyde, $O_2^{\cdot-}$. Ce phénomène est nommé «*découplage de la NOS*», puisqu'il intervient principalement lorsque la NOS n'est pas couplée avec son cofacteur ou son substrat. Ainsi, sous des conditions de déplétion en substrat (**1**), la NOS produit l'anion superoxyde, conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), notamment le peroxynitrite, $ONOO^-$ [5,28]. Ce processus fait de la NOS l'une des quatre principales enzymes impliquées dans la production des ROS vasculaires (avec la xanthine oxydase, la NADH/NADPH et la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie), conduisant à une dysfonction de l'endothélium [28]. Ce phénomène joue donc

un rôle critique dans les processus de développement de nombreuses maladies cardiovasculaires.

I-2.2. Compétition Arginase/NOS et conséquences

Nous avons vu précédemment que la L-arginine (1) était le substrat de la NOS mais aussi de l'arginase [5]. Il existe donc une compétition de substrat entre ces deux enzymes (Figure 7).

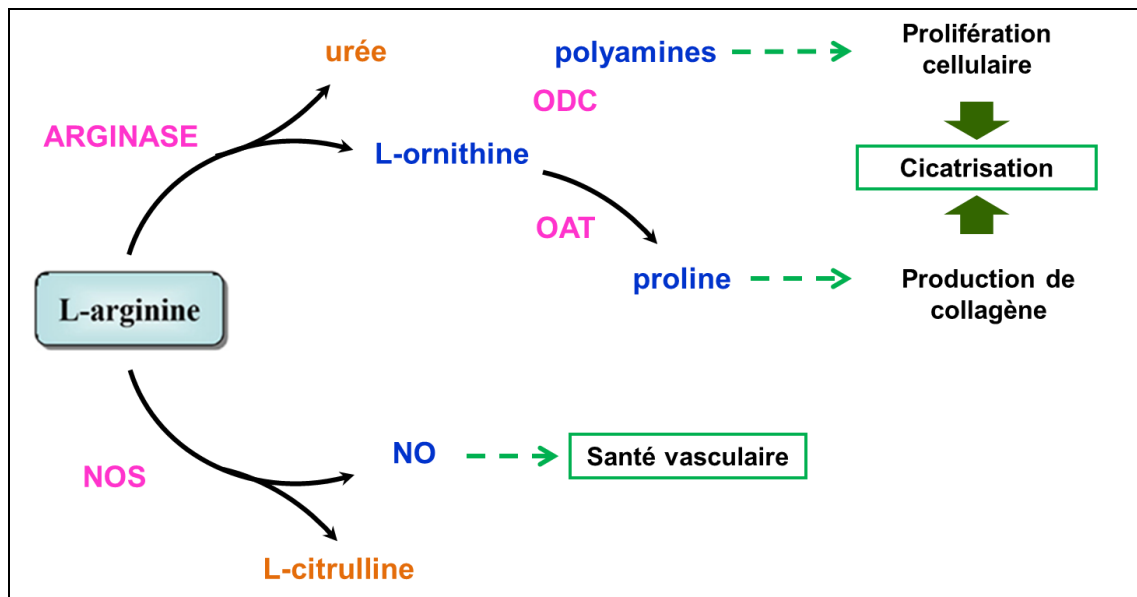


Figure 7 : Équilibre des activités de la NOS et de l'arginase en conditions physiologiques.

La production de NO se trouve ainsi régulée par une activité plus ou moins intense de l'arginase. Par conséquent, une augmentation de l'activité de l'arginase diminue la quantité d'arginine (1) disponible pour la NOS, conduisant non seulement à une diminution de la quantité de NO produite, mais aussi à l'augmentation de la production de substances réactives de l'oxygène (ROS) par découplage de la NOS [28]. Ce processus, comme nous l'avons expliqué précédemment, favorise la dysfonction endothéliale. Cette dernière est de surcroît, aggravée par l'augmentation de l'activité de l'arginase. En effet, de l'augmentation du

catabolisme de la L-arginine (1) par l'arginase, découle une surproduction de polyamines et de proline, conduisant à une prolifération cellulaire et une production de collagène trop importante, avec pour résultat l'apparition d'une rigidité des vaisseaux [5]. Cette suractivité se traduit également par une rigidification des voies aériennes supérieures, ainsi qu'une fibrose du cœur et des reins ainsi que la possibilité de formation et de développement de cancers [5] (Figure 8).

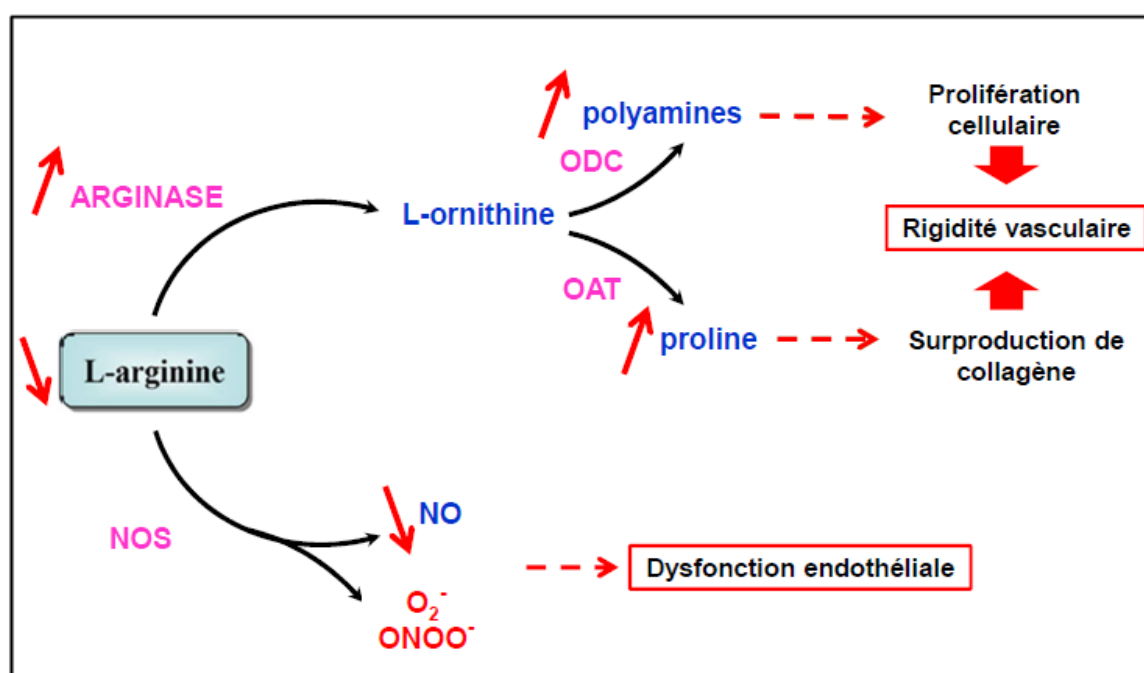


Figure 8 : Conséquences d'une suractivité de l'arginase.

Dans ce contexte, plusieurs équipes de recherche, dont l'EA 4267 Fonctions et Dysfonctions Épithéliales (FDE), se sont intéressées à l'enzyme arginase comme cible thérapeutique pour le traitement de la dysfonction endothéliale associée à un risque cardiovasculaire, apparaissant dans diverses pathologies (hypertension artérielle, diabète, maladies inflammatoires...) [20,22,30]. Il n'existe en effet à ce jour aucun traitement spécifique de la dysfonction endothéliale qui permettrait pourtant de réduire ce risque cardiovasculaire. Les études conduites sur différents modèles animaux de pathologies cardiovasculaires [28,31] ont démontré ce rôle délétère de la suractivité de l'arginase dans la

dysfonction endothéliale [5]. Ainsi, sur la base de ces données physiopathologiques, plusieurs études ont vérifié l'efficacité de l'inhibition de l'arginase pour diminuer cette dysfonction endothéliale. L'EA 4267 FDE a notamment été la première à réaliser un traitement systémique chronique par un inhibiteur d'arginase et à démontrer que les inhibiteurs d'arginase restauraient la fonction endothéliale de rats hypertendus [20] ou arthritiques [30]. Plus récemment, des études cliniques (à petite échelle et avec une administration locale), menées par d'autres équipes, ont apporté la preuve de concept de l'efficacité des inhibiteurs d'arginase en cas de dysfonction endothéliale chez le patient diabétique ou coronarien [32–34].

L'intérêt des inhibiteurs d'arginase comme médicaments potentiels n'est donc plus à démontrer et ce regain d'intérêt pour l'arginase a suscité en parallèle une émulation pour la recherche de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme.

Chapitre II : Les inhibiteurs d'arginase

Lors de la découverte de l'arginase en 1904 [1], de premières études sur l'inhibition d'arginase avaient été réalisées, en utilisant des acides aminés naturels [35]. Mais ce n'est que dans les années 1990 que la recherche sur ce type d'inhibiteurs s'est accélérée, conduisant dans un premier temps à l'obtention de divers composés synthétiques [36,37]. Plus récemment, un certain nombre d'études ont montré le potentiel inhibiteur d'arginase de produits naturels, extraits végétaux ou substances purifiées [13]. Il semble par conséquent que la source naturelle constitue un réservoir très prometteur de molécules inhibitrices d'arginase.

Notre projet de recherche s'intéressant principalement à la recherche de nouveaux inhibiteurs d'origine naturelle, nous avons choisi de présenter, dans la partie qui suit, d'une part, et de façon plutôt concise, les principaux inhibiteurs d'origine synthétique, et d'autre part, de façon plus exhaustive, les molécules naturelles présentant des capacités potentiellement inhibitrices d'arginase.

II-1. Inhibiteurs d'arginase synthétiques

II-1.1. Les dérivés de N^o -hydroxy-L-arginine (NOHA)

Depuis longtemps, la L-ornithine (**2**), un produit de l'hydrolyse de la L-arginine (**1**), catalysée par l'arginase, est connu comme étant un inhibiteur compétitif de l'arginase, avec un K_i égal à 1 mM, valeur comparable à celle du substrat naturel L-arginine (**1**) ($K_i = 1-1,7$ mM) [35,38]. Au début des années 1990, les études menées avec la N^o -hydroxy-L-arginine (NOHA, **3**) [38,39], un intermédiaire dans la biosynthèse de NO, à partir de la L-arginine (**1**), par la NO synthase, et de certains N^o -hydroxy-nor-L- α -aminoacides [40,41], ont permis d'accéder à la première catégorie d'inhibiteurs puissants de l'arginase, caractérisés par une

chaîne latérale *N*-hydroxy-guanidinium. Cette première stratégie de recherche a conduit à la découverte de la *N*⁰-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA, 5), le premier inhibiteur d'arginase de référence [42].

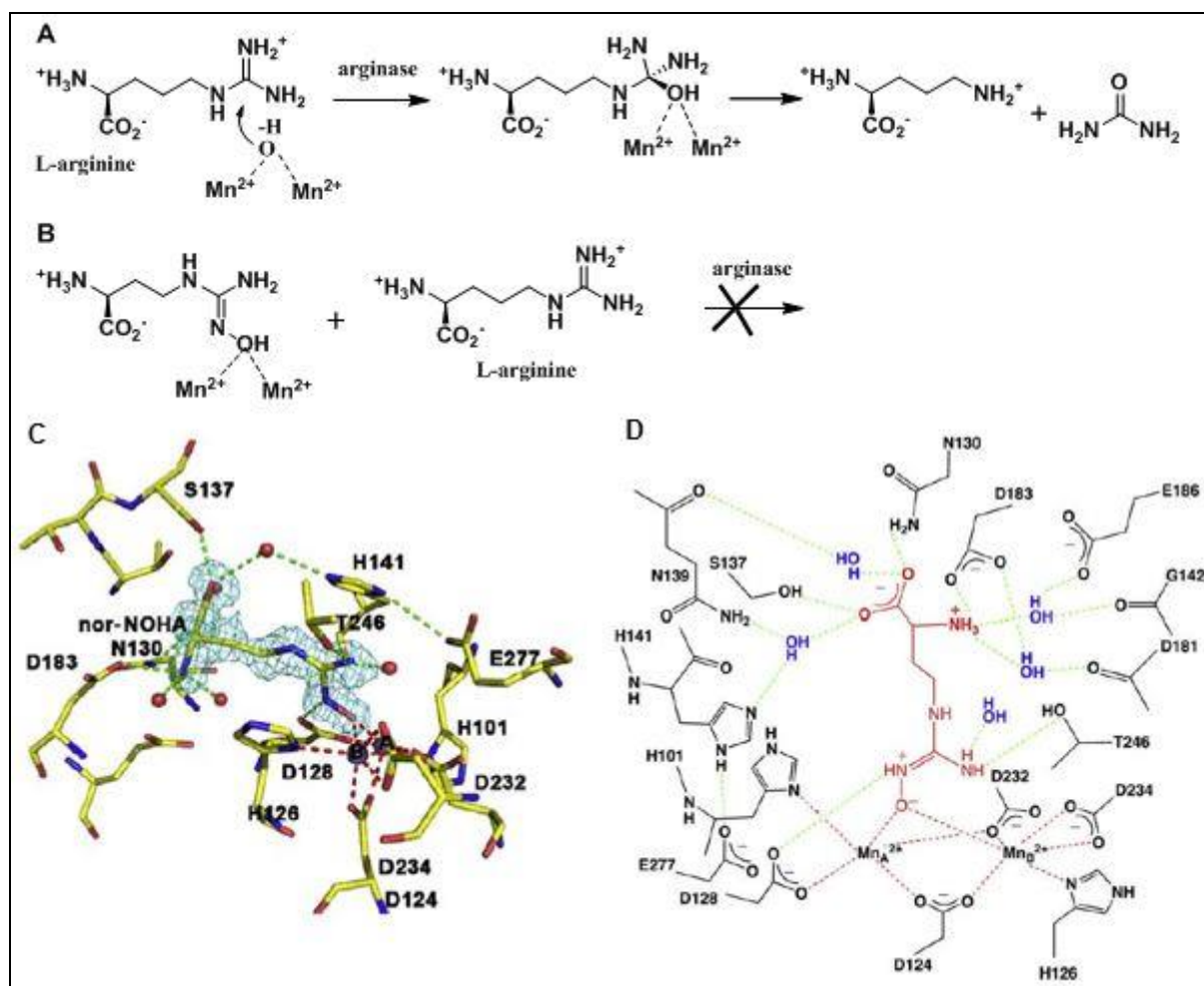


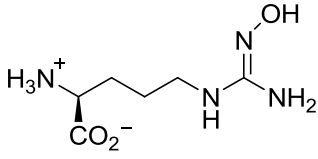
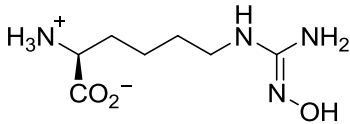
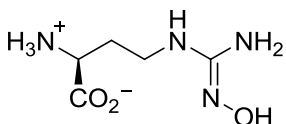
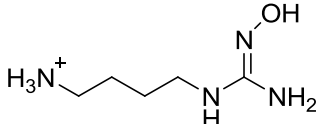
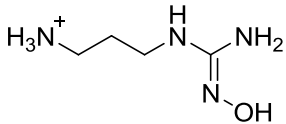
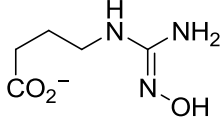
Figure 9 : Mécanisme d'inhibition de l'activité d'arginase des dérivés de NOHA (3). **(A)** Hydrolyse de la L-arginine (1) en L-ornithine (2) et urée par l'arginase. **(B)** Réaction de la nor-NOHA (5) au niveau du centre binucléaire : la partie -OH de la molécule d'eau est remplacée par la partie -OH de la nor-NOHA (5) [42]. **(C)** Plan de densité d'électrons de la nor-NOHA (5) dans le site actif de h-ARG I [43]. **(D)** Interactions entre la nor-NOHA (5) et le site actif de h-ARG I [43].

En analysant les structures cristallographiques, Cox et ses collègues ont proposé le mécanisme d'inhibition de ces molécules, et ont montré que la NOHA (3) et la nor-NOHA (5)

inhibent l'activité d'arginase en remplaçant la molécule d'eau (ou -OH) liée au cluster de manganèse par son groupe -N-OH (**Figure 9**) [41,42].

Des expérimentations réalisées sur l'arginase purifiée de foie de rat par Custot *et al.* [42] ont indiqué que la NOHA (**3**) et la nor-NOHA (**5**) sont des inhibiteurs réversibles, compétitifs, de l'arginase, avec une meilleure affinité pour le dernier ($K_i = 10 \pm 2 \mu\text{M}$ et $0,5 \pm 1 \mu\text{M}$, respectivement). De plus, la longueur de la chaîne reliant la fonction d'acide animé et la fonction de *N*-hydroxyguanidine est primordiale pour la reconnaissance par l'arginase. En effet, l'addition d'un groupement -CH₂- (homo-NOHA, **4**) conduit à une diminution importante de l'activité inhibitrice (CI_{50} était 75 fois plus élevée), tandis que l'élimination d'un -CH₂- (**5**) a nettement amélioré la reconnaissance (K_i divisé par 20) [42]. En outre, la suppression des fonctions carboxylique ou amine conduit à une diminution drastique de l'activité inhibitrice [41] (**Tableau I**). Ces observations ont démontré que les groupes α -amino et α -carboxylate sont particulièrement importants pour l'affinité de ces composés avec l'arginase [44].

Tableau I : Inhibition de l'arginase par la NOHA (3), la nor-NOHA (5) et leurs dérivés.

Composé	Structure	CI ₅₀ (μM)	Ki (μM)	[Ref.]
NOHA (3)		40 ± 10	10 ± 2	[42]
		20 ± 2		[41]
homo-NOHA (4)		3000 ± 500		[42]
nor-NOHA (5)		2 ± 0,5	0,5 ± 0,1	[42]
		1 ± 0,5		[41]
décarboxy-NOHA (6)		1000 ± 400		[41]
décarboxy-nor-NOHA (7)		300 ± 50		[41]
dés-(α-amino)-nor-NOHA (8)		5000 ± 1000		[41]

L'utilisation de la NOHA (3) en clinique est limitée par le fait que ce composé soit le précurseur pour la biosynthèse de NO par la NOS [45].

En revanche, la nor-NOHA (5), l'inhibiteur le plus actif dans cette catégorie, a une inhibition plus spécifique que la NOHA (3) sur l'arginase. Celui-ci a démontré des effets bénéfiques dans plusieurs études *in vivo* concernant des maladies associées à la dysfonction endothéliale [20,33]. Néanmoins, une étude récente a rapporté que la demi-vie de la nor-

NOHA était très courte [46] et pourrait, de ce fait, limiter l'usage de cette molécule en clinique pour une administration orale.

II-1.2. Les analogues d'acide boronique de la L-arginine

Le borate a été rapporté comme étant un inhibiteur non-compétitif de l'arginase [47,48]. De multiples expérimentations d'inhibition réalisées par Reczkowski R. S. *et al* [48] ont démontré que le borate et l'ornithine (**2**) peuvent se lier simultanément à l'enzyme arginase. En effet, au milieu aqueux, l'acide borique, $B(OH)_3$, est en équilibre avec l'anion tétraédrique borate, $B(OH)_4^-$. Il est proposé que cet anion $B(OH)_4^-$ est responsable de l'inhibition car le K_i du borate augmente quand le pH diminue [48]. Le mode d'inhibition du borate a été clarifié par l'examen de la structure cristalline, qui a bien relevé que l'oxygène de l'anion tétraédrique de borate établit une chélation avec l'ion Mn^{2+} dans le centre binucléaire, et remplace la molécule d'eau, normalement présente dans le site actif de l'enzyme native, lié à Mn^{2+} , et qui est responsable de l'attaque nucléophile sur le carbone de la fonction guanidine [49].

Le mode d'inhibition du borate et de la L-ornithine (**2**) sur l'arginase [48,49] a conduit à la conception de l'acide 2-(S)-amino-6-borono-hexanoïque (ABH, **9**) [49] et de la S-(2-boronoéthyl)-L-cystéine (BEC, **10**) [50], deux inhibiteurs compétitifs puissants appartenant à cette catégorie des inhibiteurs d'arginase dérivés de l'acide boronique. L'affinité de la chaîne boronique de ABH (**9**) et BEC (**10**) avec le site actif de l'arginase est 50 000 fois plus forte que celle des acides aminés, et que celle des groupements aldéhydes ou sulfonamiques. La partie acide boronique en lieu et place du groupement guanidinium présent dans la L-arginine (**1**), permet la formation de l'ion boronate tétraédrique [50]. Il a été confirmé par des analyses de la structure cristallographique, que cette réaction est identique à celle passant par la création d'un intermédiaire tétraédrique lors de l'attaque nucléophile de l'ion hydroxyde sur

le groupe guanidinium de la L-arginine (**1**) (**Figure 10**) [16,50,51]. ABH (**9**) et BEC (**10**) sont des inhibiteurs spécifiques de l'arginase (cf **Tableau II**).

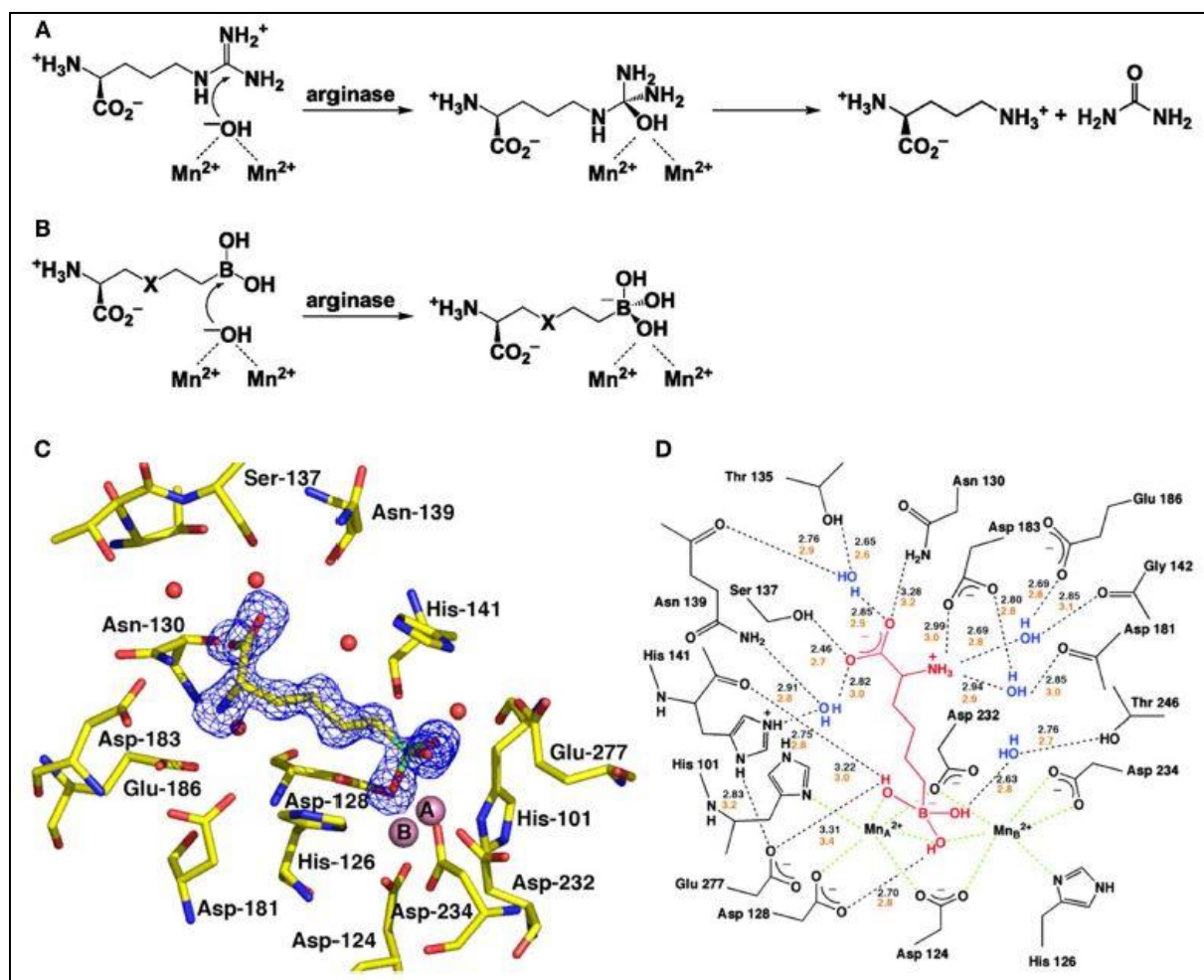


Figure 10 : Mécanisme d'inhibition de l'activité d'arginase par des analogues d'acide boronique de la L-arginine (**1**) [15,36]. **(A)** Hydrolyse de la L-arginine (**1**) en L-ornithine (**2**) et urée par l'arginase. **(B)** Réaction des analogues d'acide boronique de la L-arginine au niveau du centre binucléaire : ABH (**9**) (X = CH₂), BEC (**10**) (X = S). **(C)** Plan de densité d'électrons de ABH (**9**) dans le site actif de h-ARG I. **(D)** Interactions entre ABH (**9**) et le site actif de h-ARG I.

Tableau II : Inhibition de ABH et BEC sur les arginases

Composé	Ki/ARG I (μM)	Ki/ARG II (μM)	pH	[Ref.]
ABH (9)	0,11	0,25	7,5	[44,52]
BEC (10)	0,4-0,6	0,31	7,5	[50]

De nombreuses études cristallographiques ont permis de clarifier l'agencement du site catalytique de l'arginase et notamment les acides aminés clés pour l'activité enzymatique [2,15,16]. Les interactions des inhibiteurs avec le site actif ont été mises en évidence et ces informations ont inspiré les chercheurs pour la conception et le développement de nouveaux inhibiteurs d'arginase [24,41,44,49,51,53]. Ainsi, plusieurs séries de petites molécules ont été synthétisées et évaluées pour leurs activités inhibitrices sur l'arginase [37], telles que des acides amino-sulfonamides [54], des acides amino-aldéhydes [55], des acides aminés 2-aminoimidazoles [56], l'acide (2S)-2-amino-7,8-époxyoctanoïque [57] ou encore des acides aminés α,α -di-substitués [58]. Récemment, pour améliorer l'activité inhibitrice et la sélectivité ARG II/ARG I, certaines études ont identifié la position α de ABH (9) comme une cible intéressante pour la pharmacomodulation [24,58]. Des substituants avec une amine tertiaire reliée par une chaîne de deux carbones à la position α peuvent améliorer la capacité inhibitrice sur les deux isozymes, et cette amélioration peut être expliquée par la cristallographie au rayon X [24,58,59]. Cette dernière montre un lien, matérialisé par une molécule d'eau, entre l'azote du ligand et le groupe carboxylique de Asp200 qui est situé à l'embouchure de la poche du site actif de ARG II (Asp181 dans le cas de ARG I) [59]. Ces efforts ont mené au développement d'une nouvelle série de puissants inhibiteurs portant des substituants sur cette position α (**Tableau III**), et dont la « tête de série » est l'acide (*R*)-2-amino-6-borono-2-(2-

Tableau III : Exemples d'analogues d'aminoéthylène de ABH (9) avec leurs activités inhibitrices sur les deux isoformes d'arginase humaine [24].

45

Les composés possédant le groupe acide boronique sont actuellement considérés comme les meilleurs inhibiteurs d'arginase, cette activité étant due à leur polarisabilité [60]. Néanmoins, certains composés de ce type ont montré une toxicité inacceptable sur des hépatocytes humains et des cellules normales. De plus, le groupe acide boronique est susceptible d'être éliminé par les microsomes du foie, et transformé en dérivés hydroxyle ou cétone [60].

A ce jour, malgré un grand progrès dans la recherche de nouveaux inhibiteurs d'arginase, les composés actifs sont encore rares, et aucun n'est utilisable en clinique. La majorité des inhibiteurs d'arginase d'origine synthétique répertoriée dans la littérature est constituée par des analogues d'acide boronique. Pourtant ceux-ci ont un profil pharmacocinétique défavorable et un manque de sélectivité envers l'une ou l'autre des isoformes [60]. C'est la raison pour laquelle, l'identification de composés originaux plus actifs et sélectifs, pouvant surmonter les limitations en terme de pharmacocinétique et constituer des têtes de série, constitue un challenge d'intérêt public [61]. Étant donné la diversité des molécules naturelles, qui ont largement fait leur preuve dans le domaine de la découverte de médicaments, la recherche de ce type de composés pourrait naître ou être inspirée par des substances naturelles, notamment extraites de plantes. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par le fait que de nombreux travaux se sont penchés ces dernières années sur des inhibiteurs d'origine naturelle, avec des résultats plus ou moins prometteurs, mais qui laissent la place à des perspectives pour cette voie de recherche. Dans la session qui suit, nous rapportons en détail ces produits naturels, extraits ou molécules purifiées, pour lesquels ont été mises en évidence des propriétés inhibitrices d'arginase.

II-2. Inhibiteurs d'arginase d'origine naturelle

L'arginase est présente non seulement chez les mammifères mais aussi chez les parasites et les plantes. Chez ces dernières, cette enzyme joue un rôle important pour la régulation de l'azote et les mécanismes de défense contre le stress, les insectes, les virus, ou encore les produits chimiques [62–65]. Il existe donc des métabolites secondaires qui régulent l'activité de l'arginase chez les plantes. Récemment, de nombreuses études ont été menées sur des substances d'origine naturelle possédant des propriétés inhibitrices d'arginase, arginases mammifères ou arginase de parasites, et un certain nombre de classes de métabolites secondaires se sont révélées intéressantes : flavonoïdes [66–69], stilbénoides [70,71], ou autres composés polyphénoliques [72–74]. Certains composés naturels, tels que le glucoside de picéatannol, l'acide chlorogénique ou la fisétine ont notamment montré des activités inhibitrices importantes. Dans cette partie, une revue de la littérature concernant les inhibiteurs d'arginase, d'origine naturelle, est réalisée. Le résultat de cette étude bibliographique a fait l'objet d'une publication [13].

II-2.1. Les inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase mammifère

Comme nous l'avons présenté précédemment, la compétition entre arginase et NOS pour leur substrat commun la L-arginine (1) a été relevé depuis les années 1990. L'arginase joue donc un rôle important dans la régulation de la production du NO, et une suractivité de cette enzyme est particulièrement associée à l'apparition d'une dysfonction endothéliale à l'origine des maladies cardiovasculaires. Par conséquent, la recherche d'inhibiteurs, d'origine naturelle, d'arginase a, en grande partie, reposé sur l'étude de plantes médicinales traditionnelles ayant des propriétés bénéfiques au niveau cardiovasculaire. Il faut cependant souligner que, dans les études menées, les modèles d'évaluation biologique sont extrêmement variés. Certaines expérimentations ont été réalisées *in vitro* en utilisant par exemple des lysats

hépatiques (ARG I) et/ou rénaux (ARG II) de rat ou de souris, des anneaux aortiques de souris, des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine ou encore des macrophages. Tandis que d'autres études ont été menées *in vivo* chez des souris ou chez l'homme. Cette diversité des travaux expérimentaux rend difficile l'analyse et surtout la comparaison des résultats entre eux. Par conséquent, pour plus de lisibilité, l'ensemble des résultats de la littérature est résumé et présenté dans le **Tableau IV**. Certaines structures de composés intéressants sont données dans la **Figure 11**.

Tableau IV: Inhibition de l'arginase mammifère, ARG-I ou II, par des produits naturels.

Plante (Partie)	Extrait ou composé pur	Modèle	CI ₅₀	Effet sur l'activité de l'arginase (concentration)	[Ref.]
Evaluations <i>in vitro</i>					
<i>Ficus glomerata</i> (Écorce de la tige)	Extrait éthéropétrolique	Lysat hépatique de rat (Arg I)	<i>n.d.</i>	↓	[75]
<i>Theobroma cacao</i> (fève de cacao)	Mélange de flavanols*	HUVEC (Arg II)	<i>n.d.</i>	↓	[66]
	Épicatéchine (20)	HUVEC (Arg II)	<i>n.d.</i>	↓	
<i>Caesalpinia sappan</i> (duramen**)	Extrait acétate d'éthyle	Lysat rénal de souris (Arg II)	36,82 µg/mL	-31% (50 µg/mL)	[76]
		HUVEC (Arg II)	<i>n.d.</i>	- 76% (20 µg/mL)	
<i>Ginseng rouge de Corée</i> (racine)	Extrait aqueux	Lysat hépatique de souris (Arg I)	<i>n.d.</i>	- 91,0% (4 µg/mL) - 73,6% (16 µg/mL) - 67,3% (25 µg/mL)	[73]
		Lysat rénal de souris (Arg II)	<i>n.d.</i>	- 93,3% (4 µg/mL) - 78,3% (16 µg/mL) - 71,3% (25 µg/mL)	
		HUVEC (Arg II)	<i>n.d.</i>	- 74,0% (15 µg/mL)	
<i>Saururus chinensis</i> (partie aérienne)	Sauchinone (21)	Lysat rénal de souris (Arg II)	89,6 µM	↓	[74]
	7-Hydroxysauchinone (22)	Lysat rénal de souris (Arg II)	61,4 µM	↓	
<i>Rheum undulatum</i> (rhizome)	3'-O-β-D-glucopyranoside de picéatannol (25)	Lysat rénal de souris (Arg II)	11,06 µM	- 75 % (1 µM) - 74 % (3 µM) - 53 % (10 µM)	[70]
		Lysat hépatique de souris (Arg I)	11,22 µM	- 75 % (1 µM) - 72 % (3 µM) - 62 % (10 µM)	
		HUVEC (Arg II)	<i>n.d.</i>	- 60 % (1 µM) - 56 % (3 µM) - 37 % (10 µM)	
<i>Salvia miltiorrhiza</i> (racine)	Acide salvianolique B (27)	Lysat hépatique de souris (Arg I)	<i>n.d.</i>	- 93% (10 µM) - 88% (30 µM) - 85% (50 µM) - 71% (100 µM)	[77]

		Lysat rénal de souris (Arg II)	<i>n.d.</i>	- 96% (10 μM) - 91% (30 μM) - 92% (50 μM) - 85% (100 μM)	
		Anneau aortique de souris (Arg II)	<i>n.d.</i>	↓ (100 μM)	
		Macrophages RW 264.7	<i>n.d.</i>	↑ (100 μM) ↑ (200 μM) ↑ (400 μM)	
<i>Scutellaria indica</i> (plante entière)	Extrait méthanolique Fraction acétate d'éthyle Flavanone Flavanone	Lysat rénal de souris (Arg II)	<i>n.d.</i> <i>n.d.</i> 25,1 μM 11,6 μM	↓ ↓ ↓ ↓	[67]
Agrumes	Obacunone (26)	Lysat hépatique de souris (Arg I)	<i>n.d.</i>	- 82,2% (16 μM) - 67,9% (50 μM)	[78]
		Lysat rénal de souris (Arg II)	<i>n.d.</i>	- 81,2% (16 μM) - 69,9% (50 μM)	
		HUVEC	<i>n.d.</i>	- 65,3% (30 μM)	
Evaluations <i>in vivo</i>					
<i>Theobroma cacao</i> (fève de cacao)	Poudre de cacao	Rat <i>Sprague-Dawley</i> (4% régime alimentaire pendant 28 jours) (reins Arg II)	<i>n.d.</i>	↓	[66]
	Boisson de cacao riche en flavanols (985 mg)	Homme (dose unique 200 mL) (Arginase érythrocytaire)	<i>n.d.</i>	↓	
<i>Yucca schidigera</i> (plante entière)	Extrait aqueux Extrait soluble eau/butanol Extrait insoluble eau/butanol	Rat <i>Wistar</i> (200 mg/kg/jour par voie orale pendant 75 jours) (foie Arg I)	<i>n.d.</i> <i>n.d.</i> <i>n.d.</i>	- 17% - 14% - 3%	[79]
<i>Loranthus micranthus</i> (feuilles/extrait méthanolique)	Fraction n-Butanol Fraction chloroformique Fraction acétate d'éthyle Fraction aqueuse	Souris (250 mg/kg/jour par voie orale pendant 21 jours) (arginase cardiaque)	<i>n.d.</i> <i>n.d.</i> <i>n.d.</i> <i>n.d.</i>	- 11,7% - 2,6% - 1,2% - 8,3%	[80]
<i>Zingiber officinale</i> <i>Curcuma longa</i> (rhizome)	Poudre	Rat <i>Wistar</i> (2 et 4% régime alimentaire pendant 14 jours) (reins ARG II)	<i>n.d.</i>	↓	[81,82]

*Composition du mélange de flavanols: (-)-épicatéchine (0,1 µM) + catéchine (0,4 µM) + 7-β-D-glucuronide d'épicatéchine (0,25 µM) + 4-O-méthyl-épicatéchine (0,2 µM) + 7-β-D-glucuronide de 4-O-méthyl-épicatéchine (1,7 µM).

**Cœur des troncs d'arbres, partie centrale plus colorée, imputrescible, dépourvue de tissus vivants, souvent dure et lourde, et qui s'oppose par tous ces caractères à l'aubier qui l'entoure

CI₅₀ : concentration inhibitrice médiane; *n.d.*: non déterminée; HUVEC : cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine; ↓: diminution; ↑: augmentation

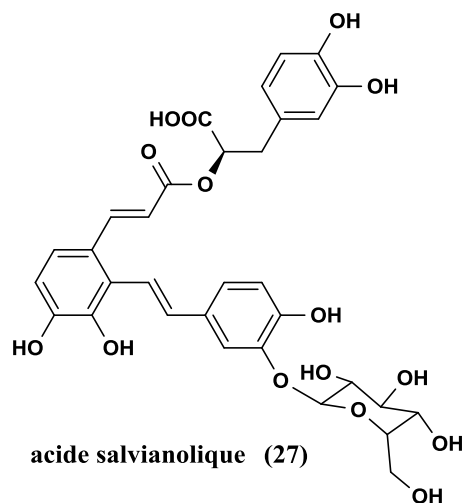
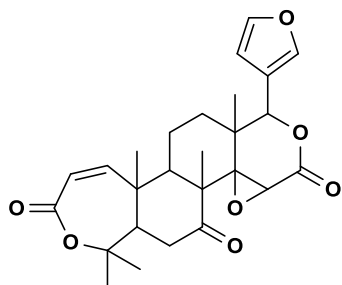
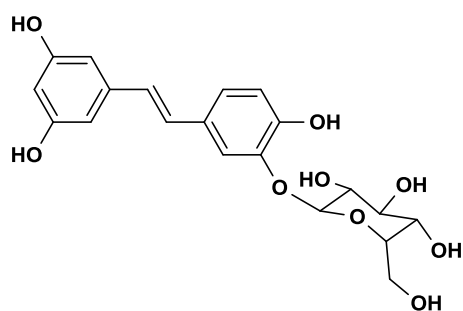
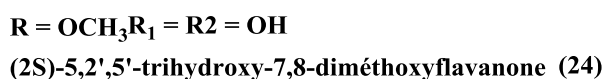
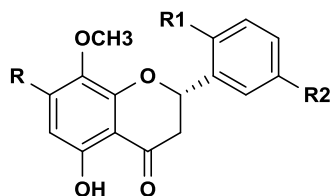
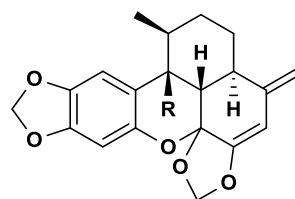
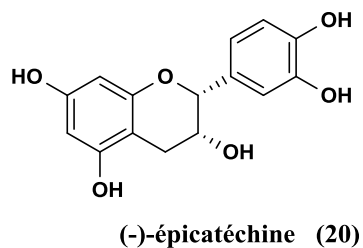


Figure 11 : Structures de molécules naturelles à propriétés inhibitrices d'arginase mammifère.

Dans une étude sur l'effet hypoglycémiant de *Ficus glomerata*, Rahman *et al.* ont réalisé des évaluations biologiques sur certaines enzymes, dont l'arginase [75]. Leurs résultats ont montré que l'extrait étheropétrolique de l'écorce de tige de cette plante pouvait inhiber ARG I du lysat hépatique de rat. Néanmoins, ni la concentration inhibitrice médiane (CI₅₀) de l'extrait, ni sa composition n'ont été déterminées.

Une autre étude s'est concentrée sur les fèves de cacao (graines de *Theobroma cacao*) , bien connues pour leur richesse en polyphénols, capables d'améliorer la fonction endothéliale et de diminuer la pression sanguine chez l'homme et les animaux [83,84]. Afin de déterminer si leurs propriétés, au niveau cardiovasculaire, sont impliquées dans l'inhibition d'arginase, Schnorr *et al.* ont testé l'effet de la (-)-épicatéchine, ainsi que celle d'un mélange de métabolites de flavanols et d'un extrait de cacao riche en flavanols, sur l'expression et/ou l'activité de l'arginase, en utilisant des modèles différents *in vitro* et *in vivo* [66]. Dans des cellules endothéliales cultivées de veine ombilicale humaine (HUVEC), la (-)-épicatéchine (1, 3 et 10 μM) ainsi que le mélange des métabolites de flavanols (0,4, 2,6 et 7,8 μM) ont significativement diminué l'activité de l'arginase, et de façon dose-dépendante (après 48h d'incubation), ainsi que l'expression de l'ARNm de ARG II (après 24h d'incubation). Cet effet a été confirmé par une expérimentation réalisée chez des rats mâles Sprague-Dawley nourris avec un régime alimentaire complémenté avec 4% de poudre de cacao riche en flavanols (m/m) et contenant la (-)-épicatéchine et ses oligomères comme principaux constituants. Après 28 jours de ce régime, l'activité de l'arginase rénale a été significativement diminuée (0,13 U/mL) par rapport à celle des rats non traités (0,18 U/mL, $p < 0,05$). Chez des hommes en bonne santé, la consommation de 200 mL d'une boisson de cacao riche en flavanols (contenant 935 mg de flavanols totaux) a induit une diminution de l'activité de l'arginase érythrocytaire après 24h (3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéine/h) par rapport à celle des sujets témoins (3,9 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéine/h, $p < 0,05$).

Loranthus micranthus, appelé aussi gui d'Afrique, est une plante médicinale traditionnelle utilisée pour traiter l'hypertension au Niger [85]. Conformément à son utilisation dans la médecine traditionnelle, l'extrait méthanolique des feuilles de cette plante a présenté une activité anti-hypertensive chez le rat [86]. Dans une autre étude visant à déterminer les mécanismes d'activité anti-hypertensive de cet extrait, le traitement des souris avec des fractions butanolique et aqueuse de l'extrait méthanolique des feuilles (250mg/kg/jour par gavage pendant 21 jours) a entraîné une

légère diminution de l'activité de l'arginase cardiaque, de -12% et -8%, respectivement [80]. Les substances bioactives n'ont pas été isolées, mais un criblage phytochimique de la fraction active a permis d'identifier des constituants polaires appartenant aux classes des terpénoïdes et des tanins [80].

Yucca schidigera est une plante du désert, qui possède plusieurs effets bénéfiques pour la santé, et est utilisée sous forme d'extraits et de préparations alimentaires chez l'homme. Les effets du *totum* (ensemble des molécules actives) de cette plante (TOT), ainsi que des fractions extractives butanolique (EB) et non-butanolique (ENB), ont été évalués sur l'activité des enzymes du cycle de l'urée, dont l'arginase, chez des rats mâles Wistar [79]. La supplémentation dans le régime alimentaire (200 mg/kg/jour pendant 75 jours) avec TOT et EB a significativement réduit l'activité de l'arginase hépatique, à hauteur de 17 et 4%, respectivement. En revanche, la fraction ENB ne s'est pas révélée active sur l'arginase. Bien que les composés responsables pour l'inhibition d'arginase n'aient pas été identifiés, les auteurs ont suggéré que cette activité inhibitrice pourrait être attribuée aux saponines, la sarsapogénine et la smilagénine, contenues dans la fraction EB [87]. Pourtant, cette hypothèse n'est pas évidente, car l'effet inhibiteur de l'extrait de *Y. schidigera* observé *in vivo* n'a pas été confirmé par le test *in vitro* sur l'arginase d'homogénat de foie de rat (ARG I) même avec une concentration élevée, jusqu'à 1000 µg/g [79].

Depuis ces dernières années, Ryoo *et al.* ont concentré leurs travaux sur la recherche de composés d'origine naturelle capables d'inhiber l'activité d'arginase en utilisant des lysats hépatiques (ARG I) ou rénaux (ARG II) de souris C57BL/6, incubés avec des extraits ou des composés naturels purs. Ces études leur ont permis d'identifier certaines plantes médicinales d'intérêt [70,71,73,74,76]. L'extrait acétate d'éthyle du duramen de *Caesalpinia sappan*, un arbre médicinal asiatique utilisé pour améliorer la circulation sanguine [88], a montré une activité inhibitrice concentration-dépendante sur ARG II ($CI_{50} = 36,82 \text{ µg/mL}$) [76]. Cet effet a été confirmé dans les expérimentations sur des cellules endothéliales HUVEC et des anneaux d'aortes

isolées de souris [76]. En outre, les auteurs ont également étudié l'effet d'un extrait aqueux de ginseng rouge de Corée (*Panax ginseng*), connu pour ses effets bénéfiques NO-dépendants sur le système cardiovasculaire [89]. Cet extrait a inhibé de manière concentration-dépendante, à la fois ARG I et sur ARG-II [73]. Néanmoins, dans ces deux extraits, les composés actifs n'ont pas été identifiés. Par ailleurs, dans une autre étude, la fraction acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Saururus chinensis* a conduit à isoler deux composés de type lignane présentant des propriétés inhibitrices d'arginase, la sauchinone (21) et l'hydroxysauchinone (22), avec des valeurs de CI_{50} respectivement égale à 89,6 μM et 61,4 μM sur ARG II [74]. De même, *Scutellaria indica* a abouti à l'identification d'une série de flavonoïdes, dont deux flavanones, (23) et (24), ayant chacune montré une activité inhibitrice importante sur ARG II (CI_{50} (23) = 25,1 μM et CI_{50} (24) = 11,6 μM) [67]. Une étude récente a montré que la flavanone (24) est un inhibiteur non compétitive de ARG I et II, capable d'inhiber à 10 μM l'activité de l'arginase dans des cellules HUVEC et des aortes de souris avec un effet similaire à celui de l'ABH (9), un inhibiteur synthétique présenté précédemment [90]. De plus, le 3'-O- β -D-glucopyranoside de picéatannol (PG) (25), un composé isolé du rhizome de la rhubarbe, *Rheum undulatum* L., a montré une activité inhibitrice sur ARG I (CI_{50} = 11,22 μM) et sur ARG II (CI_{50} = 11,06 μM) [70]. L'effet de PG sur l'activité d'arginase a été confirmé par des tests sur cellules HUVEC et sur aortes isolées de souris [70]. Des données similaires ont été obtenues dans le cas de l'obacunone (26), l'un des triterpénoïdes oxygénés rencontré dans la famille des Rutacées, et qui a présenté une activité inhibitrice sur arginase [78]. L'acide salvianolique B (27) isolé à partir de la racine de *Salvia miltiorrhiza* (Danshen), une plante médicinale chinoise couramment utilisée pour la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires, a quant à lui montré des activités variables sur l'arginase. En effet, ce composé a, d'une part, augmenté l'activité de l'arginase dans des macrophages RW 264.7 en culture, et d'autre part, inhibé l'activité de l'arginase dans le foie, le rein et l'aorte [77]. Les raisons d'une telle différence au niveau de l'effet de cette molécule (27)

sur les macrophages et autres tissus n'a pas encore été élucidée.

Récemment, *Zingiber officinale* et *Curcuma longa*, deux plantes médicinales couramment utilisées dans la médecine traditionnelle asiatique pour le traitement des maladies cardiovasculaires, ont été étudiées par Akinyemi *et al.* [81,82] dans le but de déterminer les mécanismes de leurs effets bénéfiques. Un régime alimentaire enrichi à 2 ou 4% en poudre de ces rhizomes a été soumis à des rats pendant 14 jours. Les résultats ont montré que l'activité de l'arginase chez les rats supplémentés en curcuma et en gingembre était significativement réduite par rapport à celle obtenue chez les rats non-supplémentés. Le profil de l'extrait aqueux de chacune de ces plantes a été analysé par chromatographie liquide haute performance (CLHP) afin d'identifier les constituants responsables des effets observés, et a mis en évidence la présence de certains composés déjà connus comme inhibiteurs de l'arginase, tels que l'épicatéchine, la quercétine, le kaempférol et la lutéoline [82].

Malgré le fait que plusieurs études aient déjà été réalisées afin d'étudier l'activité inhibitrice d'extraits et de composés purs isolés de plantes médicinales, sur l'arginase mammifère, les résultats ne sont pas vraiment comparables entre eux en raison de l'utilisation de modèles variés pour les tests biologiques mis en oeuvre. Il serait, par conséquent, nécessaire de pouvoir disposer, au moins *in vitro*, d'un test enzymatique rapide permettant une évaluation biologique, systématique et reproductible, sur l'arginase mammifère, de séries de composés naturels (par exemple flavonoïdes, stilbénoides,...). Ces études permettraient d'obtenir suffisamment d'informations dans le but d'établir des relations de structure-activité (RSA) par comparaison des résultats entre eux. La RSA fournit des éléments importants pour concevoir et développer de nouveaux inhibiteurs d'arginase candidats-médicaments visant le traitement de la dysfonction endothéliale associée au risque cardiovasculaire.

II-2.2. Les inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase de *Leishmania*

En parallèle avec le progrès rapide des études sur les arginases mammifères durant ces dernières années, les chercheurs ont également fait beaucoup d'efforts afin de trouver de nouveaux inhibiteurs de l'arginase de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (L-ARG). Ce dernier est un parasite de la famille Trypanosomatidae, responsable de diverses maladies tropicales négligées, appelées leishmanioses [91]. L'organisme mammifère hôte possède un système de défense mettant en œuvre la production de NO, comme oxydant toxique pour le parasite. Des études récentes ont montré que l'arginase est, par conséquent, une enzyme importante pour la viabilité et le pouvoir infectieux du parasite, lequel tire bénéfice d'une augmentation de l'activité de cette enzyme, que ce soit la sienne ou celle de l'hôte [69,92]. En effet, cette enzyme est la première dans le cycle métabolique des polyamines, composés essentiels pour la prolifération des cellules, y compris la cellule de parasite. Les polyamines sont également les précurseurs de la production de trypanothione, un composé antioxydant produit par le parasite et impliqué dans la détoxification du NO généré par le système de défense de la cellule hôte parasitée [93]. Une augmentation de l'activité arginase au niveau des macrophages de l'hôte conduit en parallèle à une diminution de production du NO, réduisant encore d'avantage la capacité défensive de l'hôte, et accentuant ainsi le pouvoir infectieux du parasite. Ces données ont encouragé la recherche de nouveaux inhibiteurs de L-ARG visant à développer de nouveaux médicaments antiparasitaires. Cet axe de recherche s'est également orienté vers les composés naturels [13,94]. L'ensemble des résultats publiés dans la littérature sur les inhibiteurs, d'origine naturelle, de L-ARG sont résumés et présentés dans le **Tableau V**. Les structures des composés les plus intéressants sont données dans la **Figure 12**.

Tableau V: Inhibition de l'arginase recombinante de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* par des produits naturels.

Plante (partie)	Extrait	CI ₅₀	Effet sur l'activité de l'arginase (Concentration)	[Ref.]
<i>Cecropia pachystachya</i> (feuilles)	Extrait éthanolique Fraction acétate d'éthyle (AF) AF soluble dans MeOH AF insoluble dans MeOH Fraction n-Butanol Fraction Dichloromethane	<i>n.d.</i> 17 µg/mL 48 µg/mL 64 µg/mL 90 µg/mL 200 µg/mL	- 90% (10 µg/mL) ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	[68]
<i>Byrsonima coccolobifolia</i> (feuilles)	Extrait éthanolique Fraction acétate d'éthyle	<i>n.d.</i> <i>n.d.</i>	>-60% (31,25 µg/mL) - 64%	[95]
(tiges)	Extrait éthanolique Fraction acétate d'éthyle	<i>n.d.</i> <i>n.d.</i>	- 60% (31,25 µg/mL) - 65%	
Composés naturels				
Acide chlorogénique		<i>n.d.</i>	- 67% (20 µM)	[68]
Isovitexine		<i>n.d.</i> <i>n.d.</i>	- 14% (20 µM) < - 50% (125 µM)	[68] [94]
(+) -Catéchine (29)		<i>n.d.</i> 0,8 µM 1,7 µM	- 66% (20 µM) ↓ ↓	[68] [96] [95]
(-) -Épicatéchine (20)		<i>n.d.</i> 1,8 µM 1,6 µM	- 62% (20 µM) ↓ ↓	[68] [96] [95]
Isoquercitrine		<i>n.d.</i> 3,8 µM 2,0 µM	- 54% (20 µM) - 70-75% (125 µM) ↓	[68] [94] [95]
Quercétine		4,3 µM <i>n.d.</i> 4,0 µM	↓ - 83% (125 µM) ↓	[69] [94] [95]
Quercitrine		10 µM <i>n.d.</i> 12,2 µM.	↓ - 50-70% (125 µM) ↓	[69] [94] [95]
Orientine (30)		7 µg/mL 16 µM	↓ - 70-75% (125 µM)	[68] [94]
Kaempférol		~ 50 µM 55 µM	↓ ↓	[94] [95]
(-) -Épicatchine-3-gallate (31)		3,8 µM	↓	[96]
Acide gallique (32)		2,2 µM	↓	
Myricétine Myricétine 3-O-α-rhamnoside Catéchine 3-O-α-rhamnopyranoside Méamsétine Heptaméthoxyflacone Tamaraxétine 3-O-α-rhamnoside (+) -Syringarésinole (33) Trigonostémone (34)		2,1 µM 2,4 µM 35,1 µM 88,1 µM 127,9 µM 223,5 µM 13,7 µM 16,6 µM	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	[95]
Fiséline Isoorientine Lutéoline 7,8-Dihydroxyflavone Galangine		1,4 µM 9 µM 9 µM 12 µM ~ 100 µM	- 87% (125 µM) - 70-75% (125 µM) - 83% (125 µM) - 80% (125 µM) - 50-70% (125 µM)	[94]

Apigénine	<i>n.d.</i>	< - 50% (125 μ M)	
Vitexine	<i>n.d.</i>	< - 50% (125 μ M)	
Verbascoside (35)	<i>n.d.</i>	↓	[97]
Composés hémisynthétiques			
Quercétine peracétylée	120,8 μ M	↓	[95]
Catéchine monoacétylée	3,7 μ M	↓	
Catéchine triacétylée	0,9 μ M	↓	
Catéchine pentaacétylée	4,8 μ M	↓	

CI₅₀ : concentration inhibitrice médiane; *n.d.* : non déterminée; ↓ : diminution; ↑ : augmentation

Da Silva *et al.* ont évalué l'activité inhibitrice d'extraits de plante sur l'arginase recombinante de L-ARG. Ils ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Cecropia pachystachya*, une plante traditionnelle brésilienne, possédait une activité intéressante (90% d'inhibition à 10 μ g/mL). Le fractionnement bioguidé de cet extrait a conduit à l'identification de molécules actives de type polyphénolique présentant des inhibitions supérieures à 50% à 20 μ M : acide chlorogénique (**28**), (+)-catéchine (**29**), (-)-épicatéchine (**20**) ; le composé le plus actif étant le glucoside d'orientine (**30**) (CI₅₀ = 16 μ M) [68]. Par la suite, une série de 13 flavones et flavonols ont été testés pour évaluer leur capacité inhibitrice sur L-ARG et analyser les RSA. Parmi ces flavonoïdes, huit composés ont montré une activité inhibitrice significative avec des pourcentages d'inhibition s'échelonnant de 50% à 87% à 125 μ M, et des valeurs de CI₅₀ comprises entre 1,4 et 16 μ M [69,94] (**Tableau V**). Ces études ont révélé que l'absence de la fonction catéchol diminue fortement l'inhibition de L-ARG [94]. Des modélisations moléculaires de docking de ces molécules avec le site actif ont suggéré que le groupe catéchol peut interagir avec l'acide aminé Asp129 présent dans le cluster de Mn²⁺ du site actif de L-ARG [69]. Les études réalisées ont également mis en évidence que le groupe hydroxyle en position 3 contribue à l'activité inhibitrice tandis que celui en position 5 n'est pas nécessaire à cette activité [94] (**Figure 13A**). Pour étudier la capacité inhibitrice sur L-ARG des molécules de type flavanol, l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG, **31**), la (+)-catéchine (**29**), la (-)-épicatéchine (**20**) et l'acide gallique (**32**) ont été testé. Une série de faibles valeurs de CI₅₀ a été obtenue avec tous ces composés [96] (**Tableau V**). Par ailleurs, une récente étude de Maquiaveli et ses collègues [97] a révélé que le verbascoside (**35**)

(**Figure 12**), un glycoside de phényléthanoïde présent dans *Stachytarpheta cayennensis* (une plante médicinale brésilienne et péruvienne), possédait un effet intéressant sur *Leishmania amazonensis*. En effet, ce composé a montré une concentration efficace médiane (CE₅₀) égale à 19 µM contre des promastigotes de *L.(L.) amazonensis*. C'est un inhibiteur compétitif de L-ARG (K_i = 0,7 µM) [97].

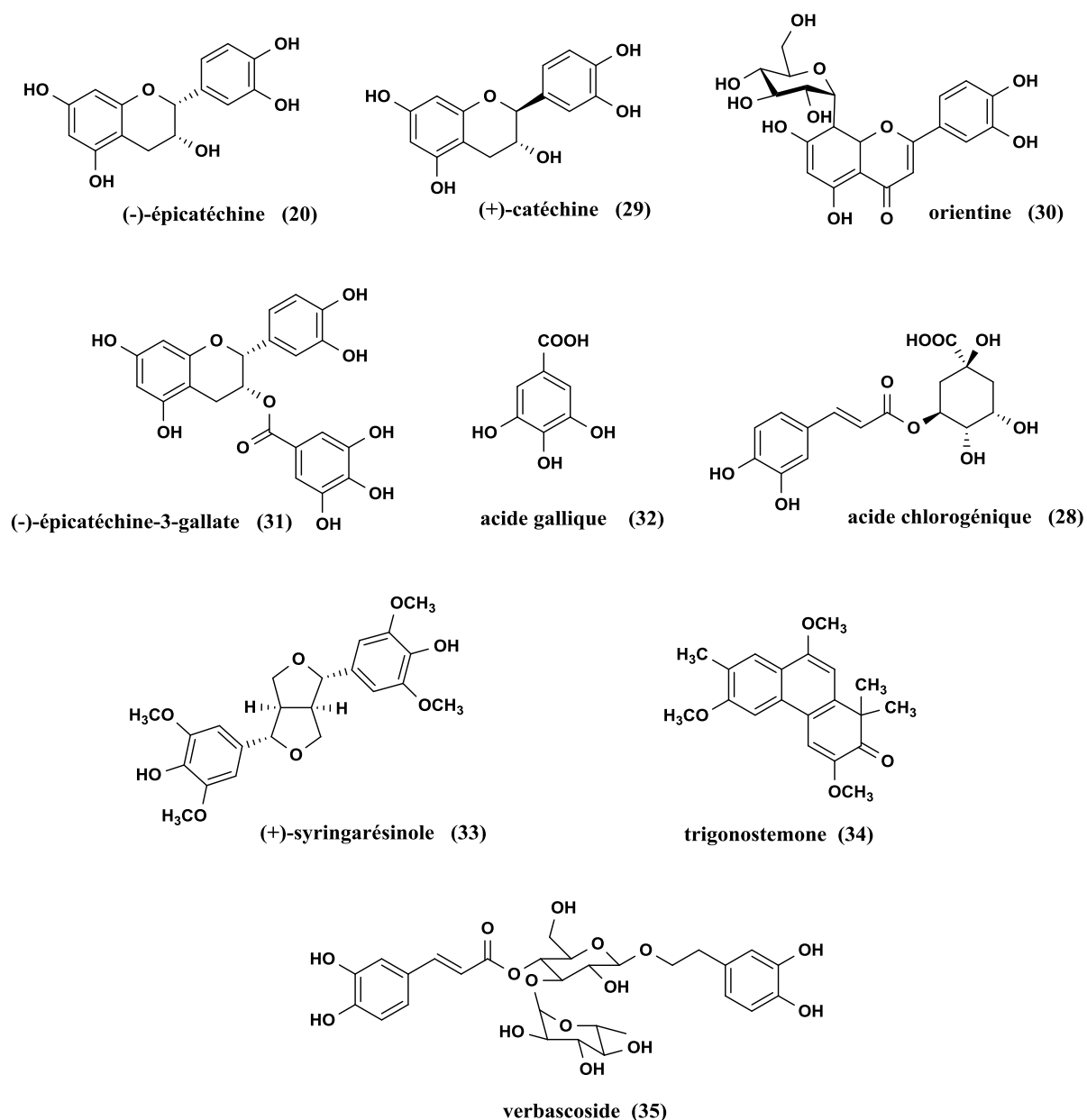


Figure 12 : Structures des inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase recombinante de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Dans une autre étude [95], les extraits bruts acétate d'éthyle de feuilles et de tiges de *Byrsonima coccolobifolia*, une plante du Cerrado brésilienne, ont montré une activité inhibitrice avec plus de 60% d'inhibition sur L-ARG à 31,25 µg/mL. Un fractionnement bioguidé de ces extraits a conduit à une série de substances actives : (+)-syringarésinole (**33**), trigonostémone (**34**) et plusieurs autres flavonoïdes connus (**Tableau V**, **Figure 12**). Pour établir des relations de structure-activité (RSA), les auteurs ont évalué, en plus, des flavonols et flavanols d'origine naturelle et hémisynthétique. Conformément aux données précédentes [94], ils ont conclu que l'augmentation du nombre d'hydroxyles sur le noyau B de flavonols, corrèle avec une augmentation de l'effet inhibiteur d'arginase. En outre, le remplacement d'un ou plusieurs groupes hydroxyle par des groupes d'acétate ou de méthoxyle a conduit à une diminution de l'activité. Cependant, dans le cas de flavan-3-ols, l'acétylation à des positions différentes n'a pas influencé l'activité inhibitrice (**Figure 13B**).

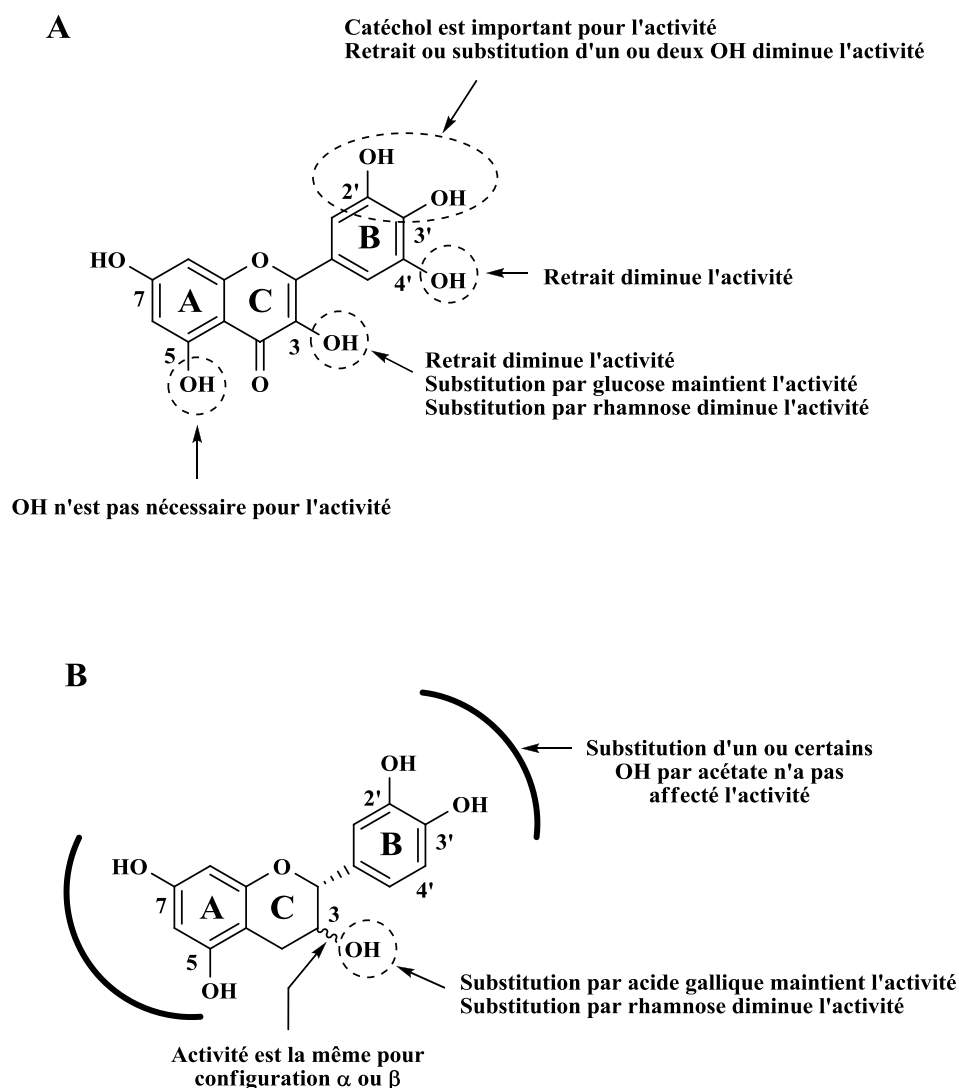


Figure 13 : Relations structure-activité (RSA) de flavonols et flavan-3-ols pour l'activité inhibitrice d'arginase de *Leishmania* [13,68,69,94]. Les RSA peuvent être résumées comme suit : **(A)** Flavonols : (i) les flavonols possédant un groupe catéchol ont montré une capacité inhibitrice sur l'arginase de *Leishmania* (des analyses de docking ont suggéré que le groupe catéchol interagit avec Asp129 concernant le complexe d'ion hydroxyde- Mn^{2+} , cofacteur dans le site actif d'arginase) ; (ii) l'augmentation du nombre des groupes hydroxyles sur le noyau B est associée à une augmentation d'activité inhibitrice d'arginase ; (iii) Le groupe hydroxyle en position 3 contribue significativement à l'activité inhibitrice, contrairement à celui en position 5 ; (iv) la substitution d'un ou plusieurs groupes hydroxyle par un groupe méthoxyle ou un acétate engendre une diminution de l'activité. **(B)** Flavan-3-ols : (i) les flavan-3-ols sont également des bons inhibiteurs de l'arginase *Leishmania* suggérant que la fonction cétone sur le noyau C n'est pas indispensable pour l'activité ; (ii) l'acétylation en diverses positions n'a pas affecté l'activité inhibitrice (contrairement au cas des flavonols).

Bien que les données accumulées dans la littérature sur l'inhibition d'arginase suggèrent que le développement d'inhibiteurs d'arginase est d'une grande pertinence thérapeutique dans diverses maladies, seuls quelques inhibiteurs efficaces d'origine synthétique sont actuellement commercialement disponibles. Malheureusement, la pharmacocinétique et la toxicité de ces inhibiteurs n'ont pas encore été entièrement évaluées, et il semble peu probable que ces molécules soient appropriées pour une application clinique [60].

Les données disponibles ont identifié des polyphénols naturels, dérivés de plantes médicinales, comme étant des composés intéressants pour identifier et développer de nouveaux inhibiteurs de l'arginase. Des travaux complémentaires seraient intéressants à mener afin d'explorer l'activité inhibitrice d'arginase d'autres classes de métabolites végétaux tels que des tanins, des alcaloïdes, des saponines ou autres terpénoïdes. Certaines études ont établi des relations structure-activité (RSA) concernant des flavonoïdes et leur activité sur L-ARG donnant des informations intéressantes, cependant il n'existe encore pas de telles évaluations sur l'arginase mammifère.

Chapitre III : Evaluation biologique de l'activité inhibitrice d'arginase

Un inhibiteur enzymatique est une molécule se liant à une enzyme et qui en diminue l'activité. L'inhibition des enzymes peut corriger un déséquilibre métabolique ou tuer un pathogène. De nos jours, un nombre important de substances actives de médicaments couramment utilisés sont des inhibiteurs d'enzymes, tels que des antiviraux pour le traitement du VIH, des anticancéreux ou encore des médicaments indiqués dans des maladies cardiovasculaires. Il existe plusieurs mécanismes différents d'inhibition enzymatique, caractérisés par des études de cinétique. Dans cette partie, nous allons rappeler brièvement la cinétique enzymatique, les différents types d'inhibiteurs, leurs mécanismes d'action et leurs effets sur la cinétique. Pour finir, nous présenterons certains modèles d'évaluation de l'activité inhibitrice d'arginase *in vitro* actuellement décrits.

III-1. Principes d'enzymologie et inhibitions enzymatiques

III-1.1. La cinétique enzymatique

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques cruciaux pour les réactions au sein des voies métaboliques des organismes vivants. Leurs propriétés sont évaluées par des études de cinétique enzymatique en examinant les vitesses des réactions catalysées par enzymes. Ces études proposent des informations indirectes sur la spécificité et le mécanisme catalytique des enzymes. En général, une réaction enzymatique peut être décrite par l'équation suivante :

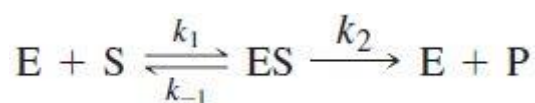


Figure 14 : Equation de la réaction catalysée par l'enzyme (E : enzyme, S : substrat, P : produit).

Les constantes de vitesse k_1 et k_{-1} dans la première étape correspondent respectivement aux vitesses d'association du substrat (S) avec l'enzyme (E), et de dissociation de S à partir de ES. La constante de vitesse de la deuxième étape k_2 correspond à la vitesse de formation du produit (P).

La cinétique enzymatique diffère de la cinétique chimique car les vitesses des réactions catalysées par enzymes dépendent de la concentration d'enzyme, et cette dernière n'est pas un produit, ni un substrat de la réaction. En plus, ces vitesses sont différentes parce que le substrat doit se fixer à l'enzyme avant d'être transformé en produit [98].

Typiquement, la cinétique d'une réaction catalysée par une enzyme consommant un substrat unique pour donner un produit est décrite par l'équation de Michaelis-Menten (**Figure 15**) [98–100].

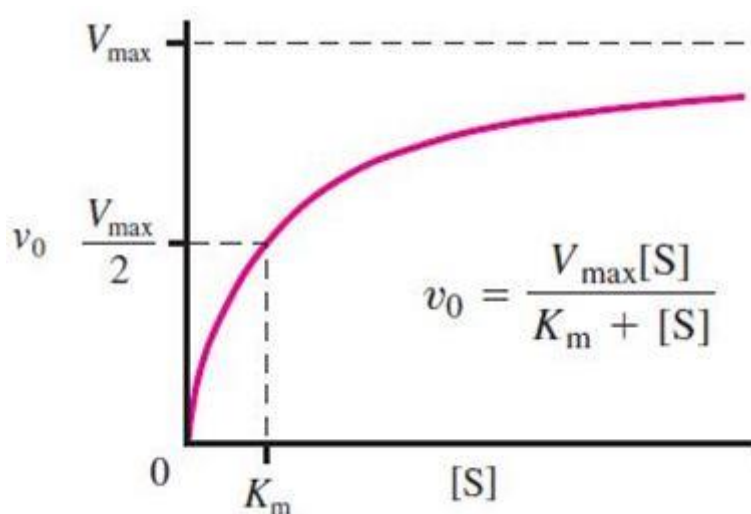


Figure 15 : Courbe hyperbolique de la vitesse initiale (v_0) en fonction de la concentration du substrat ($[S]$) dans une réaction enzymatique. La concentration de substrat correspondant à la vitesse maximale médiane ($V_{\max}/2$) est nommée constante de Michaelis (K_m), et l'enzyme est saturée à moitié quand $[S] = K_m$ [98].

Les paramètres les plus importants d'une réaction enzymatique pour étudier la spécificité et le mécanisme de réaction sont la constante de Michaelis (K_m), la vitesse

maximale de réaction ($V_{\max}$) et la constante catalytique (k_{cat}). K_m et $V_{\max}$ peuvent être déduites du graphe de Lineweaver-Burk, qui permet de déterminer la valeur de $1/K_m$ à partir de l'intersection avec l'axe x, et la valeur de $1/V_{\max}$ à partir l'intersection avec l'axe y (**Figure 16**). Pour k_{cat} , elle peut être calculée en utilisant l'équation : $k_{cat} = V_{\max}/[E]_{\text{totale}}$ [98].

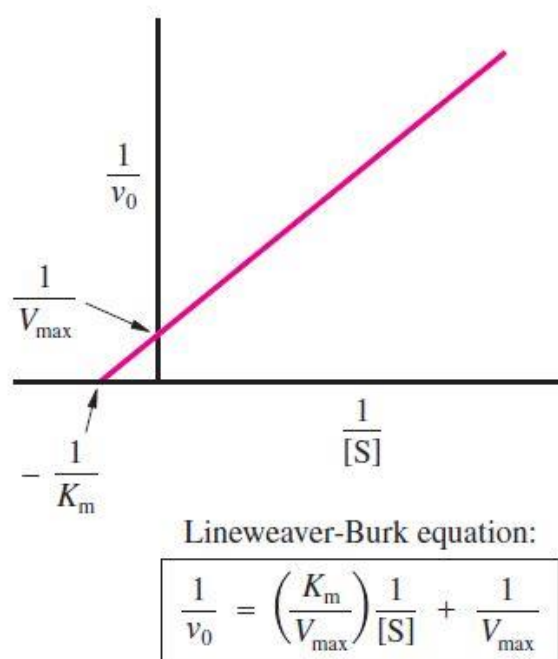


Figure 16 : Courbe de Lineweaver-Burk, issue de la transformation linéaire de l'équation de Michaelis-Menten.

Les valeurs de $1/v_0$ sont tracées en fonction des valeurs $1/[S]$ [98].

K_m est la constante de dissociation du complexe ES en E + S. Elle donne une idée de l'affinité de E pour S. Plus cette constante K_m est petite, plus le substrat sera étroitement lié à l'enzyme. Les valeurs de K_m sont aussi utilisées pour distinguer les différentes enzymes qui catalysent une même réaction [98].

III-1.2. Inhibition enzymatique

L'activité d'une enzyme (E) est diminuée ou perturbée en présence d'un inhibiteur (I). Les inhibiteurs sont souvent de petites molécules. Ces dernières peuvent empêcher la fixation du substrat (S) sur le site actif de l'enzyme cible en se fixant à sa place, ou en provoquant une déformation de l'enzyme qui rend celle-ci inactive. L'inhibition enzymatique est divisée en deux types : l'inhibition réversible et l'inhibition irréversible. Les inhibiteurs irréversibles se fixent de manière covalente à l'enzyme et modifient chimiquement des résidus aminoacides clés, nécessaires à l'activité enzymatique. En revanche, les inhibiteurs réversibles se lient de façon non covalente par le biais d'interactions faibles, faciles à enlever. Les inhibiteurs qui corrigent un déséquilibre enzymatique (comme l'arginase) sont souvent de type réversible. Et pour ce type d'inhibition, les inhibiteurs sont évalués *via* des études de cinétique enzymatique afin de déterminer leur spécificité (absence de liaison à d'autres protéines) et leur puissance : la constante d'inhibition (K_i), la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) et l'efficacité maximale (E_{max}). Une spécificité et une puissance importantes peuvent minimiser les effets secondaires éventuels d'un inhibiteur, et permettre d'éviter une toxicité importante en utilisation clinique.

III-1.2.1. Inhibition réversible

Les inhibiteurs réversibles se lient aux enzymes par des liaisons non covalentes telles que des liaisons hydrogène, des liaisons ioniques ou des interactions hydrophobes (interactions de type *van der Waals*). L'ensemble de ces liaisons de faible énergie entre la molécule et le site actif se combinent pour former une liaison forte et spécifique envers l'enzyme. Contrairement au substrat et aux inhibiteurs irréversibles, les inhibiteurs réversibles n'engendrent pas de réaction chimique lorsqu'ils s'associent à l'enzyme, et peuvent être facilement éliminés par dilution ou par dialyse [101]. Ce type d'inhibition peut être encore

divisé en quatre types que sont : les inhibitions réversibles-compétitives, -incompétitives, -non compétitives et -mixtes, qui peuvent être distinguées par leurs effets sur la cinétique enzymatique.

III-1.2.1.1. Inhibition compétitive

La plupart des inhibiteurs compétitifs ressemblent au substrat (S) de l'enzyme (E) d'un point de vue structural, et entrent en compétition avec ce dernier pour la fixation sur le même site de l'enzyme (souvent le site actif). Cette fixation empêche la réaction enzymatique, soit parce que l'inhibiteur ne possède pas le groupement chimique transformé par l'enzyme, soit parce que la position de l'inhibiteur bloque la fixation et interrompt la reconnaissance du substrat par l'enzyme (**Figure 17a**) [98,101]. Ce type d'inhibition est appelé inhibition compétitive classique.

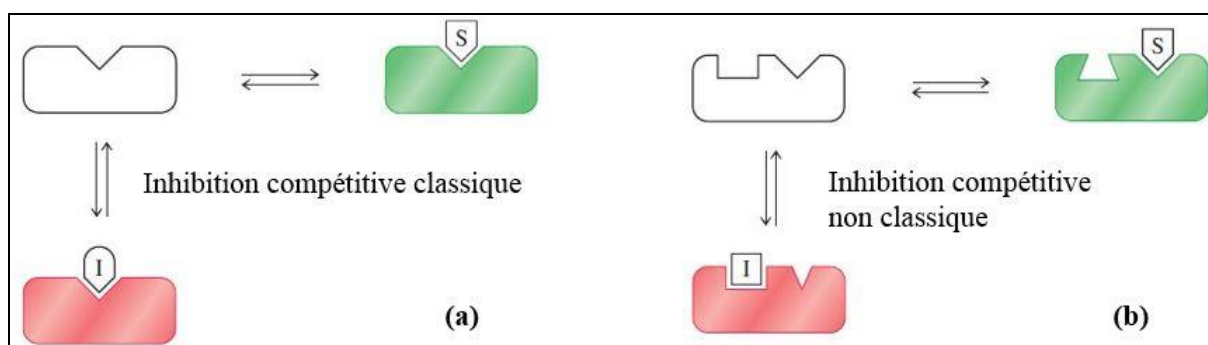


Figure 17 : Illustration d'une inhibition compétitive. (a) Inhibition compétitive classique : le substrat (S) et l'inhibiteur (I) entrent en compétition pour le site actif ; (b) Inhibition compétitive non classique : la fixation de (S) sur le site actif empêche la fixation de (I) sur un autre site de l'enzyme, et *vice versa* [98].

Dans certains cas, comme dans celui des enzymes allostériques, les inhibiteurs ne sont pas des analogues du substrat, et ne se fixent pas sur le site actif, mais sur un autre site de liaison de l'enzyme. Cette fixation entraîne ensuite une modification de la conformation du site actif, empêchant la reconnaissance du substrat par l'enzyme. Ce type d'inhibition est appelé inhibition compétitive non classique (**Figure 17b**) [98].

En revanche, la fixation du substrat sur l'enzyme empêche également celle de l'inhibiteur, c'est-à-dire que ces deux molécules s'excluent de façon mutuelle [101]. Quand (S) et (I) sont tous deux présents dans une solution, la proportion de l'enzyme qui peut former les complexes (ES) dépend de les concentrations de [S] et [I], et aussi leurs affinités relatives sur l'enzyme [98].

La formation du complexe EI peut être réduite en augmentant la concentration de S, et si cette dernière est suffisamment élevée, l'enzyme peut être saturée par le substrat. De ce fait, la vitesse maximale ($V_{\max}$) reste la même en présence ou en absence d'un inhibiteur. En revanche, plus la quantité d'inhibiteur compétitif est grande, plus la concentration de substrat doit être élevée pour atteindre une saturation à moitié. Nous avons vu précédemment que la concentration du substrat à mi-saturation est égale à K_m (**Figure 15**). Donc, l'augmentation de concentration d'un inhibiteur compétitif conduit à une augmentation de K_m , et cette nouvelle valeur est appelée K_m^{app} (**Figure 18**).

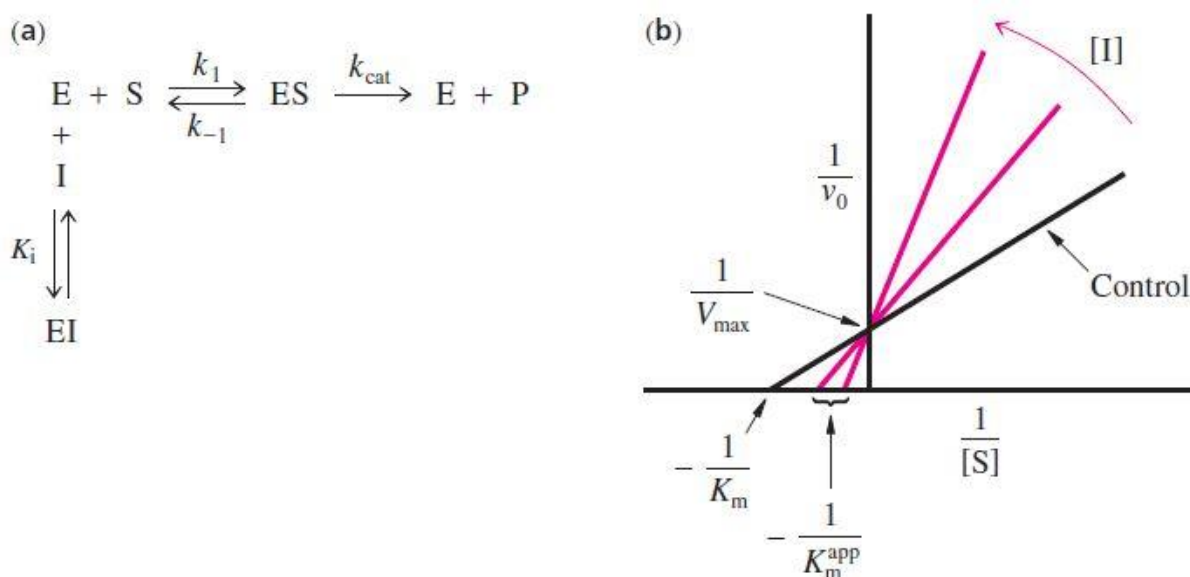


Figure 18 : Inhibition compétitive. (a) Schéma illustrant la formation du complexe EI. (b) Graphe de Lineweaver-Burk, dans le cas de l'inhibition compétitive, $V_{\max}$ reste inchangée, tandis que K_m diminue. La

courbe noire « Control » résulte de l'absence d'inhibiteur (I). Les courbes rouges illustrent les résultats en présence de (I), avec une flèche symbolisant l'augmentation de la concentration en inhibiteur [I] [98].

III-1.2.1.2. Inhibition incompétitive

En ce qui concerne l'inhibition incompétitive, l'inhibiteur (I) ne se fixe pas à l'enzyme libre (E) mais seulement à l'enzyme déjà liée à son substrat (ES), et empêche la réaction enzymatique. En fait, quand le substrat se fixe sur le site actif, une modification de la conformation de l'enzyme révèle un nouveau site de liaison sur lequel l'inhibiteur peut se fixer. Ensuite, l'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site de liaison du substrat, entraînant une interruption de la réaction enzymatique (**Figure 19**) [101].

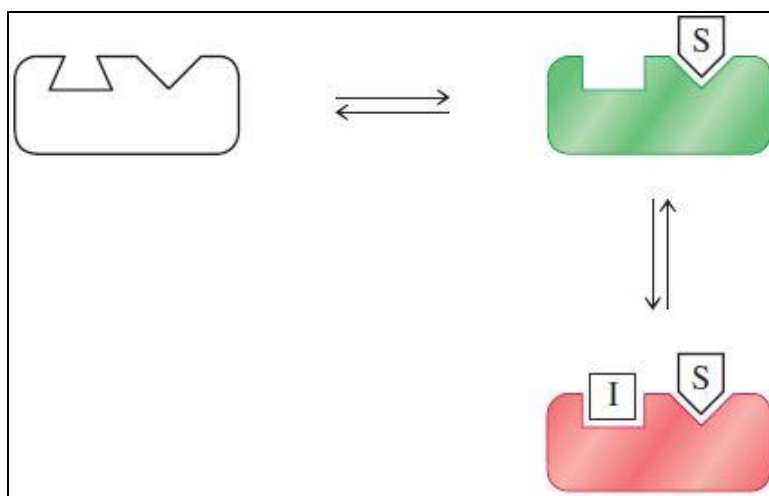


Figure 19 : Illustration d'une inhibition incompétitive : l'inhibiteur (I) se lie uniquement au complexe (ES) et inactive l'enzyme (E) [98].

Dans ce type d'inhibition, $V_{\max}$ est diminuée (et $1/V_{\max}$ augmentée) par la transformation de certaines molécules de (E) sous la forme inactive (ESI) (**Figure 20**). Quand le complexe (ES) se lie à (I), la diminution de $V_{\max}$ est irréversible même en ajoutant plus du substrat (S). L'inhibiteur incompétitif diminue également la valeur de K_m (**Figure 20b**), car en

phase d'équilibre pour la formation de (ES) et (ESI), les complexes ont une tendance à se décaler vers (ESI) [98].

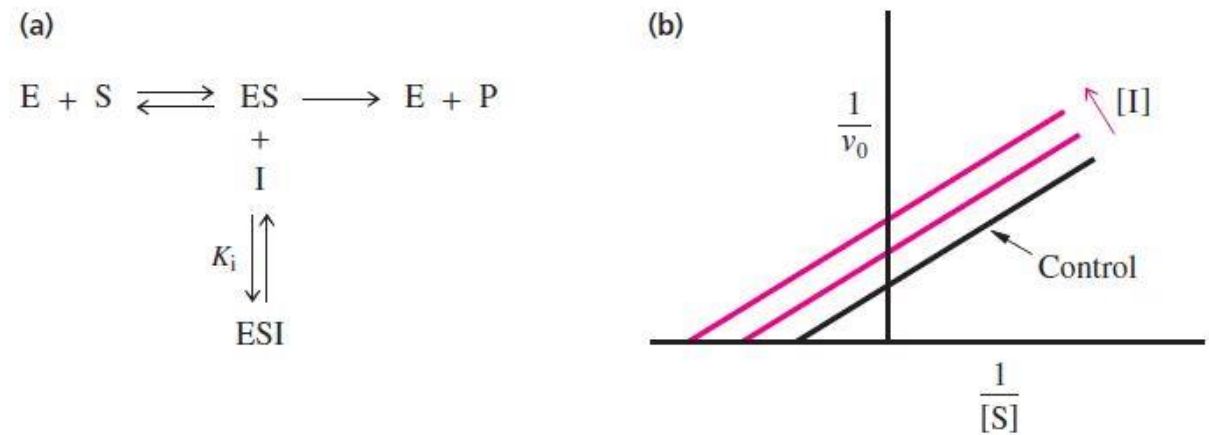


Figure 20 : Inhibition incompétitive. (a) Schéma illustrant la fixation de l'inhibiteur (I) au complexe (ES). (b) Graphe de Lineweaver-Burk, dans le cas de l'inhibition incompétitive, $V_{\max}$ et K_m sont diminuées ($1/V_{\max}$ et $1/K_m$ obtenues des intersections en y et x sont respectivement augmentées). En revanche, le rapport $K_m/V_{\max}$ (la pente des lignes) reste inchangée. La courbe noire « Control » résulte de l'absence de (I). Les lignes rouges illustrent les résultats en présence de (I), avec une flèche symbolisant l'augmentation de la concentration en inhibiteur [I] [98].

III-1.2.1.3. Inhibition non compétitive

Un inhibiteur non compétitif (I) peut se lier en parallèle et avec une même affinité sur l'enzyme libre (E) et sur l'enzyme fixée au substrat (ES) pour former les complexes inactifs (EI) ou (ESI), respectivement. En effet, (I) et (S) n'entrent pas en compétition pour se fixer sur le même site, c'est-à-dire que (S) se lie au site actif et (I) à un autre site de liaison. La fixation de (I) entraîne alors une modification de la conformation du site actif, ce qui empêche la réaction enzymatique mais n'influe pas sur la reconnaissance de (S) par (E) [98,101]. Ces inhibiteurs ne sont pas des analogues du substrat car ils ne se fixent pas sur le même site actif que (S) (**Figure 21**).

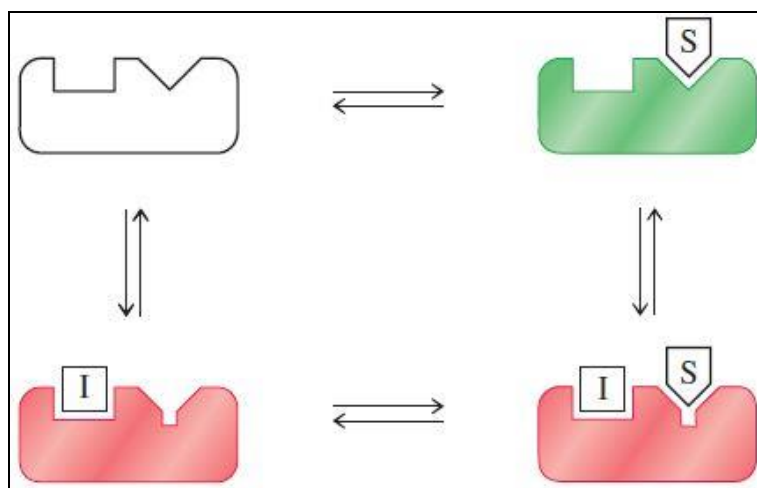


Figure 21 : Illustration d'une inhibition non compétitive : l'inhibiteur (I) peut se lier soit sur (E) soit sur (ES), inactivant ainsi l'enzyme (E) [98].

La fixation d'un inhibiteur non compétitif diminue la vitesse maximale ($V_{\max}$) de la réaction, mais ne modifie pas l'affinité de l'enzyme (K_m) pour son substrat, car ce dernier se lie aussi bien à l'enzyme libre (E) qu'au complexe enzyme-inhibiteur (EI) (**Figure 22**) [98,101].

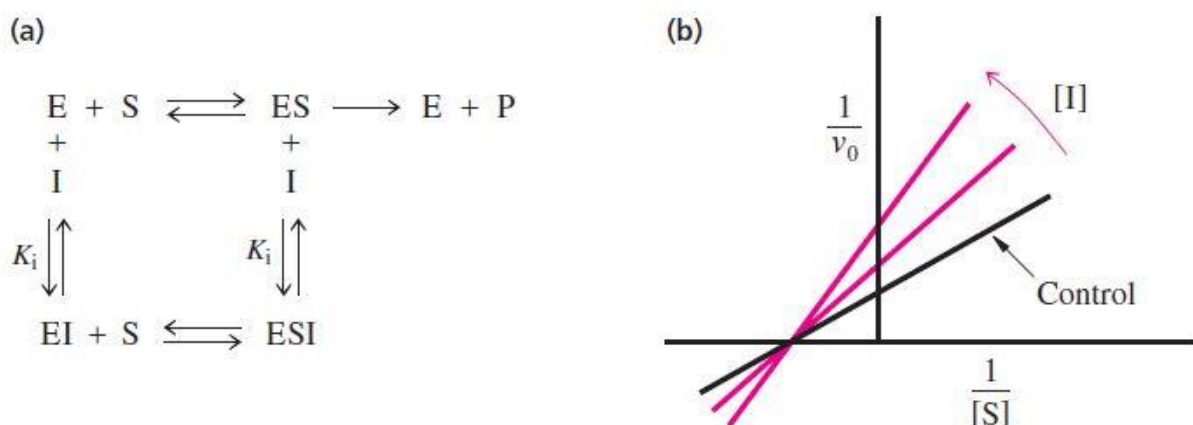


Figure 22 : Inhibition non compétitive. (a) Schéma illustrant la fixation de l'inhibiteur (I) sur E ou ES. (b) Graphe de Lineweaver-Burk, dans le cas de l'inhibition non compétitive, $V_{\max}$ est diminuée, en revanche K_m reste inchangée. La courbe noire « Control » résulte de l'absence de l'inhibiteur (I). Les courbes rouges illustrent les résultats en présence de (I), avec une flèche symbolisant l'augmentation de la concentration en inhibiteur [I] [98].

III-1.2.1.4. Inhibition mixte

La plupart des enzymes ne se conforment pas au type d'inhibition non compétitive « classique » précédemment présentée, dans lequel K_m est inchangée, mais plutôt au type d'inhibition mixte dans lequel E_{max} et K_m sont affectées car l'affinité de (I) pour (E) est différente de celle pour (ES) [98]. En effet, l'inhibition mixte est une combinaison des inhibitions décrites précédemment pour lesquelles (I) peut se lier à la fois avec (E) (K_i) et avec (ES) (K_I), mais avec des affinités différentes : $K_i \neq K_I$. Il y a deux types d'inhibitions mixtes : L'inhibition non compétitive-compétitive ($K_i < K_I$) et l'inhibition non compétitive-incompétitive ($K_i > K_I$) (**Figure 23**) [101].

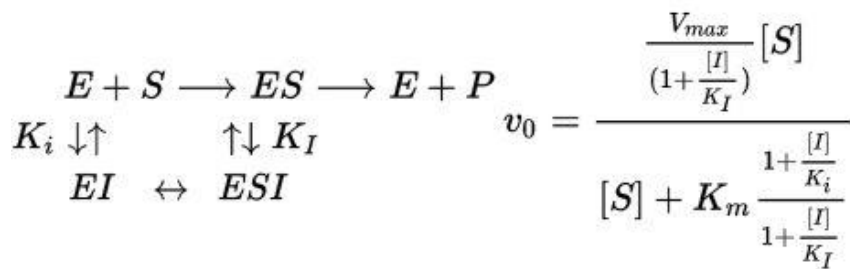


Figure 23 : Schéma et équation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition mixte : le substrat (S) et l'inhibiteur (I) se fixent parallèlement sur des sites de liaison différents [101].

En résumé, les inhibitions compétitive, incompetitive et non compétitive sont des cas particuliers de l'inhibition mixte. Le récapitulatif de ces types d'inhibition est présenté dans le **Tableau VI** [101].

Tableau VI: Récapitulatif des différents types d'inhibition réversible

	Type d'inhibition	K_m apparent	V_{max} apparente
$K_I = \infty$	compétitive	$K_m (1 + [I]/K_i)$	V_{max}
$K_i = \infty$	incompétitive	$K_m (1 + [I]/K_I)$	$V_{max}/(1 + [I]/K_I)$
$K_i = K_I$	non compétitive	K_m	$V_{max}/(1 + [I]/K_i)$
$K_i \neq K_I$	mixte	$K_m (1 + [I]/K_i)/(1 + [I]/K_I)$	$V_{max}/(1 + [I]/K_I)$

III-1.2.2. Inhibition irréversible

L'inhibition irréversible est un mécanisme où l'inhibiteur se fixe de façon stable à l'enzyme, et ensuite supprime de façon permanente l'activité de l'enzyme. Cette inhibition résulte de la formation des liaisons stables, covalentes, entre l'inhibiteur et l'enzyme. Typiquement, un inhibiteur irréversible peut provoquer l'alkylation ou l'acylation d'un résidu de la chaîne latérale du site actif, et entame le processus de modification de ce dernier empêchant ainsi la réaction enzymatique [98]. L'inhibiteur peut se lier sur le site actif de l'enzyme ou ailleurs. Les molécules présentant ce type d'inhibition sont souvent utilisées comme poisons : par exemple des organophosphates utilisés comme insecticides, herbicides et gaz neurotoxiques, qui fonctionnent en inhibant de façon irréversible l'enzyme acétylcholinestérase [98]. Quelques substances actives de médicament possèdent ce type d'inhibition comme l'aspirine qui provoque une acylation irréversible de résidus de sérine du site actif des enzymes cyclooxygénases (COX), empêchant la synthèse de prostaglandines et de thromboxanes. Un autre exemple est la pénicilline qui se fixe de façon thermodynamiquement très stable au site actif de l'enzyme transpeptidase, empêchant la synthèse du peptidoglycane, un composant important de la paroi des bactéries [101]. Ces inhibiteurs sont également parfois appelés inhibiteurs-suicides.

III-1.3. Etudes de la cinétique enzymatique et de la potentialité inhibitrice des inhibiteurs réversibles

Dans le domaine de recherche de nouveaux inhibiteurs d'enzyme, il est souvent nécessaire d'évaluer quantitativement la potentialité inhibitrice ainsi que les comportements cinétiques des composés étudiés sur l'enzyme d'intérêt. Pour connaître le mécanisme d'inhibition et comparer l'effet des inhibiteurs réversibles, la constante d'inhibition (K_i) et la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) sont souvent étudiées. Cette session est dédiée à présenter les méthodes souvent utilisées afin de déterminer le type d'inhibition et la constante K_i ainsi que la CI_{50} d'un inhibiteur réversible.

III-1.3.1. Détermination du type d'inhibition et de K_i

Plusieurs méthodes graphiques décrites dans la littérature sont utilisées pour déterminer le type d'inhibition et la K_i des inhibiteurs réversibles. Tout d'abord, en 1934, Hans Lineweaver et Dean Burk ont décrit la cinétique enzymatique en utilisant une équation baptisée en leur honneur équation de Lineweaver-Burk [102], dérivée de l'équation de Michaelis-Menten (**Figure 16**). En utilisant cette méthode, on peut déterminer V_{max} et K_m [103], et aussi distinguer les différents types d'inhibition (**Figure 24**) [103,104].

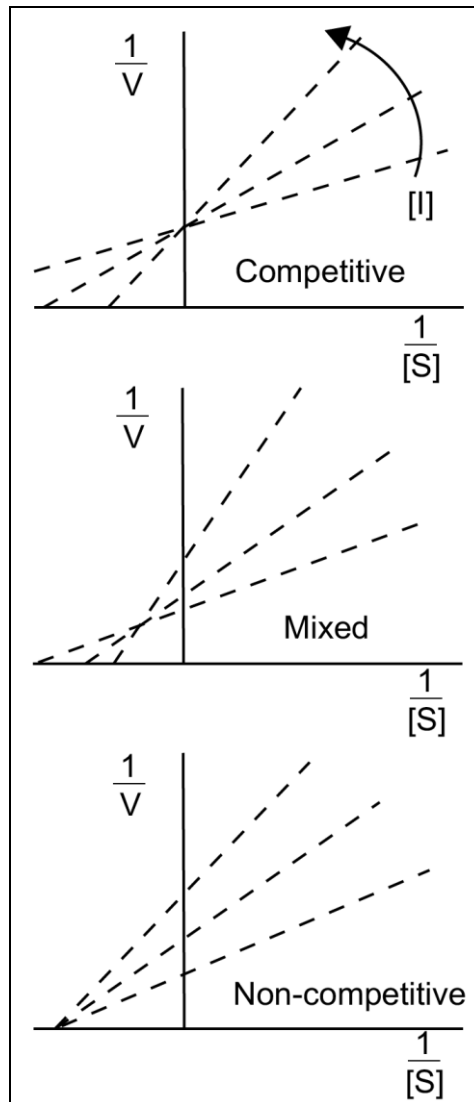


Figure 24 : Courbes de Lineweaver-Burk obtenues avec différentes concentrations en inhibiteur $[I]$ en fonction des différents types d'inhibition. La flèche indique l'augmentation de $[I]$ [104].

En complétant la courbe de Lineweaver-Burk, Malcom Dixon a proposé en 1952 une méthode graphique simple afin de déterminer K_i . En fait, en traçant $1/v$ en fonction de $[I]$ et en utilisant au moins deux concentrations du substrat, Dixon a pu déterminer K_i dans les cas d'une inhibition compétitive et non compétitive (**Figure 25**) [105].

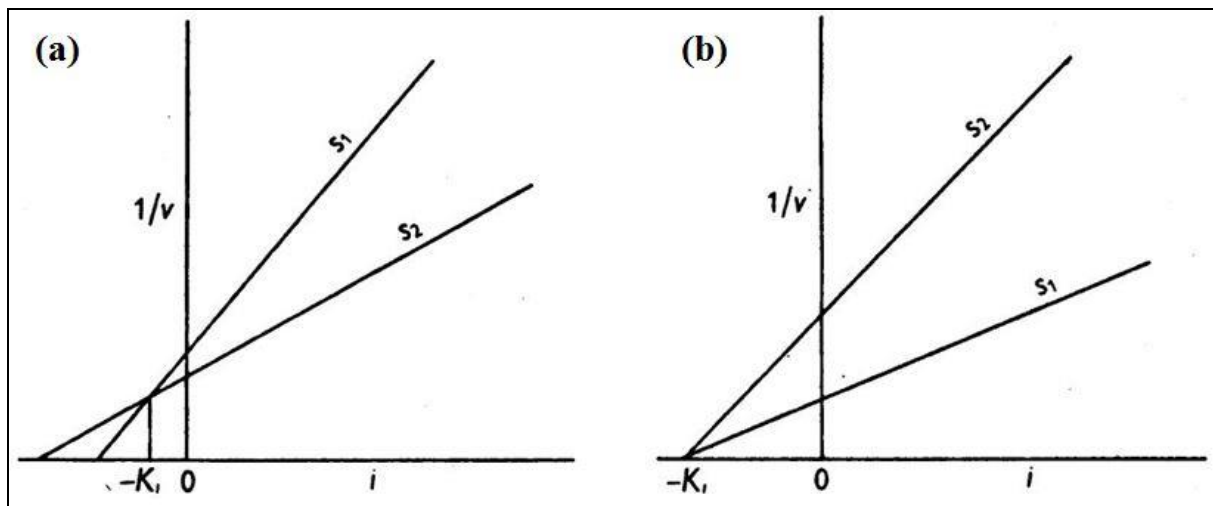


Figure 25 : Méthode graphique de Dixon pour déterminer la constante K_i : (a) inhibition compétitive, (b) inhibition non compétitive [105].

La méthode de Dixon est néanmoins limitée par le fait qu'elle ne permet pas de distinguer sans ambiguïté les inhibiteurs compétitifs des inhibiteurs mixtes [106,107]. Et, pour les inhibiteurs mixtes ou incompétitifs, elle ne fournit aucune mesure de la constante de dissociation du complexe (ESI) (K'_i). Pour résoudre cette problématique, Athel Cornish-Bowden a proposé une courbe complémentaire de celle de Dixon, traçant $[S]/v$ en fonction de $[I]$ (**Figure 26**) [108]. Dans tous les cas, le point d'intersection des courbes de Dixon permet de déduire K_i , tandis que le point d'intersection des courbes de Cornish-Bowden fournit une mesure de K'_i . Donc, l'utilisation concomitante de ces deux méthodes permet de déterminer l'ensemble des constantes d'inhibition.

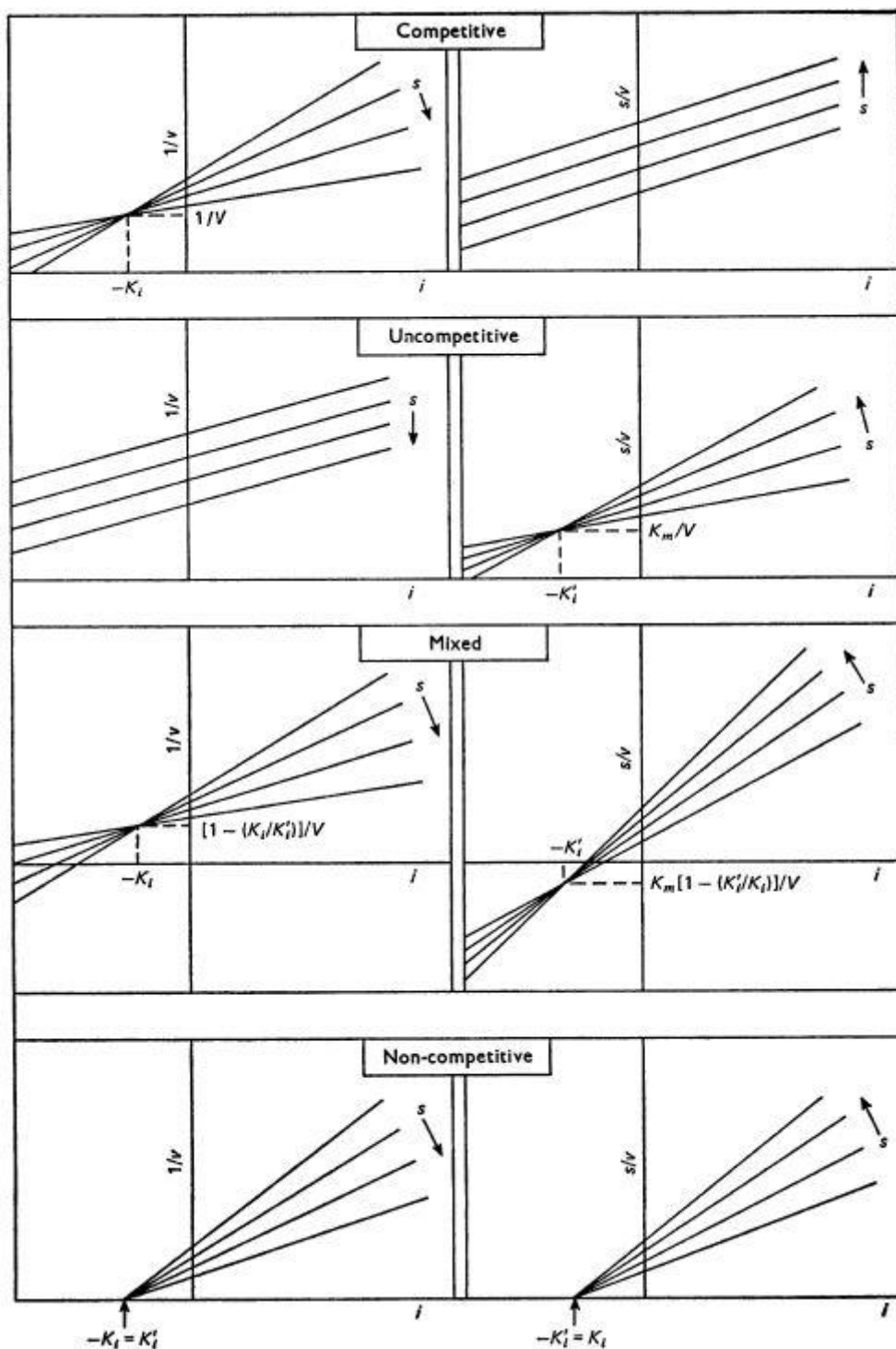


Figure 26 : Courbes caractéristiques de différents types d'inhibition : courbes de Dixon à gauche et de Cornish-Bowden à droite [108].

Récemment, une nouvelle méthode graphique de détermination directe des différents types d'inhibition et des constantes d'inhibition associées, a été présentée par Masataka Yoshino et Keiko Murakami [109]. Cette méthode appelée par les auteurs « le graphe de vitesse quotientée » consiste à tracer les données expérimentales $(V-v)/v$ en fonction de la concentration d'inhibiteur au moins à deux concentrations du substrat. V et v représentent les vitesses maximales en absence ou en présence d'un inhibiteur, respectivement, et à des concentrations déterminées de substrat (**Figure 27**) [109].

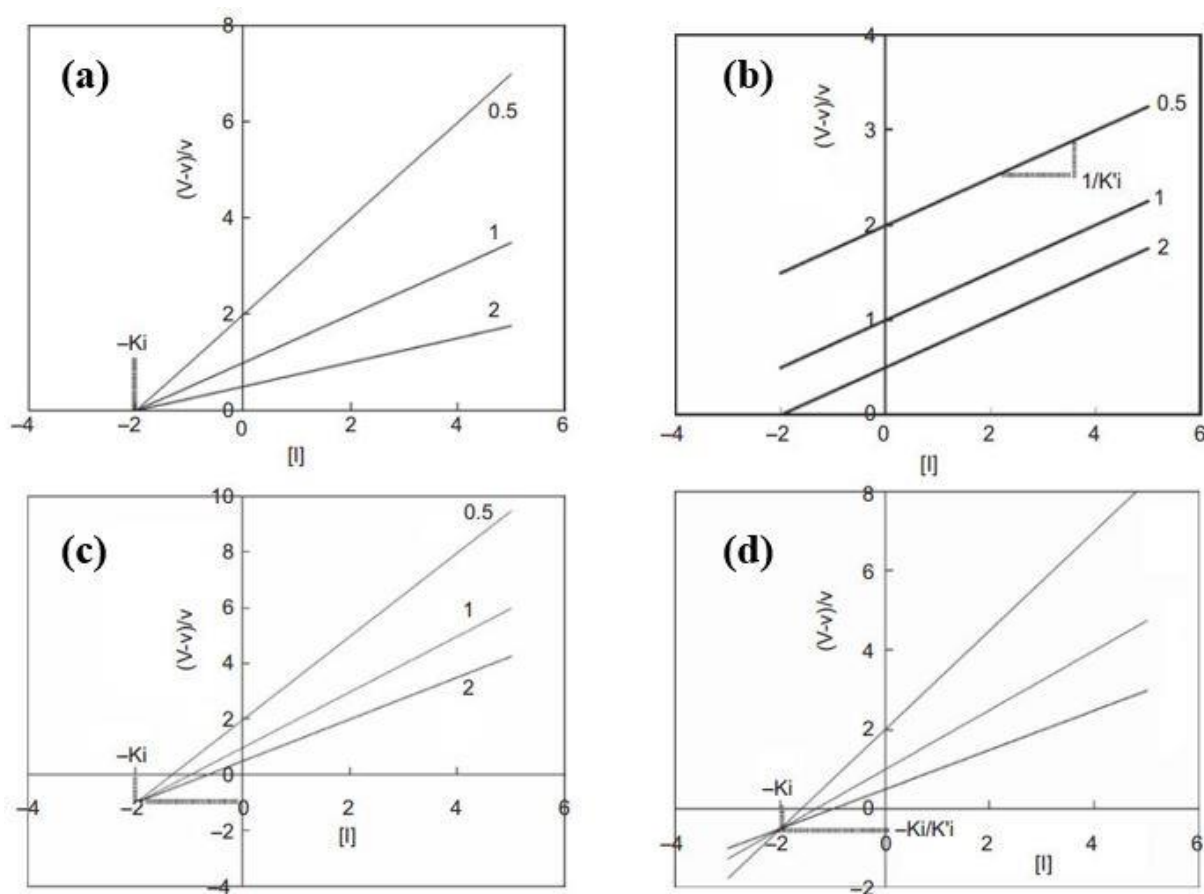


Figure 27 : Graphe de vitesse quotientée pour les différents types d'inhibition : (a) compétitive, (b) incompétitive, (c) non compétitive, (d) mixte. La concentration du substrat est indiquée pour chaque ligne [109].

Bien qu'elle requière la valeur de V pour les calculs, cette méthode permet de directement déterminer de différents types d'inhibitions ainsi que des paramètres de chacun. Pourtant, comme les autres méthodes de transformations linaires de Dixon ou de Cornish-Bowden, cette méthode ne peut pas être utilisée pour les études cinétiques sur des enzymes non conformes aux cinétiques de type Michaelis-Menten, pour lesquelles des méthodes d'analyse non-linaires informatiques sont nécessaires [109].

III-1.3.2. La concentration inhibitrice médiane (CI_{50})

La concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) est une mesure quantitative de l'efficacité d'un composé à inhiber une fonction biologique ou biochimique spécifique, comme l'activité enzymatique par exemple. Dans la stratégie de recherche de nouveaux inhibiteurs enzymatiques, la CI_{50} déterminée par une évaluation biologique *in vitro* est souvent utilisée pour analyser la potentialité et la sélectivité des composés étudiés vis-à-vis d'enzymes d'intérêt. Les valeurs de CI_{50} sont donc importantes pour l'analyse des relations de structure-activité (RSA), pour identifier des composés « chef de file », et pour procéder à une pharmacomodulation dans le but de développer un nouveau candidat médicament.

La CI_{50} d'un inhibiteur est déterminée en examinant l'effet des différentes concentrations en inhibiteur sur l'activité de l'enzyme, et en construisant ensuite une courbe sigmoïde de concentration-réponse (**Figure 28**) réalisée par un logiciel particulier comme Prism GraphPad. La CI_{50} précise la concentration nécessaire pour qu'un composé puisse inhiber la moitié de l'effet biologique maximal de l'enzyme d'intérêt [110].

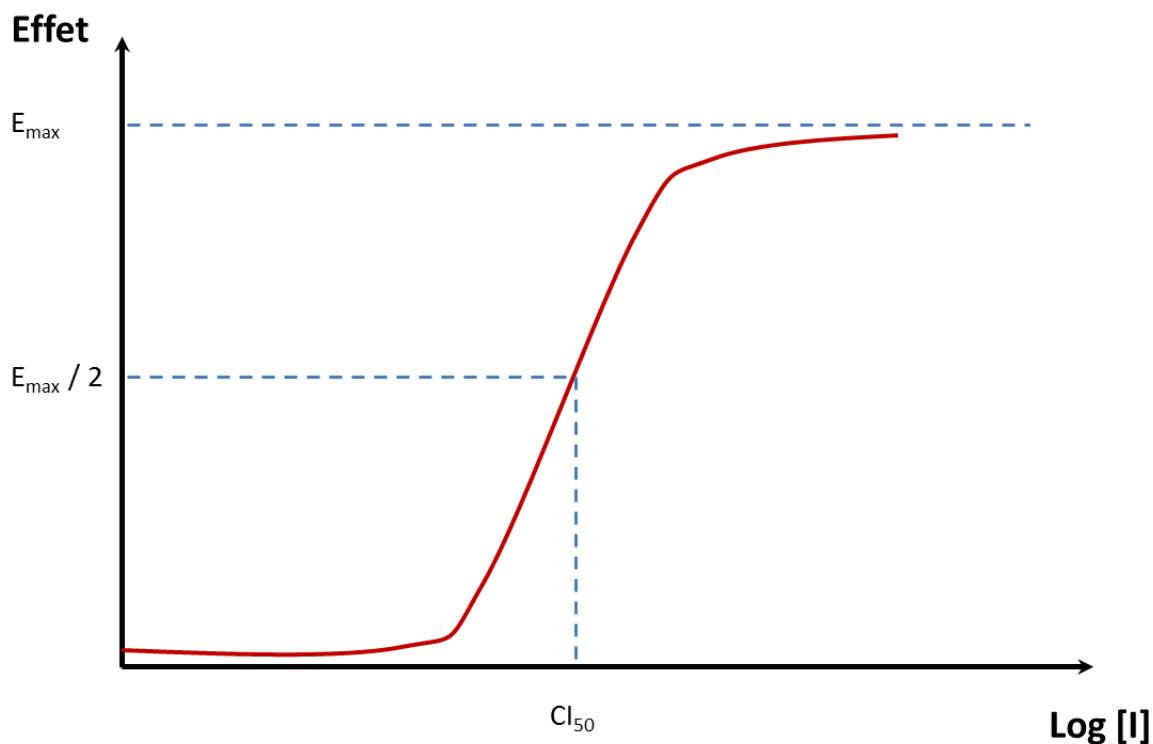


Figure 28 : Représentation graphique de la détermination de CI_{50} et E_{max}

Les valeurs de CI_{50} sont très souvent utilisées mais elles sont très dépendantes des conditions de la réaction enzymatique. En général, la CI_{50} augmente avec la concentration de l'enzyme. De plus, selon le type d'inhibition, d'autres facteurs peuvent influencer la valeur de CI_{50} tels que la concentration du substrat, le pH, la température ou encore la force ionique [98]. Ce sont les raisons pour lesquelles il est important d'évaluer les composés étudiés dans des mêmes conditions et d'utiliser un inhibiteur de référence pour que les CI_{50} obtenues soient comparables [13].

La CI_{50} n'est pas un indicateur direct de l'affinité entre l'inhibiteur et l'enzyme, contrairement à la constante K_i . Ces deux paramètres peuvent être mis en relation par l'équation de Cheng-Prusoff : $K_i = [CI_{50}/(1 + [S]/K_m)]$ [111,112].

III-2. Evaluations *in vitro* de l'activité inhibitrice d'arginase

III-2.1. Introduction

Depuis la découverte de l'enzyme aginase et de son rôle crucial dans la détoxification des déchets azotés et dans la production des polyamines, de nombreux tests biologiques *in vitro* ont été développés afin de déterminer l'activité de cette enzyme. Dans ces méthodes d'évaluation, l'activité d'arginase peut être évaluée en mesurant (i) une diminution de la concentration de la L-arginine, (ii) une augmentation de la concentration de la L-ornithine, ou alors (iii) une augmentation de la concentration d'urée [113].

III-2.2. Méthodes d'évaluation *in vitro*

Dans les études rapportées dans la littérature, les modèles d'évaluation utilisés sont relativement variés, si bien que les résultats expérimentaux sont difficilement comparables entre eux. Par ailleurs, étant donné l'intérêt thérapeutique d'une inhibition de l'arginase, il paraît indispensable de développer un protocole d'évaluation biologique approprié pour pouvoir évaluer rapidement l'activité inhibitrice de composés d'intérêt, et comparer les résultats. Cette application est très importante pour la recherche de nouveaux inhibiteurs d'arginase et pour le développement de nouveaux médicaments reposant sur une inhibition de l'arginase. Les essais *in vitro* décrits ont été réalisés par spectrophotométrie, radiométrie, ou fluorimétrie, en utilisant des lysats ou homogénats tissulaires d'animaux (rat, souris), de l'arginase purifiée ou encore de l'arginase recombinante comme des sources d'arginases. Les principaux protocoles d'évaluation *in vitro* de l'activité d'arginase trouvés dans la littérature sont résumés et présentés dans le **Tableau VII**.

Tableau VII : Tests enzymatiques *in vitro* décrits dans la littérature pour évaluer l'activité de l'arginase

Source d'arginase	Produit détecté	Méthode de mesure (révélateur chimique)	Inhibiteur de référence	[Réf.]
Arginase dans lysats/homogénats tissulaires				
Homogénats de tissus de rat (foie, rein, glandemammaire)	Urée	Spectrophotométrie (α -isonitrosopropiophénone)	non	[114–116]
Homogénat de foie de rat	Urée- $^{14}\text{C}/^{14}\text{CO}_2$	Radiométrie	non	[117–119]
Homogénat de foie de rat	Urée	Spectrophotométrie (thiosemicarbazide/Diacetylmonoxi me)	non	[113]
Homogénat de foie, fibroblaste	Ornithine	Spectrophotométrie (ninhydrine)	non	[120]
Homogénat de foie de rat et de boeuf	Arginine, ornithine, urée	Différence d'absorption entre les produits et le substrat à 205.7 nm	non	[121]
Sang humain séché sur papier filtre	Urée	Fluorimétrie	non	[122]
Sang humain séché sur papier filtre	Ornithine	Spectrophotométrie (ninhydrine)	non	[123]
Lysat de macrophagee de rat	Urée	Spectrophotométrie (α -isonitrosopropiophénone)	non	[124]
Lysat de macrophagee de rat, sérum de veau foetal	Urée- ^{14}C	Radiométrie	non	[125]
Homogénat de tissu porcin (myomètre, rein)	Urée- ^{14}C	Radiométrie	non	[126]
Homogénat de tissu caverneux humain	Urée- ^{14}C	Radiométrie	ABH	[51]
Hémolysat d'érythrocytes humains	Ornithine	Spectrophotométrie (ninhydrine)	non	[127]
Lysat de cellules HUVEC	Urée	Spectrophotométrie (α -isonitrosopropiophénone)	non	[66]
Homogénats de tissus de rat (foie, rein, pancréas, poumon)	Urée	Spectrophotométrie (thiosemicarbazide/Diacetylmonoxi me)	non	[128]
Arginase native purifiée				
Arginase bovine purifiée de foie	Urée	Spectrophotométrie (α -isonitrosopropiophénone)	non	[129]
Arginase purifiée d'homogénat de foie et d'érythrocytes humains	Urée	Spectrophotométrie (α -isonitrosopropiophénone)	non	[130]
Arginase bovine purifiée de foie	Urée	Spectrophotométrie (p-diméthylaminobenzaldéhyde)	non	[131]
Arginase purifiée de foie de rat	Ornithine/NADH	Spectrophotométrie	non	[132]
Arginase purifiée de foie de rat	Urée	Spectrophotométrie (α -isonitrosopropiophénone)	non	[133]
Arginase purifiée de foie et de rein de rat	Urée	Spectrophotométrie (p-diméthylaminobenzaldéhyde)	non	[134]
Arginase purifiée de foie de rat	Urée/Indophénol	Spectrophotométrie (phénol)	non	[135]
Arginase purifiée de foie ovin	Arginine	Spectrophotométrie (p-nitrophényl glyoxal)	non	[136]

Arginase purifiée de foie de rat	Urée- ¹⁴ C	Radiométrie	NOHA	[38]
Arginase bovine purifiée de foie	Urée	Spectrophotométrie (diacétyl monoxime)	non	[137]
Arginase bovine purifiée de foie	Ornithine	Spectrophotométrie (ninhydrine)	non	[127]
Arginase recombinante				
Arginase recombinante de foie humain	Urée/NADPH	Spectrophotométrie (NADPH)	non	[138]
Arginase recombinante humaine de type II	Urée- ¹⁴ C	Radiométrie	non	[139]
Arginase recombinante humaine de type I	Urée- ¹⁴ C	Radiométrie	ABH & BEC	[15]
Arginases recombinantes humaines de type I & II	Urée	Spectrophotométrie (o-phthaldialdéhyde)	ABH	[24]
Arginase recombinante humaine de type I	Urée	Fluorimétrie	non	[140]

Une méthode simple souvent utilisée pour déduire l'activité enzymatique est de mesurer la quantité du produit issu de la réaction enzymatique catalysée par l'enzyme. Dans les années 1940, Van Slyke et Archibald, furent les pionniers pour le développement de méthodes d'évaluation de l'activité arginase [114]. En appliquant la méthode colorimétrique de détermination d'urée dans le sang et l'urine précédemment étudiée par Archibald [141], ces auteurs ont mis au point une première méthode photométrique afin d'évaluer l'activité arginase. En fait, l'urée issue de la transformation de la L-arginine par l'arginase a été mesurée grâce à la couleur rouge formée suite à la réaction entre l'urée et l' α -isonitrosopropiophénone (ISPF) [114]. Dans cette méthode spectrophotométrique, la quantité d'urée est proportionnelle à l'activité de l'arginase. Les avantages de cette méthode sont que (i) le révélateur est peu volatile ; (ii) la couleur rouge formée est facile à détecter ; et (iii) l'ISPF est plus spécifique pour l'urée que la citrulline et les autres dérivé d'urée, par rapport à d'autres réactifs comme la diacétylmonoxime. Quelques inconvénients peuvent cependant être relevés : (i) la couleur formée est photolabile, il est donc nécessaire de garder le milieu réactionnel dans l'obscurité pendant et après l'incubation à 100°C jusqu'à la lecture ; et (ii) le temps de réaction entre l'urée et l'ISPF est un peu long (1h) [141]. En outre, les auteurs ont

développé en parallèle une méthode gazométrique pour mesurer le CO₂ libéré, issu de l'hydrolyse de l'urée par l'uréase [114].

En appliquant la méthode spectrophotométrique de Van Slyke et Archibald, l'activité de l'arginase dans plusieurs homogénats ou lysats d'organes animaux a été évaluée. Eugene Roberts a déterminé l'activité arginase présente dans les homogénats tissulaires de foie, de rein et d'épiderme de souris Swiss [115]. Cette étude a bien montré que l'incubation de l'arginase avec des ions Mn²⁺ à 50°C a clairement activé l'enzyme. Dans une autre étude menée sur les homogénats de foie et de glande mammaire de rat, Folley et Greenbaum [116] ont adapté le protocole de Van Slyke et Archibald avec une température plus élevée (37°C) et une concentration du substrat L-arginine plus basse (0,227 M). Les auteurs ont montré que Mn²⁺ était plus efficace que Co²⁺ comme activateur d'arginase, et que l'enzyme n'est peut-être pas toujours dans un état totalement activé *in vivo*. Ils ont aussi montré que le pH optimal pour l'activité de l'arginase était de 9,45 [116].

S'appuyant sur la méthode de Van Slyke et Archibald, Corraliza *et al.* [124] ont optimisé le protocole de Schimke [119] afin d'évaluer l'activité de l'arginase dans un lysat de macrophages de rat. En fait, le protocole a été modifié par réduction du volume d'ISPF (9%), réduction de la taille de l'échantillon (~25000 macrophages) et par augmentation importante de la gamme d'urée (détection jusqu'à 0,02-0,05 µmol). Selon les auteurs, ce protocole était considérablement plus sensible que ceux précédemment décrits [124]. Cette méthode a ensuite été appliquée dans certaines études pour évaluer l'effet de composés d'intérêt sur l'arginase [66,142].

La méthode de Van Slyke et Archibald a également été utilisée avec quelques modifications pour évaluer l'activité de l'arginase bovine purifiée de foie [129], l'arginase de foie et d'érythrocytes humains [130], et celle de foie de rat [133].

Par ailleurs, il existe d'autres méthodes spectrophotométriques pour évaluer l'activité de l'arginase. Ces méthodes diffèrent l'une de l'autre par les révélateurs chimiques utilisés. Par exemple, en chauffant le mélange de la réaction enzymatique avec le diacétylmonoximéthiosemicarbazide, à 100°C, pendant environ 10-20 min, la densité optique après réaction entre l'urée et le révélateur est mesurée pour déterminer la quantité d'urée, ce qui est proportionnel à l'activité d'arginase [113,128]. L'urée produite peut aussi être quantifiée par mesure spectrophotométrique après réaction avec d'autres révélateurs tels que le réactif d'Ehrlich (*p*-diméthylaminobenzaldéhyde) [131,134], l'*o*-phthaldialdéhyde (OPA) [24] ou le diacétyl monoxime [137].

Il est possible également d'évaluer l'activité arginase par des méthodes alternatives à la quantification de l'urée, mesurant la quantité de L-ornithine produite [120,123,127], ou de L-arginine consommée [136]. S'appuyant sur la méthode ornithine-ninhydrine décrite pour la première fois par Chinard [143], Iyamu *et al.* ont développé un nouveau micro-test colorimétrique pour le criblage à haut débit [127]. Dans cette étude, un mélange réactionnel contenant de l'arginase purifiée, du chlorure de manganèse (MnCl₂) et de la L-arginine est incubé à 37°C pendant 30 min. Après arrêt de la réaction enzymatique par l'ajout de l'acide chlorhydrique (HCl) puis centrifugation, des aliquots du surnageant sont transférés dans les puits d'une micro-plaque. La solution de ninhydrine est ensuite ajoutée dans les puits avant de chauffer la plaque à 100°C pendant 25 min. La couleur issue de la réaction entre la L-ornithine et la ninhydrine est ensuite mesurée grâce à un spectromètre à 505 nm [127]. Ce protocole a été optimisé par rapport celui de Chinard en réduisant sa durée. Il permet en outre d'obtenir une meilleure précision et une reproductivité améliorée. Les auteurs l'ont appliqué à l'étude de l'activité de l'arginase bovine I purifiée et de l'arginase d'hémolysat d'érythrocytes humains [127].

L'activité de l'arginase peut être aussi déduite de la diminution du substrat L-arginine au cours de la réaction enzymatique. M. Aminlari a développé une méthode colorimétrique permettant la détermination de l'activité de l'arginase grâce à la réaction entre la L-arginine et le *p*-nitrophénylglyoxale (PNPG) [136]. L'utilisation de PNPG, dans ce cas, a deux rôles : il réagit avec la L-arginine restante tout en stoppant la réaction enzymatique. Cette méthode, selon l'auteur, est simple à réaliser puisqu'elle n'utilise qu'un seul réactif, le PNPG, qu'elle est réalisable en un temps plus court, et qu'elle conserve une sensibilité équivalente aux autres méthodes précédemment publiées [136].

En outre, la quantité d'urée issue de l'hydrolyse par l'arginase peut être mesurée par la spectrophotométrie par la méthode d'enzyme couplée [132,135,138]. D'après une étude réalisée par Hirsch-Kolb et Greenberg, l'activité de l'arginase peut être couplée avec celle de l'ornithine aminotransférase qui produit le glutamate de L-ornithine. La quantité de glutamate formé est alors déterminée par l'oxydation catalysée par la glutamate déshydrogénase et la réduction simultanée de NAD (Nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase oxydée), qui est à l'origine de la formation de NADH (Nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase réduite) détectable en spectrophotométrie à 340 nm [132]. Cette méthode a montré des résultats comparables à ceux obtenus en utilisant l'ISPF [132]. Dans une autre étude menée par Garganta et Bond [135], l'urée produit par l'arginase était hydrolysée en ammoniac par l'uréase, l'ammoniac était ensuite converti en indophénol, dont absorbance était mesuré à 570 nm. Cette méthode peut être utilisée avec une faible concentration d'arginase (0,5 mU ou inférieure à 1 ng d'arginase de foie de rat) et avec une gamme large de concentrations en arginine (50 μ M à 12,5 mM) [135].

De plus, une autre méthode spectrophotométrique a été développée par Pace *et al.* pour mesurer l'activité d'arginase reposant sur les différents spectres d'absorption à 205,7 nm de la L-arginine, de la L-ornithine et de l'urée [121].

Parallèlement aux méthodes spectrophotométriques, à partir de la fin des années 1960, la radiométrie se développe et est utilisée pour l'évaluation de l'activité de l'arginase. Dans cette méthode, le substrat radiomarké arginine-guanido- ^{14}C est utilisée, l'urée- ^{14}C produite lors de l'hydrolyse catalysée par l'arginase est comptée de façon directe [15,38,51,126,139] ou indirecte par le biais de la libération de $^{14}\text{CO}_2$ après un couplage enzymatique [117–119]. Ce premier essai radioisotopique a été développé par Carulli *et al.* [117]. Les avantages de cette méthode sont : une bonne sensibilité et une bonne précision car il n'y a pas d'interférence avec l'urée non-radioactif dans le mélange d'incubation (par exemple en cas de mesure dans du sérum sanguin). En outre, le protocole est simple et facilement appliqué à un grand nombre d'échantillons. Cependant, le prix élevé du substrat radioactif, la dégradation du substrat radioactif ainsi que les conditions à respecter pour les manipulations avec des produits radioactifs constituent des inconvénients certains de cette application [117]. Un autre protocole similaire a été développé par Righetti *et al.* dans lequel l'urée- ^{14}C est transformé en $^{14}\text{CO}_2$ par l'acide nitreux [118].

L'essai radioisotopique dans lequel l'arginase couplée avec l'uréase utilisant arginine-guanido- ^{14}C est plus sensible, cependant la plupart des préparations d'uréase présentent une activité arginolytique [144]. Pour résoudre cette problématique, Rüegg et Russell ont développé un nouveau protocole dans lequel le mélange réactionnel enzymatique est traité par la résine Dowex afin d'éliminer l'arginine-guanido- ^{14}C restante. Après centrifugation, le surnageant est ensuite soumis à un compteur à scintillation pour déterminer la quantité d'urée- ^{14}C [125]. Par rapport aux autres essais plus classiques, l'essai de Rüegg et Russell s'est montré plus sensible, meilleur d'un point de vue quantitatif et plus rapide (une analyse complète ne prend que 5 min) [125]. Ce sont les raisons pour lesquelles ce protocole a été utilisé par plusieurs études pour évaluer l'activité de l'arginase [19,126] et l'inhibition de composés étudiés sur cette enzyme [15,38,51,139].

Par ailleurs, la fluorimétrie a été également utilisée pour évaluer l'activité de l'arginase [122,140], mais cette méthode est moins appliquée que la spectrophotométrie et la radiométrie. En 1980, Orfanos *et al.* ont évalué l'activité de l'arginase dans le sang séché sur papier filtre, grâce à un protocole couplant l'arginase avec l'uréase et la L-glutamate déshydrogénase [122]. L'urée formée par l'hydrolyse de la L-arginine en présence d'arginase dans le sang est mesurée par une diminution de la fluorescence de NADH [122]. Cette méthode est aussi efficace et reproductible que les méthodes spectrophotométriques. Néanmoins, les valeurs d'activité de l'arginase mesurée par cette méthode fluorimétrique sont à peine plus basse que celles obtenues avec d'autres méthodes colorimétriques, et cette différence pourrait, selon les auteurs, venir de la courte durée de l'étape d'activation d'arginase [122]. Récemment, Stasyuk *et al.* [140] ont développé un nouvel essai enzymatique pour déterminer l'activité de l'arginase en utilisant une arginase recombinante humaine I, l'uréase et l'OPA (en présence de sulfite). Le produit final OPA-ammonium peut être mesuré par spectrophotométrie et fluorimétrie [140]. Cette méthode a été ensuite appliquée à l'évaluation de la quantité de L-arginine dans le sérum sanguin (avec une gamme linéaire de 100 nM à 6 μ M, et une limite de détection de 34 nM en L-arginine). Elle a montré une bonne corrélation par rapport à la méthode enzymatique de référence [140].

III-2.3. Conclusion

Un grand nombre d'essais biologiques sont donc actuellement connus pour évaluer l'activité d'arginase tels que la spectrophotométrie, la radiométrie et la fluorimétrie. Ces méthodes avec des protocoles plus ou moins variables sont réalisées sous des conditions différentes, utilisant différentes sources d'arginase (homogénat/lysate, arginase purifiée, ou bien arginase recombinante). Les limites de ces méthodes peuvent être le prix, des manipulations quelquefois difficiles, et le besoin d'équipements particuliers (par exemple la radiométrie), la durée des expérimentations et le fait que les sources d'arginase issues

d'homogénats ou de lysats tissulaires pourraient influencer la sensibilité et la reproductivité des résultats. Ces difficultés rendent les essais actuels difficiles à une adaptation en criblage à haut débit, dans la stratégie de recherche de nouveaux inhibiteurs d'arginase. En outre, la plupart des études publiées n'ont pas utilisé de contrôles positifs, c'est-à-dire d'inhibiteurs de référence auxquels les résultats obtenus peuvent être comparés.

Il nous a donc paru nécessaire avant de débiter nos recherches de nouveaux inhibiteurs d'arginase, de disposer d'un test enzymatique ayant tout à la fois, un bon rapport efficacité-prix, une facilité de mise en œuvre, une bonne reproductibilité, et intégrant l'évaluation d'un inhibiteur de référence pour valider le test et comparer les résultats entre eux.

Chapitre IV : Modélisation moléculaire - Etude de Docking sur arginase

IV-1. Introduction sur la modélisation moléculaire

Dans le domaine de la modélisation moléculaire, le docking (ou amarrage) est une méthode qui permet de calculer l'orientation et la fixation préférentielle d'une petite molécule (dite ligand) envers une macromolécule (dite le récepteur tel que l'ADN, une enzyme, une protéine,...) lorsqu'elles sont liées pour former un complexe stable en énergie. Cette technique virtuelle ou *in silico* utilise des logiciels particuliers afin de placer le ligand dans le site actif du récepteur, et de prédire ensuite l'affinité de fixation ainsi que les interactions potentielles entre ces deux molécules. De nos jours, le docking moléculaire est largement utilisé comme outil efficace et complémentaire à d'autres méthodes, pour la conception et le développement de nouveaux médicaments [145,146].

IV-2. Principes de l'étude de docking et méthodologie

D'une façon vulgarisée, on peut comparer le docking à une situation où l'on souhaite trouver la clé (le ligand) d'une serrure (le récepteur), et où l'objectif est de trouver la forme appropriée et la meilleure orientation relative de la clé dans la serrure pour l'activer. Grâce à cette stratégie, les chercheurs peuvent choisir des composés prometteurs à synthétiser pour évaluer ensuite leur activité biologique. Le mode de liaison entre le ligand et le récepteur est prédit et sert à expliquer la capacité active des molécules testées. Le docking est une méthode intéressante pour les études de relations structure-activité, qui conduisent à une pharmacomodulation destinée à améliorer l'activité d'un composé. Cette application, communément appelée par le terme anglais « *Structure-Based Drug Design (SBDD)* » réduit effectivement le temps et le coût de la stratégie de recherche de nouveaux médicaments.

Dans l'étude de docking, chaque mode de liaison prédit entre le ligand et le récepteur est appelé « pose de fixation », et est évalué par un score reposant sur la complémentarité du ligand avec son site de liaison en termes de configuration et de certaines propriétés telles que les propriétés électrostatiques [147]. Une molécule obtenant un bon score de prédiction montre une bonne fixation dans le site de liaison et une bonne affinité pour celui-ci (**Figure 29**). Ce processus, appliqué pour toutes les molécules étudiées, donne ensuite un classement selon les scores. L'analyse des interactions potentielles entre des molécules et le site actif, ainsi que le classement des scores issus de l'étude de docking, permettent de choisir de bons candidats à se procurer, s'ils sont commerciaux, ou à synthétiser, puis à tester pour leur activité biologique [147]. Cette stratégie est appelée criblage virtuel (CV).

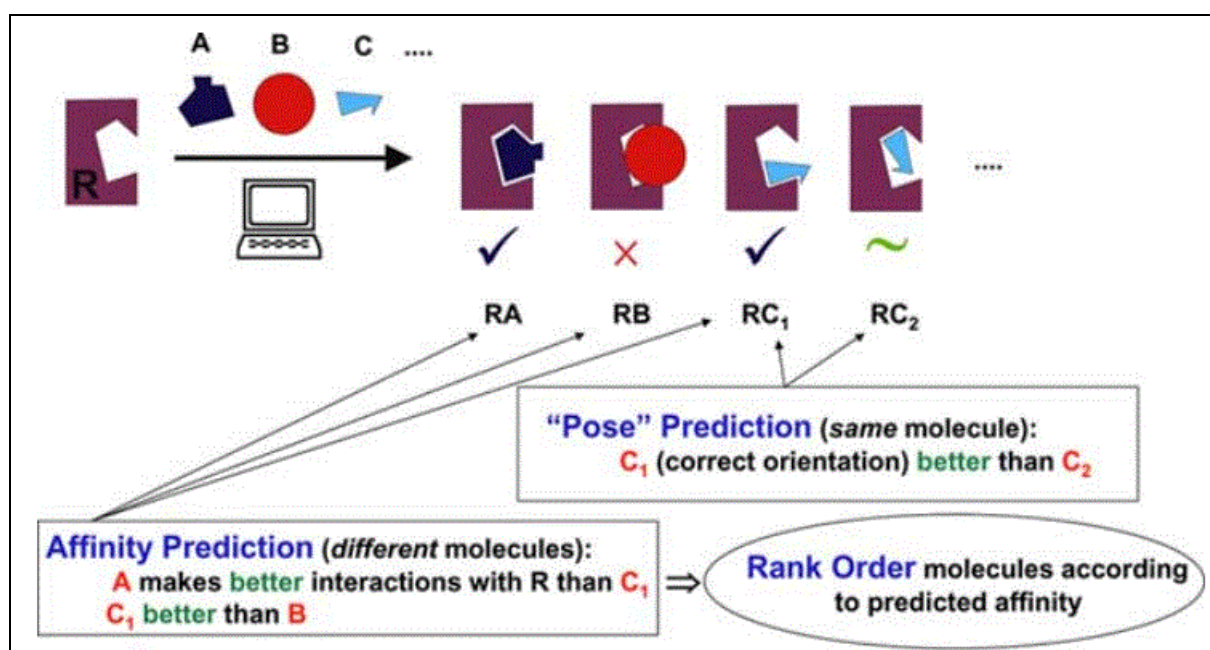


Figure 29 : Illustration de la modélisation moléculaire docking. R représente la structure d'un récepteur ; A, B, C représentent des petites molécules (ou ligands) qui sont « dockées » dans le site actif du récepteur [147].

En fonction de la flexibilité des molécules considérées (ligand et récepteur), il existe trois approches possibles pour les études de docking [148]: (i) le ligand et le récepteur sont

des molécules rigides (docking rigide), (ii) le ligand est flexible et le récepteur est rigide (docking semi-flexible), (iii) le ligand et le récepteur sont tous les deux flexibles (docking flexible). Mais la flexibilité se limite seulement à certaines chaînes choisies au niveau du site actif du récepteur. La plupart des logiciels de docking actuels tels que Gold, Autodock, FlexX sont applicables au docking semi-flexible [149,150]. Dans ce projet de thèse, nous avons utilisé le logiciel FlexX et appliqué l'approche de docking semi-flexible.

La méthodologie typique souvent appliquée pour des études de docking est présentée sur la **Figure 30** [151].

La première étape dans ce processus est l'obtention d'une structure en trois dimensions (structure 3D) pour le récepteur, qui est précédemment déterminée par cristallographie aux rayons X, par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou par modélisation par homologie [151]. De nombreuses structures 3D sont disponibles et téléchargeables sur la base de données de la banque des protéines (www.rcsb.org). Cependant certaines structures ne sont pas encore décrites par cristallographie et doivent alors être créées en utilisant la modélisation par homologie [152].

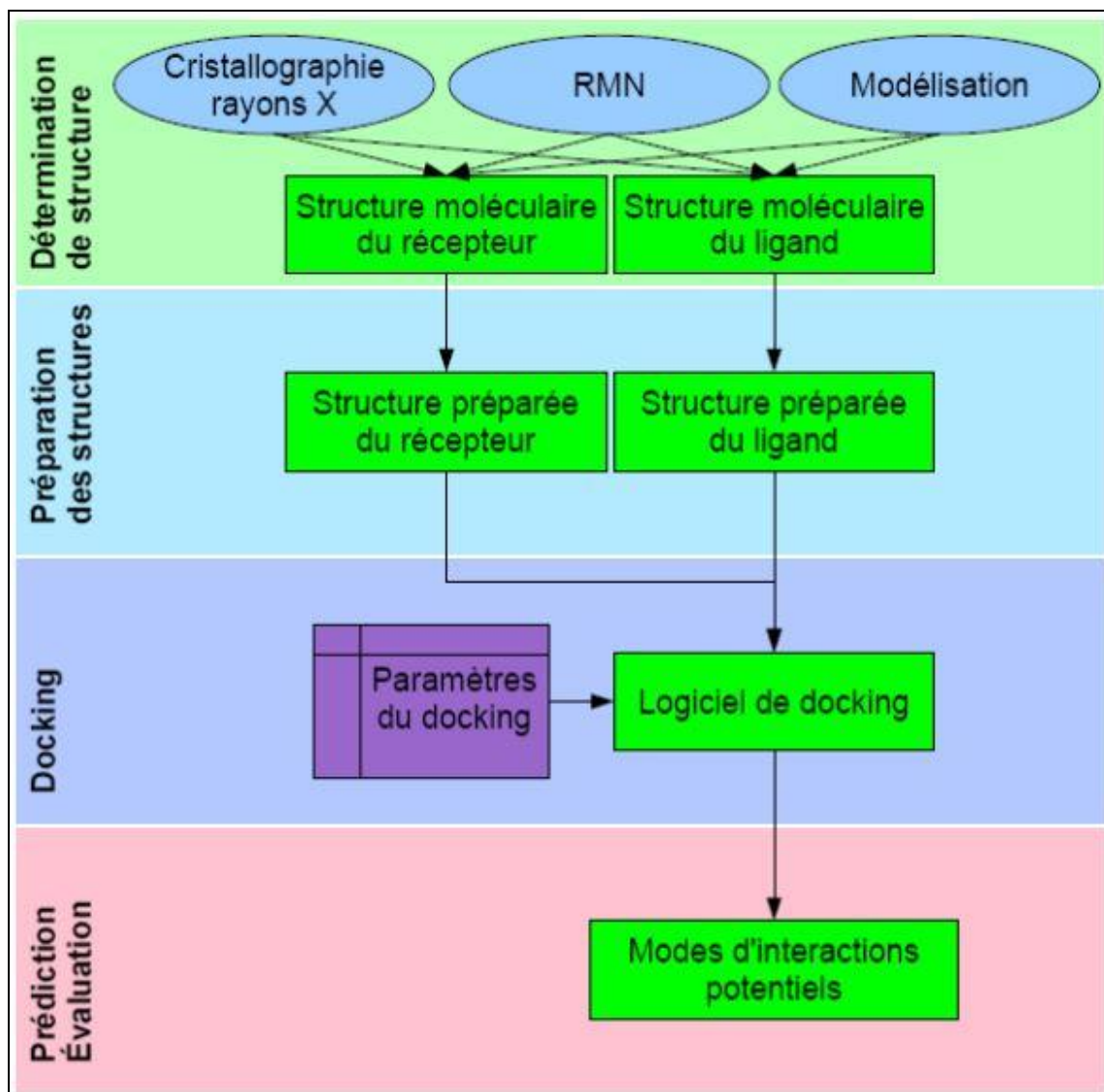


Figure 30 : Méthodologie et étapes typiques d’une étude de docking [151].

La deuxième étape est la préparation des structures du récepteur et du ligand. Dans cette étape, la structure 3D du récepteur est vérifiée, chargée en électricité, minimisée en énergie, et le site de liaison est choisi pour l’étude de docking. En parallèle, des structures des petites molécules (ligands) sont dessinées, et minimisées au moins deux fois pour avoir de bonnes conformations prêtes à être dockées dans le site (**Figure 31**).

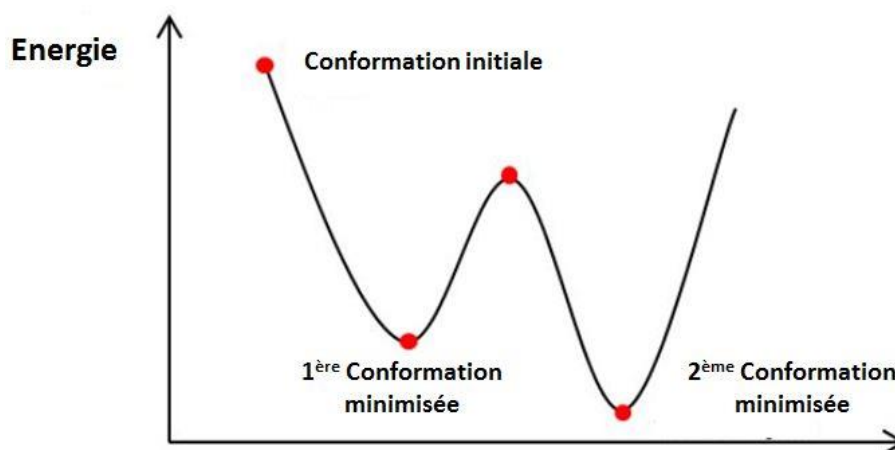


Figure 31 : Processus de minimisation d'énergie d'une molécule dans l'étude docking.

Pour la troisième étape, il s'agit de l'utilisation d'un logiciel particulier pour « docker » des molécules dans le site actif en appliquant des paramètres de docking pour bien analyser des résultats.

Enfin, la quatrième étape est l'interprétation des résultats, l'analyse des interactions potentielles entre des molécules et le site de liaison, ainsi que la mesure des scores de docking (prédiction de l'affinité) (**Figure 30**).

IV-3. Outil de docking FlexX

Dans ce projet de thèse (dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de pharmacoinformatique de l'université de Hochiminh-ville au Vietnam), le programme FlexX a été choisi pour les études de docking [153]. Il s'agit d'un outil efficace appliquant la construction incrémentale comme algorithme de recherche [154]. Le FlexX règle le ligand avec sa complète flexibilité en gardant la structure de récepteur rigide. Lors du processus de docking, le ligand est « docké » dans le site de liaison avec un fragment de base, ensuite le

ligand complet est construit en ajoutant les composantes restantes (**Figure 32**). La meilleure solution est sélectionnée suivant le score de docking [154,155].

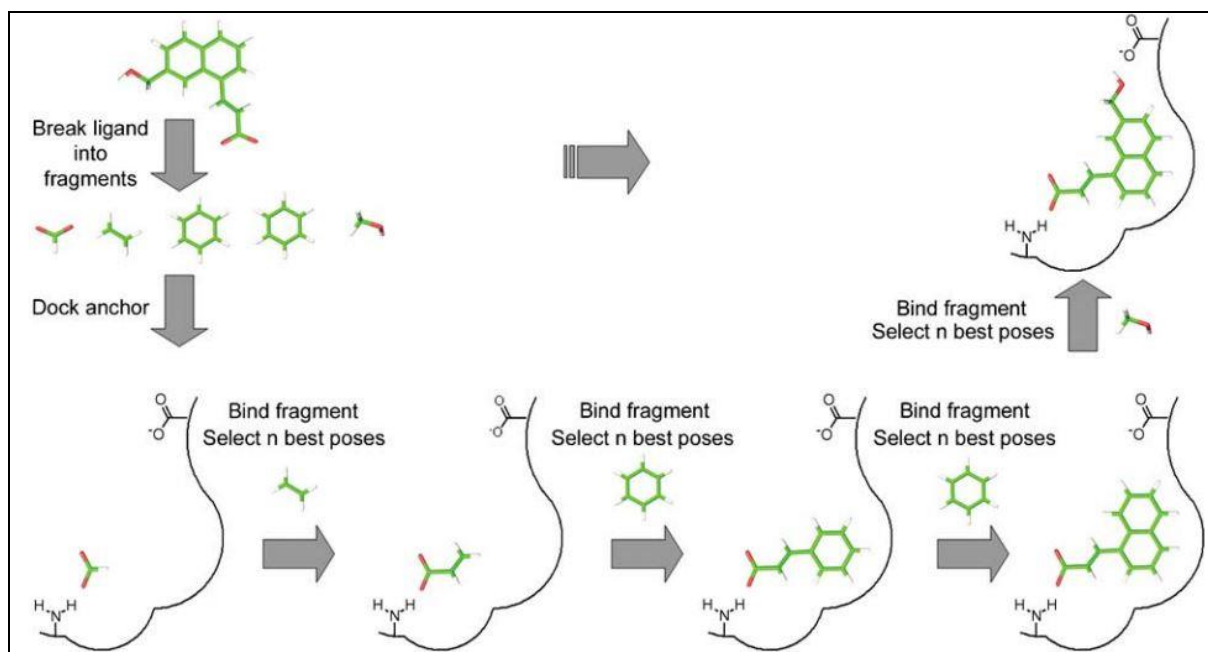


Figure 32 : La construction incrémentale dans le processus de docking par FlexX [155].

Le placement du ligand dans le site de liaison repose sur l'algorithme de « *Triangle Matching* », c'est-à-dire les centres et surfaces de liaison sur le récepteur et le ligand tels que des noyaux aromatiques, des centres donneurs ou récepteurs de proton, des liaisons ioniques, etc... La fixation est effective si ces centres et surfaces sont bien superposés (**Figure 33**) [154,155].

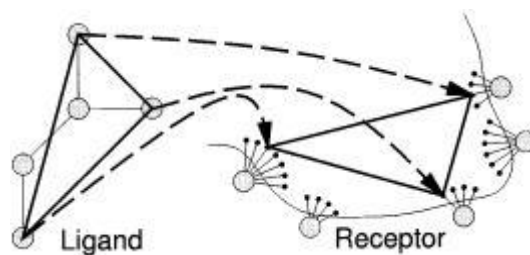


Figure 33 : Algorithme de placement de fragment « *Triangle matching* » : les trois centres de liaison du ligand (sphères grises) sont liés sur les trois points d'interaction discrets dans le site actif (points noirs), ce qui définit une transformation unique du ligand dans le site actif [154].

L'affinité prédite entre la molécule et le site de liaison est représentée par le score de docking (ou énergie de fixation). Plus ce score est faible, plus l'affinité est forte. L'énergie est calculée en se fondant sur l'énergie utilisée pour former des liaisons d'hydrogène, des interactions ioniques, des interactions aromatiques ou des interactions hydrophobes (interaction de *van der Waals*) entre la molécule et le site actif.

IV-4. Applications des études de docking à l'arginase

De nombreuses structures 3D d'arginases sont trouvées sur le site de la banque de données sur les protéines (www.rcsb.org). En fait, un total de 135 structures d'arginase, souvent cristallisées avec le substrat ou un inhibiteur connu, ont été décrites et mises à disposition pour les études de docking [156]. Parmi elles, on peut noter 54 structures d'arginase d'*Homo sapiens* (Homme), 34 structures de *Rattus norvegicus* (Rat), 10 structures de *Schistosoma mansoni* et 7 structures de *Leishmania mexicana*. Cependant, malgré ce grand nombre de structures 3D d'arginases disponibles, assez peu d'études de docking ont été rapportées dans la littérature [69,94,96,97,157–159]. En outre, ces études *in silico* concernent plus particulièrement des arginases de parasites ou de bactéries, mais peu des arginases de mammifères.

Parmi les études de docking sur l'arginase de *Leishmania*, on peut noter en premier lieu les travaux de da Silva et son équipe, portant sur la recherche de nouveaux inhibiteurs d'arginase d'origine naturelle pour le traitement des leishmanioses [69,94,96,97]. Dans une étude en 2012 sur l'effet des flavanols (quercétine, quercitrine, isoquercitrine) sur l'arginase de *Leishmania amazonensis*, cette équipe brésilienne a utilisé le docking moléculaire pour prédire des interactions entre des flavonoïdes étudiés et le site catalytique de l'arginase recombinante de *Leishmania amazonensis* (L-ARG) qu'ils utilisent comme modèle. Les résultats ont montré que le groupe catéchol de ces molécules peut interagir avec le résidu Asp129, qui est responsable de la coordination des cofacteurs Mn_A^{2+} et Mn_B^{2+} dans le site actif de l'arginase [69]. Dans une autre étude évaluant les relations structure-activité des flavonoïdes sur L-ARG, par des études de docking, la même équipe [94] a montré que la fisétine, la quercétine, la lutéoline et la 7,8-hydroxyflavone inhibent l'activité de L-ARG, et que ces inhibiteurs peuvent interagir avec des acides aminés impliqués dans la formation du cluster Mn_A^{2+} - Mn_B^{2+} dans le site catalytique. Récemment, ils ont aussi montré que le verbascoside, un glucoside de phényléthanoïde, était un inhibiteur compétitif de L-ARG présentant un K_i de 0,7 μ M [97]. Les auteurs ont également réalisé des études de docking pour expliquer l'effet de ce composé sur L-ARG au niveau moléculaire. Dans cette étude, la structure 3D de *Leishmania mexicana* (PDB ID 4IU1) a été utilisée au lieu de la structure d'homologie de *Leishmania amazonensis* car ces deux structures sont quasiment identiques et surtout bien conservées au niveau du site actif [97]. Les résultats de docking moléculaire ont montré que le verbascoside établit plusieurs interactions hydrophiles et hydrophobes avec le site actif de L-ARG. En particulier, le fragment phénéthyle peut s'approcher de la région renfermant les ions manganèse, et potentiellement interagir avec eux *via* une chélation au niveau du groupe catéchol (**Figure 34**) [97].

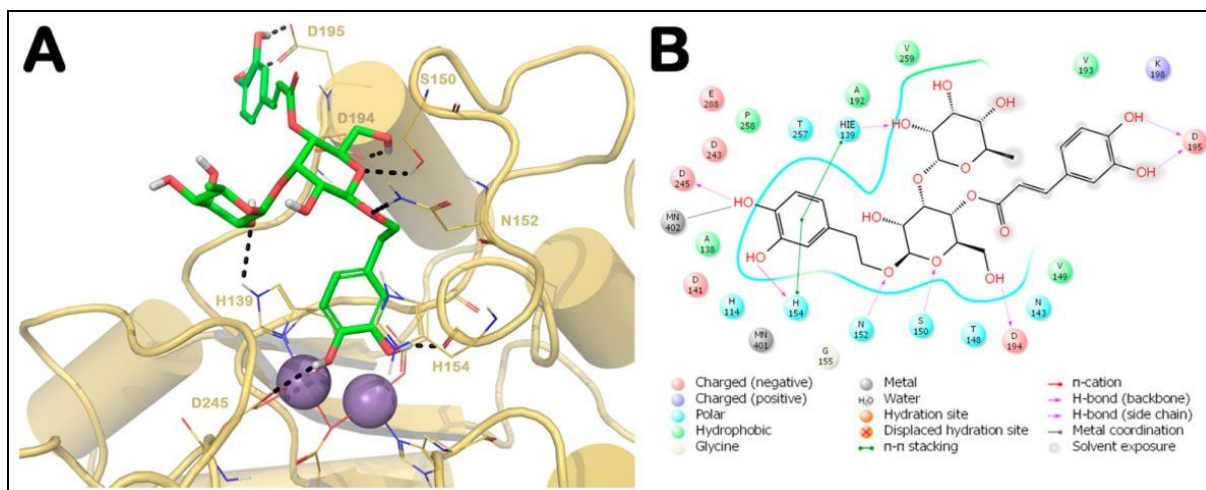


Figure 34 : La meilleure pose de docking du verbascoside dans le site actif de l'arginase de *Leishmania*. (A) Mode de liaison en 3D : verbascoside (en vert), métaux (sphères violettes) ; Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillé noirs, alors que les coordinations avec les métaux en lignes plaines. (B) Mode de liaison en 2D [97].

Dans un effort de recherche de nouveaux candidats inhibiteurs d'arginase, pour le traitement d'infections à *Helicobacter pylori*, Azizian *et al.* ont créé un modèle d'homologie d'arginase de *H. pylori* (Hp-ARG) en utilisant la structure de l'arginase de *Bacillus caldovelox* comme modèle [157]. Le modèle créé a ensuite été utilisé pour réaliser des études de docking avec certains inhibiteurs d'arginase. Les auteurs ont montré que les inhibiteurs étudiés, comme la nor-NOHA, pouvaient interagir avec sept acides aminés importants, bien conservés dans le site actif de l'arginase, tels que quatre acides aspartiques (D116, D120, D234, D236), et trois histidines (H91, H118, H133). Ces derniers jouent un rôle important pour l'hydrolyse et la stabilité du centre binucléaire manganèse de l'arginase [157].

Une autre étude *in silico* sur L-ARG, Méndez-Cuesta *et al.* ont créé une structure 3D de *Leishmania mexicana* via un modèle d'homologie utilisant la structure cristallographique de l'arginase de foie de rat [158]. Utilisant ce modèle d'homologie, les auteurs ont effectué

l'étude de docking pour 1439 molécules. Les résultats ont révélé que 18 composés étaient sélectifs pour l'arginase de *L. mexicana* [158].

Ayant ciblés l'arginase comme une cible prometteuse pour le traitement de la leishmaniose, Glisic *et al.* ont récemment publié les résultats d'un criblage virtuel (CV) d'inhibiteurs d'arginase de type flavonoïdes [159]. Dix composés dans une base de données de 5667 composés ont été sélectionnés pour l'étude de docking après des criblages préliminaires par des techniques EIIP/AQVN et par 3D QSAR. Les résultats de docking ont montré que la plupart de ces molécules ont établi des interactions plus fortes avec L-ARG qu'avec h-ARG. Deux types d'interaction ont été mis en évidence : les interactions hydrophiles avec Asn, Ser et Thr et les interactions hydrophobes avec His, Val et Ala [159].

IV-5. Conclusion

Malgré plusieurs études de docking effectuées sur l'arginase, et de nombreuses interactions prédites, les interactions entre des molécules étudiées et les manganèses dans le site actif ne sont pas toujours faciles à relever. En effet, comme nous l'avons précédemment signalé, l'arginase est une métalloenzyme contenant un cluster de manganèse dans son site actif, et une molécule d'eau dans le complexe hydroxyle-Mn²⁺ qui joue un rôle important dans le mécanisme d'hydrolyse de cette enzyme [2]. La prise en compte de ces caractéristiques constitue le vrai défi à relever pour les études de docking sur l'arginase parce qu'il n'est pas évident de prendre en compte avec précision des ions métalliques et des molécules d'eau dans les algorithmes actuels pour la modélisation moléculaire [160].

2^{ème} Partie

Travaux réalisés au cours de la thèse

Chapitre V : Optimisation d'un test in vitro pour évaluer l'activité de l'arginase

Comme nous avons précédemment expliqué dans le **chapitre III, session III.2**, disposer d'un essai pour l'évaluation biologique est indispensable pour la stratégie de recherche de nouveaux inhibiteurs d'arginase. De nombreuses méthodes ont été décrites pour évaluer l'activité d'arginase. Pourtant, ces protocoles peuvent présenter des limites comme un coût élevé (arginase humaine), le besoin d'équipements ou de manipulations particuliers (radiométrie), la durée du test, l'utilisation des sources d'arginase issues d'homogénats ou de lysats tissulaires (problème de reproductibilité). Ce sont les raisons pour lesquelles nous avons optimisé un test colorimétrique *in vitro* précédemment décrit par Corraliza *et al.* (1994) [124]. Cette méthode a montré de nombreux avantages tels que sa simplicité, la quantité illimitée de L-arginine utilisée pour un test, et l'absence d'interférence avec les autres produits comme la L-ornithine et la L-citrulline [124].

V-1. Optimisation du test d'évaluation de l'activité arginase

Parmi les essais colorimétriques les moins onéreux et les plus simples à réaliser, existants pour mettre en évidence l'activité de l'arginase, nous avons choisi la méthode largement utilisée de Corraliza *et al.* [124]. Cette méthode repose sur la détection de l'urée formée au cours de la réaction d'hydrolyse de la L-arginine par l'arginase, en utilisant l'ISPF. La couleur rouge obtenue permet ensuite la mesure d'une absorbance lue à 530 nm. Afin d'améliorer la reproductibilité de ce test, nous avons remplacé les homogénats de tissus utilisés à l'origine comme source d'arginase par une arginase commerciale : l'arginase

hépatique bovine purifiée de type I (b-ARG I). En outre, nous avons miniaturisé ce test en le réalisant sur microplaque 96-puits.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la relation entre la production d'urée et certaines combinaisons de quantité de l'arginase (0,125 à 2 unités par puits) et de durée d'incubation (30, 60 et 120 minutes) (**Figure 35**). Les résultats ont montré qu'avec les quantités les plus faibles d'arginase, cette relation était non seulement linéaire, indépendamment de la durée d'incubation, mais aussi hautement reproductible. En effet, pour les quantités d'enzyme de 0,125, 0,25 ou 0,5 U/puits, les points de données correspondant aux trois durées d'incubation sont superposés (**Figure 35**). Avec une quantité plus élevée (1 ou 2 U/puits), la vitesse de production d'urée est encore linéaire quand l'enzyme est incubée pendant 30 min. (ligne noire sur la **Figure 35**), mais elle diminue pour les durées d'incubation plus longues (60 et 120 min). Dans ces derniers cas, la consommation plus élevée de L-arginine engendre : (i) une diminution de sa concentration, ce qui impacte la vitesse selon la cinétique Michaelienne, et (ii) la production d'une quantité plus importante de L-ornithine, qui est bien connue pour exercer un effet inhibiteur d'arginase par retrocontrôle [35,38]. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser 0,25 unités d'arginase par puits pour nos expérimentations futures et une durée d'incubation de 60 min. Cette décision a été motivée par plusieurs raisons :

- utiliser une quantité minimale d'arginase, pour réduire le coût de la manipulation,
- produire suffisamment d'urée pour la détection finale,
- tout en restant capable de distinguer les potentialités inhibitrices des composés étudiés.

Ces conditions permettent d'obtenir des valeurs d'absorbance comprises entre 0 et 1 (respectivement avec ou sans inhibiteur), valeurs bien adaptées pour la plupart des spectromètres actuels.

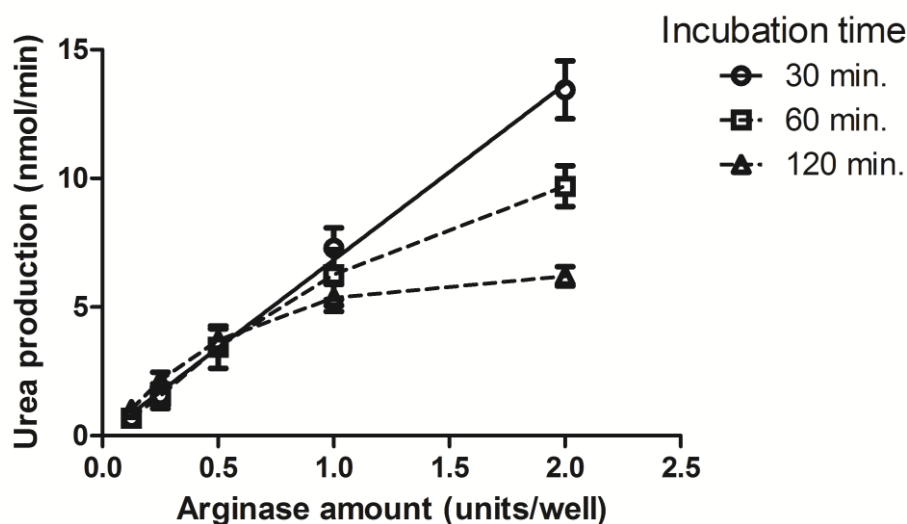


Figure 35 : Effets de la quantité d'arginase et de la durée d'incubation sur la production d'urée. Une concentration fixée de L-arginine (14,3 mM/puits) est incubée avec différentes quantités d'enzyme pendant différentes durée d'incubation 30, 60 ou 120 min, à 37°C. Les résultats, présentés sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, sont issus de trois expérimentations indépendantes réalisées chacune en triplicata.

V-2. Cinétique enzymatique de l'arginase en présence ou en absence d'un inhibiteur de référence

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la vitesse de la réaction enzymatique catalysée par b-ARG I en fonction des quantités du substrat L-arginine (**Figure 36**). La linéarité de la courbe de Lineweaver-Burk est en accord avec la cinétique de Michaelis-Menten déjà connue pour cette enzyme [161]. Cette courbe a également permis de déterminer les valeurs de K_m ($55,5 \pm 10,5$ mM) et de V_{max} ($11,5 \pm 0,5$ nmol urée.min⁻¹) dans nos conditions expérimentales. K_m est en accord avec des données précédentes rapportant une

constante K_m de 36 ± 6 mM pour l'arginase de foie de bœuf [162]. Pour nos expériences, nous avons décidé d'utiliser une concentration de L-arginine par puits égale à 14,3 mM. Cette concentration nous permet en effet d'utiliser des concentrations relativement faibles d'inhibiteurs dans les expériences ultérieures, tout en restant suffisamment élevées pour distinguer différentes potentialités inhibitrices.

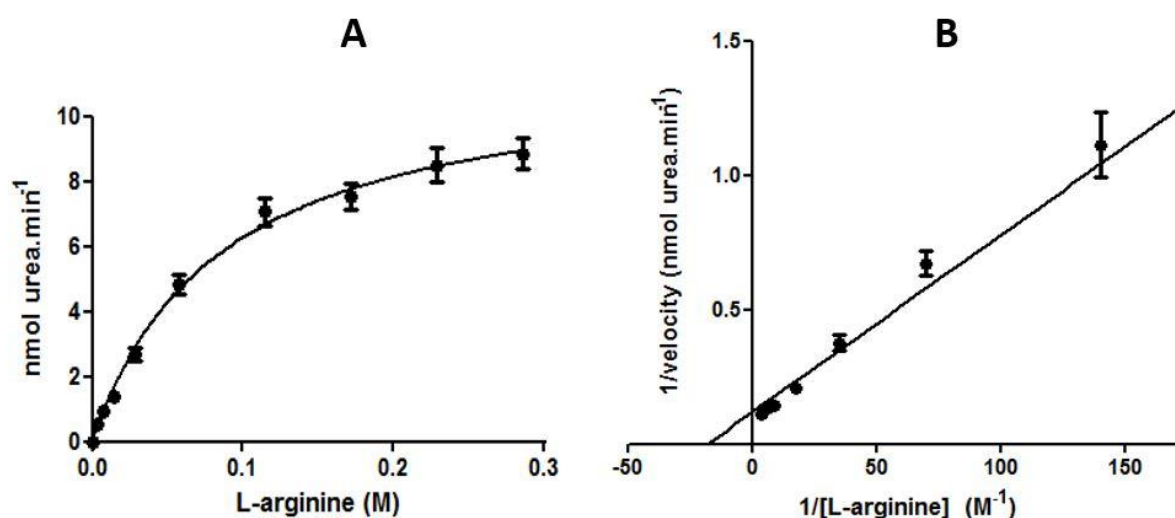


Figure 36 : Profil cinétique de Michaelis-Menten (A) et courbe de Lineweaver-Burk (B) pour b-ARG I. Une quantité fixée d'arginase (0,25 U/puits) est incubée avec une série de concentrations croissantes de L-arginine (0 à 286 mM) pendant 15 min à 37°C. La courbe de Lineweaver-Burk permet de déterminer les paramètres cinétiques K_m $55,5 \pm 10,5$ mM et V_{max} $11,5 \pm 0,5$ nmol urée.min⁻¹ (intersections à l'origine et à l'ordonnée et pente de la courbe) Les valeurs présentées sont sous forme de moyenne $\pm$ écart-type de quatre expérimentations indépendantes réalisées en triplicata.

La S-(2-boronoéthyl)-L-cystéine (BEC) est un inhibiteur commercial souvent utilisé dans les études *in vitro* et *in vivo* [163,164]. Pour utiliser ce composé comme un inhibiteur de référence dans notre test, nous avons déterminé ses caractéristiques (CI_{50} , E_{max} et K_i) ainsi que son type d'inhibition (**Figure 37**) en incubant une série des concentrations croissantes de BEC en présence de 0,25 unité de b-ARG I pendant 60 min. La courbe sigmoïde obtenue (**Figure 37A**) a donné les valeurs de CI_{50} ($3,3 \pm 0,4 \mu M$) et de E_{max} ($97,3 \pm 1,3 \%$). Pour caractériser le profil d'inhibition de BEC sur b-ARG I, des expérimentations cinétiques ont été effectuées en faisant varier la concentration du substrat en présence et en absence de l'inhibiteur à différentes concentrations. Comme on le voit sur la **Figure 37B**, les droites de Lineweaver-Burk se croisent en un point commun situé dans le premier quadrant (sens contraire des aiguilles d'une montre). Les droites de Dixon se croisent dans le deuxième quadrant (**Figure 37C**). L'ensemble de ces résultats montre que l'inhibition par BEC est de type compétitif, ce qui est en accord avec les données rapportées pour cet inhibiteur sur r-ARG I et h-ARG I [50,52]. La valeur de K_i de BEC obtenu à partir de la courbe dérivée de Lineweaver-Burk (**Figure 37D**) est de $3,5 \mu M$, ce qui est légèrement supérieur à la valeur obtenue avec r-ARG I recombinante ($0,4$ à $0,6 \mu M$) mais en accord avec la constante de dissociation $2,22 \mu M$ mesurées par titration calorimétrique isotherme [3,139,165]. L'inhibiteur BEC ainsi caractérisé, pourra être systématiquement utilisé comme témoin positif dans notre essai, d'une part pour permettre de valider les résultats obtenus, et d'autre part, pour les comparer à cet inhibiteur de référence et ainsi avoir une idée de la puissance de nos molécules.

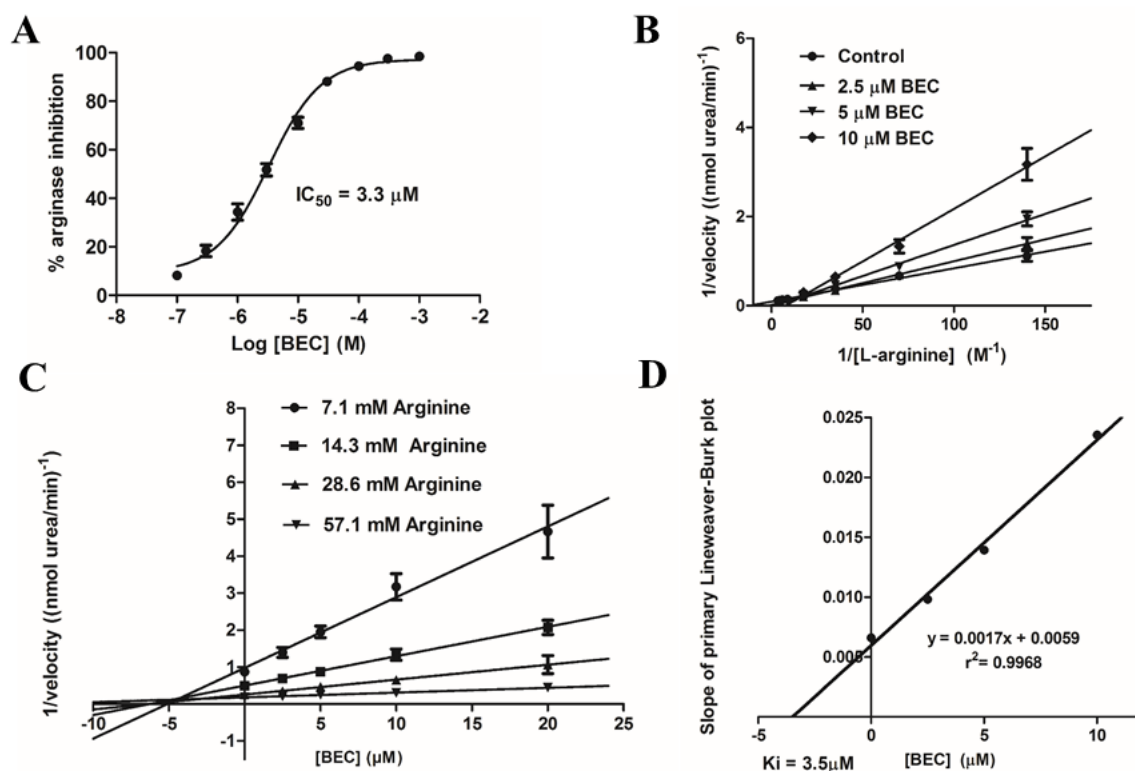


Figure 37 : Courbe de concentration-réponse de BEC. Pourcentages d'inhibition de l'arginase à différentes concentrations de BEC (**A**) permettant de déterminer la CI_{50} de $3,3 \pm 0,4 \mu M$ et l' E_{max} de $97,3 \pm 1,3 \%$. Les droites de Dixon (**C**) et de Lineweaver-Burk (**B, D**) permettent de déterminer le type d'inhibition (compétitif) et la valeur de K_i de $3,5 \mu M$. Les valeurs présentées sont les moyennes $\pm$ écart-type résultant de trois expérimentations indépendantes.

V-3. Automatisation partielle du test d'évaluation de l'activité arginase

De façon à diminuer les contraintes en termes de mobilisation humaine pour la réalisation de l'évaluation de l'activité de l'arginase décrite précédemment, l'équipe a fait l'acquisition d'un robot de pipetage Microlab Nimbus. Des expérimentations ont été réalisées pour comparer les résultats avec pipetage manuel ou robotisé [166]. Les résultats obtenus pour le BEC avec le robot sont en bonne concordance avec ceux obtenu *via* un pipetage manuel, avec une meilleure reproductibilité et une durée de manipulations plus courte (**Figure 38**).

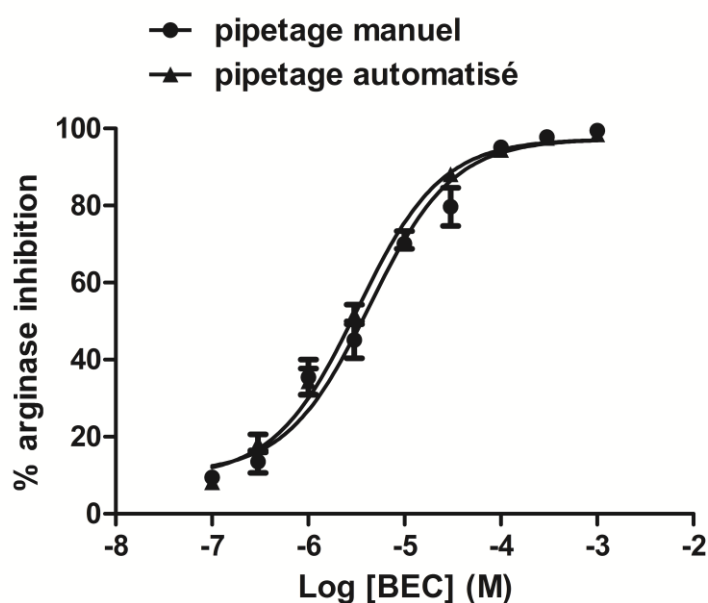


Figure 38 : Courbes sigmoïdes concentration-réponse de BEC avec pipetage manuel et automatisé.

V-4. Conclusion

Partant du test décrit par Corraliza et al. [124], nous avons développé un essai optimisé en terme de quantité d'enzyme, de durée globale de réalisation, de reproductibilité et de coût. Il était important pour la suite de notre projet de recherche de nouveaux inhibiteurs d'arginase de disposer d'un tel test permettant de comparer nos résultats entre eux et avec un inhibiteur de référence. Dans la suite de notre travail, ce test sera utilisé de diverses façons en fonction de l'objectif; les changements intervenant au niveau des plans de plaques réalisés. Les premiers essais conduits sur des molécules sont généralement réalisés en mode « criblage ». Ce mode permet d'obtenir, de façon rapide, une valeur d'inhibition exprimée en pourcentage. Les molécules sont testées à 100 μ M et celles qui atteignent au moins 50% d'inhibition, à cette concentration, sont, dans un second temps, sélectionnées être engagée dans une évaluation complémentaire permettant le calcul de la CI_{50} , cette valeur étant plus précise qu'un simple pourcentage d'inhibition, et de E_{max} . Enfin, une étude cinétique sera conduite pour évaluer le type d'inhibition et la constante K_i des molécules les plus prometteuses.

Chapitre VI : Evaluations in vitro et in silico de l'activité inhibitrice des polyphénols sur l'arginase mammifère

VI-1. Activité inhibitrice d'arginase de polyphénols ubiquitaires

VI-1.1. Introduction : choix des polyphénols

Au vu de la littérature, parmi les substances naturelles, végétales constituant une source précieuse de nouveaux inhibiteurs arginase, des composés de type polyphénol présentent un intérêt particulier [13]. Dans ce projet de thèse, nous avons donc étudié la capacité inhibitrice d'arginase mammifère de huit polyphénols ubiquitaires en utilisant l'essai *in vitro* que nous avons mis au point sur b-ARG I. Les polyphénols évalués ont été choisis en raison de leur ubiquité dans le règne végétal et dans notre alimentation quotidienne. Ce sont notamment des molécules réputées pour exercer un rôle important dans la prévention cardiovasculaire. On peut donc imaginer qu'elles puissent posséder des propriétés inhibitrices d'arginase mammifère. En outre, nous avons sélectionné des structures nous permettant de déduire des relations structure-activité par la suite.

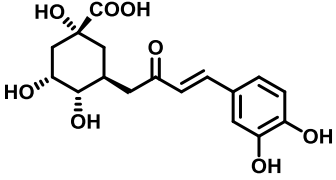
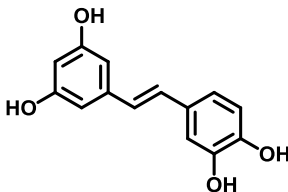
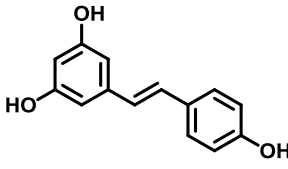
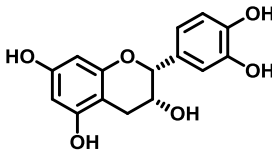
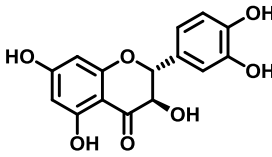
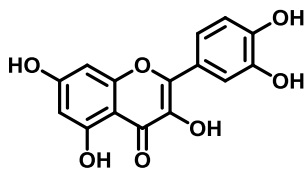
VI-1.2. Résultats et discussion

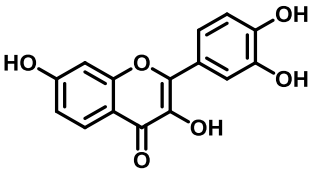
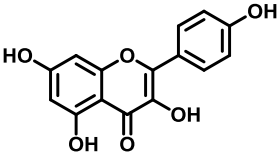
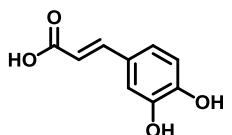
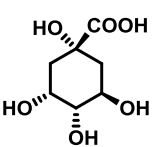
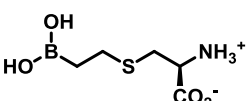
Dans un premier temps, nous avons testé ces polyphénols à la concentration de 100 μM , comme expliqué précédemment, afin d'obtenir une estimation rapide de leurs potentialités inhibitrices. Tous les composés testés ont présenté une activité inhibitrice supérieure à 40% à 100 μM . Ainsi, nous avons choisi de déterminer, pour chacune de ces molécules les valeurs de CI_{50} et d' E_{max} . En termes d'effet inhibiteur (CI_{50}) sur arginase, ces polyphénols pourraient être classés dans l'ordre suivant: acide chlorogénique > picéatannol >

resvératrol $\geq$ (-)-épicatechine > taxifoline > quercétine > fisétine > acide caféique > kaempférol > acide quinique (**Tableau VIII**).

Etant donné l'activité prometteuse de l'acide chlorogénique, un ester cafféoylquinique, nous avons complété la série de molécules testées par des essais sur les acides caféique et quinique, qui forment à eux deux l'acide chlorogénique (**Tableau VIII**).

Tableau VIII: Pourcentages d'inhibition, CI_{50} et E_{max} des polyphénols évalués sur b-ARG I.

Polyphénol	Structure	Criblage sur b-ARGI à 100 μM (%) ^a	CI_{50} (μM) ^b	E_{max} (%) ^c
Acide chlorogénique (28)		$70,7 \pm 0,7$	$10,6 \pm 0,8$	$81,0 \pm 2,7$
Picéatannol (36)		$75,9 \pm 2,1$	$12,1 \pm 0,7$	$98,1 \pm 2,1$
Resvératrol (37)		$57,5 \pm 2,1$	$18,2 \pm 0,8$	$86,0 \pm 4,1$
(-)-Épicatechine (20)		$56,8 \pm 4,7$	$19,9 \pm 0,7$	$87,6 \pm 3,1$
Taxifoline (38)		$57,2 \pm 5,9$	$23,2 \pm 0,7$	$96,5 \pm 2,1$
Quercétine (39)		$64,4 \pm 2,5$	$31,2 \pm 0,9$	$90,3 \pm 8,3$

Fiséatine (40)		$50,6 \pm 4,2$	$82,9 \pm 0,7$	$102,4 \pm 5,6$
Kaempférol (41)		$41,1 \pm 2,9$	$179,1 \pm 0,8$	$107,1 \pm 7,9$
Acide caféique (42)		$61,3 \pm 4,1$	$86,7 \pm 0,7$	$96,1 \pm 2,4$
Acide quinique (43)		$18,3 \pm 5,9$	$3060,0 \pm 0,7$	$111,9 \pm 4,9$
BEC (10, référence)		$93,6 \pm 1,1$	$3,3 \pm 0,4$	$97,3 \pm 1,3$

^aTous les composés ont été criblés à 100 μ M. Les pourcentages d'inhibition de b-ARG 1 sont présentés sous forme de la moyenne $\pm$ écart-type (n = 3). ^bCI₅₀ : Concentration inhibitrice médiane présentée sous forme de moyenne $\pm$ écart-type (n = 3). ^cE_{max}: Pourcentage d'inhibition maximal obtenu lorsque la courbe sigmoïde atteint la phase de plateau, présenté sous forme de la moyenne $\pm$ écart type (n = 3).

Les deux polyphénols les plus actifs sont donc l'acide chlorogénique (ACG) et le picéatannol (PCT), présentant respectivement des CI_{50} de $10,6 \pm 0,8 \mu M$ (**Figure 39A**) et de $12,1 \pm 0,7 \mu M$ (**Figure 40A**). Bien que leur activité inhibitrice reste légèrement inférieure à celle de l'inhibiteur de référence BEC ($CI_{50} = 3,3 \pm 0,4 \mu M$), ces deux composés polyphénoliques ont montré une bonne efficacité avec des E_{max} atteignant $81 \pm 3 \%$ pour ACG et $98 \pm 2 \%$ pour PCT, soit des valeurs proches de celle du BEC ($97 \pm 1 \%$) (**Tableau VIII**).

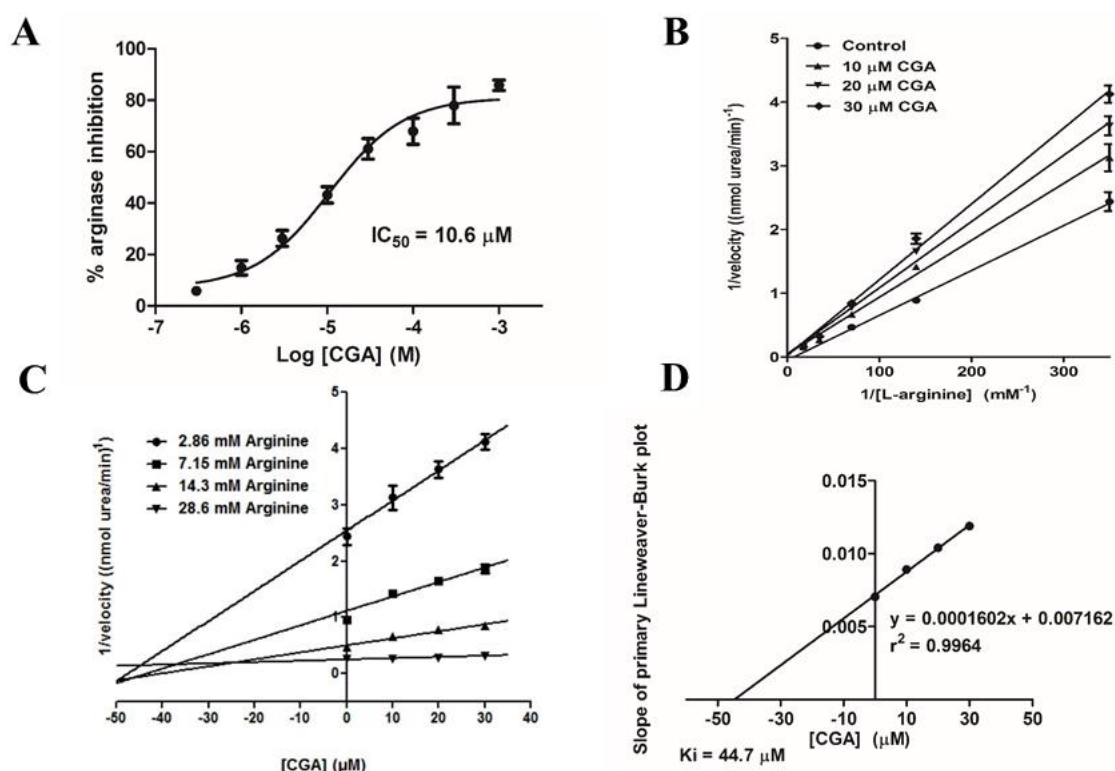


Figure 39 : Courbes de concentration-réponse de ACG. Pourcentage d'inhibition d'arginase à différentes concentrations de ACG (**A**) permettant de déterminer CI_{50} $10,6 \pm 0,8 \mu M$. Les courbes de Dixon (**C**) et de Lineweaver-Burk (**B**, **D**) permettant de déterminer le type d'inhibition (compétitif) et K_i $44,7 \mu M$. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type ($n = 3$).

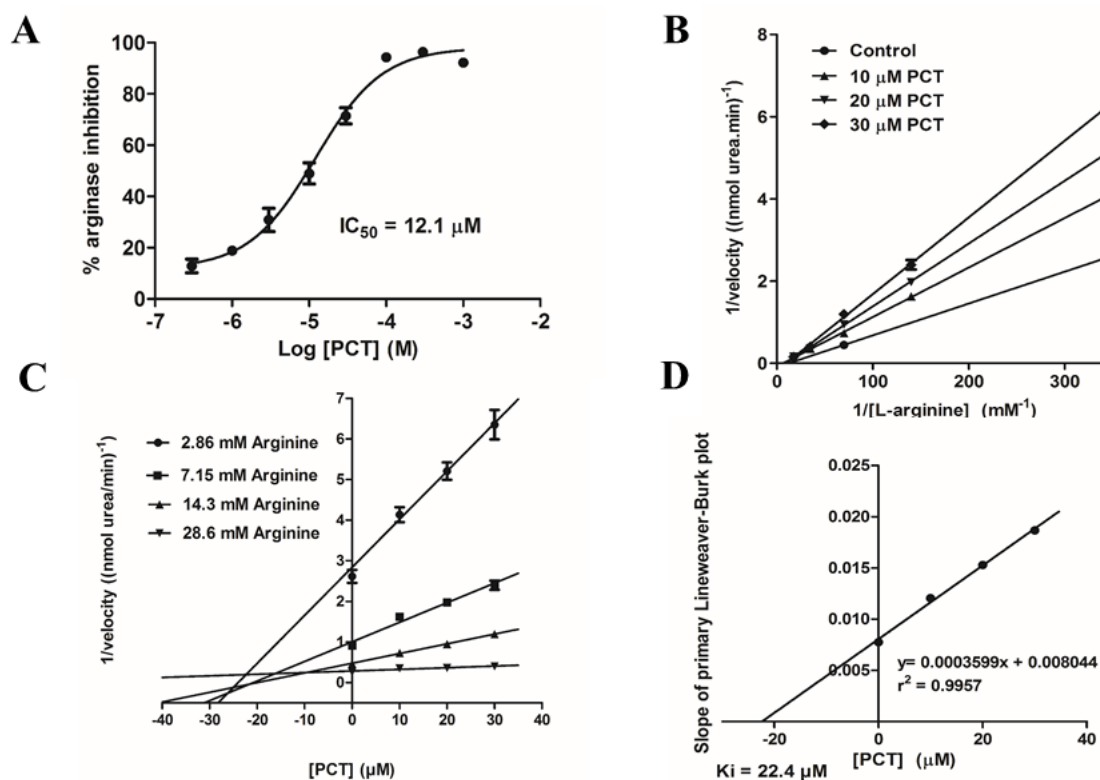


Figure 40 : Courbes de concentration-réponse de PCT. Pourcentage d'inhibition d'arginase à différentes concentrations de PCT (A) permettant de déterminer CI_{50} $12,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$. Les courbes de Dixon (C) et de Lineweaver-Burk (B, D) permettent de déterminer le type d'inhibition (compétitif) et K_i $22,4 \mu\text{M}$. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type ($n = 3$).

Nous avons ensuite réalisé des études de la cinétique enzymatique pour analyser le profil inhibiteur de ces deux polyphénols. Les courbes de Lineweaver-Burk et la courbe de Dixon nous ont conduit à identifier une inhibition de type compétitif à la fois pour ACG (Figure 39B, C) et pour PCT (Figure 40B, C). Les constantes de dissociation (K_i) déterminées graphiquement grâce à la courbe secondaire de Lineweaver-Burk étaient de $44,7 \mu\text{M}$ pour ACG (Figure 39D) et $22,4 \mu\text{M}$ pour PCT (Figure 40D).

Bien que ces deux composés aient montré une potentialité (CI_{50}) similaire, il est probable que PCT présente une plus grande affinité pour arginase que ACG. Nos résultats

concernant l'activité inhibitrice de PCT sont compatibles avec l'activité d'inhibition sur l'arginase précédemment publiée pour un glucoside de picéatannol, le picéatannol-3'-O- β -D-glucopyranoside. Ce composé, isolé à partir de racine de rhubarbe (*Rheum undulatum* L.) a en effet induit une inhibition de l'arginase de foie de rat avec une CI_{50} de 11 μ M [70].

Notre étude rapporte également un effet inhibiteur significatif sur l'arginase mammifère de l'ACG, un polyphénol omniprésent contenu dans plusieurs plantes alimentaires et médicinales [165,167]. Cependant, les deux éléments constitutifs de l'ACG, à savoir les acides caféique et quinique, ont montré une moins bonne activité ($CI_{50} = 86,7 \pm 0,7$ et $3060,0 \pm 0,7$ μ M, respectivement), par rapport à la molécule d'AGC entière ($CI_{50} = 10,6 \pm 0,8$ μ M). On remarque tout de même que le fragment de caféoylole ou 3,4-dihydroxycinnamoylole (acide caféique) présente une bien meilleure activité que l'acide quinique. Ce fragment est retrouvé à la fois dans la structure de PCT et de ACG, suggérant qu'il joue sans doute un rôle dans l'activité inhibitrice. Les résultats suggèrent que le motif caféoylole porté par une molécule plus longue que l'acide caféique pourraient présenter une activité inhibitrice plus importante que celui-ci. D'autres études telles que des simulations de docking ou expérimentations cristallographiques sont bien sûr nécessaires pour clarifier le mode de liaison de ce type de molécule à l'arginase. Par rapport à PCT et ACG, le resvératrol a été légèrement moins actif suggérant que la présence du groupe catéchol permettait d'augmenter l'activité inhibitrice. Pour confirmer l'importance de ce groupe catéchol, nous avons comparé l'activité inhibitrice de la série de flavonoïdes testés. Certains possèdent en effet cette fonction (épicatéchine, taxifoline, quercétine, fisétine) tandis que le kaempférol ne la porte pas. Les résultats (**Tableau VIII**) ont montré que l'absence d'un groupe catéchol, dans le cas du kaempférol, est associée à une diminution importante de l'activité inhibitrice. La CI_{50} est égale à 179 μ M pour le kaempférol alors que les CI_{50} les autres flavonoïdes s'échelonnent de 20 à 83 μ M). Les puissants inhibiteurs de l'arginase, tels que des dérivés d'acide boronique, comme par

exemple le BEC, ont tendance à se lier au groupe -OH coordonné au deux ions Mn^{2+} dans le site actif, puis à perturber la réaction enzymatique [15]. Par conséquent, il est possible que la fonction catéchol de ces polyphénols puisse établir, elle aussi, des liaisons avec les ions Mn^{2+} ou -OH dans le cluster binucléaire Mn^{2+} , et ainsi inhiber l'activité de l'arginase. Dans cette série de composés, d'autres éléments de relations structure activité ont pu être dégagés. La présence d'un groupe carbonyle en position 4 n'a pas influencé l'activité inhibitrice (CI_{50} épicatechine $19,9 \pm 0,7 \mu M$ vs taxifoline $23,2 \pm 0,7 \mu M$), tandis que l'insaturation de la liaison 2,3 a légèrement réduit l'activité inhibitrice (CI_{50} taxifoline $23,2 \pm 0,7 \mu M$ vs CI_{50} quercétine $31,2 \pm 0,9 \mu M$), de même que l'absence de groupe -OH en position 5 (quercétine $31,2 \pm 0,9 \mu M$ vs fisétine $82,9 \pm 0,7 \mu M$).

VI-1.3. Conclusion

En conclusion, cette présente étude a rapporté la potentialité inhibitrice de plusieurs polyphénols naturels sur l'arginase mammifère, y compris l'acide chlorogénique, le picéatannol, le resvératrol et l'épicatechine. L'évaluation a été effectuée en utilisant un nouveau test *in vitro*, simple et peu coûteux, nécessitant de petites quantités de b-ARG I purifiée disponible dans le commerce. Nos résultats ont identifié l'importance du fragment caféoyloyle ou (3,4-dihydroxycinnamoyloyle) et de la fonction catéchol dans l'activité inhibitrice des composés testés, apportant ainsi des caractéristiques utiles pour développer de nouveaux inhibiteurs d'arginase *via* une conception rationnelle.

L'ensemble de ces travaux fait l'objet d'un article original publié dans *Planta medica* [168]. Les courbes sigmoïdes de concentration-réponse ayant permis de déterminer les CI_{50} des polyphénols étudiés sont rassemblées dans l'**Annexe 2**.

VI-2. Modélisation moléculaire de b-ARGI et études de docking des polyphénols dans le site actif de l'enzyme

VI-2.1. Introduction

En parallèle des expérimentations *in vitro* sur b-ARG I, nous avons réalisé des études de docking afin d'expliquer au niveau moléculaire les interactions potentielles entre les molécules étudiées et le site actif de l'arginase. Les études *in silico* de docking moléculaire ont été réalisées en collaboration avec le Dr Thai Khac-Minh, du laboratoire de pharmacoinformatique de l'Université de Médecine et de Pharmacie de Hô Chi Minh-ville, au Viêt-Nam.

Les résultats des études de docking moléculaire *in silico* pourront nous permettre de compléter les résultats biologiques obtenus *in vitro*. Comme nous l'avons précédemment expliqué dans la partie de bibliographie, la réalisation d'études de docking nécessitent de disposer de la structure de l'enzyme en 3D, résolue par cristallographie. Cependant aucune structure cristallographique de la b-ARG I n'est disponible sur la banque de données de protéines (www.rcsb.org). Une solution alternative est de prédire une structure 3D de b-ARG I par homologie.

VI-2.2. Prédiction de la structure 3D de b-ARG I par homologie

Dans un premier temps, la séquence d'acides aminés de l'arginase I de *Bos taurus* (codées Q2KJ64) a été obtenue à partir de la base de données UniProt (www.uniprot.org). Un modèle 3D de b-ARG I a ensuite pu être créé par homologie de structure avec h-ARGI, dont la structure 3D cristallisée est décrite. Pour ce faire, le serveur TASSER I [152] a été utilisé. Celui-ci a convergé vers un seul modèle offrant des paramètres fiables [169].

L'alignement de la structure d'homologie prédite de b-ARG I avec la structure de h-ARG I (**Figure 41**) a ensuite été effectué grâce à la mise en œuvre du logiciel Sybyl-X 2.0 [170]. Celui-ci a montré une identité à 91,1% et un score RMSD (déviations de la racine de la moyenne des carrés) de 0,355 sur le C α . La plupart des résidus d'acides aminés essentiels pour l'activité hydrolytique de h-ARG I [2] tels que His101, Asp124, His126, Asp128, His141, Asp232, Asp234, Glu277 sont identiques dans la structure d'homologie de b-ARG I. Cette structure d'homologie de b-ARG I est donc prête pour réaliser des modélisations moléculaires par la suite.

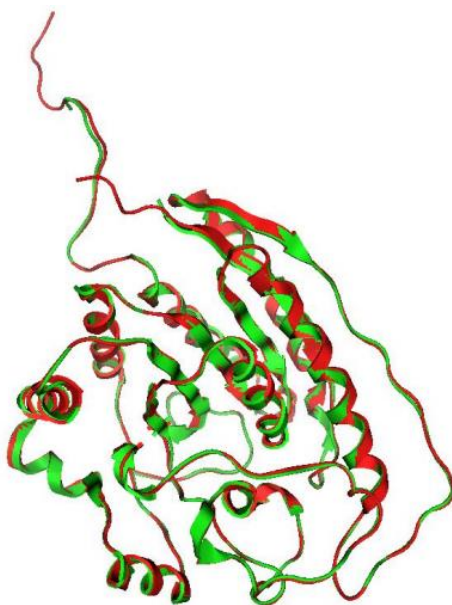


Figure 41 : Alignement de la structure de b-ARG I (en rouge) et h-ARG I (en vert) réalisé par le logiciel Sybyl X 2.0.

VI-2.3. Études de docking des polyphénols sur l'arginase

Le modèle d'homologie de b-ARG I créé précédemment nous a permis de réaliser des études de docking pour les polyphénols étudiés. Ces derniers ont été « dockés » avec succès dans le site actif de b-ARG I. Les scores de docking et les modes de liaisons sont présentés dans l'**Annexe 3**.

Les résultats de l'étude de docking de CGA ont confirmé que la fonction catéchol pouvait pénétrer dans le site actif de l'enzyme. En effet, les modes de liaison, observés en 2D et 3D (**Figure 42**), ont bien montré les interactions hydrogènes entre CGA et les résidus His126, Asp232 dans le cluster de manganèse. Le fragment quinoylé, quant à lui, interagit avec les résidus Asp181 et Thr246 au niveau de la « bouche » de la poche formée par le site catalytique de b-ARG I, aidant ainsi le fragment caféoylé à se rapprocher de la profondeur du site actif.

Des résultats similaires ont été obtenus pour PCT (**Figure 43**), dont la fonction catéchol pénètre dans la profondeur de la poche active. Les prédictions montrent des interactions avec des acides aminés importants tels que His101, His126 et Asp232. Ainsi, les résultats *in silico* et *in vitro* ont suggéré que la présence du fragment 3,4-dihydroxycinnamoylé dans les structures de ACG et PCT est importante pour l'activité inhibitrice de ces molécules.

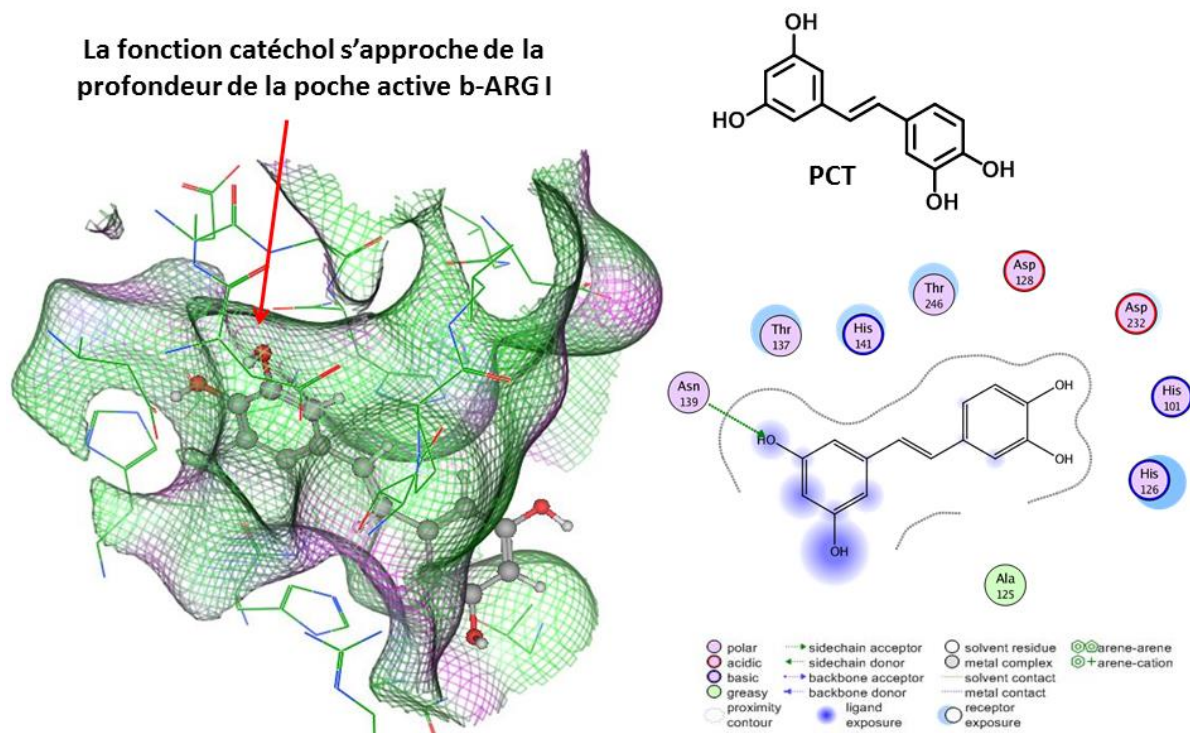


Figure 43 : Modes de liaison en 3D (à gauche) et 2D (à droite) de PCT dans le site actif de b-ARG I. Pour le mode de liaison 3D, CGA est représenté sous forme "boule et bâton": C (gris), O (rouge), H (blanc); les résidus essentiels du site de liaison sont représentés par des lignes. Les modélisations moléculaires ont été réalisées par le programme FlexX dans le logiciel LeadIt 2.0.2 [153] et les images ont été créées par le logiciel MOE 2008.10 [171].

Cependant, la structure 3D de b-ARG I prédite par homologie avec h-ARG I ne présente pas de manganèse dans le site actif. Les résultats obtenus ne nous ont, par conséquent, pas permis de montrer les potentielles interactions entre les molécules testées et les ions Mn^{2+} . En revanche, comme nous l'avons précédemment présenté, il y a une identité élevée entre la structure de h-ARG I et b-ARG I, surtout au niveau des acides aminés au site actif qui sont strictement conservés. Ce sont les raisons pour lesquelles, pour aller plus loin,

nous avons essayé de réaliser certaines modélisations moléculaires sur h-ARG I pour les composés les plus actifs. Effectivement, les modes de liaison de ACG dans le site actif de h-ARG I (PDP ID: 3kv2) (**Figure 44**) ont confirmé que le fragment quinoylé peut interagir avec les résidus de la bouche de la poche catalytique de h-ARG I, et orientent le fragment caféoylé de ACG qui peut pénétrer dans la profondeur du site actif et interagir avec les résidus Asp124, Asp232 et Asp234 par des interactions hydrogènes, ainsi qu'avec His141 via une interaction π -cation. Il est, par ailleurs, très intéressant de noter que la fonction catéchol pourrait chélater les ions Mn^{2+} dans le site actif de l'arginase (**Figure 44**). Ces résultats soutiennent les résultats précédemment obtenus par les tests biologiques, et confirment à nouveau l'importance du motif 3,4-dihydroxycinnamoylé et de la fonction catéchol pour l'activité inhibitrice de la molécule.

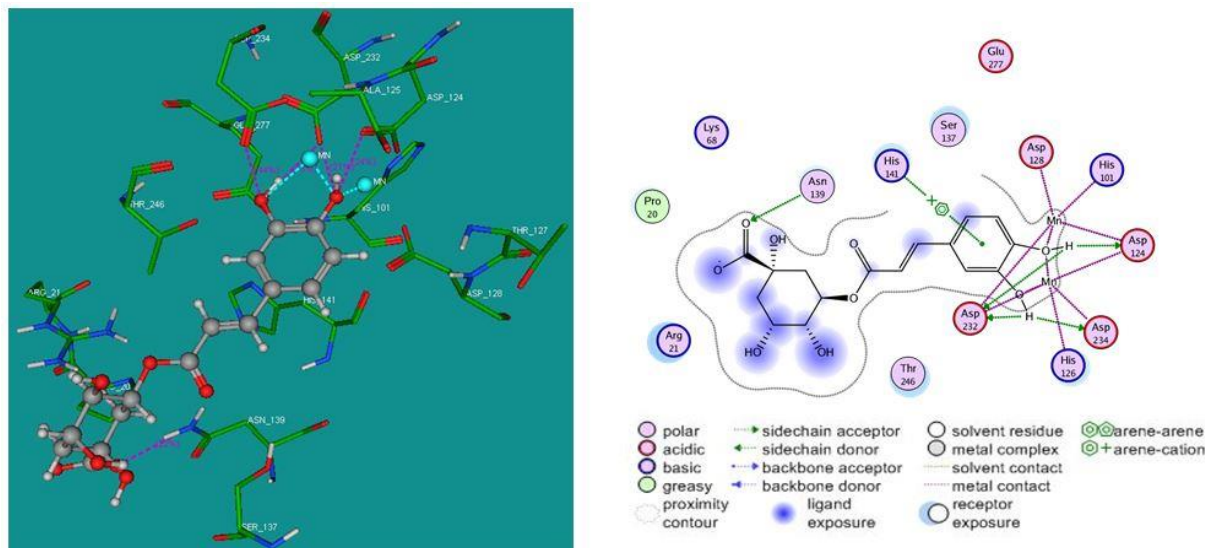


Figure 44 : Modes de liaison en 3D (à gauche) et 2D (à droite) de ACG dans le site actif de h-ARG I (PDP ID: 3kv2). Pour le mode de liaison 3D, ACG est représenté sous forme "boule et bâton": C (gris), O (rouge), H (blanc); les ions manganèse sont représentés sous forme de sphères couleur cyan; les résidus essentiels du site de liaison sont représentés par des lignes. Les liaisons d'hydrogène sont représentées sous forme des lignes en pointillés rose, alors que les coordinations métalliques sont représentées par des lignes cyan, en pointillés. Les

modélisations moléculaires ont été réalisées par le programme FlexX dans le logiciel LeadIt 2.0.2 [153] et les images ont été créées par le logiciel MOE 2008.10 [171].

VI-2.4. Conclusion

Au cours de ces travaux nous avons créé une structure 3D de b-ARG I par homologie avec la structure de h-ARG I. Les études de docking sur b-ARG I et h-ARG I ont été réalisées pour les deux produits naturels les plus actifs (PCT et ACG). Les modes de liaison de ces deux polyphénols avec les sites actifs de b-ARG I et de h-ARG I nous ont montré que le motif de 3,4-dihydroxycinnamoyle pourrait pénétrer profondément dans la poche catalytique, alors que la fonction catéchol était capable de chélater les ions Mn^{2+} dans le cluster binucléaire, qui joue un rôle indispensable dans le mécanisme hydrolytique de l'arginase. Ces résultats suggèrent que les dérivés de 3,4-dihydroxycinnamoyles constituent des structures prometteuses pour l'inhibition de l'activité d'arginase.

Chapitre VII : Synthèse et évaluations in vitro et in silico de l'activité inhibitrice des dérivés amides de l'acide caféique sur l'arginase mammifère

VII-1. Etudes de dérivés amides de l'acide caféique

La partie bibliographique de ce travail nous a permis de constater qu'à ce jour, il y a un nombre limité d'inhibiteurs synthétiques de l'arginase disponibles dans le commerce, tels que nor-NOHA, BEC et ABH. Nous avons également relevé qu'il existe encore plusieurs freins à une utilisation de ces molécules en thérapeutique: une faible biodisponibilité et une toxicité potentielle (BEC, ABH) [60] une demi-vie trop courte (nor-NOHA) [46], ou leur coût élevé [172]. Considérant que le développement d'inhibiteurs de l'arginase est d'une grande pertinence thérapeutique dans diverses maladies humaines, des recherches ont été entreprises dans le but de développer des pro-drogues de NOHA [173], d'optimiser ABH en substituant la fonction acide aminé C α [24,58,59,174], ou de remplacer la fonction acide boronique [54–57]. En parallèle, les plantes ont été identifiées comme une source potentielle d'inhibiteurs d'arginase [13]. Cependant, la démarche d'hémisynthèse n'a encore jamais été utilisée pour la conception et le développement de nouveaux inhibiteurs de l'arginase [13]. Dans le cadre de notre projet de recherche visant à développer des inhibiteurs de l'arginase mammifères inspirés par des molécules naturelles, nous avons précédemment rapporté que l'acide chlorogénique (AGC) possède un effet inhibiteur intéressant sur b-ARG I [142,168]. Ce dernier est un ester entre l'acide caféique et l'acide quinique, et comme indiqué précédemment, la partie caféoyloyle est probablement impliquée de façon plus significative pour l'inhibition de l'arginase [142,168]. Par ailleurs, il est intéressant de noter que certains dérivés de l'acide caféique ont précédemment montré un bon effet antioxydant et une inhibition importante sur la tyrosinase, une autre métalloenzyme [175–179]. L'arginase étant aussi une

métalloenzyme, il nous a semblé intéressant d'évaluer l'effet inhibiteur de dérivés de l'acide caféique sur l'arginase. Dans cet esprit, les travaux suivants du projet de thèse ont porté sur la synthèse d'une série de dérivés cinnamides, ainsi que leur évaluation biologique sur b-ARG I purifiée (**Figure 45**).

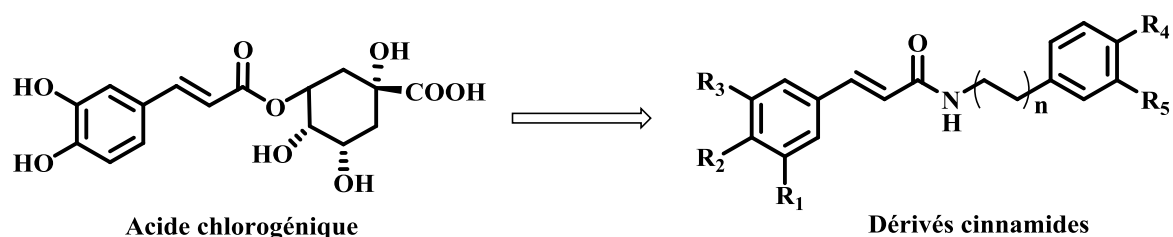


Figure 45 : Conception rationnelle de dérivés cinnamides inspirés par ACG.

En outre, des études de cinétique enzymatique et de docking moléculaire ont été effectuées sur les composés les plus actifs et pour analyser le mécanisme d'inhibition ainsi que les interactions entre la molécule et le site actif. Les résultats obtenus ont été comparés aux résultats obtenus avec ACG.

VII-1.1. Synthèse chimique des dérivés cinnamides

Les dérivés cinnamides ont été synthétisés à l'aide de sels de phosphonium en tant que réactifs de condensation par un mode opératoire adapté de Okombi *et al.* [180]. Le protocole de synthèse a été modifié par le remplacement du benzotriazol-1-yloxytris (diméthylamino)-phosphonium (BOP) par le benzotriazol-1-yloxytri (pyrrolidino)-phosphonium (PyBOP) [181] afin d'éviter l'apparition du produit secondaire cancérigène issu de la réaction de couplage, l'hexaméthylphosphorotriamide (HMPA) [182]. La liaison amide a été formée en mélangeant l'acide carboxylique libre avec une variété de composés aminés en présence de

PyBOP et de triéthylamine (Et_3N) dans un mélange des solvants diméthylformamide (DMF) et dichlorométhane (CH_2Cl_2) (**Figure 46**).

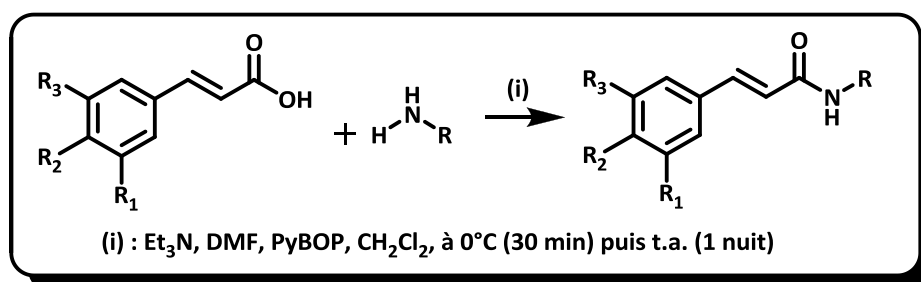


Figure 46 : Procédure générale de synthèse des dérivés cinnamides. Réactifs et conditions : PyBOP, DMF, Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C (30 min) puis à température ambiante (t.a.) (1 nuit).

Au niveau du mécanisme réactionnel, l'acide carboxylique déprotoné réagit d'abord avec PyBOP pour produire les espèces acylphosphonium activé et hydroxybenzotriazole (HOBt). Ensuite, HOBt réagit avec l'acide activé pour former un ester de benzotriazole, qui subit finalement une aminolyse (**Figure 47**) [183].

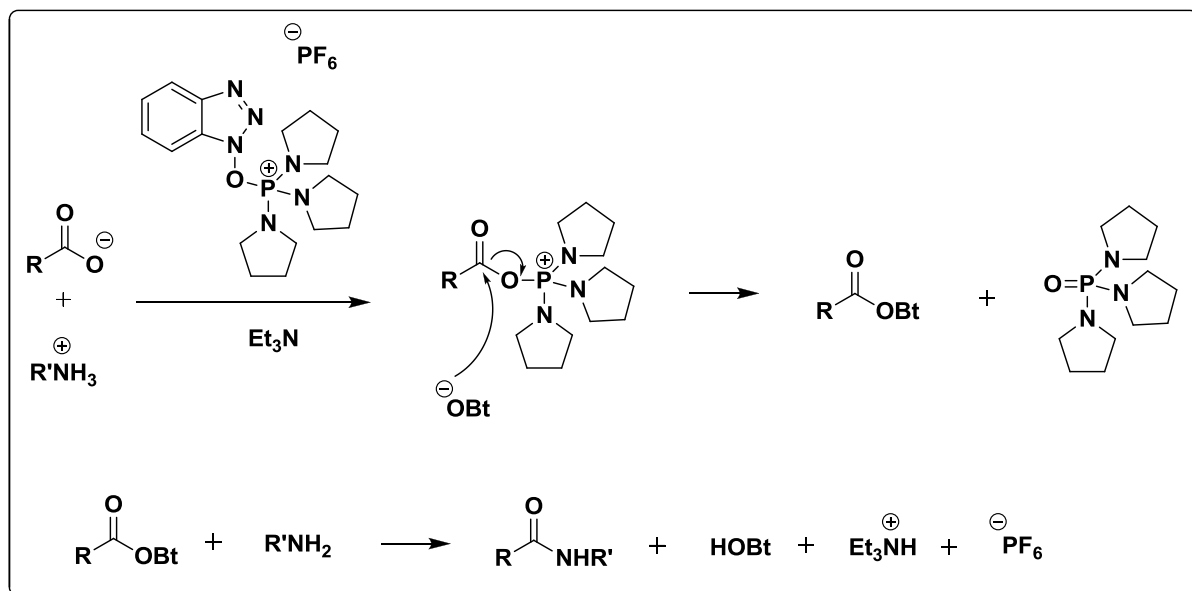
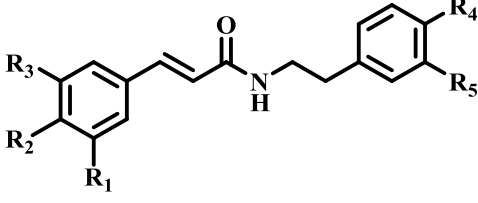
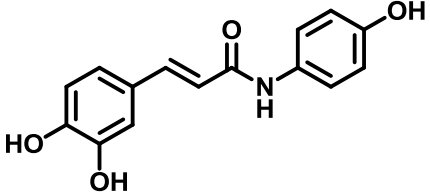
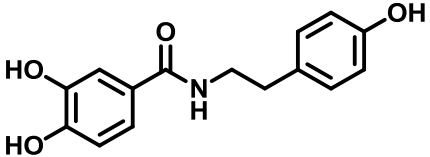
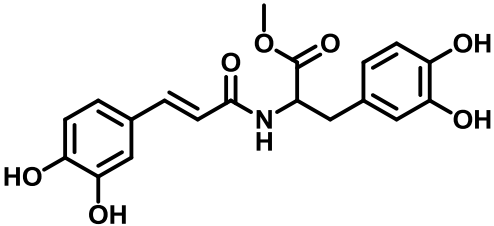
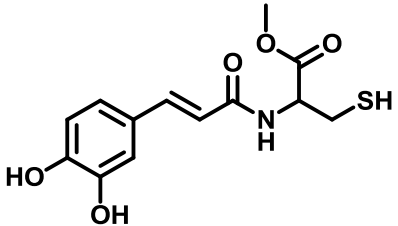
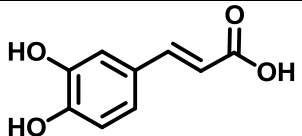
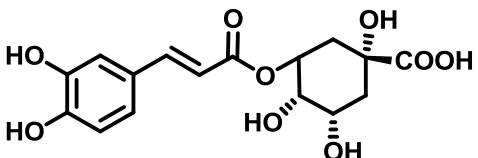
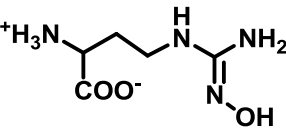


Figure 47 : Mécanisme de l'amidation utilisant PyBOP.

Cependant, un inconvénient majeur de cette procédure est que le triamide d'acide tripyrrolidinophosphoric (TPPA), un produit secondaire dérivé de PyBOP, est plus visqueux et moins polaire que HMPA, et il présente de plus un point d'ébullition plus élevé, rendant plus difficile son élimination à la fin de la réaction et par la même, la purification des dérivés cinnamides. Ceci a conduit à des rendements faibles pour certains produits désirés [182]. Dix-neuf dérivés cinnamides ont été synthétisés avec succès avec des rendements s'échelonnant de 19% à 98% (**Tableau IX**).

Tableau IX : Structures des dérivés cinnamide et leur potentialité inhibitrice sur b-ARG I.

Composé						Rendement (%)	%Inhibition b-ARGI ^a à 100 µM	CI ₅₀ ^b (µM)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅			
44	OH	OH	H	H	H	45	64 ± 2	6,9 ± 1,3
45	OCH ₃	OH	H	H	H	79	37 ± 4	n.d. ^c
46	H	OH	H	H	H	65	31 ± 4	n.d.
47	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	90	35 ± 2	n.d.
48	H	H	H	H	H	79	34 ± 2	n.d.
49	OH	OH	H	OH	H	72	58 ± 2	22,1 ± 1,6
50	OCH ₃	OH	H	OH	H	57	24 ± 2	n.d.
51	H	OH	H	OH	H	50	40 ± 2	n.d.
52	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	98	30 ± 2	n.d.
53	H	H	H	OH	H	81	34 ± 3	n.d.
54	OH	OH	H	OH	OH	44	62 ± 3	114,9 ± 1,3
55	OCH ₃	OH	H	OH	OH	30	61 ± 3	198,7 ± 1,4
56	H	OH	H	OH	OH	41	54 ± 1	170,4 ± 1,7
57	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	70	53 ± 1	193,6 ± 1,4

58	H	H	H	OH	OH	62	68 ± 3	39,3 ± 1,4
59						19	59 ± 1	35,6 ± 1,3
60 ^d						12	52 ± 2	175,3 ± 1,5
61						54	62 ± 1	41,9 ± 1,3
62						10	67 ± 1	37,0 ± 1,3
acide caféique (42)						-	61 ± 4	86,7 ± 8,0
ACG (28)						-	71 ± 1	10,6 ± 1,6
nor-NOHA ^e (5, référence)						-	99 ± 1	1,7 ± 0,2

^aLes valeurs ont été obtenues à partir de trois expérimentations distinctes réalisées chacune en duplicata.

^bCI₅₀: Concentration inhibitrice médiane, obtenue à partir de trois expérimentations distinctes réalisées chacune en duplicata

^cn.d: non déterminé.

^jLe composé **60** a été préparé à partir de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque.

^eN⁰-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA): composé synthétique utilisé comme inhibiteur de référence.

VII-1.2. Evaluation de l'activité inhibitrice des dérivés cinnamides sur b-ARG I

La structure de (*E*)-N-(2-phényléthyl)-3,4-dihydroxycinnamide (composé **44**) ou phénylamide d'acide caféique (CAPA) a été choisie comme structure de base (**Tableau IX**) dans cette étude. Par la suite, les composés **45-62** ont été synthétisés pour étudier l'impact, sur l'effet inhibiteur d'arginase mammifère, des groupes hydroxyles en différentes positions sur les deux noyaux aromatiques, et de leurs substitutions par des groupements méthyle. Les composés **59** et **60** ont été synthétisés pour évaluer la contribution de la double liaison du fragment caféoyl et de la simple liaison du fragment phénéthylamine. Le composé **61** a été synthétisé pour explorer l'effet d'un groupe méthylcarboxylate sur le fragment phénéthylamine. Enfin, pour évaluer l'importance du noyau aromatique dans le fragment phénéthylamine, il a été remplacé par un groupe sulfhydryle (composé **62**). Les structures de ces composés ont été confirmées par RMN, HRMS (ESI), spectre IR et par comparaison avec la littérature. Les structures sont présentées dans le **Tableau IX**. Les données analytiques des nouveaux composés sont présentées dans **Annexe 1**.

L'activité inhibitrice sur b-ARG I a été évaluée en utilisant le test *in vitro* optimisé précédemment à partir du protocole de Corraliza *et al.* (1994) [124]. Dans cette partie de nos travaux, nous avons utilisé un autre inhibiteur de référence, la N^ω-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA), ainsi que l'ACG, substance naturelle de référence ayant inspiré ces travaux d'hémisynthèse.

Tel qu'indiqué dans le **Tableau IX**, onze des composés étudiés ont présenté une inhibition de l'arginase supérieure à 50% à 100 µM. Les valeurs de CI₅₀ de ces composés ont été ensuite déterminées grâce au tracé des courbes sigmoïdes (cf **Annexe 2**) pour analyser les relations structure-activité (RSA). Il est à noter que ces onze composés portent un groupe catéchol, soit sur le cinnamoyle (**44**, **49**, **59** et **62**) ou le benzoyle (**60**), soit sur la partie phénéthyle (**55-58**), ou soit des deux côtés (**54** et **61**). Il apparaît que la suppression ou la méthylation de l'un ou

des deux groupes hydroxyles de la fonction catéchol conduit à une diminution sévère de l'activité inhibitrice d'arginase (**44** vs **45-48**). Notons que notre démarche d'hémisynthèse a conduit à une amélioration de l'activité inhibitrice initiale. En effet, le composé **44**, le phénylamide d'acide caféique (CAPA), a montré une valeur CI_{50} de $6,9 \pm 1,3 \mu M$ (**Figure 49 :A**). Cette valeur reste néanmoins encore supérieure à celle de l'inhibiteur synthétique de référence nor-NOHA ($CI_{50} = 1,7 \pm 0,2 \mu M$). D'un point de vue des relations structure-activité (RSA), la fonctionnalisation de la partie phénéthylque de **44** par un (composé **49**) ou deux (composé **54**) groupes hydroxyles a diminué l'activité. Mais dans le cas où la partie cinnamoyle est non substituée, l'inhibition a été partiellement restaurée par la présence d'un groupe catéchol sur l'autre partie phénéthylque (**58** vs **54**). Ce résultat confirme le rôle important de la fonction catéchol de ce type de composés pour l'activité inhibitrice d'arginase. Une réduction de la longueur de la molécule en supprimant une liaison soit du côté caféoyloyle, soit du côté de phénéthyle a également diminué l'activité (**49** vs **59, 60**). Mais l'intégrité de la partie cinnamoyle semble être plus importante que celle de la partie phénéthyle. Un groupe méthylcarboxylate en position 1 du fragment phénéthylamine a amélioré l'activité inhibitrice (**61** vs **54**), tandis que le remplacement du cycle aromatique du fragment phénéthylamine par un groupe sulfhydryle a eu peu d'effet sur l'activité inhibitrice (**61** vs **62**), ce qui suggère que des interactions non spécifiques ont probablement lieu entre cette partie et la bouche du site actif (**Figure 48**). Par conséquent, des pharmacomodulations sur cette position pourraient augmenter l'affinité de la molécule vers le site actif.

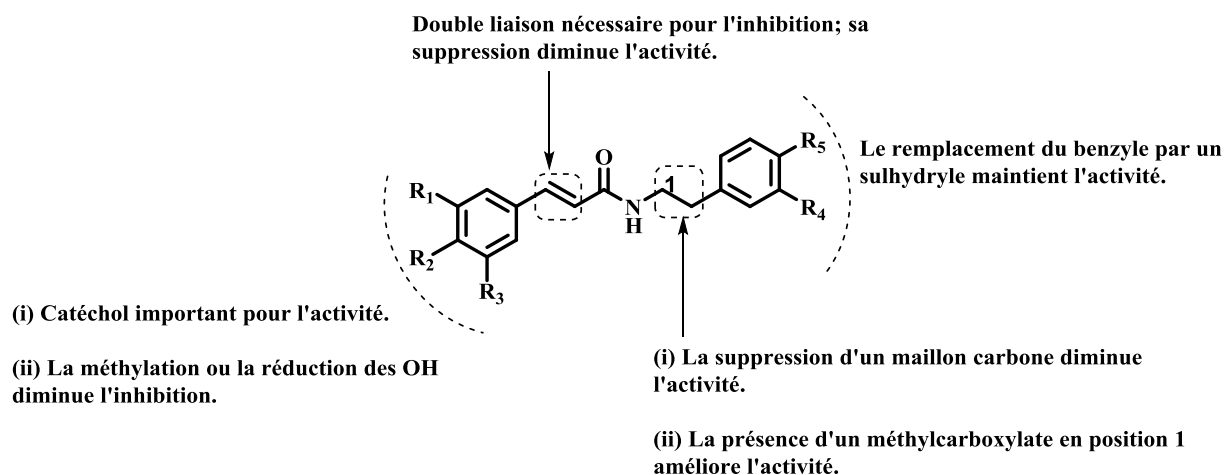


Figure 48 : Relations structure-activité (RSA) des dérivés de cinnamides sur b-ARG I.

VII-1.3. Etudes de la cinétique enzymatique de CAPA (44) sur b-ARG I

Le mécanisme d'inhibition et la constante d'inhibition (K_i) du CAPA (44), le composé le plus actif de la série des cinnamides étudiés, a été évalué par des études de la cinétique enzymatique. Les données cinétiques récoltées ont été utilisées pour générer les courbes de Lineweaver-Burk, de Dixon et de Cornish-Bowden (**Figure 49 :B-D**), qui nous ont permis de déterminer que CAPA était un inhibiteur compétitif [108].

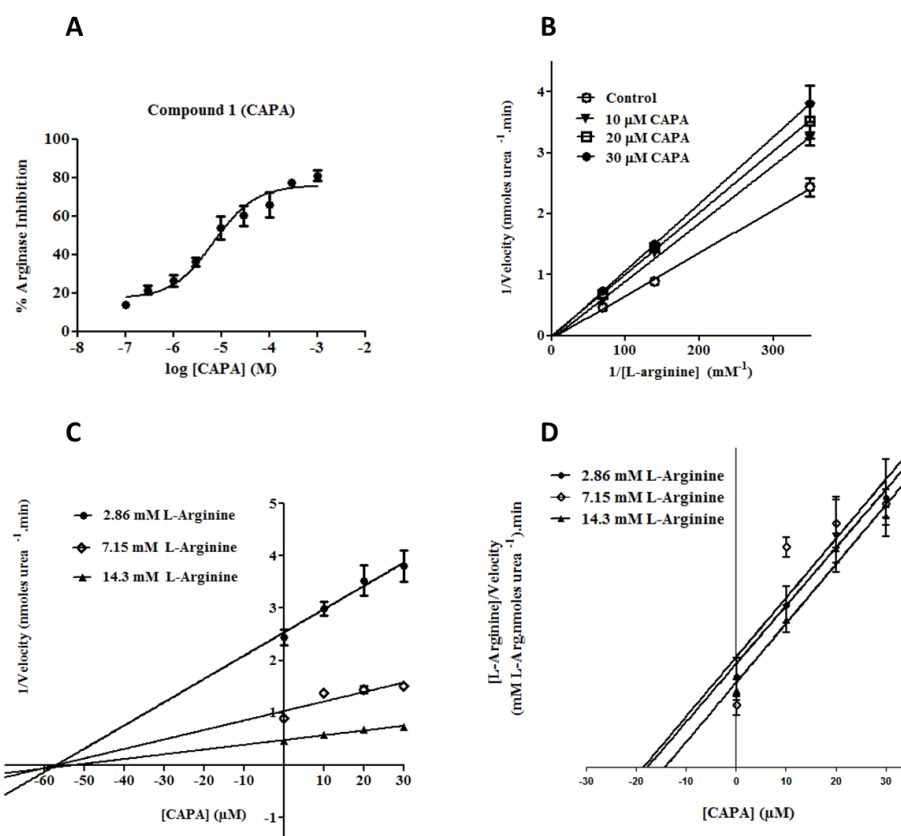


Figure 49 : Cinétique de l'inhibition d'arginase par **44** (CAPA). La CI_{50} a été déterminée à partir d'une courbe sigmoïde (A). Le mécanisme d'inhibition compétitive a été déterminé par l'analyse des tracés de Lineweaver-Burk (B), de Dixon (C) et de Cornish-Bowden (D). Pour les études cinétiques, la L-arginine a été utilisée à des concentrations de 2,86, 7,15 et 14,3 mM; et les concentrations de **44** étaient de 10, 20, 30 μM. Chaque point dessiné représente la moyenne de trois expérimentations indépendantes chacune réalisées en triplicata.

La cinétique à l'état stable de b-ARG I nous a donné la constante de Michaelis-Menten de b-ARG I, $K_m = 55,5 \pm 10,5 \mu M$ [168]. Pour déterminer la CI_{50} de CAPA, une concentration de L-arginine de 14,3 mM a été utilisée. Les valeurs de K_i pour CAPA, ACG et nor-NOHA peuvent alors être calculées grâce à l'équation de Cheng-Prusoff [$K_i = CI_{50} / (1 + [S] / K_m)$] [111] (Tableau X).

Tableau X : Comparaison des valeurs de K_i pour l'inhibition d'arginase par CAPA, ACG et nor-NOHA.

Inhibiteur	K_i (μM)	Type d'inhibition
CAPA (44)	$5,5 \pm 1,0$	Competitive
ACG	$8,4 \pm 1,2$	Competitive
nor-NOHA	$1,3 \pm 0,1$	Competitive

L'affinité *in vitro* de CAPA est meilleure que ACG (K_i $5,5 \pm 1,0$ vs $8,4 \pm 1,2$ μM , respectivement). Durant ces dernières années, plusieurs groupes chimiques ciblant le cluster bimanganese ont été identifiés. Et l'affinité *in vitro* de CAPA est similaire à celle décrite pour les dérivés d'aminé imidazole [56], et meilleure que celle des dérivés thiosemicarbazides [18], sulfamides [54], nitro [57] et aldéhydes [55] qui ont montré des K_i supérieure à 50 μM . Les cinnamides étudiés peuvent donc être ajoutés à cette liste, et semblent être prometteurs pour la conception de nouveaux inhibiteurs à venir.

VII-1.4. Modélisation moléculaire (études de docking) de CAPA (**44**) sur arginase

En tant que composé le plus actif de la série des dérivés cinnamides étudiés, CAPA (**44**) (CI_{50} $6,9 \pm 1,3$ μM) a été soumis à une étude de docking pour évaluer les interactions potentielles de ce candidat avec le site actif de l'arginase. Les résultats obtenus du modèle de b-ARG I (**Figure 50**) ont montré que le motif 3,4-dihydroxycinnamoyle peut pénétrer dans la profondeur de la poche catalytique de b-ARG I, et la fonction catéchol peut interagir avec certains résidus importants tels que His101, Asp124, Ala125, Asp128, Asp232 et His126. En outre, le fragment phénéthyle reste au niveau de la bouche de la poche active et pourrait interagir avec des acides aminés situés à ce niveau tels que Arg21, Gly245 et Asn139.

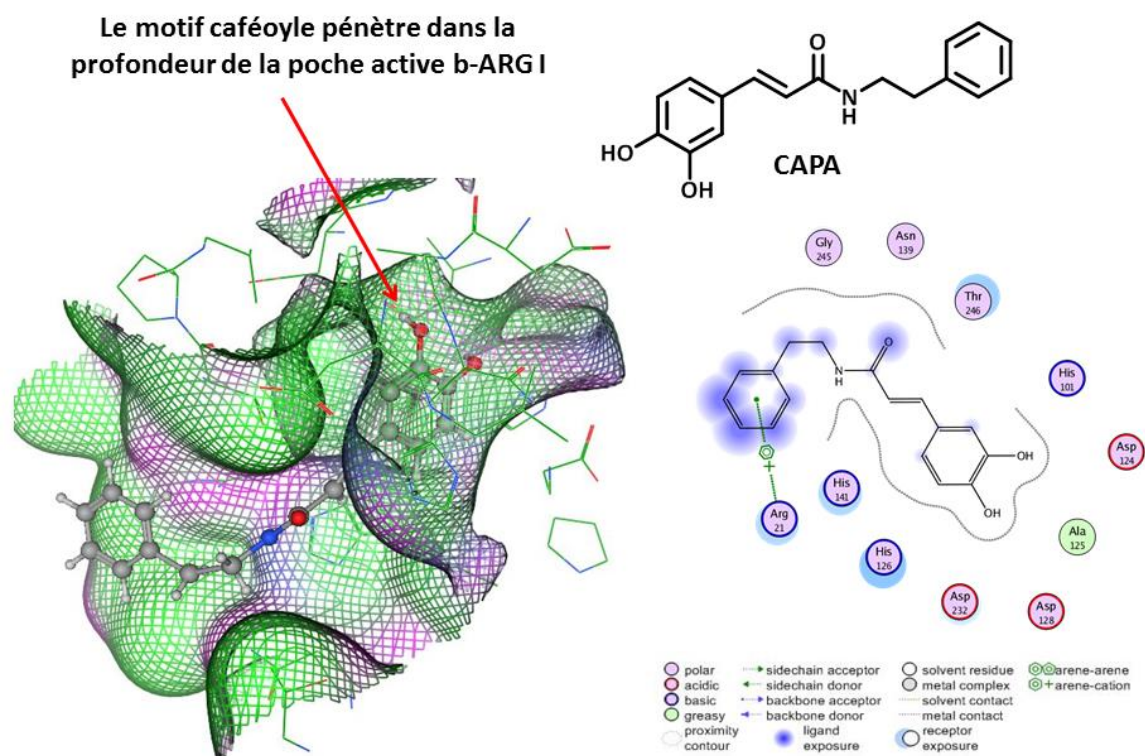


Figure 50 : Modes de liaison en 3D (à gauche) et 2D (à droite) de CAPA dans le site actif de b-ARG I. Pour le mode de liaison 3D, CAPA est représenté sous forme "boule et bâton": C (gris), O (rouge), H (blanc); les résidus essentiels du site de liaison sont représentés par des lignes. Les modélisations moléculaires ont été réalisées par le programme FlexX dans le logiciel LeadIt 2.0.2 [153] et les images ont été créées par le logiciel MOE 2008.10 [171].

Pour obtenir d'avantage d'informations sur l'interaction entre CAPA et l'arginase humaine, nous avons « docké » cette molécule dans le site actif de h-ARG I. Les résultats sont similaires à ceux de b-ARG I. Notamment, les modes de liaison en 3D et 2D nous ont montré que la fonction de CAPA pourrait interagir avec les cofacteurs Mn^{2+} , former des interactions hydrogène avec Asp234 et Thr246, ainsi que des interactions π - π avec His141 et His126

(**Figure 51**). Le fragment phénéthyl se place à l'entrée du site actif et établit des interactions hydrophobes avec des acides aminés autour de la bouche.

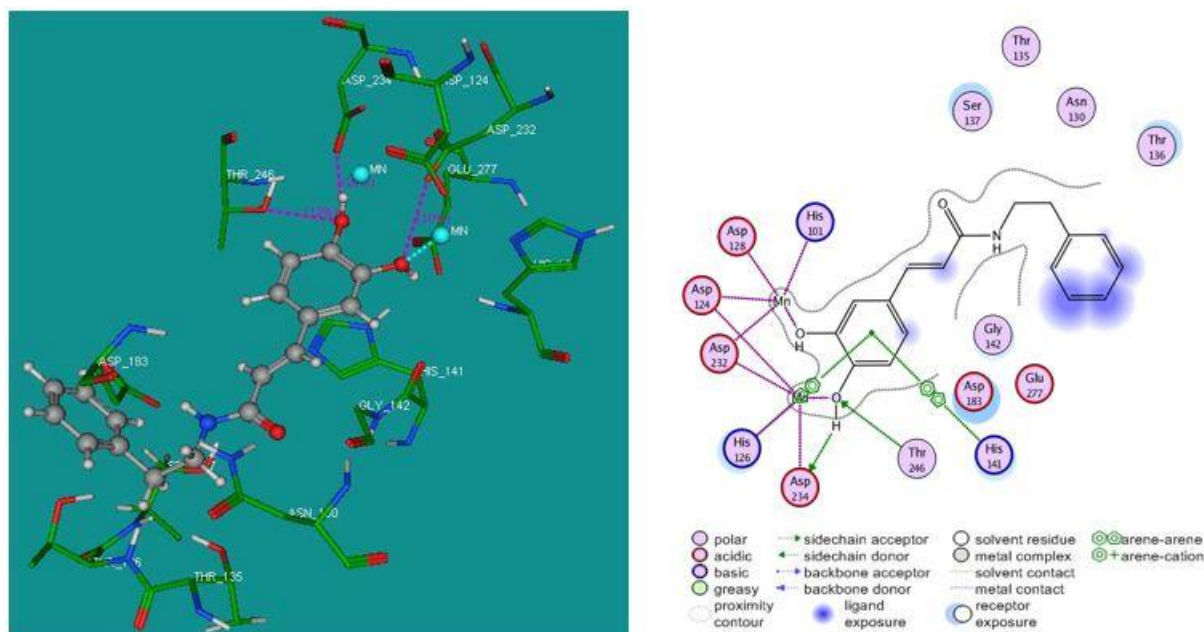


Figure 51 : Modes de liaison en 3D (à gauche) et 2D (à droite) de CAPA dans le site actif de h-ARG I. Pour le mode de liaison 3D, CAPA est représenté sous forme "boule et bâton": C (gris), O (rouge), H (blanc); les ions manganèse sont représentés sous forme de sphères couleur cyan; les résidus essentiels du site de liaison sont représentés par des lignes. Les liaisons hydrogène sont représentées sous forme des lignes en pointillés rose, alors que les coordinations métalliques sont représentées par des lignes en pointillés cyan. Les modélisations moléculaires ont été réalisées par le programme FlexX dans le logiciel LeadIt 2.0.2 [153] et les images ont été créées par le logiciel MOE 2008.10 [171].

En outre, il est intéressant de remarquer que le composé **58** a montré une position opposée par rapport à CAPA dans la façon de se fixer au site actif de l'arginase (**Figure 52**). En effet, le fragment cinnamoyle non substitué est resté à l'entrée de la poche catalytique de b-ARG I, alors que la partie phényléthylamine portant le groupe catéchol pénètre dans la profondeur de la poche (**Figure 52**). Ces modes de liaison opposés ont confirmé l'hypothèse

d'un rôle crucial de la fonction catéchol pour l'inhibition de l'arginase, et clairement expliqué pourquoi l'activité *in vitro* a été récupérée en partie pour le composé **58** malgré le fait que fragment cinnamoyle ne soit pas fonctionnalisé.

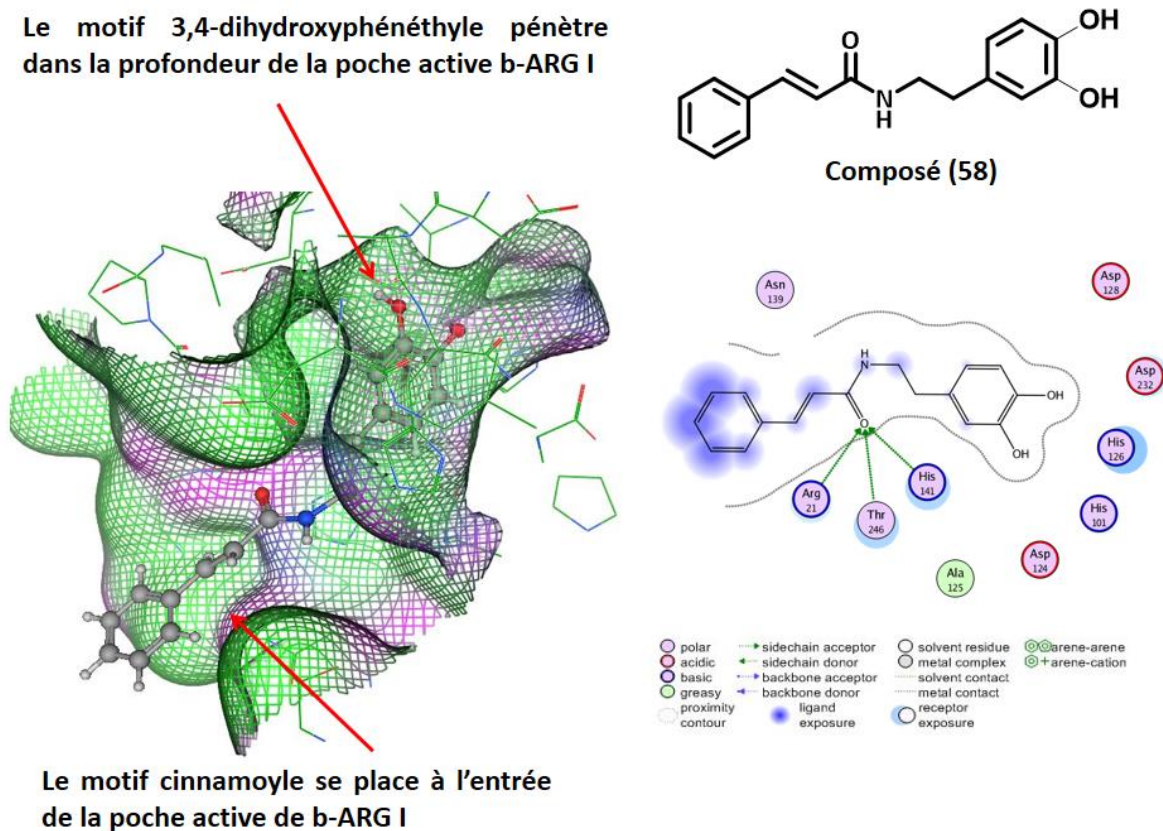


Figure 52 : Modes de liaison en 3D (à gauche) et 2D (à droite) de **58** dans le site actif de b-ARG I. Pour le mode de liaison 3D, **58** est représenté sous forme "boule et le bâton": C (gris), O (rouge), H (blanc); les résidus essentiels du site de liaison sont représentés par des lignes. Les modélisations moléculaires ont été réalisées par le programme FlexX dans le logiciel LeadIt 2.0.2 [153], et les images ont été créées par le logiciel MOE 2008.10 [171].

VII-I.5. Conclusion

Dix-neuf dérivés cinnamides ont été synthétisés et évalués pour leur capacités inhibitrices sur b-ARG I. Dans cette étude, la nor-NOHA et l'acide chlorogénique (ACG) ont été utilisés comme inhibiteurs de référence, respectivement synthétique et naturel. Parmi les composés étudiés, ACG et six cinnamides ont montré une CI_{50} inférieure à 50 μM . Le phénéthylamide d'acide caféique (CAPA, composé **44**) a été le plus actif de cette série, avec une valeur d' IC_{50} de 6,9 μM . L'objectif a donc été atteint avec l'obtention d'un composé plus actif que l'ACG qui a inspiré sa conception. L'évaluation de l'activité inhibitrice de composés sur b-ARG I est un modèle intéressant à plusieurs niveaux puisque, d'une part, il permet une évaluation rapide sur une arginase mammifère purifiée et d'autre part, que cette enzyme est beaucoup moins onéreuse que h-ARG. Cependant, il est évident que cette approche devra être complétée par des évaluation sur h-ARG I /II avant d'aller plus loin avec des études *in vivo*. Des études de cinétique enzymatique effectuées sur b-ARG I ont montré que le composé CAPA est de type inhibiteur compétitif. La modélisation moléculaire a indiqué que le motif caféoyl pourrait pénétrer dans le site actif de ARG-I afin de chélater le cofacteur Mn^{2+} et interagir avec des résidus importants et bien conservés du site catalytique de l'arginase, tels que Asp124, His126, His141, Asp232, Asp234, et Thr246. Ce pourrait être la raison pour laquelle CAPA a perturbé l'activité enzymatique de l'arginase. En résumé, nos résultats ont montré, pour la première fois le rôle important du fragment caféoyl dans le site actif de l'arginase.

L'ensemble des résultats obtenus sur ce volet hémisynthèse de cinnamides est publié dans le journal « *International Journal of Molecular Sciences* » [184].

Chapitre VIII : Etudes de dérivés d'esters de l'acide caféique

VIII-1. Synthèse chimique et évaluation de l'activité inhibitrice de dérivés esters de l'acide caféique

VIII-1.1. Introduction

Les résultats biologiques obtenus avec les dérivés amides de l'acide caféique nous ont encouragés à étudier l'effet inhibiteur de dérivés ester de l'acide caféique. Prenant en compte que le composé le plus actif de la série des cinnamides étudiés est CAPA (**44**), nous avons décidé de synthétiser et d'évaluer dans un premier temps le composé **63** (caffeic acid phenyl ester, CAPE) qui a une structure similaire à celle de CAPA (**Tableau XI**). Ensuite, pour évaluer l'effet de la présence d'un groupe hydroxyle et de la suppression d'une liaison sur le motif phénéthyl pour l'inhibition d'arginase, nous avons synthétisé les composés **64** et **65**, respectivement (**Tableau XI**).

VIII-1.2. Résultats et discussion

L'ester **63** a été synthétisé en utilisant le protocole précédemment publié par Appendino *et al.* [185] et reposant sur la réaction de Mitsunobu [186] (**Figure 53**). En effet, cette réaction a montré des avantages pour des substitutions nucléophiles directement sur le groupe –OH des alcools, et elle est efficace pour une estérification chimiosélective des alcools polyphénoliques et des acides phénoliques [185]. De plus, cette méthode de synthèse nous a permis d'obtenir les esters désirés en une seule étape et sans nécessiter de passage par des intermédiaires portant des groupes de protection [185] (**Figure 53**).

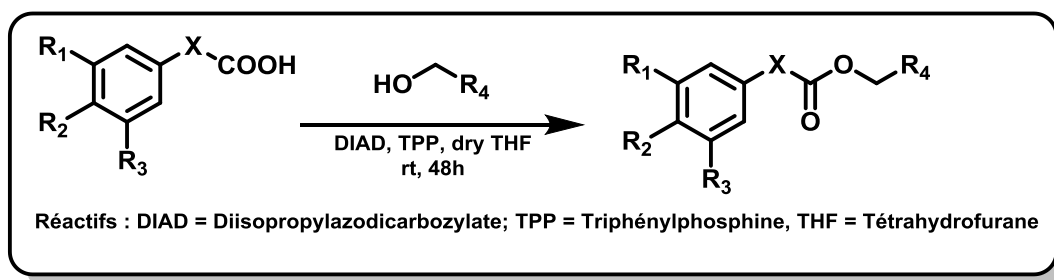


Figure 53 : Procédure générale de synthèse des dérivés esters de l'acide caféique par la réaction de Mitsunobu [185]. Réactifs et conditions : DIAD, TPP, THF sec, 0°C (10 min) puis t.a. (48h).

La réaction de Mitsunobu est une méthode d'estérification efficace utilisant des conditions réactionnelles douces, ce qui permet la modification stéréosélective de la fonction alcool de nombreux composés naturels [186–188]. Le mécanisme de la conversion d'un alcool primaire en un ester en présence de triphénylphosphine (PPh_3) et de diisopropylazodicarboxylate (DIAD) peut être expliqué comme décrit sur la **Figure 54** [188,189].

Un inconvénient majeur de la méthode de Mitsunobu que nous avons rencontré lors de la fabrication des esters désirés est que les produits secondaires formés au cours de la réaction (triphénylphosphine oxide et hydrazodicarboxylates) étaient parfois difficiles à éliminer par chromatographie sur silicagel. En effet, nous avons dû mettre en œuvre plusieurs séparations successives par chromatographies flash, et combiner avec la chromatographie liquide haute performance (CLHP) pour réussir à purifier correctement les produits. C'est la raison pour laquelle nous avons obtenu des rendements faibles pour nos esters, à savoir 21% (**63**), 57% (**64**) et 7% (**65**).

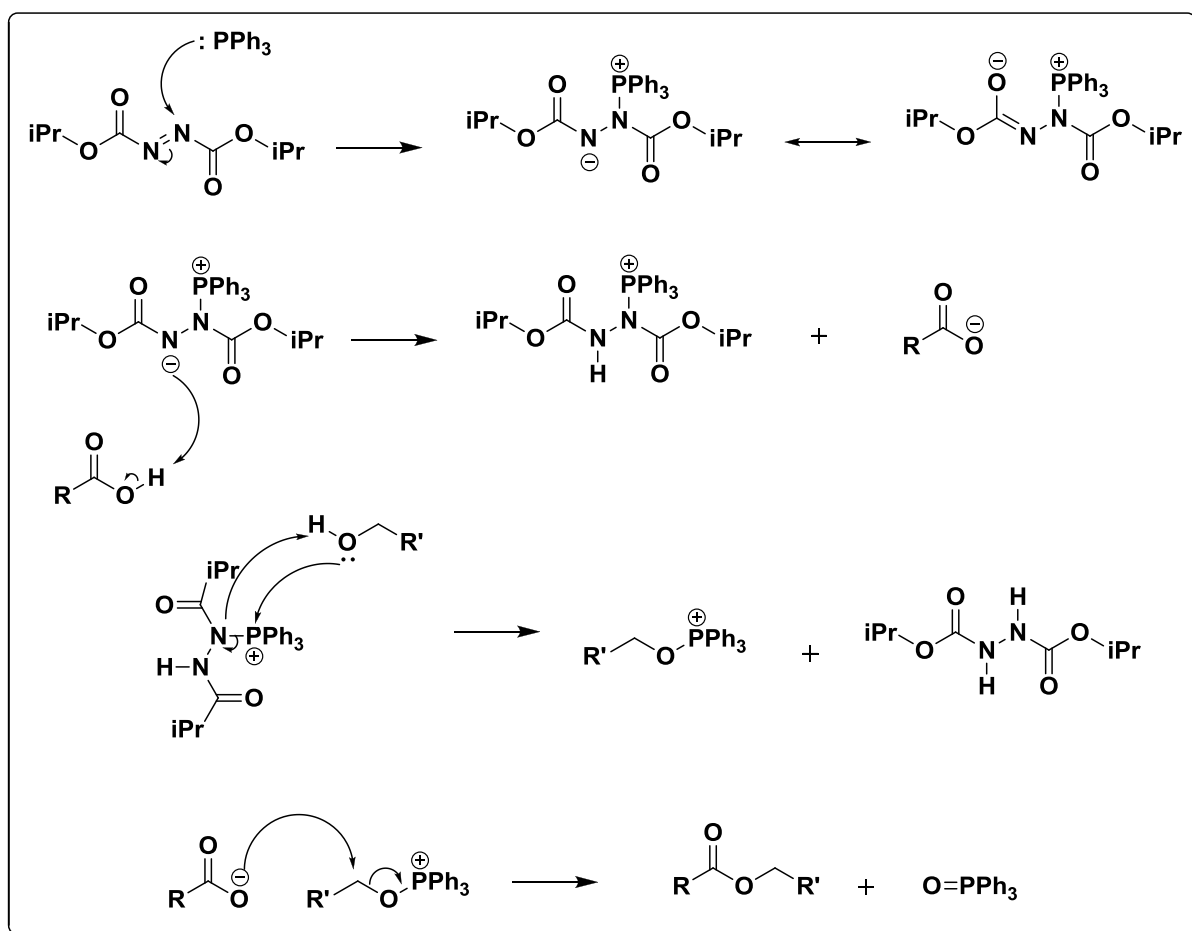
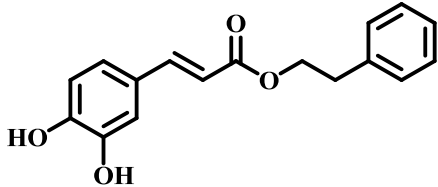
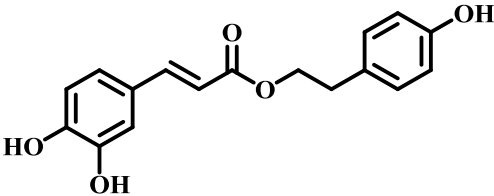
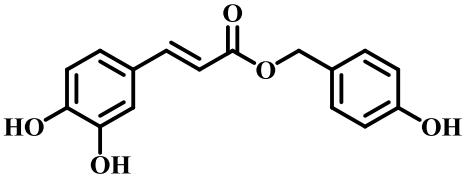
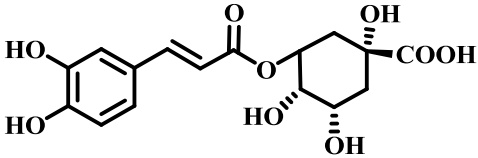
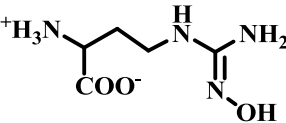


Figure 54 : Mécanisme de la réaction de Mitsunobu.

Les résultats biologiques ont mis en évidence une inhibition plus ou moins importante pour les esters étudiés (**Tableau XI**). Le CAPE (**63**) s'est révélé être le composé le plus actif de ces trois composés avec une CI_{50} de $19,2 \pm 1,2 \mu M$, mais il reste *a priori* moins intéressant que CAPA (**44**) et ACG (**28**) (CI_{50} $6,9 \pm 1,3$ et $10,6 \pm 0,8 \mu M$, respectivement). Cette observation a donc suggéré que la fonction d'amide est plus importante que la fonction ester pour l'inhibition de l'arginase. Par ailleurs, la présence d'un groupe hydroxyle sur le motif phénéthyle a réduit l'activité inhibitrice (**63** vs **64**, CI_{50} $19,2 \pm 1,2$ et $23,9 \pm 1,1 \mu M$, respectivement). En outre, la diminution de la longueur du motif phénéthyle a largement fait chuter l'activité (**64** vs **65**, CI_{50} $23,9 \pm 1,1$ et $153,6 \pm 1,3 \mu M$, respectivement).

Tableau XI : Structures des esters étudiés et leur activité inhibitrice sur b-ARG I.

Composé	Structure	%Inhibition b-ARGI ^a à 100 μ M	CI ₅₀ ^b (μ M)
CAPE (63)		72 $\pm$ 2	19,2 $\pm$ 1,2
(64)		75 $\pm$ 1	23,9 $\pm$ 1,1
(65)		52 $\pm$ 2	153,6 $\pm$ 1,3
ACG (28)		71 $\pm$ 1	10,6 $\pm$ 0,8
nor-NOHA ^c (5)		99 $\pm$ 1	1,7 $\pm$ 0,2

^aLes valeurs ont été obtenues à partir de trois expérimentations distinctes chacune réalisée en duplicata.

^bCI₅₀: Concentration inhibitrice médiane obtenue à partir de trois expérimentations distinctes chacune réalisée en triplicata.

^cN^ω-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA): composé utilisé comme inhibiteur de référence.

Pour évaluer les interactions potentielles au niveau du site actif de b-ARG I, le CAPE (63) a également été « docké » dans le site actif. Les modes de liaisons en 3D et 2D issus de la modélisation moléculaire nous ont bien montré que le motif caféoylle de CAPE peut pénétrer au fond de la poche active de l'enzyme, et que la fonction catéchol interagit avec certains résidus essentiels du site actif tels que Ala125 et Asp232 (**Figure 55**). Ces résultats ont confirmé à nouveau le rôle important du motif caféoylle pour l'activité inhibitrice de la molécule.

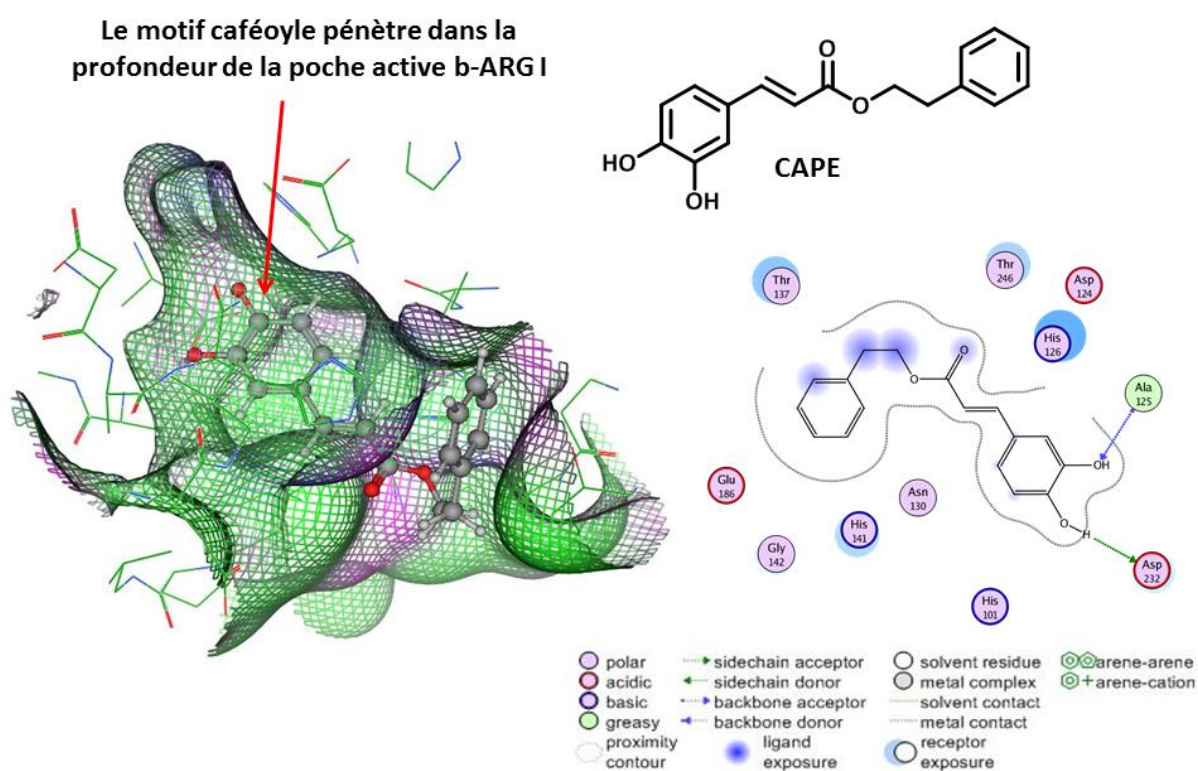


Figure 55 : Modes de liaison en 3D (à gauche) et 2D (à droite) de CAPE dans le site actif de b-ARG I. Pour le mode de liaison 3D, CAPE est représenté sous forme "boule et bâton": C (gris), O (rouge), H (blanc); les résidus essentiels du site de liaison sont représentés par des lignes. Les modélisations moléculaires ont été réalisées par le programme FlexX dans le logiciel LeadIt 2.0.2 [153], et les images ont été créées par le logiciel MOE 2008.10 [171].

VIII-1.3. Conclusion

Par la réaction de Mitsunobu, nous avons obtenu trois dérivés esters de l'acide caféique : CAPE (**63**) et les esters (**64**) et (**65**). Les résultats biologiques ont montré que ces esters ont pu inhiber significativement l'activité d'arginase ; le CAPE étant le plus actif. Cependant, ce dernier reste moins actif que le composé CAPA (**44**), suggérant que la fonction amide est plus intéressante que la fonction ester pour l'activité inhibitrice. La modélisation moléculaire de (**63**) dans le site actif d'arginase a confirmé à nouveau l'importance du motif caféoyl de la molécule pour l'inhibition d'arginase. La fonction catéchol et la longueur du motif phénéthyle semblent également importantes pour l'activité inhibitrice.

VIII-2. Synthèse chimique et évaluation de l'activité inhibitrice de *(E)*-acétoxybenzyl-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (**66**)

VIII-2.1. Introduction

Avant d'appliquer la réaction de Mitsunobu pour synthétiser les esters d'acide caféique, nous avons essayé une méthode de synthèse multi-étapes avec la protection du groupe hydroxyle phénolique (**Figure 56**).

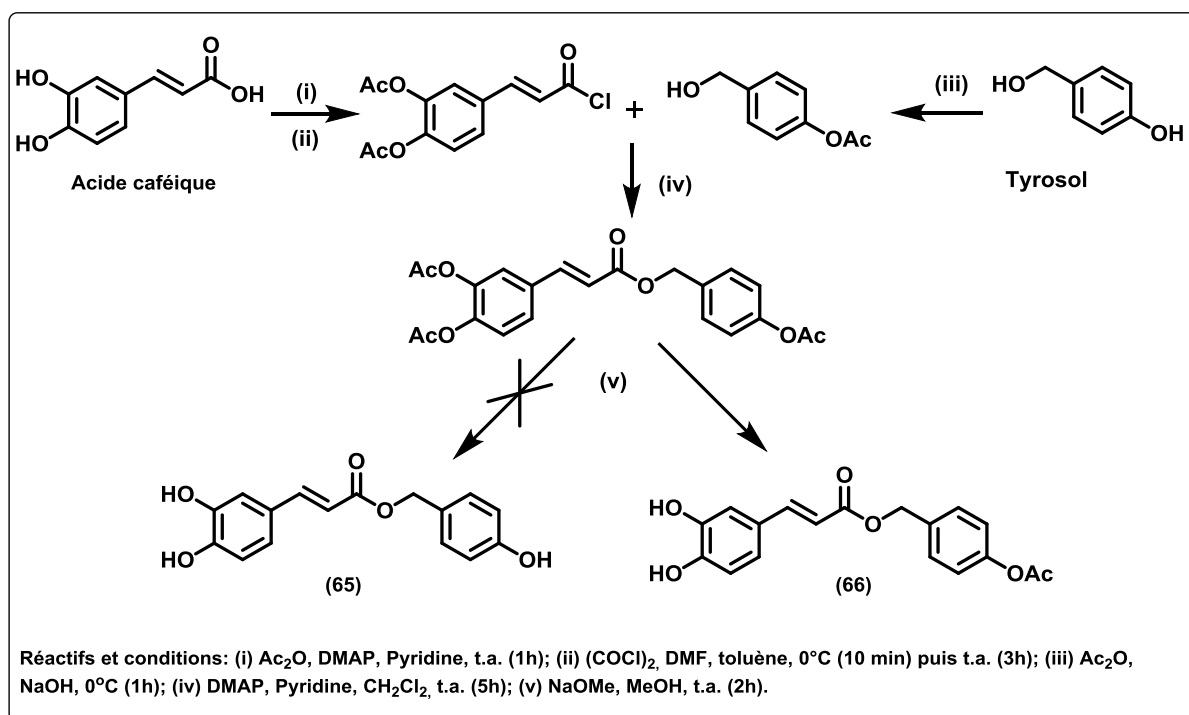


Figure 56 : Procédure de synthèse multi-étapes pour le composé **66**. Réactifs et conditions : (i) Ac_2O , DMAP, Pyridine, t.a. (4h) ; (ii) $(\text{COCl})_2$, DMF, toluène, 0°C (10 min) puis t.a. (3h) ; (iii) Ac_2O , NaOH, 0°C (1h) ; (iv) DMAP, Pyridine, CH_2Cl_2 , t.a (5h) ; (v) NaOMe, MeOH, t.a (2h).

VIII-2.2. Résultats et discussion

Dans cette approche, nous avons d'abord élaboré des précurseurs intermédiaires (**Figure 56**). L'acide di-O-acétylcaféique a été obtenu avec un bon rendement (96%) en mélangeant l'acide caféique avec la diméthylaminopyridine (DMAP), la pyridine et l'anhydride acétique [190]. Le chlorure d'acide di-O-acétylcaféique a été ensuite synthétisé sous atmosphère inerte (azote) en utilisant les réactifs DMF et chlorure d'oxalyle [190]. Ce chlorure d'acide brut a été rapidement utilisé pour l'étape suivante sans purification car il est instable. L'alcool 4-O-acétylbenzylique a été produit en ajoutant goutte à goutte l'anhydride acétique dans la solution basique de l'alcool 4-hydroxybenzylique [191]. Le couplage entre le chlorure d'acide et l'alcool 4-O-acétylbenzylique s'est déroulé en présence de DMAP, de

pyridine dans le CH_2Cl_2 sous atmosphère d'azote [190]. Enfin, la désacétylation a été réalisée dans une solution méthanolique contenant NaOMe [192] (**Figure 56**).

En fait, nous avons tenté le protocole de désacétylation publié par Sanderson *et al.* [193] qui ont déprotégé des dérivés de diacétylcaféoyle. Nous avons laissé réagir pendant 2h le produit acétylé avec le chlorure de guanidinium et la tréthylamine dans CH_2Cl_2 et MeOH (solvants secs) sous atmosphère d'argon. Malheureusement, le traitement de la réaction par la suite n'a pas conduit à l'ester espéré. En effet, le spectre de RMN ^1H du brut réactionnel a montré des pics ne correspondant pas au produit envisagé. Nous avons par conséquent tenté une autre approche appliquant le protocole publié par Guo *et al.* [192] qui ont utilisé NaOMe/MeOH pour déprotéger des dérivés de salidroside acétylés.

Lors de la première réaction de désacétylation avec NaOMe/MeOH, nous avons utilisé 0,23 équivalent NaOMe (mmoles) : après le traitement de la réaction et purification par chromatographie flash, nous avons obtenu un solide blanc. Cependant, l'analyse du spectre ^1H -RMN de ce dernier nous a montré qu'il restait un groupe acétyle et que la déprotection n'était donc pas complète. La mise en œuvre de techniques de RMN du ^{13}C et de RMN bidimensionnelle (HSQC, HMBC) (**Tableau XII**) nous a permis de préciser la position du groupe acétyle restant sur la molécule. Celui-ci se situe sur la partie benzyle. La structure du produit final (**66**) est donné par la **Figure 57**.

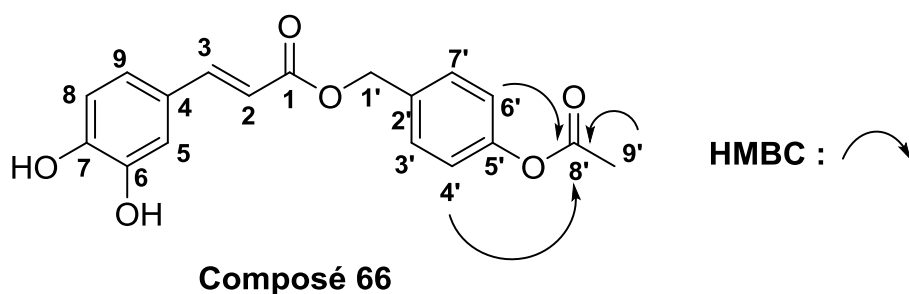


Figure 57 : Structure du dérivé ester caféique acétylé et corrélations HMBC précisant la position de l'acétyle.

Tableau XII : Attributions des protons et carbonnes de **66** à partir des données RMN ^1H , ^{13}C , HSQC et HMBC.

Attribution	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (signal, J)	HMBC
1	167,3	-	C-1/H-2, C-1/H-3, C-1/H-1'
2	115,3	6,34 (d; 16,0)	C-2/H-3, C-2/H-1'
3	146,2	7,60 (d; 16,0)	C-3/H-2, C-3/H-5, C-3/H-9
4	127,6	-	C-4/H-2, C-4/H-3, C-4/H-5, C-4/H-8, C-4/H-9
5	115,3	7,18 (d; 1,9)	C-5/H-2, C-5/H-8, C-5/H-9
6	146,4	-	C-6/H-3, C-6/H-8
7	148,9	-	C-7/H-5, C-7/H-8, C-7/H-9
8	116,4	6,87 (d; 8,3)	C-8/H-5, C-8/H-9
9	122,7	7,06 (d d; 8,3 ; 1,9)	C-9/H-2, C-9/H-3, C-9/H-5, C-9/H-8
1'	65,8	5,21 (s)	C-1'/H-2, C-1'/H-3',7', C-1'/H-4',6'
2'	135,2	-	C-2'/H-1', C-2'/H-4',6'
3', 7'	122,8	7,48 (d; 8,5)	C-3',7'/H-4',6', C-3',7'/H-3',7'
4', 6'	130,2	7,14 (d; 8,5)	C-4',6'/H-3',7', C-4',6'/H-4',6', C-4',6'/H-1'
5'	151,8	-	C-5'/H-3',7', C-5'/H-4',6', C-5'/H-9'
8'	169,7	-	C-8'/H-4',6', C-8'/H-9'
9'	21,0	2,26 (s)	-
3,4-OH		8,33 (bs)	-

Ce composé **66** a été également évalué pour l'activité inhibitrice sur b-ARG I et a montré une inhibition de $70 \pm 3 \%$ à $100 \mu\text{M}$ et une CI_{50} à $45,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$. Il est intéressant de

noter que la présence d'un substituant acétyle sur le motif hydroxybenzyle a largement augmenté la potentialité inhibitrice de la molécule (**66** vs **65**, CI_{50} $45,4 \pm 1,1$ et $153,6 \pm 1,3$ μ M, respectivement). Une étude de docking est venue compléter ces résultats biologiques. La différence d'activité observée pourrait provenir du fait que cette fonction acétyle placée sur le fragment hydroxybenzyle pourrait établir une liaison plus spécifique avec un résidu (Lys 136) de l'entrée du site actif, et stabiliser le fragment caféoyl au fond de la poche catalytique (**Figure 58**).

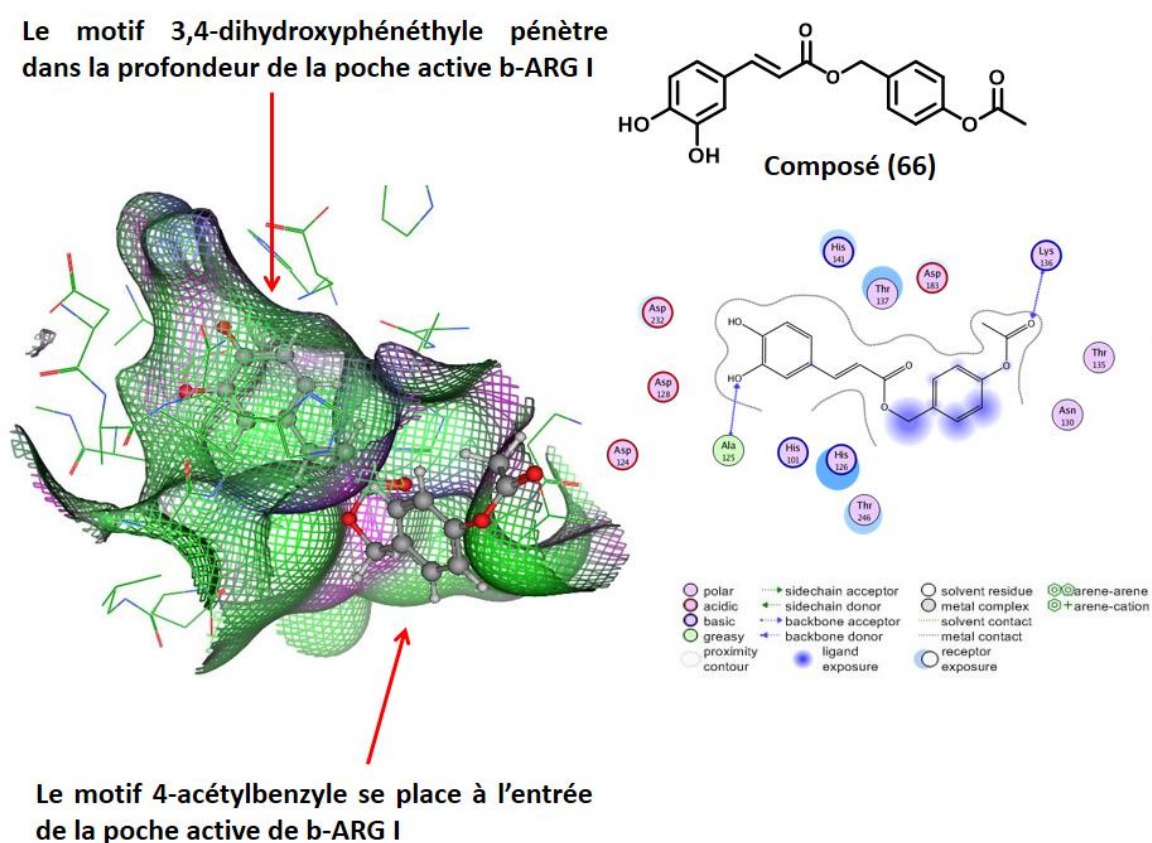


Figure 58 : Modes de liaison en 3D (à gauche) et 2D (à droite) de **66** dans le site actif de b-ARG I. Pour le mode de liaison 3D, **66** est représenté sous forme "boule et bâton": C (gris), O (rouge), H (blanc); les résidus essentiels du site de liaison sont représentés par des lignes. Les modélisations moléculaires ont été réalisées par le programme FlexX dans le logiciel LeadIt 2.0.2 [153] et les images ont été créées par le logiciel MOE 2008.10 [171].

VIII-2.3. Conclusion

Une approche de synthèse trois-étapes a été appliquée pour préparer des esters de l'acide caféique. En revanche, l'étape de désacétylation ne nous a pas conduit à l'ester envisagé (**65**), mais au composé **66**, comme en ont témoigné les spectres RMN (1D et 2D). L'activité inhibitrice sur l'arginase de (**66**) a tout de même été évaluée, et a montré une CI_{50} égale à 45,4 μ M, ce qui était nettement mieux que celle de l'ester **65** (CI_{50} 153,6 μ M). L'étude de docking a suggéré que le motif caféoyl est primordial pour l'activité. La présence du groupe acétyle sur le fragment 4-hydroxybenzyle a beaucoup amélioré l'activité inhibitrice de la molécule.

VIII-3. Synthèse chimique et évaluation de l'activité inhibitrice du 2,3,4,6-*O*-acétyl-caféoyl- β -D-glucose (**68**)

VIII-3.1. Introduction

Comme précédemment discuté dans le cadre des relations structure-activité de ACG au regard des études de modélisation moléculaire, le motif quinoyl s'installe à l'entrée du site actif et permet d'aider le motif caféoyl à bien s'approcher de la profondeur de la poche active (**Figure 42**), pour que la fonction catéchol puisse chélater le cofacteur Mn^{2+} et inhiber l'activité de l'arginase (**Figure 44**). Le fragment quinoyl joue un rôle important dans la stabilisation et l'orientation du motif caféoyl dans la poche active. Nous supposons que des pharmacomodulations au niveau de ce fragment pourraient donc améliorer l'activité inhibitrice de la molécule. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de remplacer le fragment quinoyl par un autre motif de structure similaire tel que le glucose. Pour cela, nous avons essayé de synthétiser dans un premier temps le composé 1-*O*- β -D-caféoylglucose (**67**) (**Figure 59**).

VIII-3.2. Résultats et discussion

Dans cette approche de synthèse, le chlorure d'acide 3,4-*O*-acétylcaféique a été fabriqué grâce au protocole précédemment mentionné pour le composé **66** (**Figure 56**). Par ailleurs, le bromure de tétra-*O*-acétyl- α -D-glucose a été synthétisé à partir du D-glucose via un produit intermédiaire penta-*O*-acétyl- β -D-glucose [194,195] (**Figure 59**). Le couplage entre le chlorure d'acide 3,4-*O*-acétylcaféique et le bromure de tétra-*O*-acétyl- α -D-glucose s'est déroulé en présence de carbonate d'argent (Ag_2CO_3) comme catalyseur [191]. Le produit de couplage a été ensuite soumis à une réaction de désacétylation en utilisant NaOMe/MeOH [191,192].

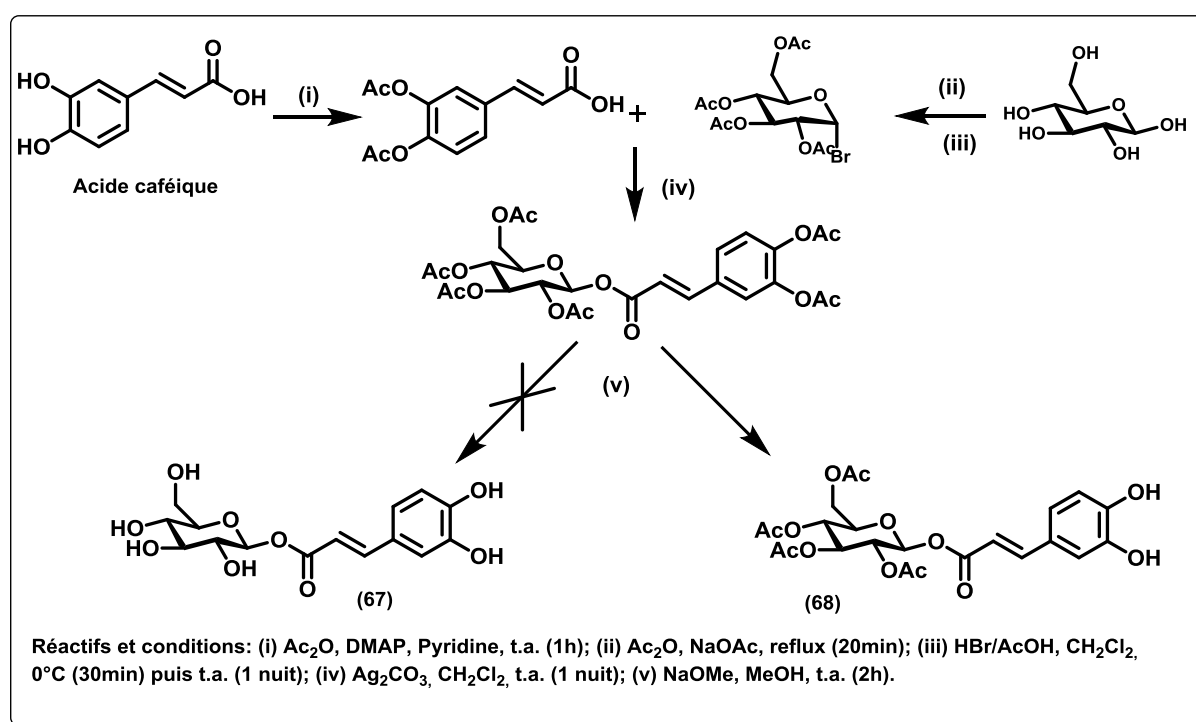


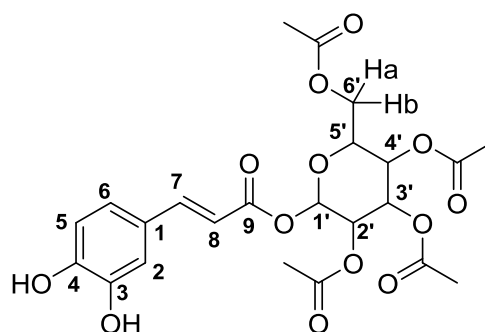
Figure 59 : Procédure de synthèse multi-étapes pour le composé **68**. Réactifs et conditions : (i) Ac_2O , DMAP, Pyridine, température ambiante (t.a.) (4h) ; (ii) Ac_2O , NaOAc, reflux (20min); (iii) HBr/AcOH, CH_2Cl_2 , 0°C (30min) puis t.a. (1 nuit); (iv) Ag_2CO_3 , CH_2Cl_2 , t.a. (1 nuit); (v) NaOMe, MeOH, t.a. (2h).

Malheureusement, l'étape de désacétylation avec une équivalence de 0,25 (produit acétylé/NaOMe) n'a pas conduit au composé envisagé (**67**), l'analyse du spectre RMN de

proton nous a montré qu'il s'agit d'un produit désacétylé au niveau du motif caféoylé, mais non désacétylé au niveau du glucose (**68**) (**Figure 59**). En analysant l'ensemble des spectres de RMN (^1H , ^{13}C , HSQC et HMBC) ainsi que le spectre de masse, nous avons pu confirmer la structure de **68** (**Tableau XIII**).

Le composé **68** a été ensuite évalué pour son activité inhibitrice d'arginase. Il a montré une inhibition potentielle sur b-ARG I avec un pourcentage d'inhibition de $54 \pm 3 \%$ à $100 \mu\text{M}$ et une CI_{50} $73,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$. Ce composé est cependant moins actif que ACG (CI_{50} $10,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$), et suggère que le fragment de tétra-*O*-acétylglucosyle pourrait être trop volumineux et empêché le motif caféoylé de pénétrer dans la profondeur de la poche active par rapport au cas de ACG.

Nous avons supposé que les conditions utilisées pour la réaction de désacétylation n'étaient pas suffisamment fortes pour déprotéger tous les hydroxyles présents dans la structure du produit de couplage (**Figure 59**). Par la suite, nous avons décidé de contrôler la réaction de désacétylation par NaOMe/MeOH en augmentant, d'une part, la quantité du catalyseur NaOMe, de 0,1 à 0,5 équivalents par rapport au produit de départ, et d'autre part, la température de réaction de t.a à 50°C . Des prélèvements réguliers du mélange réactionnel suivi d'analyses par CLHP ont été réalisés afin de contrôler la cinétique réactionnelle à chaque étape (**Figure 60**).



Composé 68

Tableau XIII : Attributions des protons et carbonnes de **68** à partir des données RMN ^1H , ^{13}C , HSQC et HMBC

Attribution	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (signal, J)	HMBC
1	127,27	-	C-1/H-2, C-1/H-5, C-1/H-7, C-1/H-8
2	115,54	7,19 (d, 2,0)	C-2/H-5, C-2/H-6, C-2/H-7, C-2/H-8
3	146,39	-	C-3/H-2, C-3/H-5, C-3/H-6, C-3/H-7
4	149,42	8,43 (bs)	C-4/H-2, C-4/H-5, C-4/H-6
5	116,50	6,89 (d; 8,1)	C-5/H-2, C-5/H-6
6	123,23	7,08 (dd; 8,1; 2,0)	C-6/H-2, C-6/H-5, C-6/H-7, C-6/H-8
7	148,27	7,62 (d; 16,0)	C-7/H-2, C-7/H-6, C-7/H-8
8	113,84	6,27 (d; 16,0)	C-8/H-7
9	165,47	-	C-9/H-7, C-9/H-8, C-9/H-1'
1'	92,50	6,00 (d; 8,3)	C-1'/H-8, C-1'/H-2', C-1'/H-5', C-1'/H-6'a
2'	71,39	5,14 (t; 9,6)	C-2'/H-3', C-2'/H-4', C-2'/H(OAc)
3'	73,31	5,43 (t, 9,6)	C-3'/H-1', C-3'/H-5', C-3'/H(OAc)
4'	69,03	5,13 (t, 9,6)	C-4'/H-2', C-4'/H-3', C-4'/H-5', C-4'/H-6'a, C-4'/H-6'b, C-4'/H(OAc)
5'	73,27	4,16 (ddd; 9,6; 4,7; 2,4)	C-5'/H-4', C-5'/H-6'a, C-5'/H-6'b
6'	62,55	4,29 (dd; 12,3; 4,7 / Ha) 4,11 (dd; 12,3; 2,3 / Hb)	C-6'/H-4', C-6'/H-5', C-6'/H(OAc)
-C=O de 2'-OAc	170,08	-	C(C=O)/H(OAc), C(C=O)/H-2'
-C=O de 3'-OAc	170,31	-	C(C=O)/H(OAc), C(C=O)/H-3'
-C=O de 4'-OAc	169,88	-	C(C=O)/H(OAc), C(C=O)/H-4'
-C=O de 6'-OAc	170,74	-	C(C=O)/H(OAc), C(C=O)/H-6'a, C(C=O)/H-6'b
4 x CH ₃ /4 x OAc	20,67; 20,63; 20,60	2,01-1,96 (m)	-
3,4-OH	-	8,43 (bs)	-

A la condition 0,1 éq. NaOMe (t.a., 2h), la réaction de désacétylation n'a pas eu lieu. En effet, un seul pic a été détecté par CLHP et ce pic correspondait à un composé de même temps de rétention que le produit de départ (**Figure 60A**). A la condition de 0,2 éq. NaOMe (t.a., 1 nuit), la réaction a débuté. En effet, le chromatogramme obtenu par CLHP montre deux nouveaux pics majeurs (**F1 & F2**), tandis que le pic du produit de départ a disparu. Nous avons obtenu le même profil à la condition de 0,3 éq. NaOMe (t.a., 2h30). Le profil CLHP du composé **68** a également été enregistré, et en comparant les profils précédents de la réaction nous avons pu voir que le pic **F1** était effectivement le composé **68**, déprotégé au niveau du catéchol de l'acide caféique (**Figure 60A**).

Ensuite, nous avons rajouté NaOMe jusqu'à 0,4 éq. et laissé réagir pendant une nuit. Nous avons observé un changement significatif entre les deux pics F1 & F2. En effet, le pic de F2 s'est agrandi, alors que le pic de F1 a diminué au cours de la réaction à la condition de 0,4 éq. NaOMe (**Figure 60B**).

En espérant que le pic F2 était le produit complètement désacétylé, nous avons augmenté encore la quantité de NaOMe jusqu'à 0,5 éq. et la température jusqu'à 50°C. La proportion entre les deux pics F1 & F2 a rapidement changé à cette condition, pour atteindre à un maximum de F2 après 19h30 de réaction (**Figure 60C**). Enfin, la réaction a été stoppée et le brut purifié par CLHP préparative pour obtenir les deux produits F1 & F2 qui ont été ensuite soumis à la RMN du proton. Le spectre RMN du proton de F1 s'est révélé identique à celui de **68**, tandis que le spectre de F2 a montré qu'il s'agissait d'un produit dégradé du produit de départ (probablement l'acide caféique). Ces résultats ont suggéré qu'il y avait une dégradation du produit de départ au cours de la réaction de désacétylation catalysée par NaOMe/MeOH, et cette dégradation devient plus importante lorsque l'on augmente la quantité de NaOMe ainsi que la température réactionnelle. Il est intéressant de noter que le

penta-acétylglucoside seul est complètement désacétylé à la condition de 0,1 éq. NaOMe, à t.a. au bout de 30 min [196].

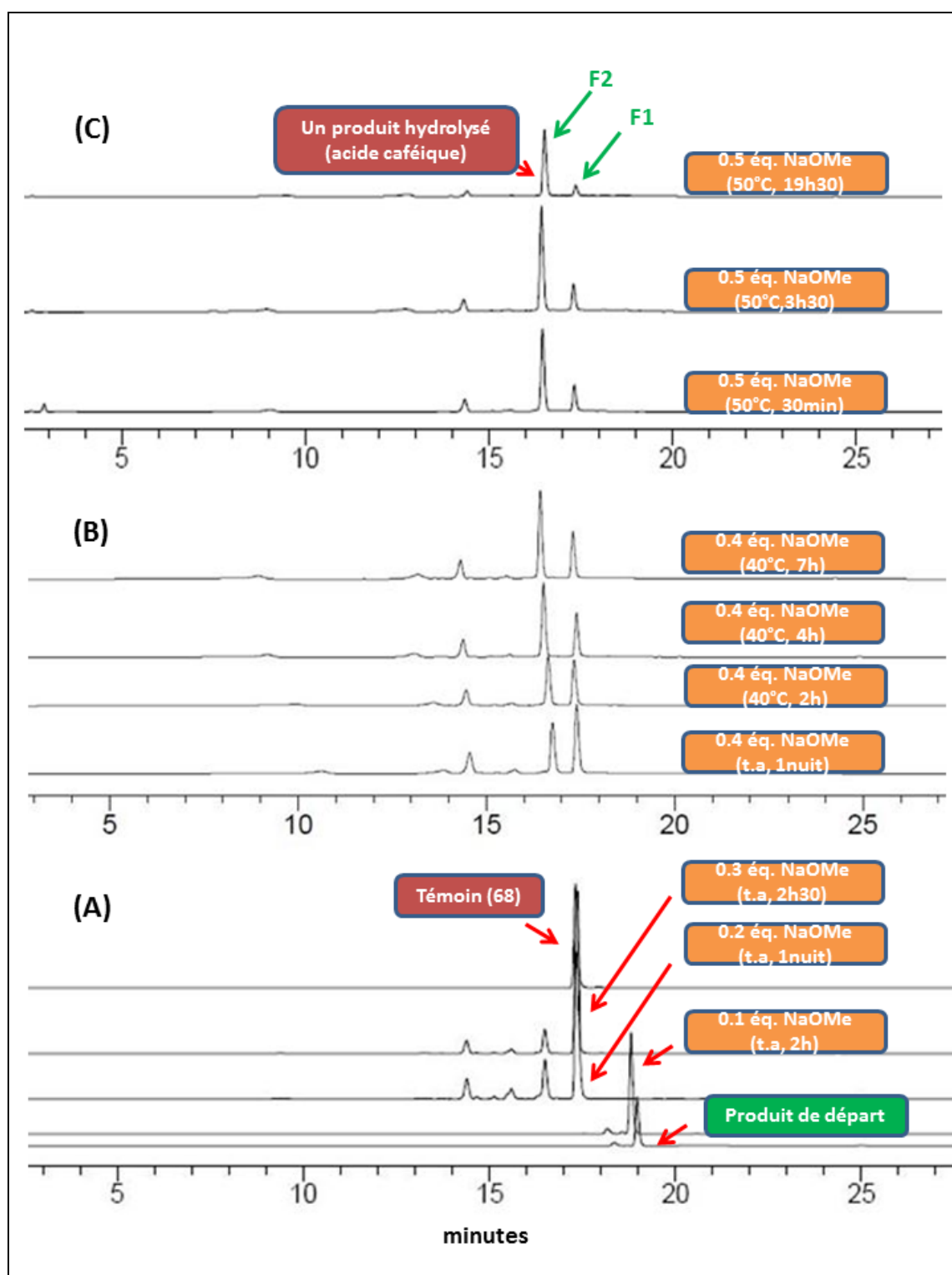


Figure 60 : Analyses CLHP à différents temps de réaction de la réaction de désacétylation du composé **66** à l'aide du catalyseur NaOMe/MeOH. Conditions réactionnelles : (A) 0,1 éq. NaOMe, t.a. (2h) ; 0,2 éq. NaOMe,

t.a. (1 nuit) ; 0,3 éq. NaOMe, t.a. (2h30). (B) 0,4 éq. NaOMe, t.a. (1 nuit) ; 0,4 éq. NaOMe, 40°C (2h); 0,4 éq. NaOMe, 40°C (4h); 0,4 éq. NaOMe, 40°C (7h); (C) 0,5 éq. NaOMe, 50°C (30min); 0,5 éq. NaOMe, 50°C (3h30) ; 0,5 éq. NaOMe, 50°C (19h30).

La fonction ester du produit de départ est probablement hydrolysée en conditions réactionnelles, ce qui signifie qu'il est difficile de réaliser la désacétylation du produit de couplage (**Figure 59**) tout en maintenant l'intégrité de la fonction ester dans les conditions utilisées.

VIII-3.4. Conclusion

Finalement, l'approche de synthèse utilisée (**Figure 59**) ne nous a pas permis d'obtenir le composé 1-*O*- β -D-caféoylglucose (**67**) envisagé, une autre procédure de synthèse devra être adaptée afin d'obtenir ce type de composé [197].

Chapitre IX : Synthèse chimique des dérivés de picéatannol et évaluation de l'activité inhibitrice sur b-ARG I

IX-1. Synthèse chimique des glucosides de picéatannol

IX-1.1. Introduction

Le picéatannol-3'-O- β -D-glucopyranoside (**69**, **Figure 61**) extrait de la rhubarbe a été rapporté par Woo *et al.* (2010) comme ayant une bonne activité inhibitrice sur arginase et une activité activatrice sur l'enzyme NOS endothéliale (eNOS) [70].

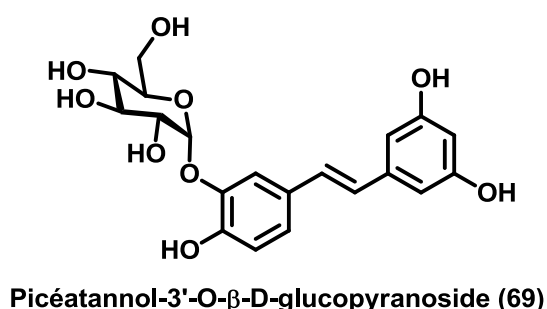


Figure 61 : Structure du Picéatannol-3'-O- β -D-glucopyranoside (PG)

En effet, ce stilbénoïde naturel (**69**) a montré une $CI_{50} \sim 11 \mu M$ sur r-ARG I & II, et a augmenté la production du NO par eNOS [70]. Comme nous l'avons précédemment présenté dans le **Chapitre VI**, nous avons évalué l'activité inhibitrice du picéatannol (PCT) sur l'arginase, et ce composé a effectivement montré une inhibition de b-ARG I avec une CI_{50} égale à $12,1 \mu M$, du même ordre de grandeur que celle de **69** sur r-ARG. Ces résultats nous ont suggéré que l'activité inhibitrice d'arginase de ce type de composé provient probablement de la structure de PCT. Intéressés par ces résultats, nous avons voulu évalué l'effet de

glucosides de picéatannol (PGs) sur notre modèle. Cependant aucun PG n'est disponible dans le commerce. c'est la raison pour laquelle, nous avons décidé, dans un premier temps, d'obtenir des PGs par hémisynthèse à partir de PCT et du glucose comme produits de départ. Nous avons d'abord essayé de synthétiser des PGs par une procédure sans protection des groupes hydroxyles présents sur la structure de PCT (**Figure 62**) en envisageant d'obtenir **69** ainsi que d'autres PGs, résultant de la glycosylation éventuelle de l'un ou de plusieurs des divers hydroxyles.

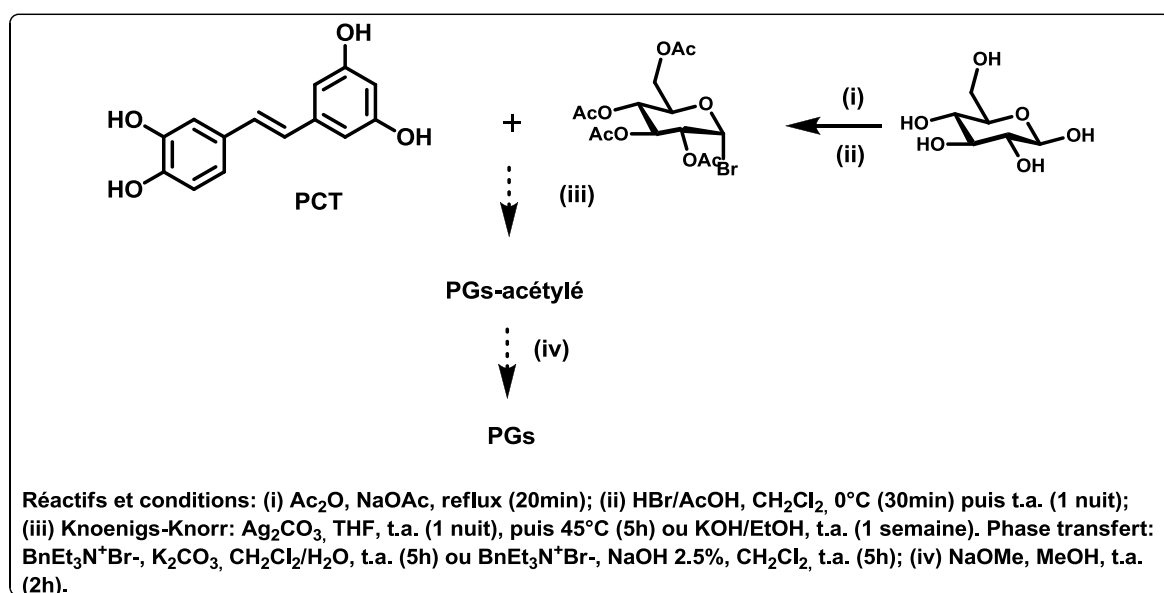


Figure 62 : Procédure d'hémisynthèse des glucosides de picéatannol (PGs).

IX-1.2. Résultats et discussion

Dans cette approche, nous avons décidé de réaliser le couplage entre PCT et le bromure d'acétoxyglycosyle par deux méthodes de glycosylation : la première est celle de Koenigs-Knorr [198,199], et la deuxième utilise la catalyse par transfert de phase [200,201]. Le produit

de couplage (PG-acétylé) serait ensuite déprotégé en utilisant le méthoxyde de sodium dans le méthanol [198,200] (**Figure 62**).

Dans un premier temps, nous avons utilisé la réaction classique de Koenigs-Knorr pour réaliser la glycosylation [202,203]. Cette méthode permet d'obtenir la formation de glycoside à partir d'halogénures de glycosyle tels que chlorures, bromures ou iodures, en tant que les donneurs de glycosyle. La réaction se déroule en présence d'un sel de métal lourd, comme l'argent ou le mercure [203]. La **Figure 63** montre le mécanisme de formation d'un β -glycoside à partir de l' α -halocarbohydrate en présence du sel d'argent [204].

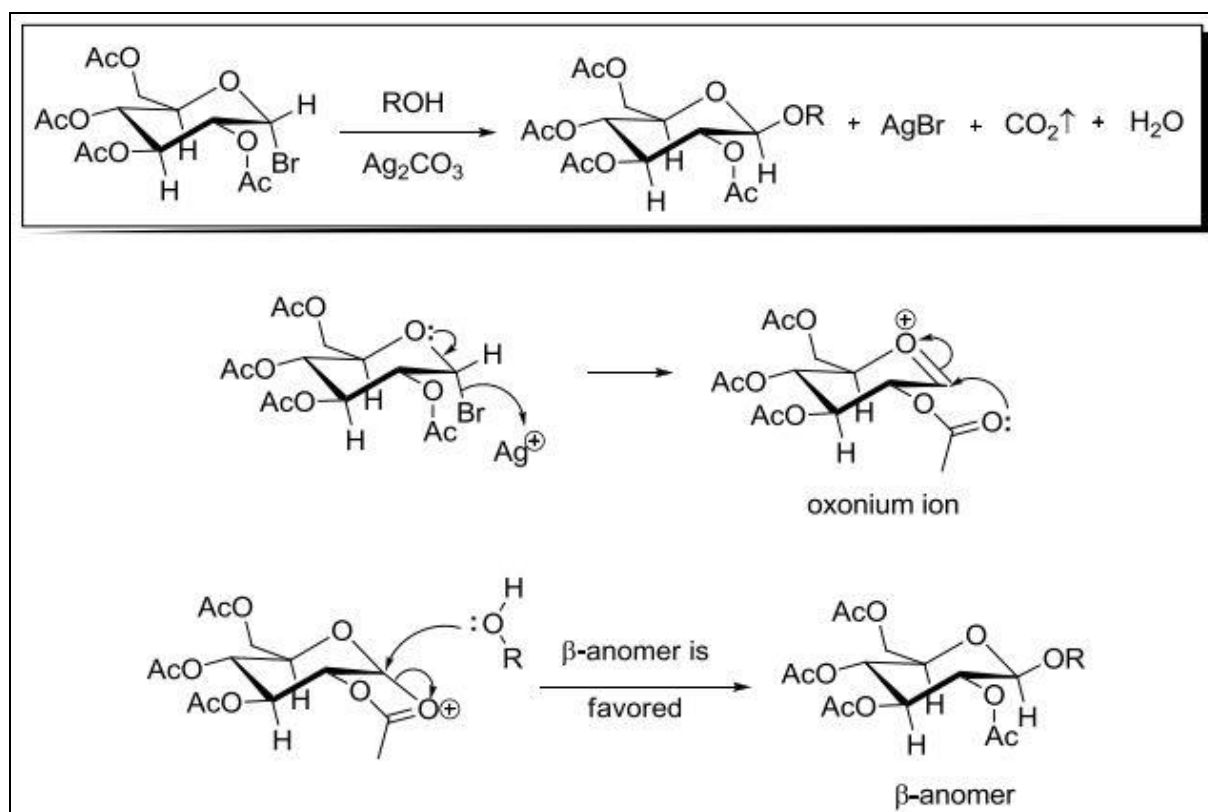


Figure 63 : Mécanisme de la glycosylation de Koenigs-Knorr [204].

La glycosylation des polyphénols par la méthode de Koenigs-Knorr a été réalisée dans de nombreuses études, y compris celles impliquant des stilbénoides avec quelques

modifications [198,199]. Dans notre étude, nous avons adapté la procédure décrite par Wang *et al.* pour synthétiser des PGs [198]. En fait, dans cette procédure, nous avons mélangé le PCT et le bromure de glycosyle comme le donneur de glycosyle en présence du carbonate d'argent comme catalyseur. Cette réaction a été réalisée sous atmosphère d'argon. Un tamis moléculaire 4Å en poudre a également été ajouté afin d'éliminer l'eau et le CO₂ produits au cours de la réaction (voir plus de détails concernant ce mode opératoire dans la partie expérimentale). Après le traitement de la réaction, le résidu brut a été analysé par CCM et CLHP, et également évalué pour l'inhibition d'arginase. L'analyse sur CCM nous a montré la présence d'un spot majeur correspondant au PCT. Le chromatogramme par CLHP a fait apparaître un pic mineur ayant le même temps de rétention que celui de PCT, suivi de deux autres pics quantitativement importants (**Figure 64**). La séparation des produits de réaction par chromatographie flash a conduit à l'obtention de trois fractions analysées ensuite par RMN ¹H. Les spectres de proton nous ont montré des pics coresspondant au PCT pour la première fraction, en revanche les spectres des autres fractions ne correspondaient pas aux produits PGs envisagés. Le pic majeur observé sur le chromatogramme (**Figure 64**) pourrait correspondre à un dérivé du sucre ou à un produit de dégradation de PCT. De plus, l'évaluation biologique du brut de réaction sur b-ARG a donné 29 ± 4 % d'inhibition à 100 µg/ml, valeur probablement due à un effet du PCT résiduel.

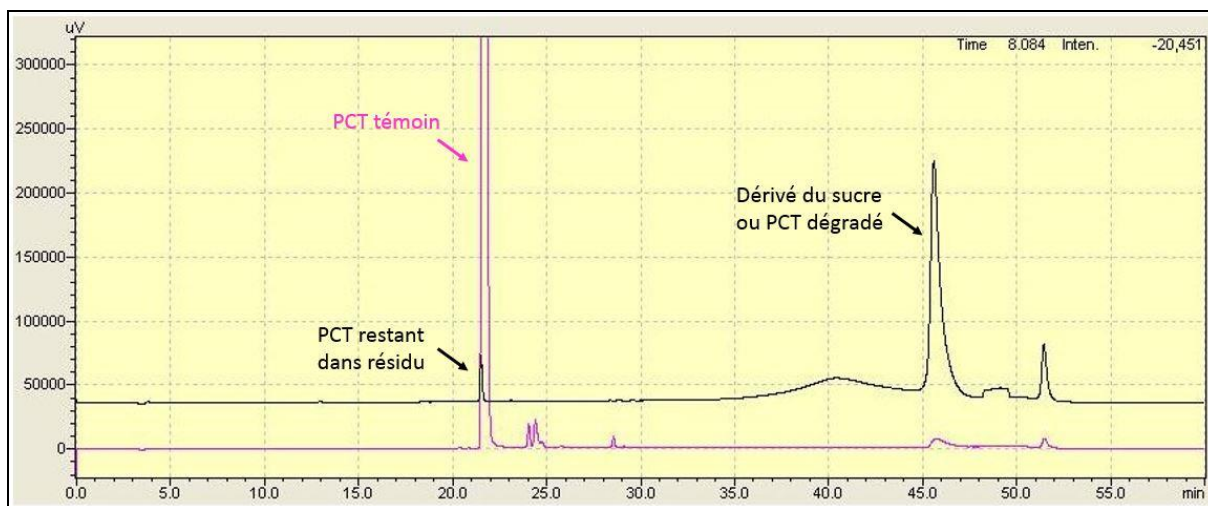


Figure 64 : Chromatogramme d'analyse CLHP du brut réactionnel de la réaction de glycolysation.

Par ailleurs, nous avons tenté un protocole alternatif reposant toujours sur la méthode de Koenigs-Knorr et publié par Regev-Shoshani *et al.* [199] pour coupler le PCT et le bromure de glycosyle. Cette procédure utilise l'hydroxyde de potassium comme catalyseur, et l'éthanol absolu comme solvant. Cette réaction se déroule, en revanche, sur un temps beaucoup plus long (1 semaine) et est contrôlée par CCM. A la fin de la réaction, le composé de départ PCT était encore largement majoritaire. La purification du brut réactionnel a permis d'obtenir trois fractions qui ont été analysées par RMN ^1H . L'analyse des spectres obtenus a montré les signaux caractéristiques de PCT dans une fraction, mais aucun signal des produits envisagés n'a été détecté dans les autres fractions.

Suite aux échecs de la mise en œuvre de la réaction de Koenigs-Knorr, nous avons, dans un second temps, tenter une autre méthode, appelée glycolysation par catalyse par transfert de phase. En effet, cette méthode a été beaucoup utilisée pour synthétiser des glycosides en utilisant des halogénures de glycosyle comme donneurs de glycosyle [222,226–228]. Cette méthode possède pour avantages des conditions douces et l'obtention de bons rendements [205,206]. En bref, le bromure de glycosyle et PCT sont d'abord fortement agités dans un mélange de CH_2Cl_2 et l'eau en présence de K_2CO_3 et $\text{Bn}(\text{Et})_3\text{NBr}$ comme catalyseurs.

Le produit de couplage se forme à l'interface entre les deux phases non miscibles puis passe dans la phase organique, qui est ensuite séparée, lavée et concentrée pour obtenir le brut réactionnel contenant *à priori* le produit envisagé. Le principe de la catalyse par transfert de phase en solution est schématisé sur la **Figure 65** ci-après.

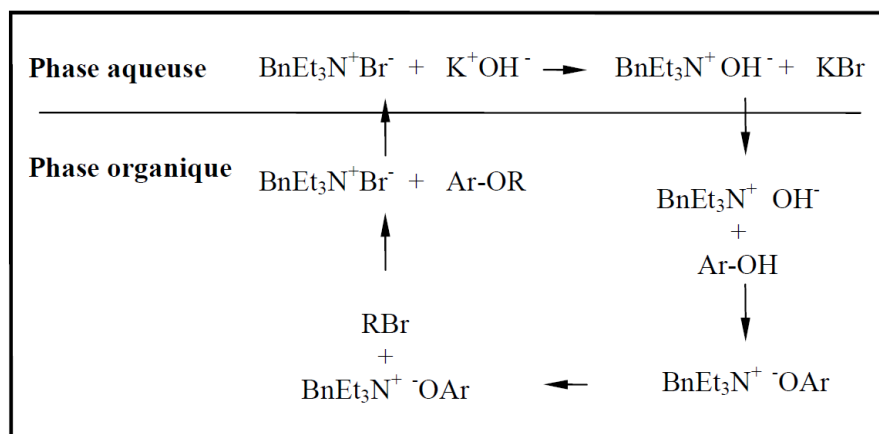


Figure 65 : Schéma du principe de la catalyse par transfert de phase en solution.

IX-1.3. Conclusion

Malheureusement, là encore, nos essais se sont révélés infructueux, de même qu'une variante de la procédure utilisant $\text{Bn}(\text{Et})_3\text{NBr}$ dans NaOH 2,5% comme catalyseur [201]. Nous n'avons donc pas réussi à obtenir le produit de couplage. Deux méthodes de glycosylation ont été choisies à partir de la littérature pour synthétiser PGs. Néanmoins, aucune des deux méthodes ne nous a permis d'obtenir le produit de couplage. Deux hypothèses principales peuvent éventuellement expliquer ce manque de réussite : (i) le bromure de glycosyle est très sensible et peut s'hydrolyser facilement avant ou au cours de la réaction de glycosylation ; (ii) le PCT est sensible à l'oxydation et peut-être dégradé aux conditions réactionnelles. En fait, Wang *et al.* ont obtenu avec de modestes rendements des glucuronides de resvératrol en appliquant la méthode de Knoenigs-Knorr [198]. Ces remarques ont montré que la glycosylation du PCT sans protection des groupes hydroxyles

peut être difficile à réaliser et donne des rendements très faibles. D'autres méthodes multi-étapes prenant en compte la protection des hydroxyles pourraient être envisagées comme méthodes alternatives pour synthétiser des PGs. Par exemple, Wang *et al.* ont partiellement protégé les hydroxyles par silylation aléatoire avant de débiter la réaction de glycosylation, ce qui a donné un meilleur rendement [198].

IX-2. Evaluation *in vitro* de l'activité inhibitrice de dérivés de picéatannol sur b-ARG I

IX-2.1. Introduction

Malgré le fait que nous n'ayons pas réussi à synthétiser les glucosides du picéatannol souhaités, nous avons pu obtenir deux glucosides naturels: le 3-O- β -D-glucopyranoside de picéatannol (ou astringine, **70**) et le 3-O- β -D-glucopyranoside de resvératrol (ou picéide, **71**) (**Figure 66**) grâce à une collaboration avec le laboratoire du Dr. Stéphanie Krisa, de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Bordeaux, France.

IX-2.2. Résultats et discussion

L'astringine (**70**) et le picéide (**71**) ont été testés sur b-ARG I, et les résultats sont présentés dans le **Tableau XIV**.

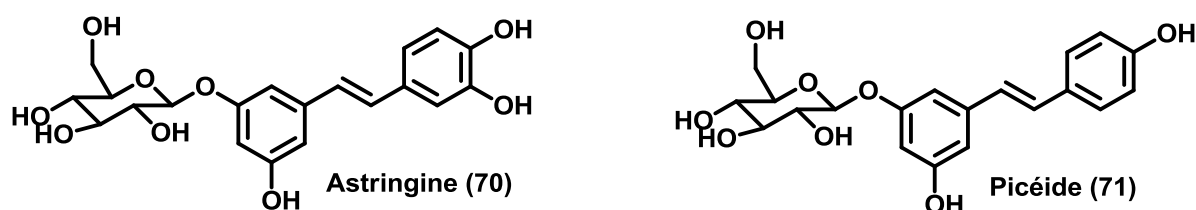


Figure 66 : Structures de l'astringine (**70**) et du picéide (**71**).

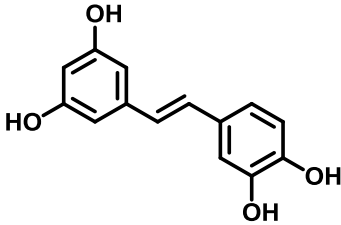
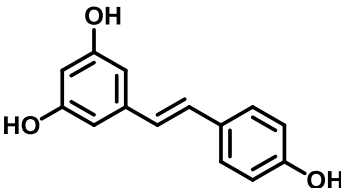
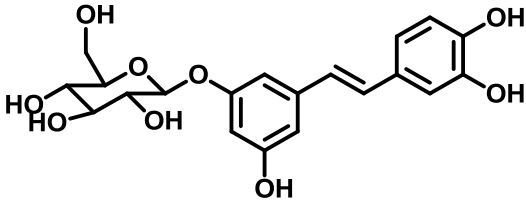
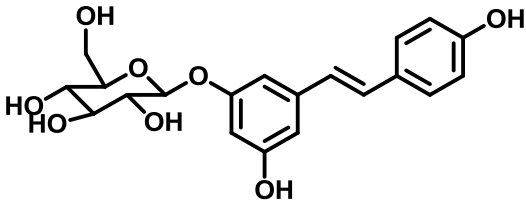
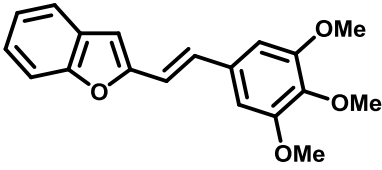
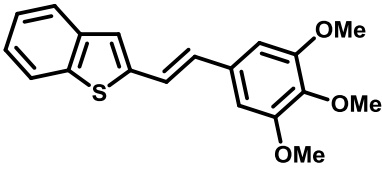
D'ailleurs, grâce à la mise en place d'une autre collaboration avec le Dr Thierry Lomberget, de l'EA4446 - Biomolécules, Cancer et Chimiorésistances (B2C), Université

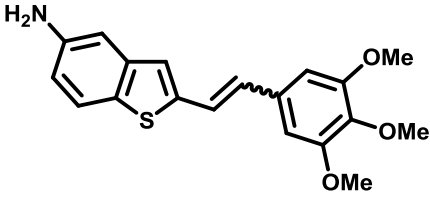
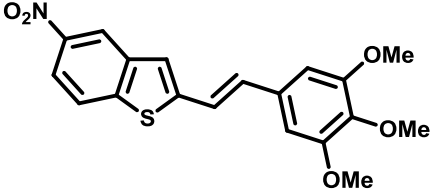
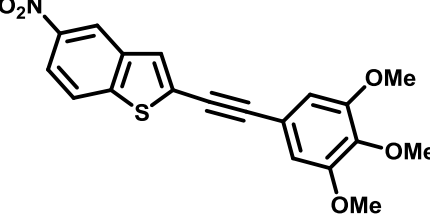
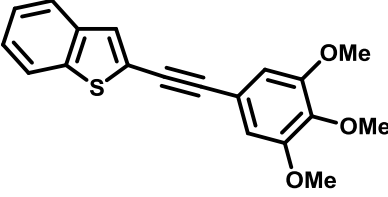
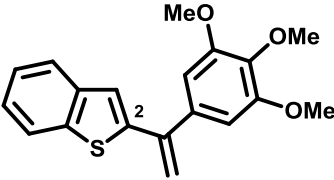
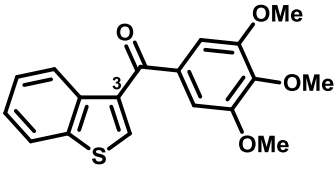
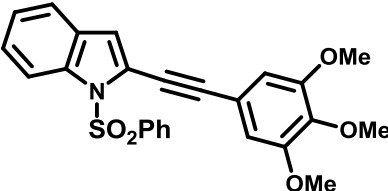
Claude Bernard Lyon 1, France, 13 dérivés de stilbénoides de synthèse (**72-84**) ont pu être soumis au criblage biologique sur l'arginase. Les résultats sont également présentés dans le **Tableau XIV**.

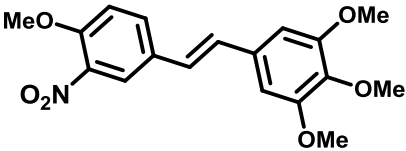
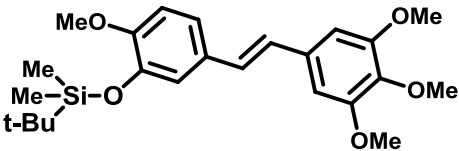
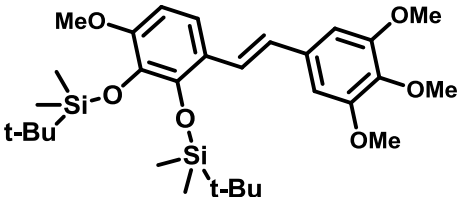
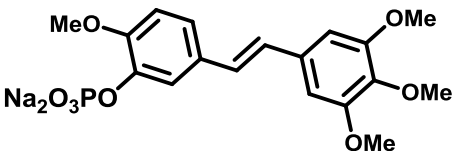
Les deux glycosides **70** et **71** ont montré une inhibition potentielle sur b-ARG I, et l'astringine (**70**) avec une fonction catéchol est plus actif que le picéide (**71**) ($CI_{50} = 29,6 \pm 1,2$ et $40,8 \pm 1,1 \mu M$, respectivement). Il est intéressant de noter que la présence d'un sucre en position 3 a diminué environ deux fois d'activité inhibitrice sur b-ARG I (**36** vs **70** ; **37** vs **71**). Il est donc possible que la présence de sucre pourrait empêcher le motif cinnamoyle de s'approcher au fond du site actif de b-ARG I pour interagir avec des résidus acide aminés essentiels pour l'activité d'arginase.

Par contre, les 13 dérivés de stilbénolide n'ont pas montré une inhibition importante sur l'arginase (**Tableau XIV**). La plupart de ces composés possède des groupes méthoxyles qui pourraient être défavorables pour l'activité inhibitrice. Les deux composés tels que **82** et **83** peuvent être déprotégés des groupes silylés pour libérer des groupes hydroxyles qui pourraient améliorer l'activité inhibitrice de ces molécules.

Tableau XIV : Structure et'activité inhibitrice de dérivés de stilbénoides sur b-ARG I.

Composé	Structure	%Inhibition b-ARGI ^a à 100 µM	CI ₅₀ ^b (µM)
(36)		76	12,1 ± 0,7
(37)		57	18,2 ± 0,8
(70)		77	29,6 ± 1,2
(71)		55	40,8 ± 1,1
(72)		13	n.d ^c
(73)		9	n.d

(74)		31	n.d
(75)		15	n.d
(76)		29	n.d
(77)		22	n.d
(78)		1	n.d
(79)		11	n.d
(80)		27	n.d

(81)		19	n.d
(82)		42	n.d
(83)		14	n.d
(84)		0	n.d

^aLes valeurs sont présentées en moyenne.

^bCI₅₀: Concentration inhibitrice médiane obtenue à partir de trois différentes expérimentations chaune en triplicata.

^cn.d: non déterminé.

IX-2.3. Conclusion

Deux glycosides naturels (**70** et **71**) ainsi que 13 dérivés synthétiques de stibénoïdes ont été testés sur l'arginase. Les résultats biologiques ont relévé que ces deux glucosides ont montré de bonnes activités inhibitrices, mais plus faibles que (**36**) et (**37**). Cela suggère que la glycosylation diminue l'activité inhibitrice sur l'arginase. Par ailleurs, les dérivés synthétiques variés de stilbénoïdes n'ont pas inhibé l'activité d'arginase, confirmant que l'absence de la fonction catéchol entraîne dans ce cas une forte diminution de l'activité inhibitrice de la molécule.

Conclusion générale et perspectives

L'arginase est une metalloenzyme, dont l'intérêt comme cible thérapeutique a été démontré par de nombreuses études. Une inhibition de l'arginase, testées sur différents modèles *in vivo*, incluant des études cliniques avec une administration locale, a notamment apporté la preuve de concept de l'intérêt de cette stratégie de traitement. Trois inhibiteurs sont actuellement commercialisés (nor-NOHA, ABH et BEC) mais en dépit de leur potentiel, ces molécules sont incompatibles avec un usage médical *per os* (faible demi-vie de la nor-NOHA et faible biodisponibilité de l'ABH et du BEC). L'obtention de nouveaux inhibiteurs est donc encore d'un intérêt substantiel, pour le développement de candidats médicaments. Dans ce projet de thèse, nous nous sommes donnés pour objectif la recherche d'inhibiteurs d'arginase, d'origine naturelle et hémi-synthétique. Une revue de la littérature recensant les composés naturels présentant des propriétés inhibitrices d'arginase nous a permis de constater l'intérêt de la source naturelle comme voie de recherche, ainsi que la nécessité de disposer d'un test fiable et reproductible afin de pouvoir évaluer la capacité inhibitrice de nos molécules. Nous avons par conséquent développé, grâce à l'optimisation d'un test existant, un essai colorimétrique miniaturisé et partiellement automatisé, utilisant une arginase mammifère commerciale, purifiée de foie de bœuf. Ce test a d'abord été validé grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de référence (nor-NOHA 1,7 μM et BEC 3,3 μM), avant d'être utilisé pour l'évaluation biologique d'une série de polyphénols naturels, mettant en évidence les potentialités, en tant qu'inhibiteur d'arginase, de l'acide chlorogénique (acide caféoylquinique) et du picéatannol (stilbène), avec des CI_{50} égales à 10,6 μM et 12,1 μM , respectivement. Des études de cinétique enzymatique ont montré que l'inhibition était réversible et compétitive. En parallèle, des études complémentaires de docking moléculaire ont été réalisées. La structure tridimensionnelle (3D) cristallisée de l'arginase hépatique bovine n'étant pas à ce jour

répertoriée dans les bases de données existantes, nous avons créé, grâce à une collaboration établie avec le Laboratoire de Pharmacoinformatique de l'Université de Hochiminh-ville au Vietnam, un modèle 3D de cette structure par homologie avec l'arginase humaine. Les études de docking conduites ont alors montré l'intérêt de la partie caféique de nos molécules pour la conservation de l'activité inhibitrice. Ce résultat a d'ailleurs été confirmé avec le docking mené sur l'arginase humaine. Les interactions avec le site actif ont également été prédites. Nous nous sommes alors focalisés sur deux stratégies de recherche : des dérivés cinnamoyle et cafféoyle et des stilbènes dérivés du résvératrol et du picéatannol. Dans un premier temps, la synthèse de 19 dérivés cinnamides a été réalisée. Après évaluation biologique, des éléments de relation structure-activité ont pu être déduits et il est apparu que le composé (*E*)-N-(2-phényléthyl)-3,4-dihydroxycinnamide ou « *caffeic acid phenyl amide* » (CAPA) présentait la meilleure activité ($CI_{50} = 6,9 \mu M$). Ce composé est un inhibiteur réversible et compétitif de l'arginase étudiée. Son insertion dans le site actif a été modélisée et les interactions avec le site actif ont été prédites. Suite à cette étude, des dérivés ester dont le caféate de phénéthyle ou « *caffeic acid phenyl ester* » (CAPE), analogue de CAPA, ont été préparés et évalués. Même si l'activité de CAPE reste intéressante ($CI_{50} = 19,2 \mu M$), elle n'est cependant pas améliorée par rapport à CAPA. Les études de docking de CAPE avec le site actif de l'arginase ont montré des similitudes avec CAPA dans les interactions du catéchol de la molécule avec l'enzyme. Dans un second temps, nous avons exploré la piste des dérivés de stilbènes type resvératrol et picéatannol. La littérature rapporte l'activité intéressante d'un dérivé glycosylé de picéatannol (PG). Nous avons donc tenté, sans succès, la synthèse de ce composé. Cependant, des composés naturels de structure proche du PG, l'astringine et le picéide, ont pu être évalués grâce à une collaboration avec l'institut de la vigne et du vin à Bordeaux, mais les CI_{50} obtenues n'ont pas montré d'amélioration de l'activité par rapport au picéatannol. Enfin, une collaboration avec l'EA Biomolécules, cancer et chimiorésistances de l'université Claude

Bernard de Lyon 1 nous a permis de tester 13 autres molécules synthétiques de type stilbénoides, mais là encore les activités biologiques obtenues n'ont pas été concluantes.

Finalement, notre projet de thèse a permis le développement d'un essai simple et reproductible permettant de cribler des molécules et de détecter celles possédant des capacités inhibitrices d'arginase mammifère. Nous avons pu également identifier des composés naturels « têtes de série » utilisables pour le développement d'analogues plus actifs. L'une des molécules hémi-synthétiques obtenue (CAPA) s'est révélée plus active que les composés d'origine mais des études plus poussées devront être menées, notamment pour évaluer son effet *in vitro* sur l'arginase humaine, avant d'envisager d'éventuelles études *in vivo* pour véritablement confirmer son intérêt.

Partie expérimentale

Chapitre X : Optimisation du test enzymatique in vitro sur b-ARG I et évaluation de l'activité inhibitrice

X-1. Matériels

Tous les réactifs proviennent de chez Sigma-Aldrich, sauf le picéatannol (TCI Chemicals), le resvératrol (Alexis Biochemicals) et l'acide quinique (Alfa Aesar). Le S-(2-boronoéthyl)-L-cystéine (BEC) provient de Calbiochem (Millipore) et l'arginase bovine purifiée de foie (b-ARG I) de MP Biomedicals. Une unité (1U) de cette arginase bovine est définie par ce fournisseur comme étant la quantité d'enzyme qui convertit 1 μ mole de L-arginine en urée et L-ornithine par minute à pH 9,5 et à 37°C. Une solution mère à 1U/ μ L de cette enzyme est préparée dans le tampon suivant: Tris/HCl (50 mM, pH = 7,5) avec 0,1% d'albumine de sérum bovin (désignée comme tampon TBSA par la suite) contenant NaCl 0,1 M et 20% de glycérol. Cette solution mère est stockée à -26 ° C jusqu'à son utilisation.

X-2. Détermination de $V_{\max}$ et K_m

L'activité de b-ARG I purifiée a été évaluée à différentes concentrations de L-arginine à 37°C pendant 15 min. Nous avons utilisé des dilutions en série d'une solution mère à 2M de L-arginine, nous donnant des concentrations du substrat dans chaque puits variant de 0 à 286 mM. En utilisant une courbe standard d'urée mentionnée ci-dessous, nous avons converti les absorbances à 550 nm en nmole d'urée produite par min. L'expérimentation a été réalisée quatre fois de manière indépendante et à chaque fois en triplicat. Nous avons ensuite tracé la production d'urée en fonction de la concentration de L-arginine en utilisant le logiciel GraphPad Prism (version 5.0.3) pour déterminer les valeurs $V_{\max}$ et K_m .

X-3. Évaluation de la capacité inhibitrice d'arginase *in vitro*

Procédure générale. Une solution mère à 70 mM dans diméthylsulfoxyde (DMSO) 100% est d'abord préparée dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) 100%, puis est ensuite diluée en série dans l'eau ultra-pur (EUP) pour avoir des concentrations plus faibles utilisées dans le test enzymatique (au moins 8 concentrations allant de 10^{-7} à 10^{-3} M). Dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits, les solutions suivantes sont ajoutées dans cet ordre: (i) 10 μ L de tampon TBSA avec ou sans (contrôle) arginase à 0,025 U/ μ L, sauf indication contraire, (ii) 30 μ L de Tris- une solution de HCl (50 mM, pH 7,5) contenant 10 mM de MnCl_2 en tant que cofacteur, (iii) 10 μ L d'une solution contenant un inhibiteur de référence (Témoin positif), une solution de molécule à tester ou un solvant (Témoin négatif/ blanc), (4) 20 μ L de L-arginine (pH 9,7, 0,05M, sauf autres indications contraires). La microplaque est couverte par un film plastique collant, et mise à incuber pendant 60 min dans un bain-marie à 37°C. La réaction enzymatique est stoppée par addition de 120 μ L d'une solution d'acides $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (1: 3: 7) après avoir placé la microplaque sur la glace. Ensuite, 10 μ L d'ISPF (5% dans l'éthanol absolu) sont ajoutés, et la microplaque est couverte d'un film d'aluminium collant, puis placée dans un four à 100°C pendant 45 min. La microplaque est ensuite maintenue dans l'obscurité jusqu'à refroidissement, car la couleur issue de la réaction entre l'urée et l'ISPF est sensible à la lumière. Après 5 min de centrifugation et 10 min supplémentaires de refroidissement, la microplaque est agitée pendant 2 min et la densité optique est mesurée à 550 nm à 25°C grâce à un spectrophotomètre (Synergy HT Biotek).

Évaluation en mode « criblage ». Dans le cas d'une première évaluation rapide, un criblage des composés à tester est réalisé à la concentration de 100 μ M. Dans ce cas, l'évaluation de la capacité inhibitrice de l'arginase est exprimée en pourcent. Elle est calculée par rapport à l'activité maximale de l'arginase (activité en absence de molécule à tester). Une

expérimentation nécessite une microplaque et permet d'évaluer neuf composés différents à deux concentrations et en duplicat. Chaque expérimentation est répétée trois fois de façon indépendantes.

Obtention de la CI_{50} et de E_{max} . Dans ce cas, l'activité de l'arginase est exprimée comme la quantité d'urée produite par minute - calculé à partir d'une courbe standard d'urée (gamme). Pour obtenir la courbe standard, des solutions d'urée (70 μ L) de concentrations croissantes sont ajoutées dans des puits puis la procédure de révélation de la coloration, décrite ci-dessus, est appliquée. Une expérimentation nécessite une microplaque et permet d'obtenir les CI_{50} et E_{max} pour un inhibiteur de référence ou un composé à tester. Les concentrations d'inhibiteur ou de composé à tester s'échelonnent entre 10^{-7} et 10^{-3} . Chaque concentration est testée en triplicat et chaque expérimentation est répétée trois fois de façon indépendante. Les valeurs obtenues sont reportées sur une échelle semi-logarithmique pour tracer la courbe sigmoïde concentration-réponse. Ce type de courbe est obtenue par le biais du logiciel GraphPad qui fournit également les valeurs de CI_{50} et E_{max} , ainsi que leurs intervalles de confiance.

X-4. Détermination de K_i et du type d'inhibition

L'activité de b-ARG I purifiée (0,25 unité) a été dosée en présence de différentes concentrations de l'inhibiteur de référence BEC (0 ; 2,5 ; 5 ; 10 et 20 μ L) pour chaque concentration du substrat L-arginine (7,1 ; 14,3 ; 28,6 et 57,1 mM) à 37°C pendant 60 min. L'urée produite a été mesurée comme décrit ci-dessus. Après avoir tracé la production d'urée en fonction de la concentration BEC pour chaque concentration d'arginine, nous avons pu déterminer la constante K_i grâce à l'ordonnée du point d'intersection entre les quatre lignes obtenues ou à l'aide de la courbe secondaire de Lineweaver-Burk en utilisant le logiciel

GraphPad Prism (version 5.0.3). Les expérimentations ont été effectuées chacune en triplicat et trois fois de manière indépendante.

X-6. Pipetage automatisé appliqué au test d'évaluation de l'activité arginase

Le protocole semi-automatisé a été mis en œuvre en utilisant un robot de pipetage Microlab Nimbus (Hamilton France) pour maximiser le flux de travail et de précision. Microlab Nimbus est équipé avec 4 canaux de pipetage et équipé du logiciel Hamilton Run Control [166].

Chapitre XI : Chimie

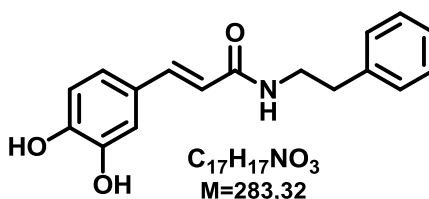
Tous les réactifs ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich et utilisés sans purification supplémentaire. Les solvants (méthanol, acétate d'éthyle, cyclohexane et dichlorométhane) ont été fournis par les sociétés Carlo Erba Reagents et VWR Chemicals. Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques pré-revêtues de gel de silice aluminium (Macherey-Nagel) et la visualisation effectuée sous lumière UV (à 254 et 365 nm). Les purifications par chromatographie Flash ont été effectuées à l'aide d'un appareil Spot II Armen, en utilisant des cartouches EasyVarioFlash[®] DL (Merck) avec dépôt solide, et comme éluants, des mélanges de CH₂Cl₂ et MeOH. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) analytique a été réalisée à l'aide d'un appareil de Shimadzu, équipé un détecteur UV-Vis et une colonne à phase inverse C18 (EVO C18, 100Å, H15-075635, 250 x 4,6 mm), volume d'injection de 20 µL, débit à 1mL/min. La CLHP préparative a été effectuée par un appareil PLC2020 (Gilson), équipé un détecteur UV-Vis et une colonne à phase inverse C18 (EVO C18, 100Å, H15-081422, 250 x 21,2 mm), volume d'injection de 500 µL, débit à 20 ml/min. Tous les échantillons ont été solubilisé dans MeOH et filtré sur filtre millipore Nylon 0,2 µm. ¹H-RMN à 300 MHz et ¹³C-RMN à 75 MHz (¹³C-RMN uniquement pour les composés dont les données analytiques manquaient dans la littérature) ont été acquises à l'aide d'un spectromètre Bruker AC300 (Bruker BioSpin). Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en parties par million (ppm) par rapport aux signaux de solvants résiduels [208]. Les constantes de couplage (J) sont indiquées en hertz (Hz). Les données sont présentées dans l'ordre suivant: déplacement chimique (δ , ppm), multiplicité (s, singlet; bs, singlet large; d, doublet; dd, doublet de doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet), constante de couplage (J , Hz), intégration. Les spectres infra-rouge (IR) ont été mesurés à l'aide d'un appareil Spectrum65 Perkin Elmer avec UART. Les absorptions sont données en

cm⁻¹. Les spectres de masse à haute résolution, réalisés en mode ionisation par électrospray (HRMS-ESI), ont été réalisés par l'instrument SCA Illkirch QToF (Strasbourg).

XI-1. Synthèse des dérivés amides de l'acide caféique

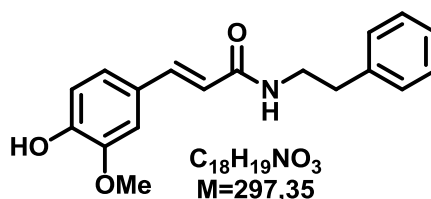
Protocole général (Amidation grâce au catalyseur PyBOP): Une solution d'acide cinnamique substitué ou de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (1,66 mmol) et de la triméthylamine (Et₃N) (0,35 ml, 2,49 mmol, 1,5 éq.) dans du diméthylformamide (DMF) (3,5 ml) est refroidie dans un bain de glace (0°C). Une amine correspondante (1,66 mmol, 1 éq.) est ajoutée puis une solution de benzotriazolyloxy-tris(pyrrolidino)-phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) (864 mg, 1,66 mmol, 1 éq.) dans du dichlorométhane (CH₂Cl₂) (3,5 ml). Le mélange est agité pendant 30 min à 0°C, puis pendant une nuit à température ambiante. La solution réactionnelle est ensuite concentrée sous vide pour éliminer CH₂Cl₂. Ensuite, 30 ml d'eau sont ajoutés à la solution restante et le mélange résultant est extrait par de l'acétate d'éthyle (EtOAc) (3 x 75 ml). La phase organique alors obtenue est lavée avec successivement 100 ml d'une solution 1M de HCl, 100 ml d'eau, 100 ml d'une solution 1 M de NaHCO₃ et 100 ml d'eau salée, avant d'être séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis concentrée sous vide. Le brut est purifié par Chromatographie flash sur gel de silice (éluant: CH₂Cl₂ : MeOH / 98: 2 à 80:20) pour obtenir le composé visé [180].

XI-1.1. (E)-N-(2-phényléthyl)-3,4-dihydroxycinnamide (44)



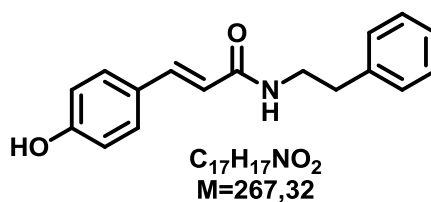
Protocole général utilisant l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (300 mg, 1,66 mmol) et la 2-phényléthylamine (209 μ L, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **44** (213 mg, 45%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,2$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5); IR (ATR) $\gamma \text{ cm}^{-1}$: 3259, 3087, 3061, 3027, 2969, 2935, 2870, 1702, 1652, 1590, 1513; $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , 300 MHz): δ 8,23 (s, 2H), 7,41 (d, $J = 15,6$, 1H), 7,31-7,17 (m, 6H), 7,06 (s, 1H), 6,93 (d, $J = 8,0$, 1H), 6,83 (d, $J = 8,0$, 1H), 6,43 (d, $J = 15,6$, 1H), 3,57-3,50 (m, 2H), 2,90-2,82 (m, 2H); HRMS (ESI) m/z calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 284,1208, trouvée : 284,1288. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [209].

XI-1.2. (E)-N-(2-phényléthyl)-3-méthoxy-4-hydroxycinnamide (45)



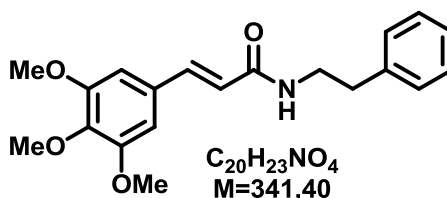
Protocole général utilisant l'acide 3-methoxy-4-hydroxycinnamique (322 mg, 1,66 mmol) et la 2-phényléthylamine (209 μ L, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **45** (388 mg, 79%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,33$ (Cyclohexane/EtOAc 4:6); IR (ATR) $\gamma \text{ cm}^{-1}$: 3270, 3063, 3027, 2935, 1652, 1585, 1510; $^1\text{H-NMR}$ (MeOD- d_4 , 300 MHz): δ 7,44 (d, $J = 15,7$, 1H), 7,32-7,17 (m, 5H), 7,12 (s, 1H), 7,03 (d, $J = 8,4$, 1H), 6,79 (d, $J = 8,4$, 1H), 6,40 (d, $J = 15,7$, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,52 (t, $J = 7,2$, 2H), 2,86 (t, $J = 7,2$, 2H); HRMS (ESI) m/z calculée pour $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 298,1365, trouvée : 298,1442. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [210].

XI-1.3. (E)-N-(2-phényléthyl)-4-hydroxycinnamide (46)



Protocole général utilisant l'acide 4-hydroxycinnamique (272 mg, 1,66 mmol) et la 2-phényléthylamine (209 μ L, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **46** (288 mg, 65%) sous forme de sirop incolore. $R_f = 0,56$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5); IR (ATR) γ cm^{-1} : 3400, 3263, 3085, 3064, 3026, 2934, 2813, 2750, 2687, 2608, 1651, 1600, 1579, 1511; ^1H -NMR ($MeOD-d_4$, 300 MHz): δ 7,47-7,38 (m, 3H), 7,31-7,17 (m, 5H), 6,78 (d, $J = 8,4$, 2H), 6,38 (d, $J = 15,7$, 1H), 3,51 (t, $J = 7,2$, 2H), 2,85 (t, $J = 7,2$, 2H); HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{17}H_{18}NO_2$ [$M + H$] $^+$: 268,1259, trouvée : 268,1336. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [211].

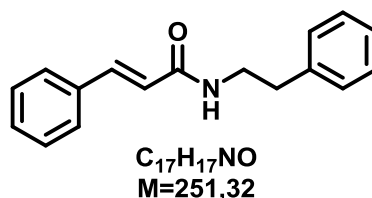
XI-1.4. (E)-N-(2-phényléthyl)-3,4,5-triméthoxycinnamide (47)



Protocole général utilisant l'acide 3,4,5-triméthoxycinnamique (395 mg, 1,66 mmol) et la 2-phényléthylamine (209 μ L, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **47** (511 mg, 90%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,56$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5); IR (ATR) γ cm^{-1} : 3305, 3087, 3062, 3030, 3005, 2967, 2933, 2862, 2835, 1653, 1615, 1581, 1536, 1506; ^1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 7,53 (d, $J = 15,5$, 1H), 7,36-7,22 (m, 5H), 6,71 (s, 2H), 6,22 (d, $J = 15,5$, 1H), 5,55 (bs, 1H), 3,88 (s, 6H), 3,87 (s, 3H), 3,71-3,65 (m, 2H), 2,89 (t, $J = 6,8$, 2H); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 165,9, 153,5, 141,1, 139,6, 138,9, 130,5, 128,9, 128,8, 126,7, 120,0,

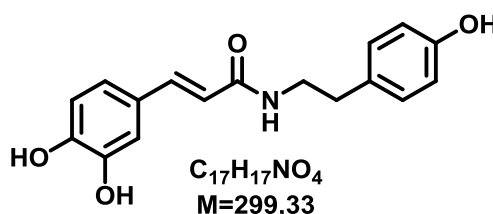
104,9, 61,1, 56,2, 40,9, 35,7; HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{20}H_{24}NO_4$ $[M + H]^+$: 342,1627, trouvée : 342,1709.

XI-1.5. (E)-N-(2-phényléthyl)cinnamide (48)



Protocole général utilisant l'acide cinnamique (246 mg, 1,66 mmol) et la 2-phényléthylamine (209 μ L, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **48** (330 mg, 79%) sous forme de solide blanc. R_f = 0,7 (CH_2Cl_2 /MeOH 95:5); IR (ATR) γ cm^{-1} : 3265, 3062, 3030, 2971, 2944, 2862, 1959, 1895, 1819, 1660, 1651, 1603, 1579, 1544; ^1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 7,62 (d, J = 15,5, 1H), 7,50-7,47 (m, 2H), 7,40-7,31 (m, 5H), 7,25-7,22 (m, 3H), 6,32 (d, J = 15,5, 1H), 5,58 (bs, 1H), 3,71-3,65 (m, 2H), 2,90 (t, J = 6,6, 2H); HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{17}H_{18}NO$ $[M + H]^+$: 252,1310, trouvée : 252,1386. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [212].

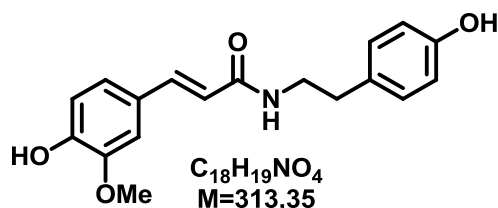
XI-1.6. (E)-N-(2-(4-hydroxyphényl)éthyl)-3,4-dihydroxycinnamide (49)



Protocole général utilisant l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (300 mg, 1,66 mmol) et la 2-(4-hydroxyphényl)éthylamine (228 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **49** (358 mg, 72%) comme un solide jaune pâle. R_f = 0,64 (Cyclohexane/EtOAc 1:9); IR (ATR) γ cm^{-1} : 3349, 3167, 3030, 2960, 2930, 2877, 1727, 1645, 1602, 1578, 1535, 1514; ^1H -NMR (DMSO-

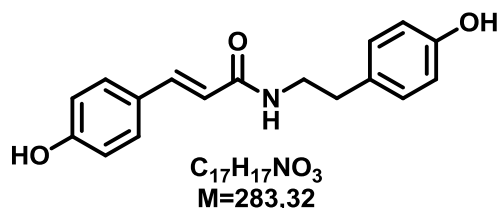
*d*₆, 300 MHz): δ 9,23 (bs, 3H), 8,02 (bs, 1H), 7,21 (d, $J = 15,6$, 1H), 7,0 (d, $J = 8,2$, 2H), 6,93 (s, 1H), 6,82 (d, $J = 8,0$, 1H), 6,73 (d, $J = 8,0$, 1H), 6,67 (d, $J = 8,2$, 2H), 6,31 (d, $J = 15,6$, 1H), 3,34-3,28 (m, 2H), 2,63 (t, $J = 7,3$, 2H); HRMS (ESI) m/z calculée pour C₁₇H₁₈NO₄ [M + H]⁺ : 300,1236, trouvée : 300,1235. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [213].

XI-1.7. (*E*)-*N*-(4-hydroxyphénéthyl)-3-méthoxy-4-hydroxycinnamide (**50**)



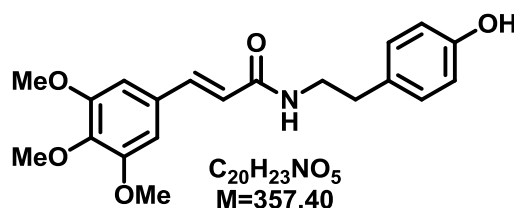
Protocole général utilisant l'acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique (322 mg, 1,66 mmol) et la 4-hydroxyphénéthylamine (228 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **50** (298 mg, 57%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,22$ (Cyclohexane/EtOAc 5:5); IR (ATR) γ cm⁻¹: 3287, 3015, 2936, 1651, 1586, 1510; ¹H-NMR (MeOD-*d*₄, 300 MHz): δ 7,43 (d, $J = 16,0$, 1H), 7,12 (s, 1H), 7,07-7,01 (m, 3H), 6,79 (d, $J = 8,1$, 1H), 6,71 (d, $J = 8,0$, 2H), 6,40 (d, $J = 16,0$, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,47 (t, $J = 6,9$, 2H), 2,76 (t, $J = 6,9$, 2H); HRMS (ESI) m/z calculée pour C₁₈H₂₀NO₄ [M + H]⁺ : 314,1314, trouvée : 314,1396. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [214].

XI-1.8. (*E*)-*N*-(4-hydroxyphénéthyl)-4-hydroxycinnamide (**51**)



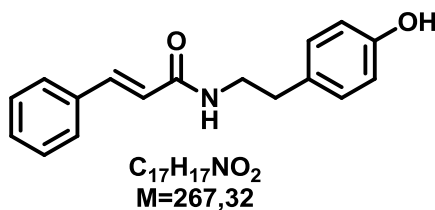
Protocole général utilisant l'acide 4-hydroxycinnamique (272 mg, 1,66 mmol) et la 4-hydroxyphénéthylamine (228 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **51** (233 mg, 50%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,30$ (Cyclohexane/EtOAc 5:5); IR (ATR) $\gamma \text{ cm}^{-1}$: 3431, 3171, 3024, 2942, 1895, 1660, 1622, 1602, 1590, 1530, 1510; $^1\text{H-NMR}$ (MeOD- d_4 , 300 MHz): δ 7,46-7,38 (m, 3H), 7,05 (d, $J = 8,1$, 2H), 6,78 (d, $J = 8,3$, 2H), 6,71 (d, $J = 8,1$, 2H), 6,38 (d, $J = 15,6$, 1H), 3,45 (t, $J = 7,3$, 2H), 2,75 (t, $J = 7,3$, 2H); HRMS (ESI) m/z calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 284,1208, trouvée : 284,1285. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [215].

XI-1.9. (E)-N-(4-hydroxyphénéthyl)-3,4,5-triméthoxycinnamide (52)



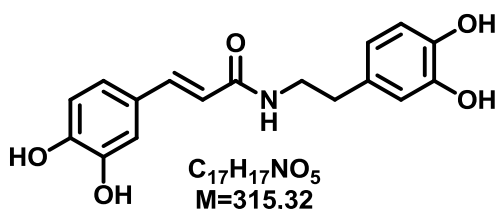
Protocole général utilisant l'acide 3,4,5-triméthoxycinnamique (395 mg, 1,66 mmol) et la 4-hydroxyphénéthylamine (228 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **52** (586 mg, 98%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,26$ (Cyclohexane/EtOAc 5:5); IR (ATR) $\gamma \text{ cm}^{-1}$: 3323, 3012, 2963, 2940, 2909, 2888, 2847, 2824, 2605, 1994, 1652, 1605, 1580, 1544, 1516, 1504; $^1\text{H-NMR}$ (MeOD- d_4 , 300 MHz): δ 7,44 (d, $J = 15,7$, 1H), 7,06 (d, $J = 8,1$, 2H), 6,86 (s, 2H), 6,72 (d, $J = 8,1$, 2H), 6,51 (d, $J = 15,7$, 1H), 3,87 (s, 6H), 3,78 (s, 3H), 3,48 (t, $J = 7,2$, 2H), 2,76 (t, $J = 7,2$, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD- d_4 + 10% CDCl_3 , 75 MHz): δ 168,5, 156,8, 154,5, 141,6, 140,4, 132,1, 131,1, 130,7, 121,2, 116,2, 106,1, 61,3, 56,7, 42,5, 35,7; HRMS (ESI) m/z calculée pour $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 358,1576, trouvée : 358,1657.

XI-1.10. (E)-N-(4-hydroxyphénéthyl)-cinnamide (53)



Protocole général utilisant l'acide cinnamique (246 mg, 1,66 mmol) et la 4-hydroxyphénéthylamine (228 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **53** (359 mg, 81%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,44$ (Cyclohexane/EtOAc 5:5); IR (ATR) γ cm^{-1} : 3429, 3268, 3059, 3022, 2941, 2922, 2858, 1889, 1665, 1624, 1611, 1592, 1532, 1512; ^1H -NMR (MeOD- d_4 , 300 MHz): δ 7,56-7,49 (m, 3H), 7,42-7,33 (m, 3H), 7,06 (d, $J = 8,2$, 2H), 6,72 (d, $J = 8,2$, 2H), 6,57 (d, $J = 16,0$, 1H), 3,47 (t, $J = 6,9$, 2H), 2,76 (t, $J = 6,9$, 2H); HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{17}H_{18}NO_2$ $[M + H]^+$: 268,1259, trouvée : 268,1337. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [216].

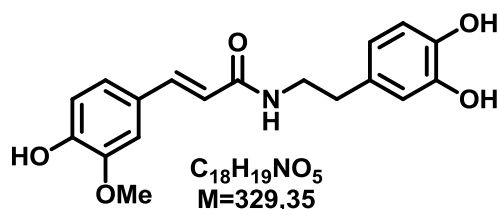
XI-1.11. (E)-N-(3,4-dihydroxyphénéthyl)-3,4-dihydroxycinnamide (54)



Protocole général utilisant l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (300 mg, 1,66 mmol) et la 3,4-dihydroxyphénéthylamine hydrochlorure (315 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **54** (229 mg, 44%) comme un solide jaune pâle. $R_f = 0,45$ (CH_2Cl_2 /MeOH 85:15); IR (ATR) γ cm^{-1} : 3214, 2938, 2723, 1695, 1650, 1586, 1514; ^1H -NMR (Acetone- d_6 , 300 MHz): δ 8,15 (bs, 4H), 7,43 (s, 1H), 7,42 (d, $J = 15,6$, 1H), 7,06 (s, 1H), 6,89 (d, $J = 8,1$, 1H), 6,8 (d, $J = 8,2$, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,69 (d, $J = 8,2$, 1H), 6,52 (d, $J = 8,1$, 1H), 6,44 (d, $J = 15,6$, 1H), 3,47 (m, 2H), 2,67 (t, $J = 6,9$, 2H); HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{17}H_{18}NO_5$ $[M + H]^+$:

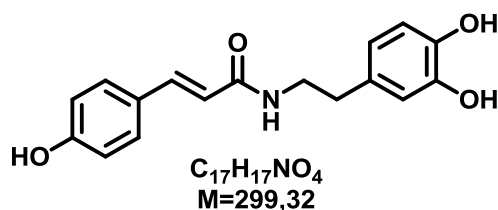
316,1185; trouvée : 316,1181. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [217].

XI-1.12. (E)-N-(3,4-dihydroxyphénéthyl)-3-méthoxy-4-hydroxycinnamide (55)



Protocole général utilisant l'acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique (322 mg, 1,66 mmol) et la 3,4-dihydroxyphénéthylamine hydrochlorure (315 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **55** (164 mg, 30%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,14$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5); IR (ATR) γ cm^{-1} : 3321, 2969, 2937, 2841, 2720, 1651, 1585, 1510; ^1H -NMR (MeOD- d_4 , 300 MHz): δ 7,43 (d, $J = 16,0$, 1H), 7,12 (s, 1H), 7,02 (d, $J = 8,0$, 1H), 6,79 (d, $J = 8,3$, 1H), 6,71-6,67 (m, 2H), 6,55 (d, $J = 8,0$, 1H), 6,40 (d, $J = 16,0$, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,46 (t, $J = 7,0$, 2H), 2,70 (t, $J = 7,0$, 2H). ^{13}C -NMR (MeOD- d_4 , 75 MHz): δ 169,3, 149,9, 149,4, 146,4, 144,9, 142,2, 132,2, 128,4, 123,4, 121,2, 118,9, 117,0, 116,6, 116,5, 111,6, 56,5, 42,7, 36,2; HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{18}H_{20}NO_5$ $[M + H]^+$: 330,1263; trouvée : 330,1342.

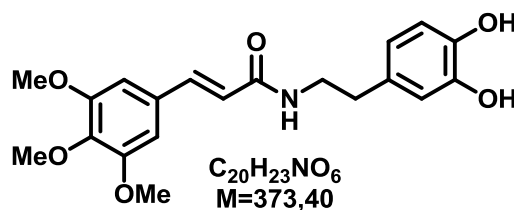
XI-1.13. (E)-N-(3,4-dihydroxyphénéthyl)-4-hydroxycinnamide (56)



Protocole général utilisant l'acide 4-hydroxycinnamique (272 mg, 1,66 mmol) et la 3,4-dihydroxyphénéthylamine hydrochlorure (315 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **56** (204 mg, 41%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,15$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5); IR (ATR) γ

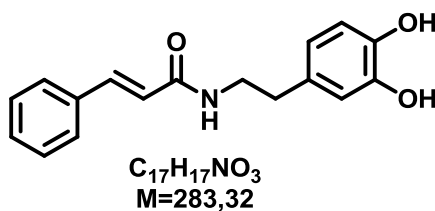
cm⁻¹: 3270, 3025, 2938, 2817, 2701, 1696, 1648, 1577, 1511; ¹H-NMR (MeOD-*d*₄, 300 MHz): δ 7,44 (d, *J* = 16,0, 1H), 7,40 (d, *J* = 8,4, 2H), 6,79 (d, *J* = 8,4, 2H), 6,70-6,67 (m, 2H), 6,55 (d, *J* = 8,0, 1H), 6,38 (d, *J* = 16,0, 1H), 3,45 (t, *J* = 7,0, 2H), 2,70 (t, *J* = 7,0, 2H); HRMS (ESI) *m/z* calculée pour C₁₇H₁₈NO₄ [M + H]⁺ : 300,1158; trouvée : 300,1233. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [178].

XI-1.14. (*E*)-*N*-(3,4-dihydroxyphénéthyl)-3,4,5-triméthoxycinnamide (57)



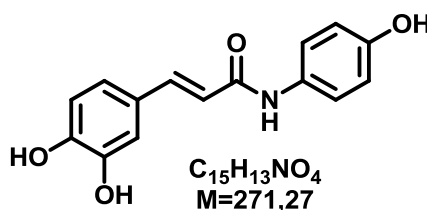
Protocole général utilisant l'acide 3,4,5-triméthoxycinnamique (395 mg, 1,66 mmol) et la 3,4-dihydroxyphénéthylamine hydrochlorure (315 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **57** (436 mg, 70%) sous forme de solide blanc. *R_f* = 0,26 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5); IR (ATR) γ cm⁻¹: 3337, 3105, 3040, 2963, 2944, 2843, 2728, 1706, 1658, 1613, 1605, 1585, 1544, 1504; ¹H-NMR (MeOD-*d*₄, 300 MHz): δ 7,44 (d, *J* = 15,7, 1H), 6,87 (s, 2H), 6,71-6,67 (m, 2H), 6,57-6,48 (m, 2H), 3,87 (s, 6H), 3,78 (s, 3H), 3,47 (t, *J* = 7,2, 2H), 2,71 (t, *J* = 7,2, 2H); HRMS (ESI) *m/z* calculée pour C₂₀H₂₄NO₆ [M + H]⁺ : 374,1525; trouvée : 374,1605. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [218].

XI-1.15. (*E*)-*N*-(3,4-dihydroxyphénéthyl)cinnamide (58)



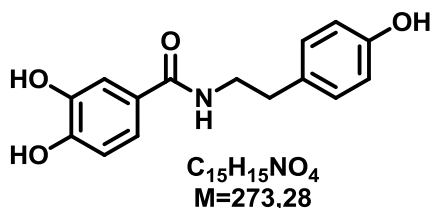
Protocole général utilisant l'acide cinnamique (246 mg, 1,66 mmol) et 3,4-dihydroxyphénéthylamine hydrochlorure (315 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **58** (293 mg, 62%) sous forme de sirop incolore. $R_f = 0,29$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5); IR (ATR) $\gamma \text{ cm}^{-1}$: 3265, 2927, 1702, 1655, 1599, 1519; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{MeOD-}d_4$, 300 MHz): δ 7,56-7,49 (m, 3H), 7,42-7,35 (m, 3H), 6,71-6,67 (m, 2H), 6,60-6,54 (m, 2H), 3,47 (t, $J = 7,2$, 2H), 2,71 (t, $J = 7,2$, 2H); HRMS (ESI) m/z calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 284,1208; trouvée : 284,1283. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [178].

XI-1.16. (E)-N-(4-hydroxyphényl)-3,4-dihydroxycinnamide (59)



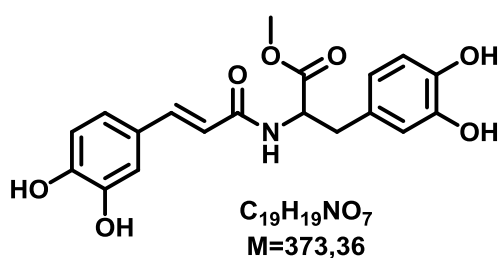
Protocole général utilisant l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (300 mg, 1,66 mmol) et la 4-hydroxyphénylamine (181 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **59** (84 mg, 19%) sous forme de solide brun. $R_f = 0,65$ (Cyclohexane/EtOAc 1:9); IR (ATR) $\gamma \text{ cm}^{-1}$: 3210, 1696, 1648, 1588, 1535, 1508; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz): δ 9,83 (s, 1H), 9,46 (bs, 1H), 9,21 (bs, 2H), 7,46 (d, $J = 8,6$, 2H), 7,33 (d, $J = 15,6$, 1H), 6,98 (s, 1H), 6,88 (d, $J = 8,3$, 1H), 6,76 (d, $J = 8,3$, 1H), 6,70 (d, $J = 8,6$, 2H), 6,49 (d, $J = 15,6$, 1H); HRMS (ESI) m/z calculée pour $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 272,0923, trouvée : 272,0918. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [219].

XI-1.17. *N*-(4-hydroxyphénéthyl)-3,4-dihydroxybenzamide (60)



Protocole général utilisant l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (256 mg, 1,66 mmol) et la 4-hydroxyphénéthylamine (228 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **60** (53 mg, 12%) sous forme de sirop incolore. $R_f = 0,19$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5); IR (ATR) γ cm^{-1} : 3177, 2970, 2948, 2869, 1698, 1632, 1589, 1553, 1510; ^1H -NMR (MeOD- d_4 , 300 MHz): δ 7,24 (d, $J = 2,0$, 1H), 7,15 (dd, $J_1 = 8,2$, $J_2 = 2,0$, 2H), 7,06 (d, $J = 8,3$, 2H), 6,78 (d, $J = 8,2$, 1H), 6,71 (d, $J = 8,3$, 2H), 3,49 (t, $J = 7,3$, 2H), 2,78 (t, $J = 7,3$, 2H). HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{15}H_{16}NO_4$ $[M + H]^+$: 274,1001, trouvée : 274,1072. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [220].

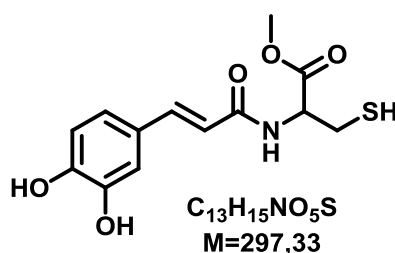
XI-1.18. 3-(3,4-Dihydroxyphényl)-2-[3-(3,4-dihydroxyphényl)-acryloylamino]-propionique méthyl ester (61)



Protocole général utilisant l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (300 mg, 1,66 mmol) et la L-3,4-dihydroxyphénylalanine méthyl ester (315 mg, 1,66 mmol, précédemment préparé d'après [221]) pour obtenir le composé **61** (332 mg, 54%) sous forme de solide jaune. $R_f = 0,5$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 85:15); IR (ATR) γ cm^{-1} : 3308, 2953, 2838, 2725, 1722, 1650, 1594, 1514; ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 8,35 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 6,93

(s, 1H), 6,83 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 6,73 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 6,61-6,59 (m, 2H), 6,45 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 6,38 (d, $J = 15,7$ Hz, 1H), 4,46 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 2,89-2,72 (m, 2H); HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{19}H_{20}NO_7$ $[M + H]^+$: 374,1240; trouvée : 374,1240. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [222].

XI-1.19. (E)-N-(3,4-dihydroxycinnamoyl)-L-cystéine méthyl ester (62)



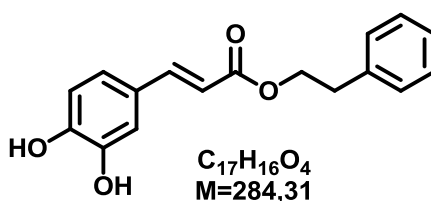
Protocole général utilisant l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (300 mg, 1,66 mmol) et L-cystéine méthyl ester hydrochlorure (285 mg, 1,66 mmol) pour obtenir le composé **62** (50,8 mg, 10%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,19$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5); IR (ATR) γ cm^{-1} : 3472, 3400, 3318, 3163, 2952, 2551, 1730, 1654, 1592, 1524; ^1H -NMR (Acetone- d_6 , 300 MHz): δ 8,31 (bs, 2H), 7,52 (d, $J = 7,6$, 1H), 7,44 (d, $J = 15,6$, 1H), 7,09 (d, $J = 1,8$, 1H), 6,97 (dd, $J_1 = 1,8$, $J_2 = 8,2$, 1H), 6,84 (d, $J = 8,2$, 1H), 6,62 (d, $J = 15,6$, 1H), 4,87-4,80 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,05-2,93 (m, 2H), 1,96 (t, $J = 8,5$, 1H); HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{13}H_{16}NO_5S$ $[M + H]^+$: 298,0671; trouvée : 298,0750. Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [217].

XI-2. Synthèse des dérivés esters de l'acide caféique

Protocole général (Réaction de Mitsunobu) : À une solution refroidie (0°C) fraîchement préparée contenant un alcool (1 mmol) et l'acide caféique (180 mg, 1 mmol, 1 éq.) dans le tétrahydrofurane (THF) anhydre (3,5 ml), sont ajoutés la triphénylphosphine (280

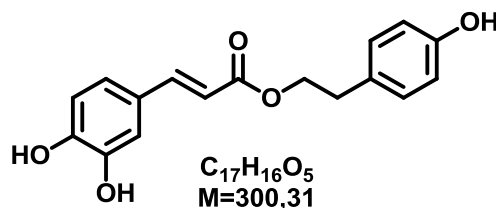
mg, 1 mmol, 1 éq.) et le diisopropylazodicarboxylate (208 μ l, 1 mmol, 1 éq.). Après agitation pendant 48 heures à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite, puis le résidu est partagé entre l'acétate d'éthyle (60 ml) et une solution de NaHCO_3 saturé (50 ml). La phase organique est lavée avec de la saumure (50 ml), puis séchée sur Na_2SO_4 anhydre avant d'être concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est alors purifié par chromatographie flash (dépôt solide, éluants: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98: 2 à 90:10) pour isoler l'ester désiré [185].

XI-2.1. (*E*)-phénéthyl 3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (**63**)



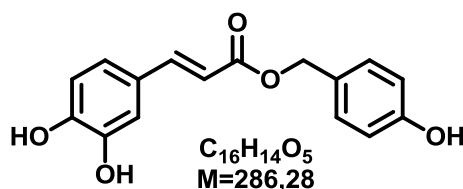
Protocole général utilisant le 2-phényléthanol (124 μ L, 1 mmol). Des purifications par chromatographie flash ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98: 2 à 90:10) puis par CLHP préparative (Eau/MeOH, en gradient) ont été utilisées pour isoler le composé **63** (61 mg, 21%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,33$ (Cyclohexane/EtOAc 60:40); $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , 300 MHz): δ 8,39 (bs, 1H), 8,12 (bs, 1H), 7,52 (d, $J = 16,0$, 1H), 7,32 (s, 2H), 7,31 (s, 2H), 7,26-7,19 (m, 1H), 7,15 (d, $J = 2,1$, 1H), 7,04 (dd, $J_1 = 2,1$, $J_2 = 8,1$, 1H), 6,87 (d, $J = 8,1$, 1H), 6,26 (d, $J = 16,0$, 1H), 4,35 (t, $J = 7,0$, 2H), 2,99 (t, $J = 7,0$, 2H). Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [223].

XI-2.2. (E)-4-hydroxyphénéthyl-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (64)



Protocole général utilisant le tyrosol (138 mg, 1 mmol) pour obtenir le composé **64** (170 mg, 57%) sous forme de solide blanc. $R_f = 0,18$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5); ^1H -NMR (Acetone- d_6 , 300 MHz): δ 8,30 (bs, 3H), 7,52 (d, $J = 16$, 1H), 7,15-7,11 (m, 3H), 7,04 (dd, $J_1 = 1,9$, $J_2 = 8,0$, 1H), 6,86 (d, $J = 8,0$, 1H), 6,78 (d, $J = 8,4$, 2H), 6,27 (d, $J = 16,0$, 1H), 4,28 (t, $J = 7,0$, 2H), 2,89 (t, $J = 7,0$, 2H). Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [224].

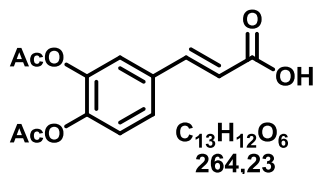
XI-2.3. (E)-4-hydroxybenzyl-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (65)



Protocole général utilisant l'alcool 4-hydroxybenzylique (124 mg, 1 mmol) pour obtenir le composé **65** (21 mg, 7%) sous forme de solide jaune pâle. $R_f = 0,12$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5); ^1H -NMR (Acetone- d_6 , 300 MHz): δ 8,39 (bs, 3H), 7,55 (d, $J = 16,0$, 1H), 7,28 (d, $J = 8,4$, 2H), 7,16 (d, $J = 2,0$, 1H), 7,04 (dd, $J_1 = 2,0$, $J_2 = 8,2$, 1H), 6,87-6,83 (m, 3H), 6,30 (d, $J = 16,0$, 1H), 5,10 (s, 2H). ^{13}C -NMR (Acetone- d_6 , 400 MHz): δ 167,4, 158,4, 146,3, 145,9, 131,1, 129,1, 128,6, 127,7, 122,6, 116,4, 116,1, 115,7, 115,3, 66,4. HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{16}H_{14}NaO_5$ $[M + Na]^+$: 309.0841; trouvée : 309.0732.

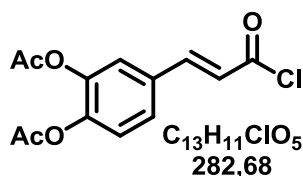
XI-3. Synthèse de (E)-acétoxybenzyl-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (66)

XI-3.1. Acide 3,4-di-O-acétylcaféique



Dans un ballon à fond rond placé dans un bain d'eau glacée, contenant la solution d'acide caféique (900 mg, 5 mmol) et de DMAP (15 mg, 0,125 mmol) dans de la pyridine (2,5 ml) est ajouté de l'anhydride acétique (1,2 ml, 12,5 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h, puis versé sur de la glace pilée. La phase aqueuse est acidifiée avec solution HCl 1 M, puis extraite par EtOAc / THF (3: 1; 3 x 40 ml). Les phases organiques combinées sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrée, concentrée sous pression réduite, puis laisser sécher à température ambiante pendant une nuit. La trituration du résidu avec de l'éther de pétrole (30 ml) contenant de petites quantités d'EtOAc (5 gouttes) a fournit l'acide 3,4-di-O-acétylcaféique (1,27 g, 96%) sous forme d'un solide blanc [190]. $R_f = 0,2$ (Cyclohexane/EtOAc 60:40); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 12,55 (bs, 1H, -OH), 7,65 (s, 1H, H-ar), 7,63 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H-ar), 7,54 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, H_β), 7,31 (d, 1H, H-ar), 6,53 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 2,29 (s, 3H, -OCH₃), 2,28 (s, 3H, -OCH₃).

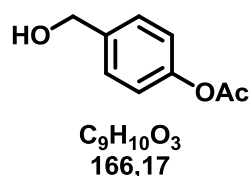
XI-3.2. Chlorure d'acide 3,4-O-diacétylcaféique



Dans un ballon à fond rond de 50 ml, sous atmosphère d'azote, l'acide 3,4-di-O-acétylcaféique (1 g, 3,78 mmol) est mis en suspension dans du toluène (10 ml) contenant une

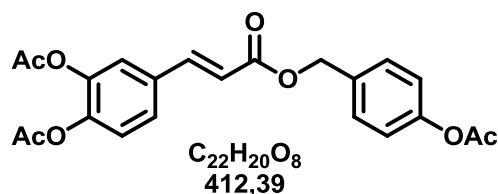
goutte de DMF. Le ballon est ensuite placé dans un bain d'eau glacée (0°C), et le chlorure d'oxalyle (0,66 ml, 7,692 mmol) est ajouté. Après une agitation pendant 3h à la température ambiante, tous les matériels de départ sont dissouts conduisant à la formation d'une solution brun pâle. Le toluène et le chlorure d'oxalyle restants sont éliminés sous pression réduite pour obtenir un solide (1,33g), de couleur jaune pâle. Ce solide est ensuite utilisé immédiatement (sans purification) pour l'étape suivante [190]. $R_f = 0,5$ (Cyclohexane/EtOAc 50:50) (CCM: la solution réactionnelle a été prélevée et diluée dans MeOH pour convertir le produit sous forme d'ester avant de déposer sur la plaque Silicagel).

XI-3.3. Alcool 4-O-acétylbenzylique



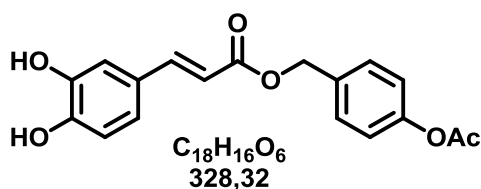
Dans un ballon de 50 ml contenant une solution, sous agitation, d'alcool 4-hydroxybenzylique (1,24 g, 10 mmol) en solution aqueuse de NaOH 6 M (2,5 ml), 7,5g de glace ont été ajoutés. Le ballon est lui-même placé dans un bain d'eau glacée et l'anhydride acétique (1,33 ml, 12 mmol) est ajouté lentement pendant 40 min sous agitation vigoureuse. Le mélange réactionnel est ensuite agité à 0°C pendant 2 h, puis à température ambiante pendant une nuit. La solution est extraite trois fois avec EtOAc (3 x 20 ml), puis les phases organiques sont réunies puis lavées avec de la saumure (10 ml), séchées sur Na_2SO_4 , puis concentrées sous pression réduite. Le résidu a été purifié par chromatographie flash (Cyclohexane/EtOAc 90 :10 (20min) puis 50 :50 (30min)) pour obtenir l'alcool 4-O-acétylbenzylique (778 mg, 47%) sous forme d'une huile jaune pâle [191]. $R_f = 0,4$ (Cyclohexane/EtOAc 60:40) ; ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 7,33 (d, $J = 8,1$, 2H), 7,06 (d, $J = 8,0$, 2H), 4,48 (s, 2H), 5,22(bs, 1H), 4,48 (s, 2H), 2,25 (s, 3H).

XI-3.4. (E)-acétoxybenzyl-3-(3,4-diacétoxyphényl)acrylate



Dans un ballon de 50 ml, sous atmosphère d'azote, contenant une solution de l'alcool 4-O-acétylbenzylique (0,51 g, 3,1 mmol) et de DMAP (57 mg, 0,47 mmol) dans CH_2Cl_2 (30 mL), sont ajoutés la pyridine (3 ml) et le chlorure d'acide 3,4-O-diacétylcaféique (1,33 g, 4,7 mmol) à température ambiante. Le mélange réactionnel est agité pendant 5 h, puis acidifié avec une solution HCl 1M (pH=3) (30 ml). Les phases sont séparées, et la phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (3 x 20 ml). Les phases organiques sont combinées et séchées (Na_2SO_4), filtrées et enfin concentrées sous vide pour obtenir une huile jaune. Ce résidu est ensuite purifié par chromatographie sur colonne (Cyclohexane/EtOAc 50:50) pour obtenir le produit désiré sous forme d'une huile incolore (444 mg, 35%) [190]. $R_f = 0,5$ (Cyclohexane/EtOAc 50:50) ; ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 7,67-7,72 (m, 3H, 2H-ar and 1H $_{\beta}$), 7,48 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H-ar), 7,32 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, H-ar), 7,15 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H-ar), 6,72 (d, $J = 16,0$ Hz 1H, H $_{\alpha}$), 5,23 (s, 2H, -CH $_2$ -), 2,29 (s, 6H, 2 x -OCH $_3$), 2,27 (s, 3H, -OCH $_3$) ; HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{22}H_{20}NaO_8$ $[M + Na]^+$: 435,0671, trouvée : 435,1059.

XI-3.5. (E)-acétoxybenzyl-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate (66)



A une solution de (E)-acétoxybenzyl-3-(3,4-diacétoxyphényl)acrylate (159 mg, 0,38 mmol) dans MeOH (5 ml), on ajoute NaOMe (6,2 mg, 0,11 mmol, 0,23 éq.). Le mélange

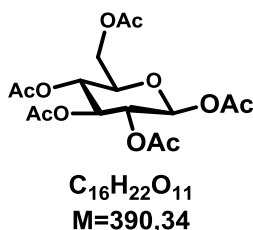
réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h, avant d'être dilué par MeOH (5 ml) et acidifié avec la résine Amberlite IR-120 (H⁺) résine jusqu'à pH = 7. Le mélange résultant est filtré puis concentré à sec. Le résidu est purifié par mise en œuvre de deux chromatographies flash successives (éluant: CH₂Cl₂ / MeOH 98: 2 à 80:20) pour obtenir **(66)** sous forme de solide blanc. R_f = 0.55 (CH₂Cl₂/MeOH 90:10); ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, 300 MHz): δ 8,38 (bs, 2H), 7,59 (d, J = 16,0, 1H), 7,48 (d, J = 8,2, 2H), 7,17-7,12 (m, 3H), 7,06 (dd, J_1 = 2,0, J_2 = 8,0, 1H), 6,86 (d, J = 8,0, 1H), 6,34 (d, J = 16,0, 1H), 5,21 (s, 2H), 2,26 (s, 3H). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, 75 MHz): δ 169,7, 167,3, 151,8, 148,9, 146,4, 146,2, 135,2, 130,2, 127,6, 122,77, 122,73, 116,4, 115,4, 115,3, 65,8, 21,0; HRMS (ESI) m/z calculée pour C₁₈H₁₇NO₆ [M + H]⁺ : 329,0947; trouvée : 329,1018.

La cinétique de cette réaction a été réalisée en changeant des conditions réactionnelles : NaOMe éq. 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 et à température ambiante, 40°C, 50°C. A chaque étape, un petit volume (10 μ L) du mélange réactionnel a été prélevé, dilué dans le MeOH, filtré sur le filtre millipore Nylon 0,2 μ m et analysé par CLHP analytique. Eluants : Eau/MeOH 10 : 90 (5 min) ; 10 : 90 à 40 : 60 (20 min) ; 40 : 60 (5 min) ; 40 : 60 à 100% (5 min), 100% MeOH à 10 : 90 (5 min), 10 : 90 (10 min).

XI-4. Synthèse du 2,3,4,6-O-tétraacétyl-caféoyl- β -D-glucose (68)

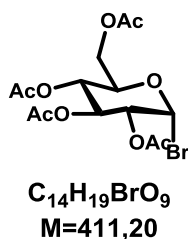
L'acide 3,4-O-diacétylcaféique a été préparé comme la procédure précédemment décrite dans la session XI-3. Le bromure de tétra-O-acétyl- α -D-glucose a été préparé comme suit :

XI-4.1. Penta-O-acétyl- β -D-glucose



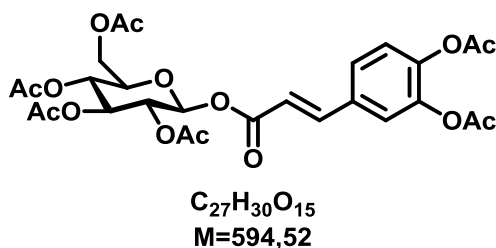
Dans un ballon de 50 ml, une suspension blanche d'anhydride acétique (28,4 g, 26,25 ml, 278 mmol) et de NaOAc (1,14 g, 13,9 mmol) est doucement chauffée à reflux. Le D-glucose en poudre (5,00 g, 27,8 mmol) est lentement ajoutée sur une période de 15 min. Le mélange devient transparent. La solution est alors chauffée à reflux à 135 ° C pendant 5 min, puis refroidie à température ambiante. La réaction est ensuite stoppée par addition de glace (21,19 g) et abandonnée pendant 2h. Lors de ce traitement, le produit tétra-O-acétyl- β -D-glucose précipite. Il est ensuite filtré, lavé avec l'eau froide jusqu'à ce que l'odeur d'acide acétique disparaisse. Le produit brut est alors purifié par recristallisation (EtOH, 100 ml) pour obtenir le penta-O-acétyl- β -D-glucose pur (4,3 g, 40%) sous forme d'une poudre blanche. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane/EtOAc 60 : 40) et les composés sont révélés après pulvérisation d'une solution constituée de 0,5 ml d'anisaldéhyde, 9 ml d'éthanol, 0,5 ml d'acide sulfurique concentré et 0,1 ml d'acide acétique. La plaque CCM est chauffée à 100°C pour visualiser des tâches de sucre. $R_f = 0,3$ (cyclohexane/EtOAc 60 : 40). Point de fusion : 131-132°C. ^1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 5,68 (d, $J = 8,1$, 1H), 5,20 (dd, $J_1 = 9,8$, $J_2 = 9,4$, 1H), 5,16-5,10 (m, 2H), 4,26 (dd, $J_1 = 12,6$, $J_2 = 4,6$, 1H), 4,11 (dd, $J_1 = 12,6$, $J_2 = 2,3$, 1H), 3,84 (ddd, $J_1 = 9,8$, $J_2 = 4,6$, $J_3 = 2,3$, 1H), 2,12 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,03 (s, 6H), 2,01 (s, 3H). Les données analytiques sont en accord avec les données précédemment décrites [225].

XI-4.2. Bromure de tétra-O-acétyl- α -D-glucose



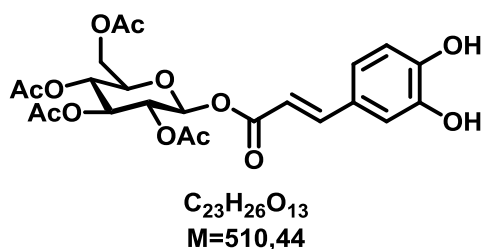
Dans un ballon de 50 ml, le penta-O-acétyl- β -D-glucose (1,0 g, 2,56 mmol) est dissous dans CH_2Cl_2 (5 ml) sous atmosphère d'argon. Une solution à 30% d'HBr dans AcOH (2 ml) est ajoutée goutte à goutte (10-15 min) à 0°C. Le mélange ainsi obtenu (couleur orange) est agité à 0°C pendant 30 min, puis à température ambiante pendant une nuit (la progression de la réaction est suivie par CCM (cyclohexane/EtOAc 60 : 40) jusqu'à ce que tout le produit de départ est disparu. Après, la solution réactionnelle est diluée avec CH_2Cl_2 (10 ml) et versée dans la glace (10 g). La phase organique est ensuite séparée et lavée à l'eau froide (2x10 ml), avec une solution de NaHCO_3 saturée (2x20 ml) et de la saumure (2x20 ml). Puis, la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et concentrée sous pression réduite pour obtenir le bromure de tétra-O-acétyl- α -D-glucose sous forme d'une huile incolore, avec un rendement quantitatif (1,13 g brut) [226]. $R_f = 0,5$ (cyclohexane/EtOAc 60 : 40). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 6,61 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H), 5,56 (t, $J = 9,9$ Hz, 1H), 5,16 (t, $J = 9,3$ Hz, 1H), 4,84 (dd, $J_1 = 10,05$ Hz, $J_2 = 4,5$ Hz, 1H), 4,36 – 4,27 (m, 2H), 4,13 (d, $J = 10,08$ Hz, 1H), 2,10 (s, 6H), 2,05 (s, 3H), 2,03 (s, 3H).

XI-4.3. 2,3,4,6-O-tétraacétyl-(3,4-diacétoxycaféoyl)- β -D-glucose



Dans un ballon de 50 ml, sous atmosphère d'azote, Ag_2CO_3 (413 mg, 1,5 mmol) et l'acide 3,4-O-diacétylcaféique (396 mg, 1,5 mmol) sont ajoutés dans CH_2Cl_2 (5 ml). Le mélange résultant est agité pendant 15 min à température ambiante, puis une solution de bromure de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyle dans du CH_2Cl_2 (5 ml) est à son tour ajouté, goutte à goutte, durant 35 min, puis une nuit à température ambiante. Ce mélange réactionnel est ensuite filtré puis lavé par une solution de $NaHCO_3$ 1M (20 ml) et de la saumure (20 ml), séché sur Na_2SO_4 , puis concentré sous vide. Le résidu a été purifié par chromatographie sur colonne ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98 : 2) pour obtenir le composé envisagé sous forme d'une huile incolore [226]. $R_f = 0,25$ (cyclohexane/EtOAc 60 : 40). ^1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 7,69 (d, 15,7H), 7,43-7,37 (m, 2H), 7,22 (s, 1H), 6,36 (d, $J = 15,7$, 1H), 5,83 (d, $J = 8,0$, 1H), 5,33-5,13 (m, 3H), 4,13 (dd, $J_1 = 12,6$, $J_2 = 4,1$, 1H), 4,13 (d, $J = 12,0$, 1H), 3,90 (d, $J = 9,1$, 1H), 2,31-2,30 (m, 6H), 2,09-2,03 (m, 12H). HRMS (ESI) m/z calculée pour $C_{27}H_{30}NaO_{15}$ $[M + Na]^+$: 617,1584, trouvée : 617,1483.

XI-4.4. 2,3,4,6-O-tétraacétyl-caféoyl- β -D-glucose (68)



À une solution de 2,3,4,6-O-tétraacétyl-(3,4-diacétoxycaféoyl)- β -D-glucose (290 mg, 0,48 mmol) dans le MeOH (5 ml) est ajouté du NaOMe (65 mg, 0,12 mmol, 0,25 ép.). La solution réactionnelle jaune résultante est agitée à température ambiante pendant 2 h, puis diluée avec le MeOH (5 ml) et acidifiée par la résine Amberlite IR-120 (H⁺) jusqu'à pH = 7 (solution légèrement jaune). Ce dernier mélange est filtré et évaporé à sec. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie flash (éluant: CH₂Cl₂ / MeOH 98 : 2 à 80 : 20) pour obtenir le composé (**68**) sous forme d'un solide blanc [192]. R_f = 0,29 (Cyclohexane/EtOAc 50:50); (CDCl₃, 300 MHz): δ 7,61 (d, 15,9H), 7,06 (d, J = 2,0, 1H), 6,97 (dd, J_1 = 8,1, J_2 = 2,0, 1H), 6,86 (d, J = 8,1, 1H), 6,18 (d, J = 15,9, 1H), 5,83 (d, J = 7,9, 1H), 5,33-5,13 (m, 3H), 4,13 (dd, J_1 = 12,7, J_2 = 4,5, 1H), 4,17-4,09 (m, 1H), 3,93-3,87 (m, 1H), 2,07-2,01 (m, 12H). (CDCl₃, 400 MHz): δ 170,7, 170,3, 170,1, 169,8, 165,4, 149,4, 148,2, 146,4, 127,3, 123,2, 116,5, 115,6, 113,8, 92,5, 73,3, 73,2, 71,3, 69,0, 62,5, 55,0, 20,67, 20,63, 20,60; HRMS (ESI) m/z calculée pour C₂₃H₂₆NaO₁₃ [M + Na]⁺ : 533,1373; trouvée : 533,1271.

XI-5. Héli-synthèse des glucosides du picéatannol (PGs)

Le bromure de tétra-O-acétyl- α -D-glucose a été préparé comme nous avons décrit dans **XI-4.2.** à partir de β -D-glucose.

XI-5.1. Glycosylation par la méthode de Knoenigs-Knorr

XI-5.1.1. Première procédure utilisant Ag₂CO₃/ THF

Dans un ballon de 10 ml contenant du tamis moléculaire 4Å en poudre (1g) et Ag₂CO₃ (670 mg), sous atmosphère d'argon, le produit brut de bromure de glycosyle (1,02 g) dans du THF séché (3 ml) est ajouté. La suspension est ensuite agitée à 0°C pendant 1h, puis une solution de picéatannol (122 mg) dans du THF sec (2 ml) est ajoutée. Le mélange réactionnel

est agité à température ambiante pendant une nuit, puis à 45°C pendant 5h. La suspension de couleur brune foncée est filtré à travers de la poudre Célite, et lavée à l'aide de THF (3x5 mL) [198]. Le filtrat et les liquides de lavage ont été combinés et concentrés sous vide pour obtenir le brut, analysé par CLHP. Eluants : Eau/CH₃CN (+0,1% THF) 10 : 90 (5 min) ; 10 : 90 à 40 : 60 (20 min) ; 40 : 60 (5 min) ; 40 : 60 à 100% (5 min), 100% CH₃CN à 10 : 90 (5 min), 10 : 90 (10 min).

XI-5.1.2. Deuxième procédure utilisant KOH / EtOH

Dans un ballon de 5 ml , le picéatannol (54 mg, 0,22 mmol) est mélangé avec du bromure de glycosyle (90 mg, 0,22 mmol), 120 µl d'hydroxyde de potassium et 2 ml d'éthanol absolu. Le mélange est agité pendant 1 semaine à température ambiante et régulièrement contrôlée par CCM (éluaux : cyclohexane : EtOAc :acide formique 50 : 50 : 0,02). Le brut de réaction recolté à la fin de la réaction est ensuite purifié par flash pour obtenir trois fractions, analysées par RMN proton [199].

XI-5.2. Glycosylation par la méthode de catalyseur transfer des phases

XI-5.2.1. Première procédure utilisant BnEt₃N⁺Br⁻ / K₂CO₃

Un mélange de bromure de glycosyle (312 mg, 0,76 mmol) et de piceatannol (93 mg, 0,38 mmol) dans 22 ml d'un mélange CH₂Cl₂ / H₂O (10 : 1) est agité pendant 10 min. Puis, K₂CO₃ (157 mg, 1,14 mmol) et BnEt₃N⁺Br⁻ (52 mg, 0,19 mmol) sont à leur tour ajoutés à cette solution. Le mélange réactionnel est vigoureusement agité, à 40°C et pendant 5h. Après avoir neutralisé la solution par HCl 1M dilué avec CHCl₃, celle-ci est lavée par une solution saturée de NaHCO₃ puis de la saumure, séché sur Na₂SO₄ puis concentrée sous pression réduite pour obtenir un résidu qui a été analysé par RMN de proton [200].

XI-5.2.2. Deuxième procédure utilisant $\text{BnEt}_3\text{N}^+\text{Br}^-$ / NaOH

Une solution aqueuse de NaOH 2,5% (5 ml) contenant du picéatannol (92 mg, 0,38 mmol, 1 éq.) est agitée à température ambiante pendant 30 min (solution brune foncée). 15 ml d'une solution de bromure de benzyltriéthylammonium ($\text{BnEt}_3\text{N}^+\text{Br}^-$) (126 mg, 0,46 mmol, 1,2 éq.) dans CH_2Cl_2 y sont ajoutés, ainsi que du bromure de tétra-*O*-acétyl- α -D-glucose (189 mg, 0,46 mmol, 1,2 éq.). Le mélange biphasique est vigoureusement agité pendant 5h, puis acidifié par une solution HCl 1M avant d'être extrait avec de l'acétate d'éthyle, puis lavé avec successivement une solution NaHCO_3 1M (30 ml) et de la saumure (30 ml), puis séché sur Na_2SO_4 et enfin concentré sous vide pour obtenir un solide brun qui a été ensuite analysé par RMN de proton [201].

Chapitre XII : Modélisation moléculaire – Études de docking

XII-1. Modélisation moléculaire : prédiction de la structure de b-ARG I par homologie

La structure cristallographique de l'arginase bovine I (b-ARG I) n'étant pas, à l'heure actuelle, disponible pour des études de docking, nous avons prédit une nouvelle structure 3D de b-ARG I par homologie avec la structure h-ARG I dont la structure 3D a été cristallisée et est bien connue, en utilisant la séquence d'acides aminés de l'arginase de foie de *Bos taurus* (b-ARG I) disponible dans la base de données des protéines de NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov/protein/Q2KJ64.1). Cette prédiction a été réalisée par le serveur en ligne I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), qui est développé par Zhang *et al* [152].

En fait, la séquence d'acides aminés de b-ARG I (Q2KJ64.1 codé) provenant de la source UniProtKB et contenant 322 acides aminés a été téléchargée. Le serveur I-Tasser (Protein Structure et Fonction Prédictions) a été utilisé pour prédire la structure d'homologie de b-ARG I. En bref, la séquence b-ARG I, qui comporte moins de 1500 des acides aminés, et donc conforme à la règle du serveur I-Tasser, a été importée en fichier FASTA sur ce site pour construire la structure d'homologie. Après de remplir les informations nécessaires inhérentes à la protéine, la construction de la structure d'homologie a été réalisée par Run I-TASSER. Le serveur nous a renvoyé les modèles d'homologie de b-ARG I les plus appropriés, dans les 2-3 jours suivants.

La validation des modèles d'homologie de b-ARG I prédit par le serveur I-TASSER repose sur les paramètres de C-Score, TM-score, et RMSD. Parmi eux, C-Score est la valeur la plus fiable avec une fourchette acceptable pour [-5; 2]. Le TM-score représente le niveau de similarité globale des deux structures. Un TM-score supérieur à 0,5 suppose généralement le

même pli, tandis que des scores inférieurs à 0,17 reviennent à choisir au hasard des protéines non apparentées. Le serveur I-TASSER fournit les cinq meilleurs modèles construits dans l'ordre des C-scores décroissants. Si la simulation de I-TASSER a une bonne convergence, il y a moins de cinq modèles construits, ce qui est généralement un bon signe pour avoir un modèle fiable. Dans notre étude, un seul modèle a été proposé par I-TASSER avec les paramètres suivants : C-score = 1,74, TM-score = $0,96 \pm 0,05$, et RMSD = $2,9 \pm 2,1$ Å. Ce modèle était donc parfaitement conforme à une utilisation pour des études de docking.

XII-2. Modélisation moléculaire : étude de docking sur l'arginase

XII-2.1. Préparation du récepteur

Nous avons utilisé la structure d'homologie de b-ARG prédite par I-TASSER et la structure cristalline de h-ARG I complexé avec la nor-NOHA (id pdb: 3kv2) a été téléchargée à partir de la base-donné des protéines (www.rcsb.org). Ces deux récepteurs ont été préparés selon la procédure standard du logiciel LeadIt 2.0.2 [153]. Le site de liaison de b-ARG I a été défini à l'aide de l'outil *Site Finder* dans le logiciel MOE 2008.10 [171]. En effet, ce site contient 28 acides aminés (incluant les acides aminés essentiels pour l'activité enzymatique) qui sont Gln19, Arg21, Asp100, His101, Trp122, Val123, Asp124, Ala125, His126, Asp128, Asn130, Thr134, Thr135, Lys136, Thr137, Gly138 , Asn139, His141, Gly142, Gln143, Tyr176, Asp183, Glu186, Asp232, Asp234, Thr246, Val248, Glu277. Pour h-ARG I, le site de liaison a été défini comme étant l'ensemble des résidus d'acides aminés enfermés dans un rayon de 16,0 Å centré par le co-ligand, nor-NOHA. Toutes les molécules d'eau ont été éliminées.

XII-2.2. Préparation des ligands

Les ligands ont été construits et préparés en utilisant un logiciel Sybyl-X 2.0 [170]. Les structures 3D des ligands ont été optimisées par minimisation de l'énergie en utilisant la méthode *Conj Grad* avec des critères de convergence réglés à 0,0001 kcal/(Åmol), itérations maximales (10000) et la charge de Gasteiger Hückel assignée dans le champ de force Tripos, et d'autres paramètres ont été maintenus par défaut. Ensuite, ces structures ont été soumises à une courte dynamique moléculaire, et optimisées à nouveau par minimisation de l'énergie afin d'obtenir les conformères présentant l'énergie la plus faible, ceux qui ont été stockées dans la base de données pour la simulation de docking en utilisant le logiciel LeadIT [153].

XII-2.3. Simulation de docking par LeadIT 2.1.1

Les simulations de docking ont été réalisées en utilisant le programme FlexX [153,154] dans le logiciel LeadIt 2.0.2 avec un nombre de poses conservées réglé à 10 pour l'analyse. Le nombre maximum de solutions par itération est fixé à 1000, et le nombre maximal de solutions par fragmentation est réglé à 200. D'autres paramètres de docking sont maintenus par défaut. La technique de docking moléculaire utilisée dans cette étude est une méthode flexible avec un processus de fixation incrémentale des fragments de ligand, et le récepteur reste rigide. Les modes de liaison en 3D et 2D des solutions de docking sont créés en utilisant le logiciel MOE 2008.10 [171]. Le protocole de docking a été précédemment publié par Thai et ses collègues [227–230].

Références bibliographiques

- [1] Kossel A DH. Über Die Arginase. *HoppeSeyler's Z Physiol Chem*, **1904**, 41, 321–331.
- [2] Kanyo, Z.F.; Scolnick, L.R.; Ash, D.E.; Christianson, D.W. Structure of a Unique Binuclear Manganese Cluster in Arginase. *Nature*, **1996**, 383, 554–557.
- [3] Ash, D.E. Structure and Function of Arginases. *J. Nutr.*, **2004**, 134, 2760S–2764S.
- [4] Dzik, J.M. Evolutionary Roots of Arginase Expression and Regulation. *Front. Immunol.*, **2014**, 5, 544.
- [5] Caldwell, R.B.; Toque, H.A.; Narayanan, S.P.; Caldwell, R.W. Arginase: An Old Enzyme with New Tricks. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2015**, 36, 395–405.
- [6] Jenkinson, C.P.; Grody, W.W.; Cederbaum, S.D. Comparative Properties of Arginases. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **1996**, 114, 107–132.
- [7] Ming, X.-F.; Barandier, C.; Viswambharan, H.; Kwak, B.R.; Mach, F.; Mazzolai, L.; Hayoz, D.; Ruffieux, J.; Rusconi, S.; Montani, J.-P.; Yang, Z. Thrombin Stimulates Human Endothelial Arginase Enzymatic Activity via RhoA/ROCK Pathway Implications for Atherosclerotic Endothelial Dysfunction. *Circulation*, **2004**, 110, 3708–3714.
- [8] Morris, S.M. Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge. *J. Nutr.*, **2007**, 137(6 Suppl 2), 1602S-1609S.
- [9] Sparkes, R.S.; Dizikes, G.J.; Klisak, I.; Grody, W.W.; Mohandas, T.; Heinzmann, C.; Zollman, S.; Lusic, A.J.; Cederbaum, S.D. The Gene for Human Liver Arginase

- (ARG1) Is Assigned to Chromosome Band 6q23. *Am. J. Hum. Genet.*, **1986**, 39, 186–193.
- [10] Gotoh, T.; Chowdhury, S.; Takiguchi, M.; Mori, M. The Glucocorticoid-Responsive Gene Cascade. Activation of the Rat Arginase Gene through Induction of C/EBPbeta. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 3694–3698.
- [11] Haraguchi, Y.; Takiguchi, M.; Amaya, Y.; Kawamoto, S.; Matsuda, I.; Mori, M. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of cDNA for Human Liver Arginase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1987**, 84, 412–415.
- [12] Morris Jr., S.M.; Bhamidipati, D.; Kepka-Lenhart, D. Human Type II Arginase: Sequence Analysis and Tissue-Specific Expression. *Gene*, **1997**, 193, 157–161.
- [13] Girard-Thernier, C.; Pham, T.-N.; Demougeot, C. The Promise of Plant-Derived Substances as Inhibitors of Arginase. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2015**, 15, 798–808.
- [14] Dowling, D.P.; Costanzo, L.D.; Gennadios, H.A.; Christianson, D.W. Evolution of the Arginase Fold and Functional Diversity. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, 65, 2039–2055.
- [15] Di Costanzo, L.; Sabio, G.; Mora, A.; Rodriguez, P.C.; Ochoa, A.C.; Centeno, F.; Christianson, D.W. Crystal Structure of Human Arginase I at 1.29-Å Resolution and Exploration of Inhibition in the Immune Response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005**, 102, 13058–13063.
- [16] Cama, E.; Colletuori, D.M.; Emig, F.A.; Shin, H.; Kim, S.W.; Kim, N.N.; Traish, A.M.; Ash, D.E.; Christianson, D.W. Human Arginase II: Crystal Structure and Physiological Role in Male and Female Sexual Arousal. *Biochemistry (Mosc.)*, **2003**, 42, 8445–8451.

- [17] Khangulov, S.V.; Pessiki, P.J.; Barynin, V.V.; Ash, D.E.; Dismukes, G.C. Determination of the Metal Ion Separation and Energies of the Three Lowest Electronic States of Dimanganese (II,II) Complexes and Enzymes: Catalase and Liver Arginase. *Biochemistry (Mosc.)*, **1995**, *34*, 2015–2025.
- [18] Di Costanzo, L.; Pique, M.E.; Christianson, D.W. Crystal Structure of Human Arginase I Complexed with Thiosemicarbazide Reveals an Unusual Thiocarbonyl μ -Sulfide Ligand in the Binuclear Manganese Cluster. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 6388–6389.
- [19] Cavalli, R.C.; Burke, C.J.; Soprano, D.R.; Kawamoto, S.; Ash, D.E. Mutagenesis of Rat Liver Arginase Expressed in *Escherichia Coli*: Role of Conserved Histidines. *Biochemistry (Mosc.)*, **1994**, *33*, 10652–10657.
- [20] Bagnost, T.; Ma, L.; Silva, R.F. da; Rezakhaniha, R.; Houdayer, C.; Stergiopulos, N.; André, C.; Guillaume, Y.; Berthelot, A.; Demougeot, C. Cardiovascular Effects of Arginase Inhibition in Spontaneously Hypertensive Rats with Fully Developed Hypertension. *Cardiovasc. Res.*, **2010**, *87*, 569–577.
- [21] Segal, R.; Hannan, J.L.; Liu, X.; Kutlu, O.; Burnett, A.L.; Champion, H.C.; Kim, J.H.; Steppan, J.; Berkowitz, D.E.; Bivalacqua, T.J. Chronic Oral Administration of the Arginase Inhibitor 2(S)-amino-6-boronoheptanoic Acid (ABH) Improves Erectile Function in Aged Rats. *J. Androl.*, **2012**, *33*, 1169–1175.
- [22] Olivon, V.C.; Fraga-Silva, R.A.; Segers, D.; Demougeot, C.; de Oliveira, A.M.; Saverghini, S.S.; Berthelot, A.; de Crom, R.; Krams, R.; Stergiopulos, N.; da Silva, R.F. Arginase Inhibition Prevents the Low Shear Stress-Induced Development of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in ApoE^{-/-} Mice. *Atherosclerosis*, **2013**, *227*, 236–243.

- [23] Morris, S.M.; Gao, T.; Cooper, T.K.; Kepka-Lenhart, D.; Awad, A.S. Arginase-2 Mediates Diabetic Renal Injury. *Diabetes*, **2011**, *60*, 3015–3022.
- [24] Van Zandt, M.C.; Whitehouse, D.L.; Golebiowski, A.; Ji, M.K.; Zhang, M.; Beckett, R.P.; Jagdmann, G.E.; Ryder, T.R.; Sheeler, R.; Andreoli, M.; Conway, B.; Mahboubi, K.; D'Angelo, G.; Mitschler, A.; Cousido-Siah, A.; Ruiz, F.X.; Howard, E.I.; Podjarny, A.D.; Schroeter, H. Discovery of (R)-2-amino-6-borono-2-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)hexanoic Acid and Congeners As Highly Potent Inhibitors of Human Arginases I and II for Treatment of Myocardial Reperfusion Injury. *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 2568–2580.
- [25] Kavalukas, S.L.; Uzgare, A.R.; Bivalacqua, T.J.; Barbul, A. Arginase Inhibition Promotes Wound Healing in Mice. *Surgery*, **2012**, *151*, 287–295.
- [26] Vincendeau, P.; Gobert, A.P.; Daulouède, S.; Moynet, D.; Djavad Mossalayi, M. Arginases in Parasitic Diseases. *Trends Parasitol.*, **2003**, *19*, 9–12.
- [27] Singh, R.; Pervin, S.; Karimi, A.; Cederbaum, S.; Chaudhuri, G. Arginase Activity in Human Breast Cancer Cell Lines: N^ω-hydroxy-L-arginine Selectively Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in MDA-MB-468 Cells. *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 3305–3312.
- [28] Pernow, J.; Jung, C. Arginase as a Potential Target in the Treatment of Cardiovascular Disease: Reversal of Arginine Steal? *Cardiovasc. Res.*, **2013**, *98*, 334–343.
- [29] Oswald, I.P.; Wynn, T.A.; Sher, A.; James, S.L. NO as an Affector Molecule of Parasite Killing: Modulation of Its Synthesis by Cytokines. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **1994**, *108*, 11–18.

- [30] Prati, C.; Berthelot, A.; Kantelip, B.; Wendling, D.; Demougeot, C. Treatment with the Arginase Inhibitor N⁰-hydroxy-nor-L-arginine Restores Endothelial Function in Rat Adjuvant-Induced Arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, **2012**, *14*, R130.
- [31] Durante, W. Role of Arginase in Vessel Wall Remodeling. *Inflammation*, **2013**, *4*, 111.
- [32] Holowatz, L.A.; Kenney, W.L. Up-Regulation of Arginase Activity Contributes to Attenuated Reflex Cutaneous Vasodilatation in Hypertensive Humans. *J. Physiol.*, **2007**, *581*, 863–872.
- [33] Shemyakin, A.; Kövamees, O.; Rafnsson, A.; Böhm, F.; Svenarud, P.; Settergren, M.; Jung, C.; Pernow, J. Arginase Inhibition Improves Endothelial Function in Patients with Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation*, **2012**, *126*, 2943–2950.
- [34] Quitter, F.; Figulla, H.R.; Ferrari, M.; Pernow, J.; Jung, C. Increased Arginase Levels in Heart Failure Represent a Therapeutic Target to Rescue Microvascular Perfusion. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **2013**, *54*, 75–85.
- [35] Hunter, A.; Downs, C.E. The Inhibition of Arginase by Amino Acids. *J. Biol. Chem.*, **1945**, *157*, 427–446.
- [36] Steppan, J.; Nyhan, D.; Berkowitz, D.E. Development of Novel Arginase Inhibitors for Therapy of Endothelial Dysfunction. *Front. Immunol.*, **2013**, *4*, 278.
- [37] Pudlo, M.; Demougeot, C.; Girard-Thernier, C. Arginase Inhibitors: A Rational Approach over One Century. *Med. Res. Rev.*, **2016**, *00*, 1-40.

- [38] Daghigh, F.; Fukuto, J.M.; Ash, D.E. Inhibition of Rat Liver Arginase by an Intermediate in NO Biosynthesis, N^o-hydroxy-L-arginine: Implications for the Regulation of Nitric Oxide Biosynthesis by Arginase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, 202, 174–180.
- [39] Boucher, J.L.; Custot, J.; Vadon, S.; Delaforge, M.; Lepoivre, M.; Tenu, J.P.; Yapo, A.; Mansuy, D. N^o-hydroxy-L-arginine, an Intermediate in the L-Arginine to Nitric Oxide Pathway, Is a Strong Inhibitor of Liver and Macrophage Arginase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, 203, 1614–1621.
- [40] Custot, J.; Boucher, J.-L.; Vadon, S.; Guedes, C.; Dijols, S.; Delaforge, M.; Mansuy, D. N^o-hydroxyamino- α -amino Acids as a New Class of Very Strong Inhibitors of Arginases. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, **1996**, 1, 73–82.
- [41] Cox, J.D.; Cama, E.; Colleluori, D.M.; Pethe, S.; Boucher, J.-L.; Mansuy, D.; Ash, D.E.; Christianson, D.W. Mechanistic and Metabolic Inferences from the Binding of Substrate Analogues and Products to Arginase. *Biochemistry (Mosc.)*, **2001**, 40, 2689–2701.
- [42] Custot, J.; Moali, C.; Brollo, M.; Boucher, J.L.; Delaforge, M.; Mansuy, D.; Tenu, J.P.; Zimmermann, J.L. The New α -Amino Acid N^o-hydroxy-nor-L-arginine: A High-Affinity Inhibitor of Arginase Well Adapted to Bind to Its Manganese Cluster. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 4086–4087.
- [43] Di Costanzo, L.; Ilies, M.; Thorn, K.J.; Christianson, D.W. Inhibition of Human Arginase I by Substrate and Product Analogues. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2010**, 496, 101–108.

- [44] Cama, E.; Pethe, S.; Boucher, J.-L.; Han, S.; Emig, F.A.; Ash, D.E.; Viola, R.E.; Mansuy, D.; Christianson, D.W. Inhibitor Coordination Interactions in the Binuclear Manganese Cluster of Arginase,. *Biochemistry (Mosc.)*, **2004**, 43, 8987–8999.
- [45] Boucher, J.-L.; Genet, A.; Vadon, S.; Delaforge, M.; Henry, Y.; Mansuy, D. Cytochrome P450 Catalyzes the Oxidation of N^o-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to Nitric Oxide and Citrulline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1992**, 187, 880–886.
- [46] Havlinova, Z.; Babicova, A.; Hroch, M.; Chladek, J. Comparative Pharmacokinetics of N^o-hydroxy-nor-L-arginine, an Arginase Inhibitor, after Single-Dose Intravenous, Intraperitoneal and Intratracheal Administration to Brown Norway Rats. *Xenobiotica*, **2013**, 43, 886–894.
- [47] Nick Pace, C.; Landers, R.A. Arginase Inhibition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.*, **1981**, 658, 410–412.
- [48] Reczkowski, R.S.; Ash, D.E. Rat Liver Arginase: Kinetic Mechanism, Alternate Substrates, and Inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1994**, 312, 31–37.
- [49] Baggio, R.; Elbaum, D.; Kanyo, Z.F.; Carroll, P.J.; Cavalli, R.C.; Ash, D.E.; Christianson, D.W. Inhibition of Mn²⁺-Arginase by Borate Leads to the Design of a Transition State Analogue Inhibitor, 2(S)-amino-6-boronohexanoic Acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 8107–8108.
- [50] Kim, N.N.; Cox, J.D.; Baggio, R.F.; Emig, F.A.; Mistry, S.K.; Harper, S.L.; Speicher, D.W.; Morris, Sidney M.; Ash, D.E.; Traish, A.; Christianson, D.W. Probing Erectile Function: S-(2-boronoethyl)-L-cysteine Binds to Arginase as a Transition State

- Analogue and Enhances Smooth Muscle Relaxation in Human Penile Corpus Cavernosum. *Biochemistry (Mosc.)*, **2001**, *40*, 2678–2688.
- [51] Cox, J.D.; Kim, N.N.; Traish, A.M.; Christianson, D.W. Arginase–Boronic Acid Complex Highlights a Physiological Role in Erectile Function. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **1999**, *6*, 1043–1047.
- [52] Colletuori, D.M.; Ash, D.E. Classical and Slow-Binding Inhibitors of Human Type II Arginase. *Biochemistry (Mosc.)*, **2001**, *40*, 9356–9362.
- [53] Hai, Y.; Christianson, D.W. Crystal Structures of *Leishmania Mexicana* Arginase Complexed with α,α -Disubstituted Boronic Amino-Acid Inhibitors. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.*, **2016**, *72*, 300–306.
- [54] Cama, E.; Shin, H.; Christianson, D.W. Design of Amino Acid Sulfonamides as Transition-State Analogue Inhibitors of Arginase. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 13052–13057.
- [55] Shin, H.; Cama, E.; Christianson, D.W. Design of Amino Acid Aldehydes as Transition-State Analogue Inhibitors of Arginase. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 10278–10284.
- [56] Ilies, M.; Di Costanzo, L.; North, M.L.; Scott, J.A.; Christianson, D.W. 2-Aminoimidazole Amino Acids as Inhibitors of the Binuclear Manganese Metalloenzyme Human Arginase I. *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 4266–4276.
- [57] Zakharian, T.Y.; Di Costanzo, L.; Christianson, D.W. Synthesis of (2S)-2-amino-7,8-epoxyoctanoic Acid and Structure of Its Metal-Bridging Complex with Human Arginase I. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 3240–3243.

- [58] Ilies, M.; Di Costanzo, L.; Dowling, D.P.; Thorn, K.J.; Christianson, D.W. Binding of α,α -Disubstituted Amino Acids to Arginase Suggests New Avenues for Inhibitor Design. *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 5432–5443.
- [59] Golebiowski, A.; Paul Beckett, R.; Van Zandt, M.; Ji, M.K.; Whitehouse, D.; Ryder, T.R.; Jagdmann, E.; Andreoli, M.; Mazur, A.; Padmanilayam, M.; Cousido-Siah, A.; Mitschler, A.; Ruiz, F.X.; Podjarny, A.; Schroeter, H. 2-Substituted-2-amino-6-boronohexanoic Acids as Arginase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 2027–2030.
- [60] Ivanenkov, Y.A.; Chufarova, N.V. Small-Molecule Arginase Inhibitors. *Pharm. Pat. Anal.*, **2013**, *3*, 65–85.
- [61] Abdelkawy, K.S.; Lack, K.; Elbarbry, F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Promising Arginase Inhibitors. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **2016**, 1–16.
- [62] Kang, J.H.; Cho, Y.D. Purification and Properties of Arginase from Soybean, Glycine Max, Axes. *Plant Physiol.*, **1990**, *93*, 1230–1234.
- [63] Cao, F.-Q.; Werner, A.K.; Dahncke, K.; Romeis, T.; Liu, L.-H.; Witte, C.-P. Identification and Characterization of Proteins Involved in Rice Urea and Arginine Catabolism. *Plant Physiol.*, **2010**, *154*, 98–108.
- [64] Chen, H.; McCaig, B.C.; Melotto, M.; He, S.Y.; Howe, G.A. Regulation of Plant Arginase by Wounding, Jasmonate, and the Phytotoxin Coronatine. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 45998–46007.
- [65] Gravot, A.; Deleu, C.; Wagner, G.; Lariagon, C.; Lugan, R.; Todd, C.; Wendehenne, D.; Delourme, R.; Bouchereau, A.; Manzanares-Dauleux, M.J. Arginase Induction

- Represses Gall Development During Clubroot Infection in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, **2012**, 53, 901–911.
- [66] Schnorr, O.; Brossette, T.; Momma, T.Y.; Kleinbongard, P.; Keen, C.L.; Schroeter, H.; Sies, H. Cocoa Flavonols Lower Vascular Arginase Activity in Human Endothelial Cells *in vitro* and in Erythrocytes *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2008**, 476, 211–215.
- [67] Kim, S.W.; Cuong, T.D.; Hung, T.M.; Ryoo, S.; Lee, J.H.; Min, B.S. Arginase II Inhibitory Activity of Flavonoid Compounds from *Scutellaria Indica*. *Arch. Pharm. Res.*, **2013**, 36, 922–926.
- [68] Cruz, E. de M.; da Silva, E.R.; Maquiaveli, C. do C.; Alves, E.S.S.; Lucon Jr., J.F.; Reis, M.B.G. dos; Toledo, C.E.M. de; Cruz, F.G.; Vannier-Santos, M.A. Leishmanicidal Activity of *Cecropia Pachystachya* Flavonoids: Arginase Inhibition and Altered Mitochondrial DNA Arrangement. *Phytochemistry*, **2013**, 89, 71–77.
- [69] da Silva, E.R.; Maquiaveli, C. do C.; Magalhães, P.P. The Leishmanicidal Flavonols Quercetin and Quercitrin Target *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Arginase. *Exp. Parasitol.*, **2012**, 130, 183–188.
- [70] Woo, A.; Min, B.; Ryoo, S. Piceatannol-3'-O- β -D-glucopyranoside as an Active Component of Rhubarb Activates Endothelial Nitric Oxide Synthase through Inhibition of Arginase Activity. *Exp. Mol. Med.*, **2010**, 42, 524–532.
- [71] Woo, A.; Shin, W.; Cuong, T.D.; Min, B.; Lee, J.H.; Jeon, B.H.; Ryoo, S. Arginase Inhibition by Piceatannol-3'-O- β -D-glucopyranoside Improves Endothelial Dysfunction via Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in ApoE-Null Mice Fed a High-Cholesterol Diet. *Int. J. Mol. Med.*, **2013**, 31, 803–810.

- [72] Bounaama, A.; Djerdjouri, B.; Laroche-Clary, A.; Le Morvan, V.; Robert, J. Short Curcumin Treatment Modulates Oxidative Stress, Arginase Activity, Aberrant Crypt Foci, and TGF- β 1 and HES-1 Transcripts in 1,2-Dimethylhydrazine Colon Carcinogenesis in Mice. *Toxicology*, **2012**, 302, 308–317.
- [73] Shin, W.; Yoon, J.; Oh, G.T.; Ryoo, S. Korean Red Ginseng Inhibits Arginase and Contributes to Endothelium-dependent Vasorelaxation through Endothelial Nitric Oxide Synthase Coupling. *J. Ginseng Res.*, **2013**, 37, 64–73.
- [74] Lim, C.-J.; Cuong, T.D.; Hung, T.M.; Ryoo, S.-W.; Lee, J.-H.; Kim, E.-H.; Woo, M.-H.; Choi, J.-S.; Min, B.-S. Arginase II Inhibitory Activity of Phenolic Compounds from *Saururus Chinensis*. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2012**, 33, 3079–3082.
- [75] Rahman, N.N.; Khan, M.; Hasan, R. Bioactive Components from *Ficus Glomerata*. *Pure Appl. Chem.*, **2009**, 66, 2287–2290.
- [76] Shin, W.; Cuong, T.D.; Lee, J.H.; Min, B.; Jeon, B.H.; Lim, H.K.; Ryoo, S. Arginase Inhibition by Ethylacetate Extract of *Caesalpinia Sappan* Lignum Contributes to Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, **2011**, 15, 123–128.
- [77] Joe, Y.; Zheng, M.; Kim, H.J.; Kim, S.; Uddin, M.J.; Park, C.; Ryu, D.G.; Kang, S.S.; Ryoo, S.; Ryter, S.W.; Chang, K.C.; Chung, H.T. Salvianolic Acid B Exerts Vasoprotective Effects through the Modulation of Heme Oxygenase-1 and Arginase Activities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2012**, 341, 850–858.
- [78] Yoon, J.; Park, M.; Lee, J. hyung; Min, B.S.; Ryoo, S. Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation through Obacunone-Dependent Arginase Inhibition Restored

- Impaired Endothelial Function in ApoE-Null Mice. *Vascul. Pharmacol.*, **2014**, *60*, 102–109.
- [79] Duffy, C.F.; Killeen, G.F.; Connolly, C.D.; Power, R.F. Effects of Dietary Supplementation with *Yucca Schidigera* Roezl Ex Orgies and Its Saponin and Non-Saponin Fractions on Rat Metabolism. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 3408–3413.
- [80] Iwalokun, B.A.; Hodonu, S.A.; Nwoke, S.; Ojo, O.; Agomo, P.U. Evaluation of the Possible Mechanisms of Antihypertensive Activity of *Loranthus Micranthus*: An African Mistletoe. *Biochem. Res. Int.*, **2011**, *2011*, 1–9.
- [81] Akinyemi, A.J.; Thome, G.R.; Morsch, V.M.; Stefanello, N.; Goularte, J.F.; Belló-Klein, A.; Oboh, G.; Schetinger, M.R.C. Effect of Dietary Supplementation of Ginger and Turmeric Rhizomes on Angiotensin-1 Converting Enzyme (ACE) and Arginase Activities in L-NAME Induced Hypertensive Rats. *J. Funct. Foods*, **2015**, *17*, 792–801.
- [82] Akinyemi, A.J.; Oboh, G.; Ademiluyi, A.O.; Boligon, A.A.; Athayde, M.L. Effect of Two Ginger Varieties on Arginase Activity in Hypercholesterolemic Rats. *J. Acupunct. Meridian Stud.*, **2016**, *9*, 80–87.
- [83] Rimbach, G.; Melchin, M.; Moehring, J.; Wagner, A.E. Polyphenols from Cocoa and Vascular Health—A Critical Review. *Int. J. Mol. Sci.*, **2009**, *10*, 4290–4309.
- [84] Fraga, C.G.; Litterio, M.C.; Prince, P.D.; Calabró, V.; Piotrkowski, B.; Galleano, M. Cocoa Flavanols: Effects on Vascular Nitric Oxide and Blood Pressure. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **2010**, *48*, 63–67.

- [85] Osadebe, P.O.; Omeje, E.O. Comparative Acute Toxicities and Immunomodulatory Potentials of Five Eastern Nigeria Mistletoes. *J. Ethnopharmacol.*, **2009**, *126*, 287–293.
- [86] Obatomi, D.K.; Aina, V.O.; Temple, V.J. Effects of African Mistletoe Extract on Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Int. J. Pharmacogn.*, **1996**, *34*, 124–127.
- [87] Killeen, G.F.; Madigan, C.A.; Connolly, C.R.; Walsh, G.A.; Clark, C.; Hynes, M.J.; Timmins, B.F.; James, P.; Headon, D.R.; Power, R.F. Antimicrobial Saponins of *Yucca Schidigera* and the Implications of Their *in vitro* Properties for Their *in vivo* Impact. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 3178–3186.
- [88] Xie, Y.-W.; Ming, D.-S.; Xu, H.-X.; Dong, H.; But, P.P.-H. Vasorelaxing Effects of *Caesalpinia Sappan*. *Life Sci.*, **2000**, *67*, 1913–1918.
- [89] Jeon, B.H.; Kim, C.S.; Kim, H.S.; Park, J.B.; Nam, K.Y.; Chang, S.J. Effect of Korean Red Ginseng on Blood Pressure and Nitric Oxide Production. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2000**, *21*, 1095–1100.
- [90] Hwang, H.M.; Lee, J.H.; Min, B.S.; Jeon, B.H.; Hoe, K.L.; Kim, Y.M.; Ryoo, S. A Novel Arginase Inhibitor Derived from *Scutellaria Indica* Restored Endothelial Function in ApoE-Null Mice Fed a High-Cholesterol Diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2015**, *355*, 57–65.
- [91] OMS | Leishmaniose. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/fr/> (Accessed Jun 15, **2016**).

- [92] Silva, M.F.L. da; Zampieri, R.A.; Muxel, S.M.; Beverley, S.M.; Floeter-Winter, L.M. *Leishmania Amazonensis* Arginase Compartmentalization in the Glycosome Is Important for Parasite Infectivity. *PLOS ONE*, **2012**, 7, e34022.
- [93] Colotti, G.; Ilari, A. Polyamine Metabolism in *Leishmania*: From Arginine to Trypanothione. *Amino Acids*, **2010**, 40, 269–285.
- [94] Manjolin, L.C.; dos Reis, M.B.G.; Maquiaveli, C. do C.; Santos-Filho, O.A.; da Silva, E.R. Dietary Flavonoids Fisetin, Luteolin and Their Derived Compounds Inhibit Arginase, a Central Enzyme in *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Infection. *Food Chem.*, **2013**, 141, 2253–2262.
- [95] de Sousa, L.R.F.; Ramalho, S.D.; Burger, M.C. de M.; Nebo, L.; Fernandes, J.B.; da Silva, M.F. das G.F.; Iemma, M.R. da C.; Corrêa, C.J.; Souza, D.H.F. de; Lima, M.I.S.; Vieira, P.C. Isolation of Arginase Inhibitors from the Bioactivity-Guided Fractionation of *Byrsonima Coccolobifolia* Leaves and Stems. *J. Nat. Prod.*, **2014**, 77, 392–396.
- [96] Reis, M.B.G. dos; Manjolin, L.C.; Maquiaveli, C. do C.; Santos-Filho, O.A.; Silva, E.R. da. Inhibition of *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* and Rat Arginases by Green Tea EGCG, (+)-Catechin and (–)-Epicatechin: A Comparative Structural Analysis of Enzyme-Inhibitor Interactions. *PLOS ONE*, **2013**, 8, e78387.
- [97] Maquiaveli, C.C.; Lucon-Júnior, J.F.; Brogi, S.; Campiani, G.; Gemma, S.; Vieira, P.C.; Silva, E.R. Verbascoside Inhibits Promastigote Growth and Arginase Activity of *Leishmania Amazonensis*. *J. Nat. Prod.*, **2016**, 79, 1459–1463.

- [98] H. Robert Horton; Laurence A. Moran; K. Gray Scrimgeour; Marc D. Perry; J. David Rawn. Properties of Enzymes. In: *Principles of Biochemistry*; 4th ed.; Pearson Education: New Jersey, **2006**.
- [99] Équation de Michaelis-Menten. *Wikipédia*, **2016**.
- [100] Cornish-Bowden, A. One Hundred Years of Michaelis–Menten Kinetics. *Perspect. Sci.*, **2015**, 4, 3–9.
- [101] Inhibiteur enzymatique. *Wikipédia*, **2015**.
- [102] Lineweaver, H.; Burk, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **1934**, 56, 658–666.
- [103] Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. Appendix: Vmax and Km Can Be Determined by Double-Reciprocal Plots. *Biochemistry*; 5th ed.; W. H. Freeman: New York, **2002**.
- [104] Lineweaver–Burk Plot. *Wikipedia*, **2016**.
- [105] Dixon, M. The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochem. J.*, **1953**, 55, 170–171.
- [106] Schlamowitz, M.; Shaw, A.; Jackson, W.T. Limitations of the Dixon Plot for Ascertaining Nature of Enzyme Inhibition. *Tex. Rep. Biol. Med.*, **1969**, 27, 483–488.
- [107] Purich, D.L.; Fromm, H.J. Limitations in the Use of Dixon Plots to Evaluate Enzyme Inhibition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1972**, 268, 1–3.
- [108] Cornish-Bowden, A. A Simple Graphical Method for Determining the Inhibition Constants of Mixed, Uncompetitive and Non-Competitive Inhibitors. *Biochem. J.*, **1974**, 137, 143–144.

- [109] Yoshino, M.; Murakami, K. A Graphical Method for Determining Inhibition Constants. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2009**, *24*, 1288–1290.
- [110] Beck, B.; Chen, Y.-F.; Dere, W.; Devanarayan, V.; Eastwood, B.J.; Farmen, M.W.; Iturria, S.J.; Iversen, P.W.; Kahl, S.D.; Moore, R.A.; Sawyer, B.D.; Weidner, J. *et al.* Assay Operations for SAR Support. In: *Assay Guidance Manual*; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD), **2004**.
- [111] Yung-Chi, C.; Prusoff, W.H. Relationship between the Inhibition Constant (K_i) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per Cent Inhibition (I_{50}) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.*, **1973**, *22*, 3099–3108.
- [112] Cer, R.Z.; Mudunuri, U.; Stephens, R.; Lebeda, F.J. IC_{50} -to- K_i : A Web-Based Tool for Converting IC_{50} to K_i Values for Inhibitors of Enzyme Activity and Ligand Binding. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, *37*, W441–W445.
- [113] Geyer, J.W.; Dabich, D. Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Anal. Biochem.*, **1971**, *39*, 412–417.
- [114] Van Slyke, D.D.; Archibald, R.M. Gasometric and Photometric Measurement of Arginase Activity. *J. Biol. Chem.*, **1946**, *165*, 293–309.
- [115] Eugene Roberts. Estimation of Arginase Activity in Homogenates. *J. Biol. Chem.*, **1948**, *176*, 213–222.
- [116] Folley, S.J.; Greenbaum, A.L. Determination of the Arginase Activities of Homogenates of Liver and Mammary Gland: Effects of pH and Substrate Concentration and Especially of Activation by Divalent Metal Ions. *Biochem. J.*, **1948**, *43*, 537–549.

- [117] Carulli, N.; Kaihara, S.; Wagner, H.N. Radioisotopic Assay of Arginase Activity. *Anal. Biochem.*, **1968**, 24, 515–522.
- [118] Righetti, P.; De Luca, L.; Wolf, G. A Radiometric Assay for Arginase. *Anal. Biochem.*, **1968**, 22, 225–230.
- [119] Schimke, R.T. [38] Micromethods for the Assay of Argininosuccinate Synthetase, Argininosuccinase, and Arginase. In: *Enzymology*, B.-M. ed.; Metabolism of Amino Acids and Amines Part A; Academic Press, **1970**; 17, Part A, pp. 324–329.
- [120] Van Elsen, A.F.; Leroy, J.G. Arginase Isoenzymes in Human Diploid Fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1975**, 62, 191–198.
- [121] Pace, C.N.; Buonanno, A.; Simmons-Hansen, J. Steady-State Kinetic Studies of Arginase with an Improved Direct Spectrophotometric Assay. *Anal. Biochem.*, **1980**, 109, 261–265.
- [122] Orfanos, A.P.; Naylor, E.W.; Guthrie, R. Fluorometric Micromethod for Determination of Arginase Activity in Dried Blood Spots on Filter Paper. *Clin. Chem.*, **1980**, 26, 1198–1200.
- [123] Konarska, L.; Tomaszewski, L. A Simple Quantitative Micromethod of Arginase Assay in Blood Spots Dried on Filter Paper. *Clin. Chim. Acta*, **1986**, 154, 7–17.
- [124] Corraliza, I.M.; Campo, M.L.; Soler, G.; Modolell, M. Determination of Arginase Activity in Macrophages: A Micromethod. *J. Immunol. Methods*, **1994**, 174, 231–235.
- [125] Rüegg, U.T.; Russell, A.S. A Rapid and Sensitive Assay for Arginase. *Anal. Biochem.*, **1980**, 102, 206–212.

- [126] Weiner, C.P.; Knowles, R.G.; Stegink, L.D.; Dawson, J.; Moncada, S. Myometrial Arginase Activity Increases with Advancing Pregnancy in the Guinea Pig. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **1996**, *174*, 779–782.
- [127] Iyamu, E.W.; Asakura, T.; Woods, G.M. A Colorimetric Microplate Assay Method for High-Throughput Analysis of Arginase Activity in Vitro. *Anal. Biochem.*, **2008**, *383*, 332–334.
- [128] Biczó, G.; Hegyi, P.; Berczi, S.; Dósa, S.; Hracskó, Z.; Varga, I.S.; Iványi, B.; Venglovecz, V.; Wittmann, T.; Takács, T.; Rakonczay, Z. Inhibition of Arginase Activity Ameliorates L-Arginine-Induced Acute Pancreatitis in Rats: *Pancreas*, **2010**, *39*, 868–874.
- [129] Robbins, K.C.; Shields, J. Partial Purification of Bovine Liver Arginase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1956**, *62*, 55–62.
- [130] Cabello, J.; Basilio, C.; Prajoux, V. Kinetic Properties of Erythrocyte- and Liver Arginase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1961**, *48*, 148–152.
- [131] Hagan, J.J.; Dallam, R.D. Measurement of Arginase Activity. *Anal. Biochem.*, **1968**, *22*, 518–524.
- [132] Hirsch-Kolb, H.; Greenberg, D.M. Enzymic Microassay of Arginase with Ornithine Aminotransferase. *Anal. Biochem.*, **1970**, *35*, 60–65.
- [133] Schimke, R.T. Arginase (Rat Liver). In: *Methods in Enzymology*; Herbert Tabor, C.W.T., Ed.; Academic Press, **1970**; *17*, Part A, pp. 313–317.
- [134] Kaysen, G.A.; Strecker, H.J. Purification and Properties of Arginase of Rat Kidney. *Biochem. J.*, **1973**, *133*, 779–788.

- [135] Garganta, C.L.; Bond, J.S. Assay and Kinetics of Arginase. *Anal. Biochem.*, **1986**, *154*, 388–394.
- [136] Aminlari, M. A Novel Colorimetric Method for Assaying Arginase Activity. *Clin. Biochem.*, **1992**, *25*, 431–436.
- [137] Dabir, S.; Dabir, P.; Somvanshi, B. Purification, Properties and Alternate Substrate Specificities of Arginase from Two Different Sources: *Vigna Catjang* Cotyledon and Buffalo Liver. *Int. J. Biol. Sci.*, **2005**, *1*, 114–122.
- [138] Ikemoto, M.; Tabata, M.; Miyake, T.; Kono, T.; Mori, M.; Totani, M.; Murachi, T. Expression of Human Liver Arginase in *Escherichia Coli*. Purification and Properties of the Product. *Biochem. J.*, **1990**, *270*, 697–703.
- [139] Colleluori, D.M.; Morris, S.M.; Ash, D.E. Expression, Purification, and Characterization of Human Type II Arginase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2001**, *389*, 135–143.
- [140] Stasyuk, N.; Gayda, G.; Yepremyan, H.; Stepien, A.; Gonchar, M. Fluorometric Enzymatic Assay of L-Arginine. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2017**, *170*, 184–190.
- [141] Reginald M. Archibald. Colorimetric Determination of Urea. *J. Biol. Chem.*, **1945**, *157*, 507–518.
- [142] Pham, T.; Guglielmetti, A.; Fimbel, S.; Demougeot, C.; Girard-Thernier, C. Arginase Inhibitory Activity of Several Natural Polyphenols Using a Novel *in vitro* Test on Purified Bovine Arginase. *Planta Med.*, **2014**, *80*.

- [143] Chinard, F.P. Photometric Estimation of Proline and Ornithine. *J. Biol. Chem.*, **1952**, *199*, 91–95.
- [144] Klein, D.; Morris, D.R. Increased Arginase Activity during Lymphocyte Mitogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1978**, *81*, 199–204.
- [145] Yuriev E., Agostino M., Ramsland P. A. Challenges and Advances in Computational Docking: 2009 in Review. *J Mol Recognit*, **2011**, *24*, 149–164.
- [146] Warren G. L., Do T. D., Kelley B. P., Nicholls A. and Warren S. D. Essential Considerations for Using Protein–ligand Structures in Drug Discovery. *Drug Discov. Today*, **2012**, *17*, 1270–1281.
- [147] Kroemer, R.T. Structure-Based Drug Design: Docking and Scoring. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2007**, *8*, 312–328.
- [148] Meng, X.-Y.; Zhang, H.-X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.*, **2011**, *7*, 146–157.
- [149] Lexa, K.W.; Carlson, H.A. Protein Flexibility in Docking and Surface Mapping. *Q. Rev. Biophys.*, **2012**, *45*, 301–343.
- [150] Chen, Y.-C. Beware of Docking! *Trends Pharmacol. Sci.*, **2015**, *36*, 78–95.
- [151] Grosdidier, A. *Conception d'un Logiciel de Docking et Applications Dans la Recherche de Nouvelles Molécules Actives*, June **2007**.

<http://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01115990/document> (accessed June 25, 2016).
- [152] Zhang, Y. I-TASSER Server for Protein 3D Structure Prediction. *BMC Bioinformatics*, **2008**, *9*, 40.

- [153] BioSolveIT – GmbH, 2012. FlexX (Protein – Ligand Docker) User & Technical Reference as Part of LeadIT 2.0, Germany, pp. 15.
- [154] Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm. *J. Mol. Biol.*, **1996**, *261*, 470–489.
- [155] Moitessier, N.; Englebienne, P.; Lee, D.; Lawandi, J.; Corbeil, C.R. Towards the Development of Universal, Fast and Highly Accurate Docking/scoring Methods: A Long Way to Go. *Br. J. Pharmacol.*, **2008**, *153*, S7–S26.
- [156] <http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?grid=E6835A77&tabtoshow=Current> (Accessed Aug 20, **2016**).
- [157] Azizian H., Bahrami H., Pasalar P., Amanlou M. Molecular Modeling of *Helicobacter Pylori* Arginase and the Inhibitor Coordination Interactions. *J Mol Graph Model*, **2010**, *28*, 626–635.
- [158] Mendez-Cuesta C. A., Mendez-Lucio O., Castillo R. Homology Modeling, Docking and Molecular Dynamics of the *Leishmania Mexicana* Arginase: A Description of the Catalytic Site Useful for Drug Design. *J Mol Graph Model*, **2012**, *38*, 50–59.
- [159] Glisic, S.; Sencanski, M.; Perovic, V.; Stevanovic, S.; García-Sosa, A.T. Arginase Flavonoid Anti-Leishmanial *in silico* Inhibitors Flagged against Anti-Targets. *Molecules*, **2016**, *21*, 589.
- [160] Cheng T., Li Q., Zhou Z., Wang Y., Bryant S. H. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: A Problem-Centric Review. *AAPS J.*, **2012**, *14*, 133–141.

- [161] Türkoğlu, S.; Özer, İ. Possible Involvement of Manganese in the Catalytic Mechanism of Bovine Liver Arginase. *Int. J. Biochem.*, **1992**, *24*, 937–939.
- [162] Venkatakrishnan, G.; Shankar, V.; Reddy, S.R.R. Microheterogeneity of Molecular Forms of Arginase in Mammalian Tissues. *Indian J. Biochem. Biophys.*, **2003**, *40*, 400–408.
- [163] Jiang, W.; Sun, B.; Song, X.; Zheng, Y.; Wang, L.; Wang, T.; Liu, S. Arginase Inhibition Protects against Hypoxia-induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Mol. Med. Rep.*, **2015**, *12*, 4743–4749.
- [164] You, H.; Gao, T.; Cooper, T.K.; Morris, S.M.; Awad, A.S. Arginase Inhibition: A New Treatment for Preventing Progression of Established Diabetic Nephropathy. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, **2015**, *309*, F447-455.
- [165] Clifford, M.N. Chlorogenic Acids and Other Cinnamates – Nature, Occurrence, Dietary Burden, Absorption and Metabolism. *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, *80*, 1033–1043.
- [166] Microlab NIMBUS | Compact, Affordable Pipetting Workstation.
<http://www.hamiltoncompany.com/products/automated-liquid-handling/liquid-handling-workstations/microlab-nimbus> (Accessed Aug 22, **2016**).
- [167] Marques, V.; Farah, A. Chlorogenic Acids and Related Compounds in Medicinal Plants and Infusions. *Food Chem.*, **2009**, *113*, 1370–1376.
- [168] Bordage, S.; Pham, T.-N.; Zedet, A.; Gugglielmetti, A.-S.; Nappey, M.; Demougeot, C.; Girard-Thernier, C. Investigation of Mammal Arginase Inhibitory Properties of

- Natural Ubiquitous Polyphenols by Using an Optimized Colorimetric Microplate Assay. *Planta Med.*, **2016**, *82*, 1–7.
- [169] Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction. *Nat. Protoc.*, **2010**, *5*, 725–738.
- [170] SYBYL-X, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
http://www.tripos.com/index.php?family=modules%2CSimplePage%2C_Citations
(Accessed Mar 18, **2016**).
- [171] Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2015. Molecular Operating Environment (MOE).
https://www.chemcomp.com/Research-Citing_MOE.htm (Accessed Mar 18, **2016**).
- [172] Morris Jr, S.M. Recent Advances in Arginine Metabolism: Roles and Regulation of the Arginases. *Br. J. Pharmacol.*, **2009**, *157*, 922–930.
- [173] Schade, D.; Kotthaus, J.; Klein, N.; Kotthaus, J.; Clement, B. Prodrug Design for the Potent Cardiovascular Agent N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA): Synthetic Approaches and Physicochemical Characterization. *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 5249–5259.
- [174] Golebiowski, A.; Whitehouse, D.; Beckett, R.P.; Van Zandt, M.; Ji, M.K.; Ryder, T.R.; Jagdmann, E.; Andreoli, M.; Lee, Y.; Sheeler, R.; Conway, B.; Olczak, J.; Mazur, M.; Czystkowski, W.; Piotrowska, W.; Cousido-Siah, A.; Ruiz, F.X.; Mitschler, A.; Podjarny, A.; Schroeter, H. Synthesis of Quaternary α -Amino Acid-Based Arginase Inhibitors via the Ugi Reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 4837–4841.

- [175] Buzzetti, F.; Brasca, M.G.; Crugnola, A.; Fustinoni, S.; Longo, A.; Penco, S.; Dalla Zonca, P.; Comoglio, P.M. Cinnamamide Analogs as Inhibitors of Protein Tyrosine Kinases. *Farm. Soc. Chim. Ital.* **1993**, *48*, 615–636.
- [176] Iwai, K.; Kishimoto, N.; Kakino, Y.; Mochida, K.; Fujita, T. *In Vitro* Antioxidative Effects and Tyrosinase Inhibitory Activities of Seven Hydroxycinnamoyl Derivatives in Green Coffee Beans. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 4893–4898.
- [177] Mellay-Hamon, V.L.; Criton, M. Phenylethylamide and Phenylmethylethylamide Derivatives as New Tyrosinase Inhibitors. *Biol. Pharm. Bull.*, **2009**, *32*, 301–303.
- [178] Wu, Z.; Zheng, L.; Li, Y.; Su, F.; Yue, X.; Tang, W.; Ma, X.; Nie, J.; Li, H. Synthesis and Structure–activity Relationships and Effects of Phenylpropanoid Amides of Octopamine and Dopamine on Tyrosinase Inhibition and Antioxidation. *Food Chem.*, **2012**, *134*, 1128–1131.
- [179] Wu, Z.-R.; Zhi, D.-J.; Zheng, L.-F.; Li, J.-Y.; Li, Y.; Xie, Q.-J.; Feng, N.; Bao, Y.-F.; Gao, Q.-Y.; Song, Y.; Li, H.-Y. Design and Applications of Bifunctional Cinnamide Derivatives as Potential Antimycobacterial Agents with Few Hepatotoxic Effects. *Med. Chem. Res.*, **2014**, *24*, 161–170.
- [180] Okombi, S.; Rival, D.; Boumendjel, A.; Mariotte, A.-M.; Perrier, E. Para-Coumaric Acid or Para-Hydroxycinnamic Acid Derivatives and Their Use in Cosmetic or Dermatological Compositions. US8481593 (B2), July 9, **2013**.
- [181] Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP[®]: A New Peptide Coupling Reagent Devoid of Toxic by-Product. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 205–208.

- [182] Berndt, M.; Hölemann, A.; Niermann, A.; Bentz, C.; Zimmer, R.; Reissig, H.-U. Replacement of HMPA in Samarium Diiodide Promoted Cyclizations and Reactions of Organolithium Compounds. *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 2012, 1299–1302.
- [183] Montalbetti, C.A.G.N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron*, **2005**, 61, 10827–10852.
- [184] Pham, T.-N.; Bordage, S.; Pudlo, M.; Demougeot, C.; Thai, K.-M.; Girard-Thernier, C. Cinnamide Derivatives as Mammalian Arginase Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking. *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, 17, E1656.
- [185] Appendino, G.; Minassi, A.; Daddario, N.; Bianchi, F.; Tron, G.C. Chemoselective Esterification of Phenolic Acids and Alcohols. *Org. Lett.*, **2002**, 4, 3839–3841.
- [186] Mitsunobu, O. The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products. *Synthesis*, **1981**, 1981, 1–28.
- [187] Mitsunobu, O.; Yamada, M. Preparation of Esters of Carboxylic and Phosphoric Acid via Quaternary Phosphonium Salts. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1967**, 40, 2380–2382.
- [188] Schenk, S.; Weston, J.; Anders, E. Density Functional Investigation of the Mitsunobu Reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 12566–12576.
- [189] Mitsunobu Reaction. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/mitsunobu-reaction.shtm> (Accessed Sep 28, **2016**).
- [190] Sefkow, M.; Kelling, A.; Schilde, U. First Efficient Syntheses of 1-, 4-, and 5-Caffeoylquinic Acid. *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 2001, 2735–2742.

- [191] Shi, T.; Chen, H.; Jing, L.; Liu, X.; Sun, X.; Jiang, R. Development of a Kilogram-Scale Synthesis of Salidroside and Its Analogs. *Synth. Commun.*, **2011**, *41*, 2594–2600.
- [192] Guo, Y.; Zhao, Y.; Zheng, C.; Meng, Y.; Yang, Y. Synthesis, Biological Activity of Salidroside and Its Analogues. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2010**, *58*, 1627–1629.
- [193] Sanderson, J.T.; Clabault, H.; Patton, C.; Lassalle-Claux, G.; Jean-François, J.; Paré, A.F.; Hébert, M.J.G.; Surette, M.E.; Touaibia, M. Antiproliferative, Antiandrogenic and Cytotoxic Effects of Novel Caffeic Acid Derivatives in LNCaP Human Androgen-Dependent Prostate Cancer Cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 7182–7193.
- [194] Rodebaugh, R.; Fraser-Reid, B. Evidence for Cyclic Bromonium Ion Transfer in Electrophilic Bromination of Alkenes: Reaction of ω -Alkenyl Glycosides with Aqueous N-bromosuccinimide. *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 7663–7678.
- [195] Percec, V.; Leowanawat, P.; Sun, H.-J.; Kulikov, O.; Nusbaum, C.D.; Tran, T.M.; Bertin, A.; Wilson, D.A.; Peterca, M.; Zhang, S.; Kamat, N.P.; Vargo, K.; Moock, D.; Johnston, E.D.; Hammer, D.A.; Pochan, D.J.; Chen, Y.; Chabre, Y.M.; Shiao, T.C.; Bergeron-Brelek, M.; André, S.; Roy, R.; Gabius, H.-J.; Heiney, P.A. Modular Synthesis of Amphiphilic Janus Glycodendrimers and Their Self-Assembly into Glycodendrimersomes and Other Complex Architectures with Bioactivity to Biomedically Relevant Lectins. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 9055–9077.
- [196] Ren, B.; Wang, M.; Liu, J.; Ge, J.; Zhang, X.; Dong, H. Zemplén Transesterification: A Name Reaction That Has Misled Us for 90 Years. *Green Chem.*, **2015**, *17*, 1390–1394.

- [197] Galland, S.; Mora, N.; Abert-Vian, M.; Rakotomanomana, N.; Dangles, O. Chemical Synthesis of Hydroxycinnamic Acid Glucosides and Evaluation of Their Ability To Stabilize Natural Colors via Anthocyanin Copigmentation. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, 7573–7579.
- [198] Wang, L.-X.; Heredia, A.; Song, H.; Zhang, Z.; Yu, B.; Davis, C.; Redfield, R. Resveratrol Glucuronides as the Metabolites of Resveratrol in Humans: Characterization, Synthesis, and Anti-HIV Activity. *J. Pharm. Sci.*, **2004**, *93*, 2448–2457.
- [199] Regev-Shoshani, G.; Shoseyov, O.; Bilkis, I.; Kerem, Z. Glycosylation of Resveratrol Protects It from Enzymic Oxidation. *Biochem. J.*, **2003**, *374*, 157–163.
- [200] Li, J.-F.; Chen, S.-J.; Zhao, Y.; Li, J.-X. Glycoside Modification of Oleanolic Acid Derivatives as a Novel Class of Anti-Osteoclast Formation Agents. *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 599–605.
- [201] Lewis, P.; Kaltia, S.; Wähälä, K. The Phase Transfer Catalysed Synthesis of Isoflavone-O-glucosides. *J. Chem. Soc.*, **1998**, 2481–2484.
- [202] Koenigs, W.; Knorr, E. Ueber Einige Derivate Des Traubenzuckers Und Der Galactose. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.*, **1901**, *34*, 957–981.
- [203] Schmidt, R.R. New Methods for the Synthesis of Glycosides and Oligosaccharides—Are There Alternatives to the Koenigs-Knorr Method?. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1986**, *25*, 212–235.
- [204] Jie Jack Li. *Name Reactions: A Collection of Detailed Mechanisms and Synthetic Applications*; Fifth Edition.; Springer International Publishing, **2014**.

- [205] Peng, W.; Sun, J.; Lin, F.; Han, X.; Yu, B. Facile Synthesis of Ginsenoside Ro. *Synlett*, **2004**, 0259–0262.
- [206] Peng, W.; Han, X.; Yu, B. Synthesis of a Typical Glucuronide-Containing Saponin, 28-O- β -D-Glucopyranosyl Oleanate 3-O- β -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucuronopyranoside. *Synthesis*, **2004**, 10, 1641–1647.
- [207] Hongu, M.; Saito, K.; Tsujihara, K. Solid-Liquid Phase Transfer Catalyzed Novel Glycosylation Reaction of Phenols. *Synth. Commun.*, **1999**, 29, 2775–2781.
- [208] Gottlieb, H.E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 7512–7515.
- [209] Weng, Y.-C.; Chuang, C.-F.; Chuang, S.-T.; Chiu, H.-L.; Kuo, Y.-H.; Su, M.-J. KS370G, a Synthetic Caffeamide Derivative, Improves Left Ventricular Hypertrophy and Function in Pressure-Overload Mice Heart. *Eur. J. Pharmacol.*, **2012**, 684, 108–115.
- [210] Shi, Z.-H.; Li, N.-G.; Shi, Q.-P.; Hao-Tang, B.S.P.; Tang, Y.-P.; Wei-Li, B.S.P.; Lian-Yin, B.S.P.; Yang, J.-P.; Duan, J.-A. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Ferulic Acid Amides as Selective Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Med. Chem.*, **2013**, 9, 947–954.
- [211] Yamazaki, Y.; Kawano, Y.; Uebayasi, M. Induction of Adiponectin by Natural and Synthetic Phenolamides in Mouse and Human Preadipocytes and Its Enhancement by Docosahexaenoic Acid. *Life Sci.*, **2008**, 82, 290–300.
- [212] Yao, H.; Tang, Y.; Yamamoto, K. Metal-Free Oxidative Amide Formation with N-Hydroxysuccinimide and Hypervalent Iodine Reagents. *Tetrahedron Lett.*, **2012**, 53, 5094–5098.

- [213] Hong, S.S.; Jeong, W.; Kwon, J.G.; Choi, Y.-H.; Ahn, E.-K.; Ko, H.-J.; Seo, D.-W.; Oh, J.S. Phenolic Amides from the Fruits of *Tribulus Terrestris* and Their Inhibitory Effects on the Production of Nitric Oxide. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2013**, *34*, 3105–3108.
- [214] Kan, S.; Chen, G.; Han, C.; Chen, Z.; Song, X.; Ren, M.; Jiang, H. Chemical Constituents from the Roots of *Xanthium Sibiricum*. *Nat. Prod. Res.*, **2011**, *25*, 1243–1249.
- [215] Lin, C.-F.; Lay, H.-L.; Ni, C.-L.; Chen, C.-C. Phenolic Components of *Dendrobium Antennatum*. *Chem. Nat. Compd.*, **2013**, *49*, 520–522.
- [216] Tamiz, A.P.; Cai, S.X.; Zhou, Z.-L.; Yuen, P.-W.; Schelkun, R.M.; Whittemore, E.R.; Weber, E.; Woodward, R.M.; Keana, J.F.W. Structure–Activity Relationship of N-(Phenylalkyl)cinnamides as Novel NR2B Subtype-Selective NMDA Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 3412–3420.
- [217] Son, S.; Lewis, B.A. Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure–Activity Relationship. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *50*, 468–472.
- [218] Michalet, S.; Cartier, G.; David, B.; Mariotte, A.-M.; Dijoux-franca, M.-G.; Kaatz, G.W.; Stavri, M.; Gibbons, S. N-Caffeoylphenalkylamide Derivatives as Bacterial Efflux Pump Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 1755–1758.
- [219] Shi, Z.-H.; Li, N.-G.; Shi, Q.-P.; Tang, H.; Tang, Y.-P.; Li, W.; Yin, L.; Yang, J.-P.; Duan, J.-A. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Caffeic Acid Amides as Selective MMP-2 and MMP-9 Inhibitors. *Drug Dev. Res.*, **2012**, *73*, 343–351.

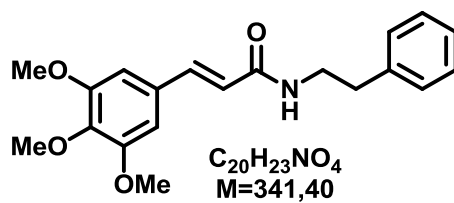
- [220] Chou, S.-C.; Su, C.-R.; Ku, Y.-C.; Wu, T.-S. The Constituents and Their Bioactivities of *Houttuynia Cordata*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2009**, *57*, 1227–1230.
- [221] Larsson, R.; Blanco, N.; Johansson, M.; Sterner, O. Synthesis of C-1 Indol-3-yl Substituted Tetrahydroisoquinoline Derivatives via a Pictet–Spengler Approach. *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 4966–4970.
- [222] Lee, S.U.; Shin, C.-G.; Lee, C.-K.; Lee, Y.S. Caffeoylglycolic and Caffeoylamino Acid Derivatives, Halfmers of L-Chicoric Acid, as New HIV-1 Integrase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, **2007**, *42*, 1309–1315.
- [223] Rodrigues, N.; Bennis, K.; Vivier, D.; Pereira, V.; C. Chatelain, F.; Chapuy, E.; Deokar, H.; Busserolles, J.; Lesage, F.; Eschalier, A.; Ducki, S. Synthesis and Structure–activity Relationship Study of Substituted Caffeate Esters as Antinociceptive Agents Modulating the TREK-1 Channel. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *75*, 391–402.
- [224] Spatafora, C.; Barresi, V.; Bhusainahalli, V.M.; Di Micco, S.; Musso, N.; Riccio, R.; Bifulco, G.; Condorelli, D.; Tringali, C. Bio-Inspired Benzo[k,l]xanthene Lignans: Synthesis, DNA-Interaction and Antiproliferative Properties. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 2686.
- [225] Michihata, N.; Kaneko, Y.; Kasai, Y.; Tanigawa, K.; Hirokane, T.; Higasa, S.; Yamada, H. High-Yield Total Synthesis of (–)-Strictinin through Intramolecular Coupling of Gallates. *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 4319–4328.
- [226] Lv, F.; He, X.; Lu, li; Wu, L.; Liu, T. Synthesis, Properties and near-Infrared Imaging Evaluation of Glucose Conjugated Zinc Phthalocyanine via Click Reaction. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **2012**, *16*, 77–84.

- [227] Thai, K.-M.; Ngo, T.-D.; Phan, T.-V.; Tran, T.-D.; Nguyen, N.-V.; Nguyen, T.-H.; Le, M.-T. Virtual Screening for Novel *Staphylococcus Aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors from Natural Products. *Med. Chem.*, **2015**, *11*, 135–155.
- [228] Thai, K.-M.; Le, D.-P.; Tran, N.-V.-K.; Nguyen, T.-T.-H.; Tran, T.-D.; Le, M.-T. Computational Assay of Zanamivir Binding Affinity with Original and Mutant Influenza Neuraminidase 9 Using Molecular Docking. *J. Theor. Biol.*, **2015**, *385*, 31–39.
- [229] Tran, T.-D.; Do, T.-H.; Tran, N.-C.; Ngo, T.-D.; Huynh, T.-N.-P.; Tran, C.-D.; Thai, K.-M. Synthesis and Anti Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Activity of Substituted Chalcones Alone and in Combination with Non-Beta-Lactam Antibiotics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 4555–4560.
- [230] Tran, T.-D.; Nguyen, T.-C.-V.; Nguyen, N.-S.; Nguyen, D.-M.; Nguyen, T.-T.-H.; Le, M.-T.; Thai, K.-M. Synthesis of Novel Chalcones as Acetylcholinesterase Inhibitors. *Appl. Sci.*, **2016**, *6*, 198.

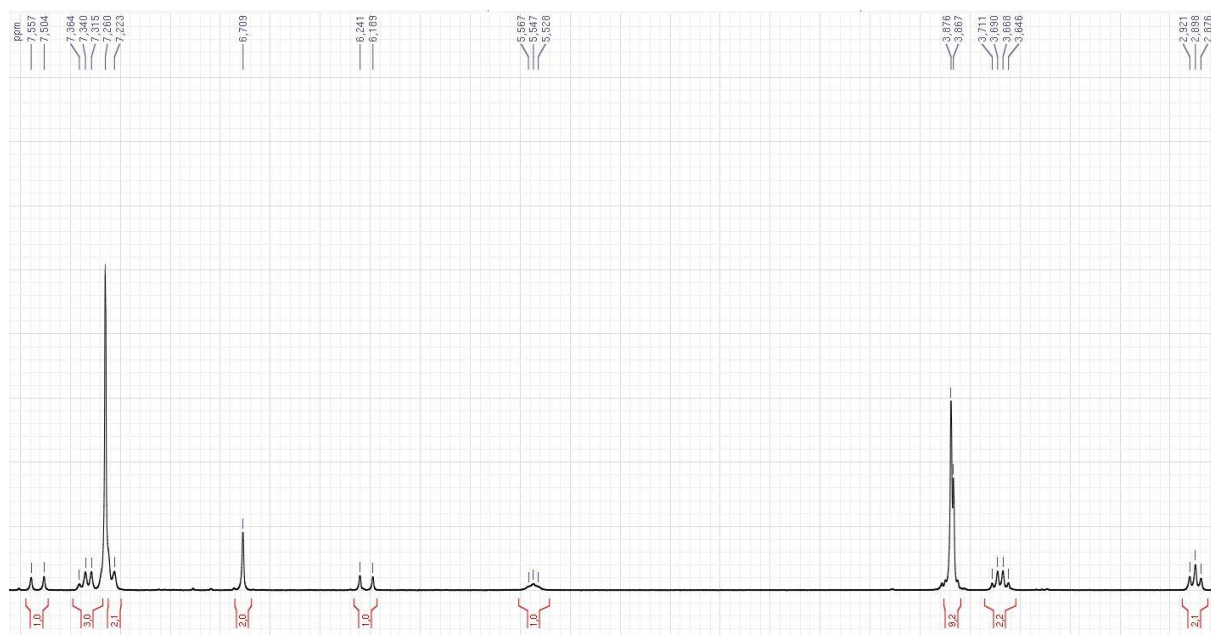
Annexes

Annexe 1 : Données analytiques des nouveaux composés

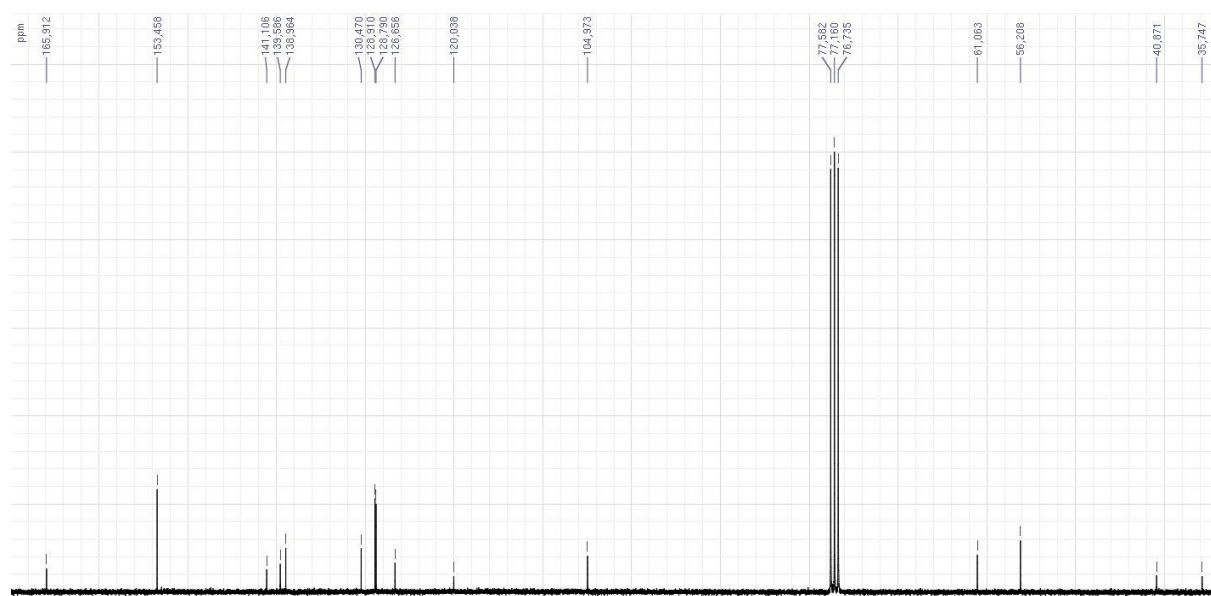
Composé (47)



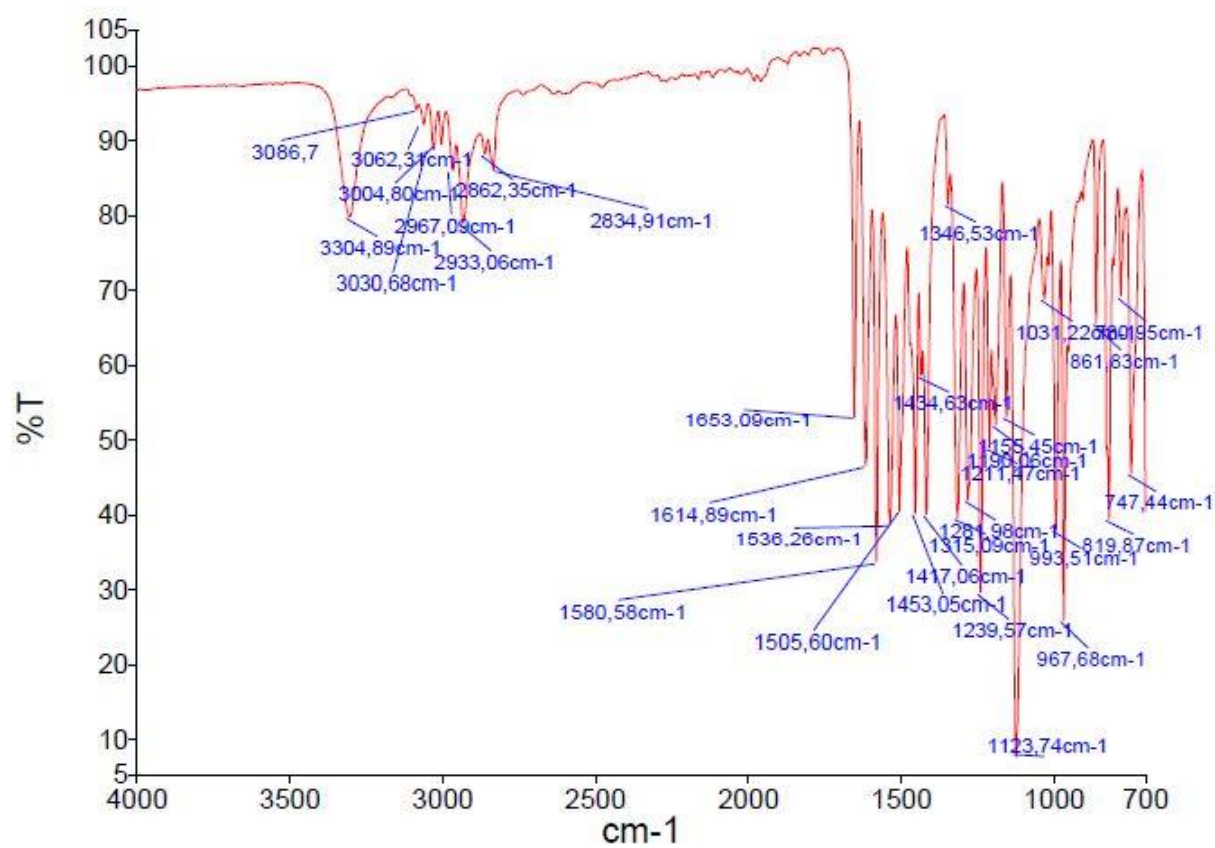
^1H -RMN ($CDCl_3$, 300 MHz)



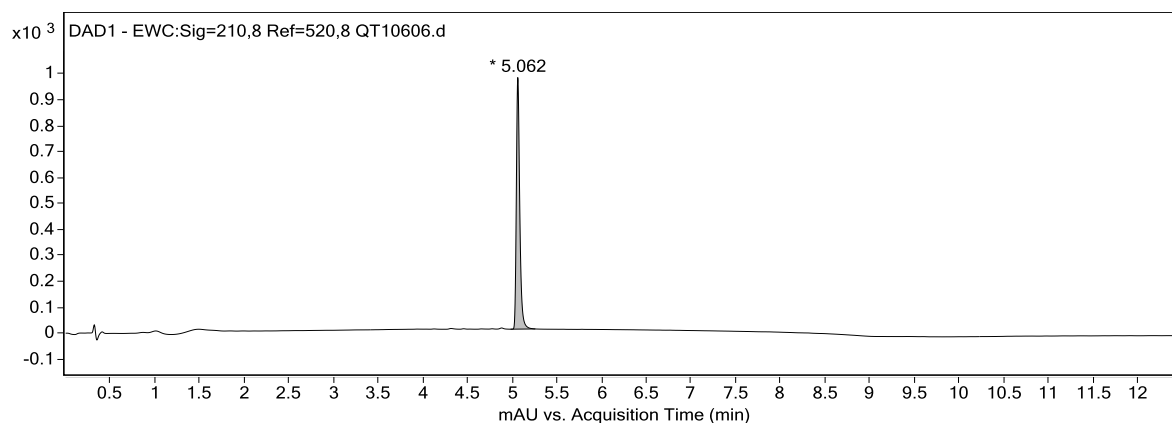
^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz)



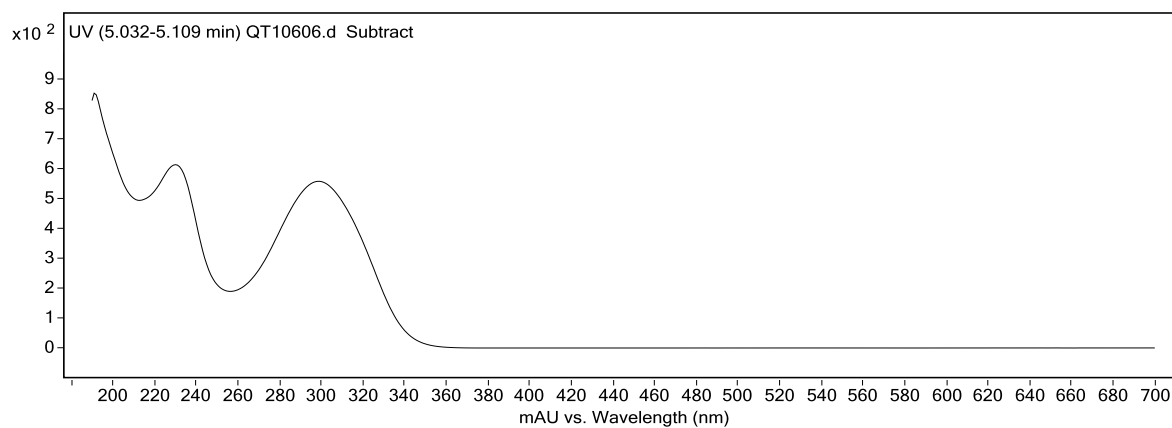
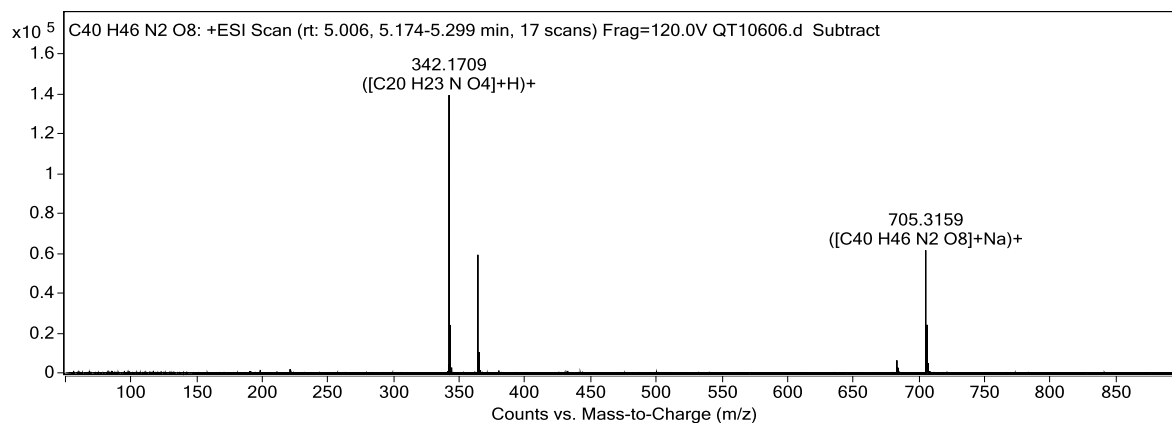
IR (ATR)



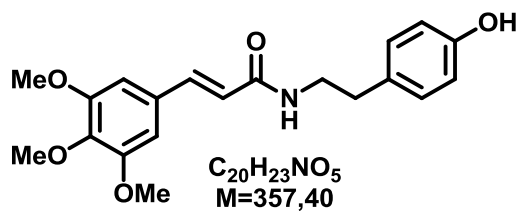
HRMS-ESI



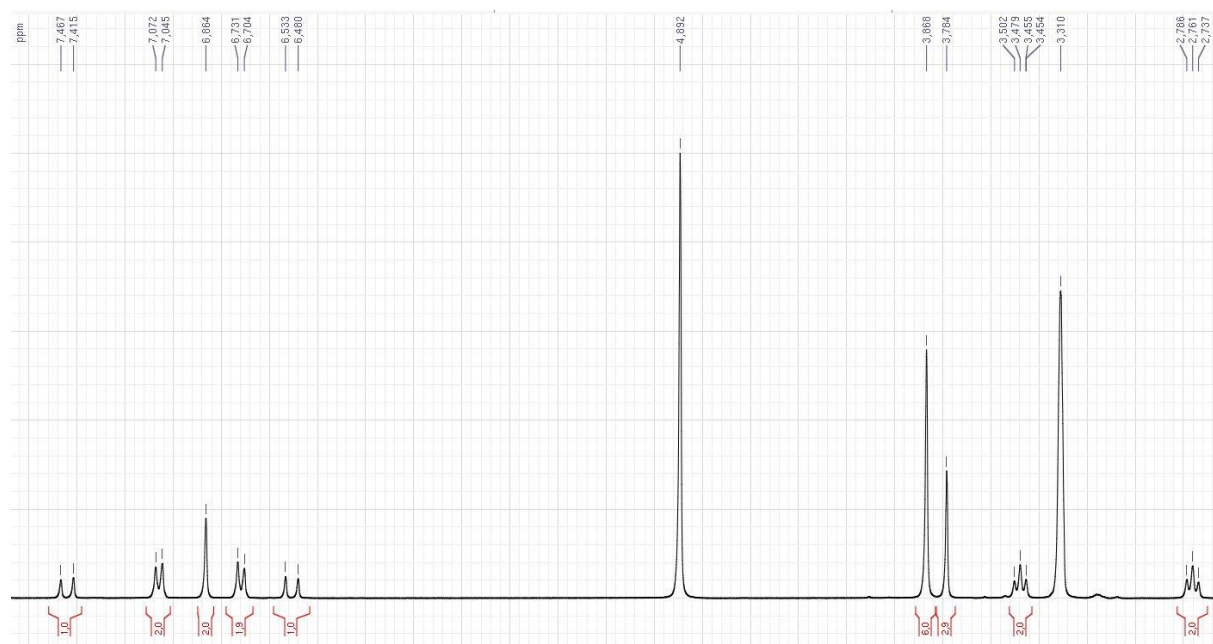
Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	4,982	5,062	5,259	969,46	2571,363	100	100



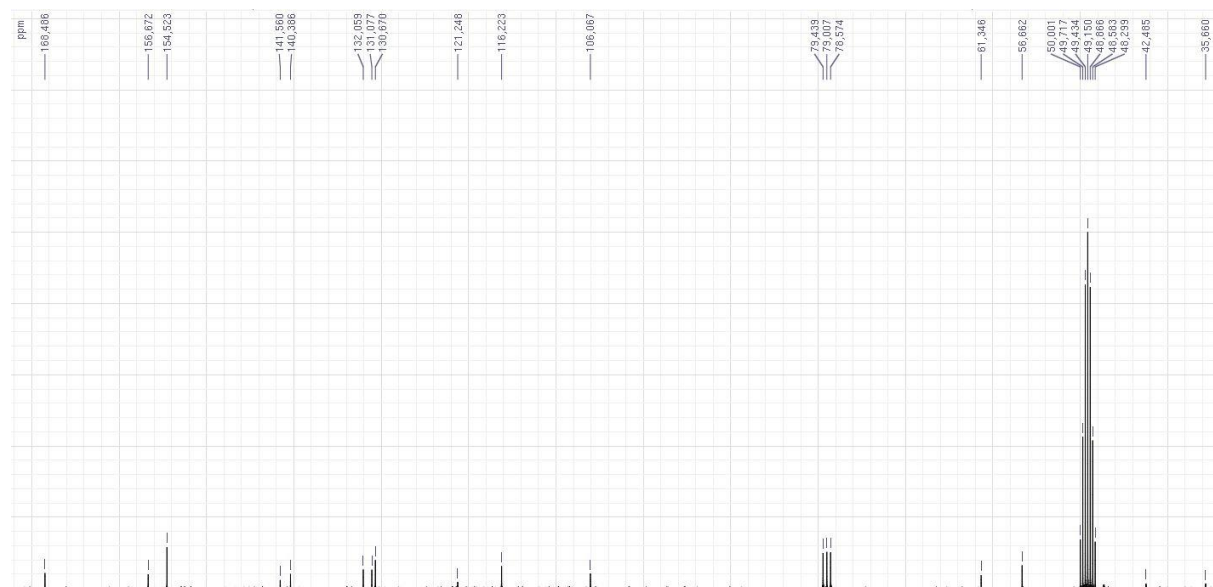
Composé (52)



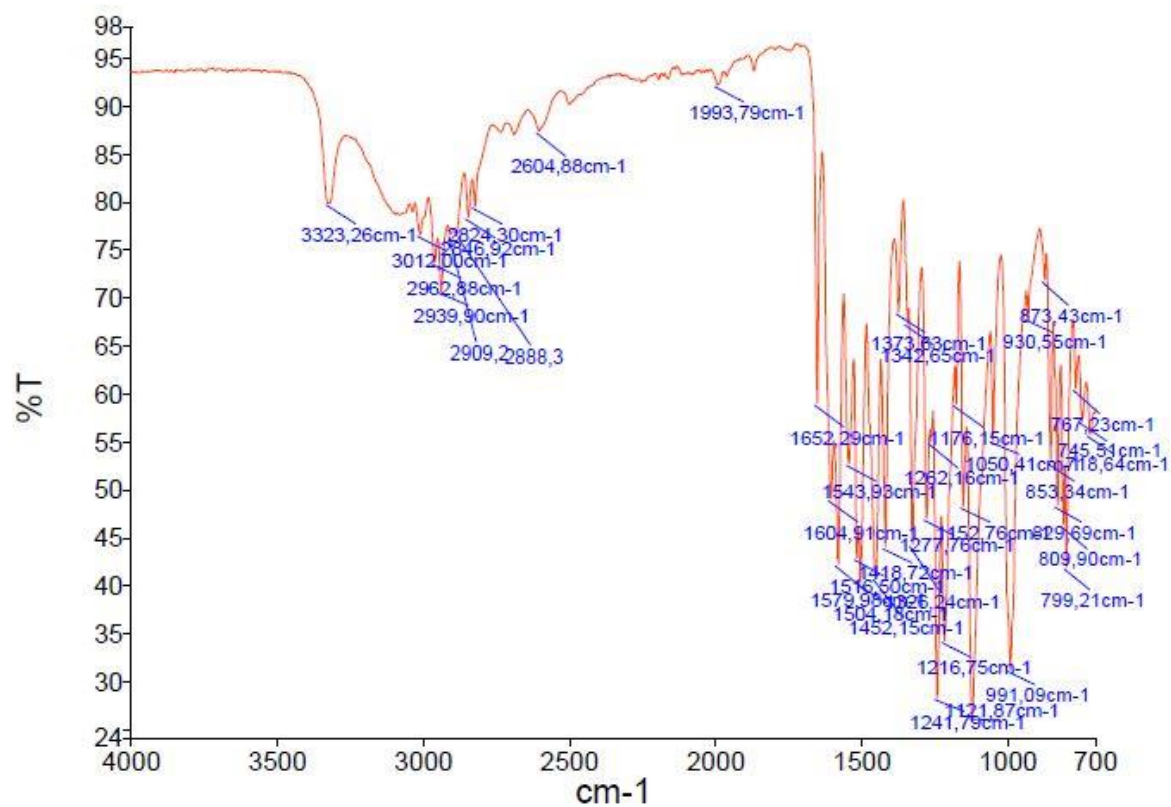
^1H -RMN (MeOD- d_4 , 300 MHz)



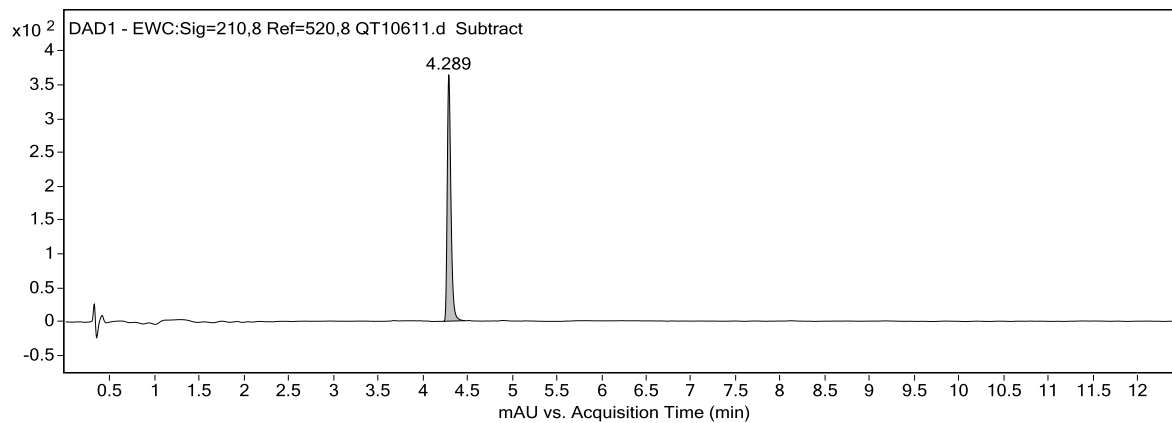
^{13}C -RMN (MeOD- d_4 + 10% CDCl_3 , 75 MHz)



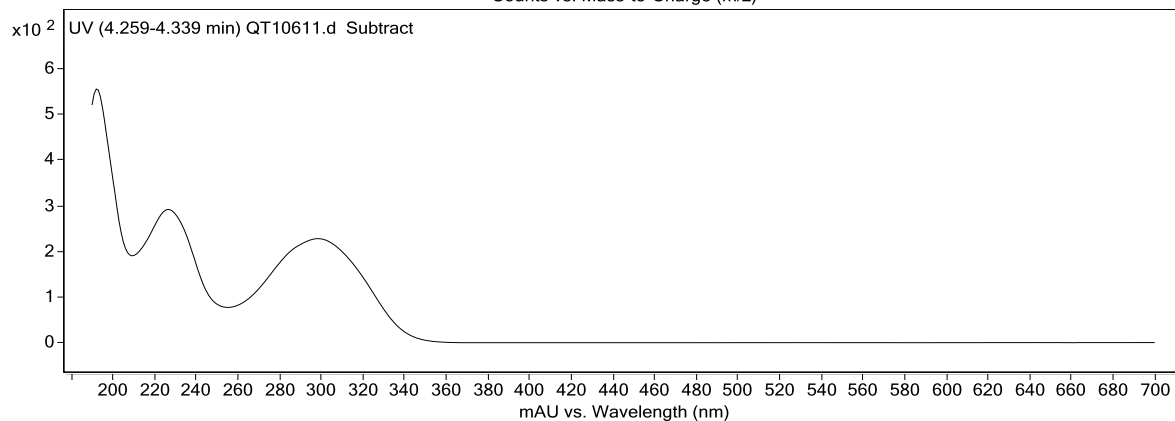
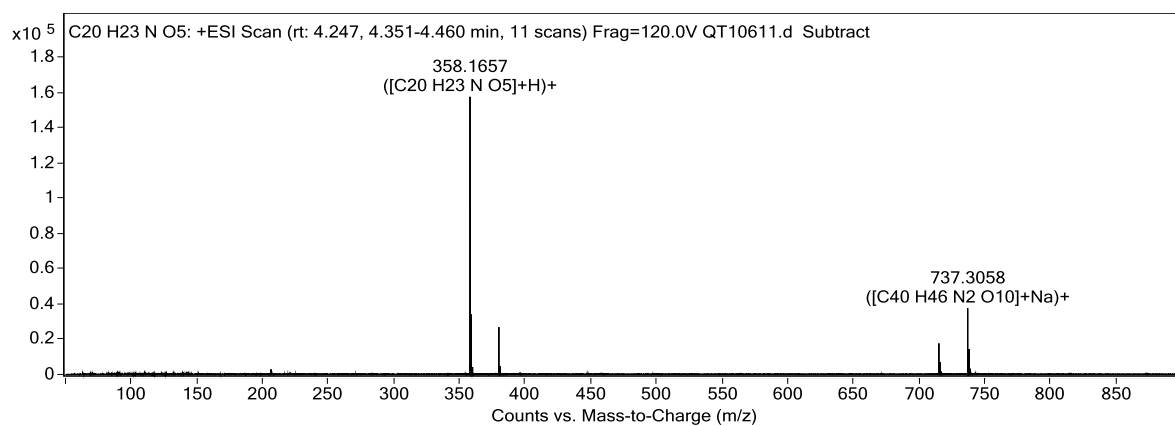
IR (ATR)



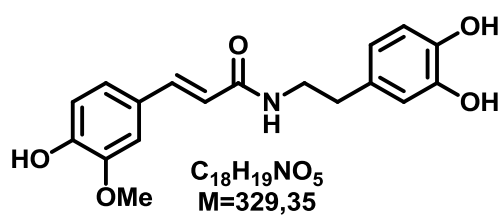
HRMS-ESI



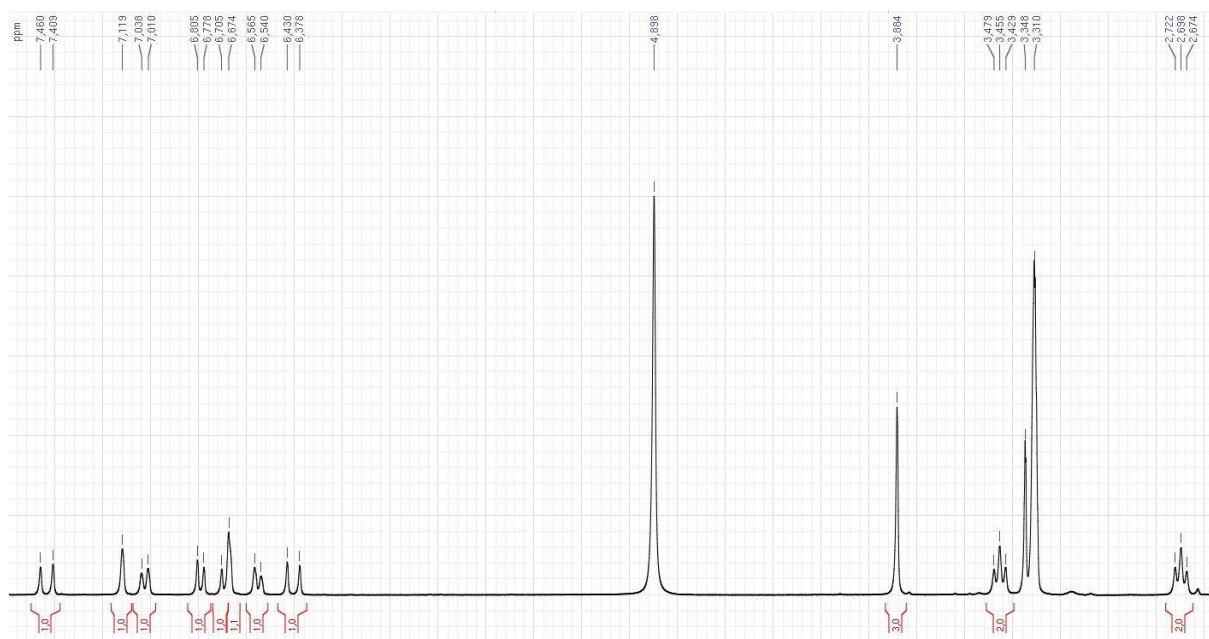
Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	4,226	4,289	4,473	363,74	920,226	100	100



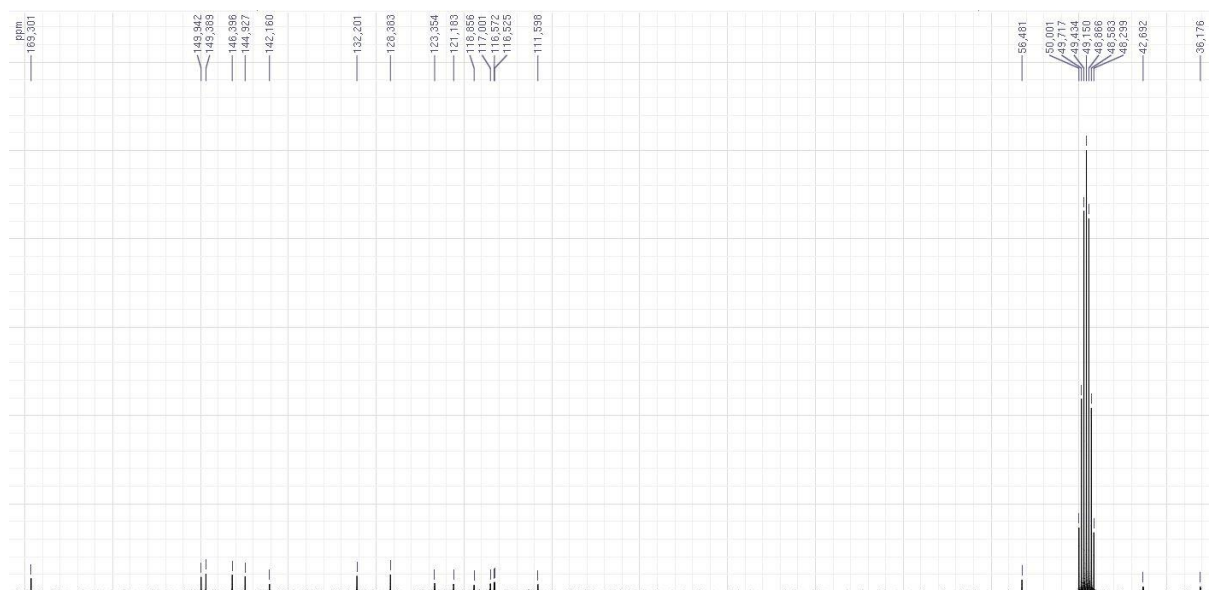
Composé (55)



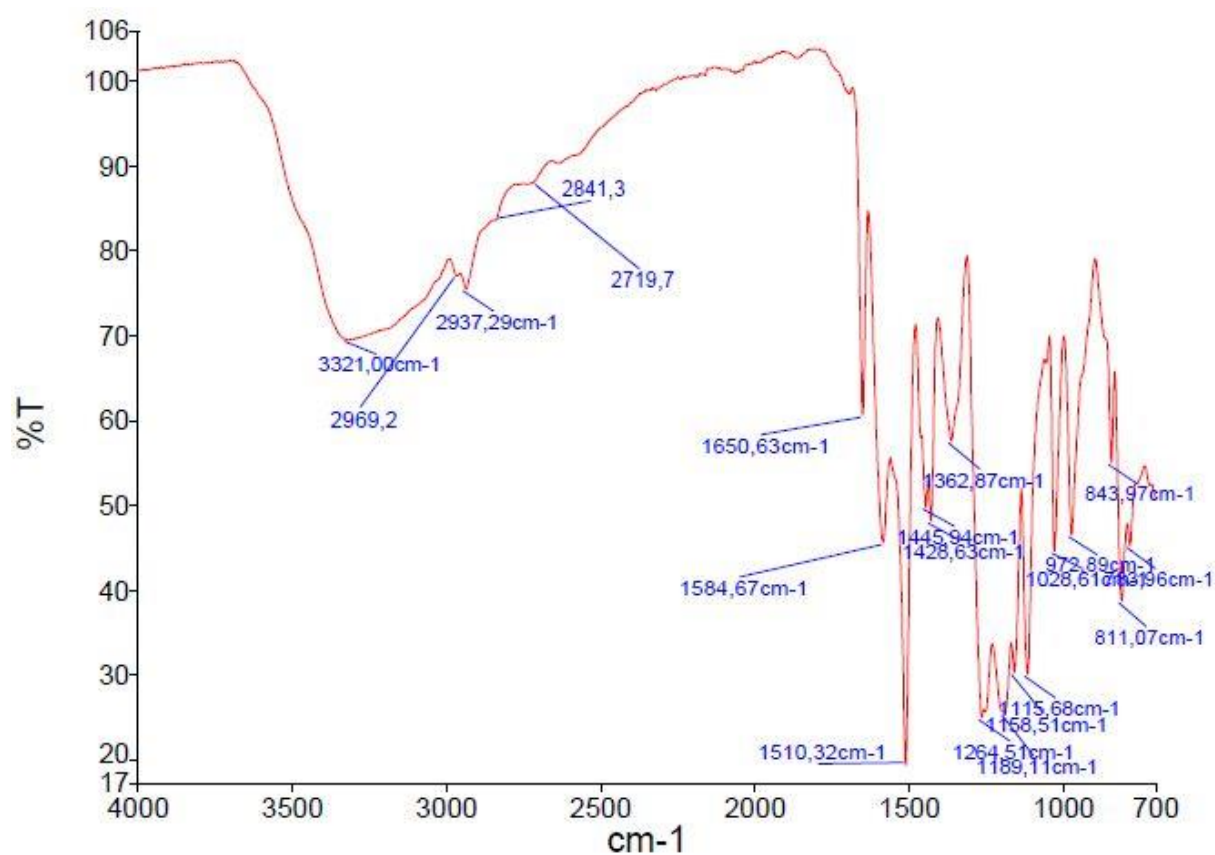
^1H -RMN (MeOD- d_4 , 300 MHz)



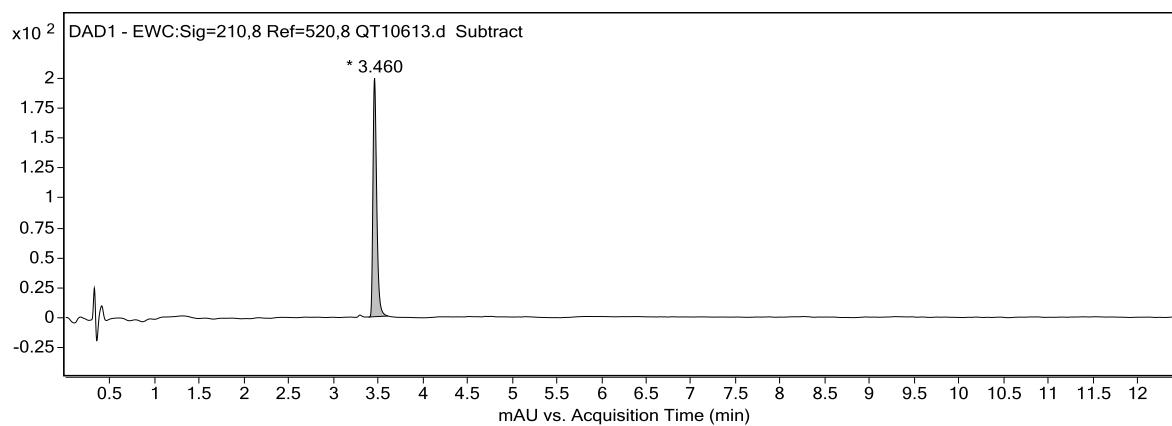
^{13}C -RMN (MeOD- d_4 , 75 MHz)



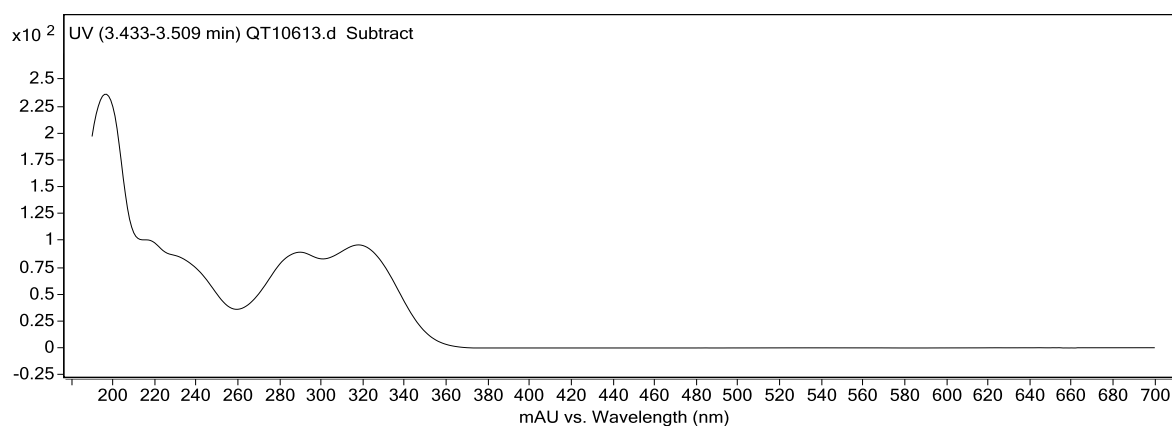
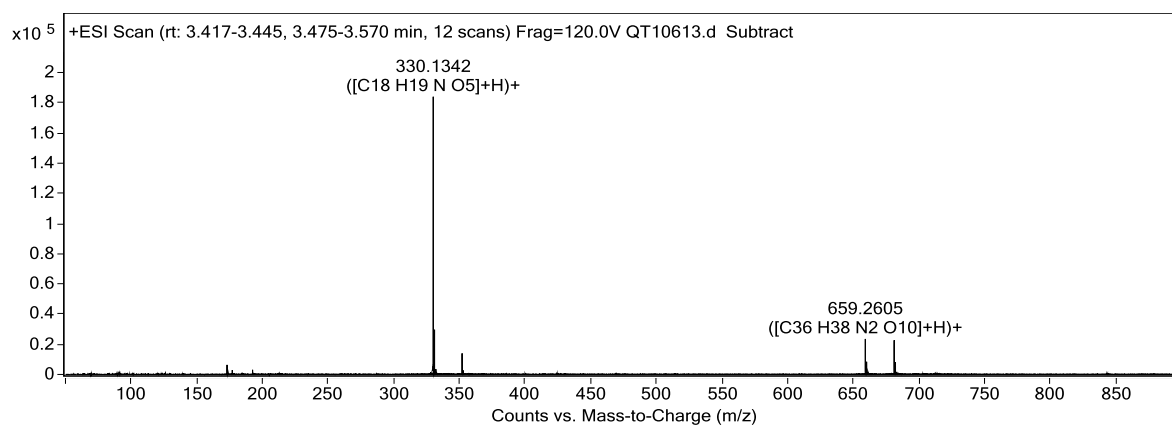
IR (ATR)



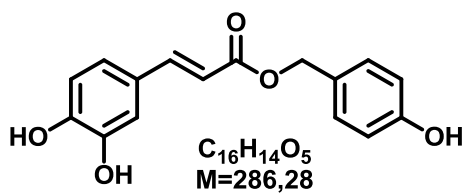
HRMS-ESI



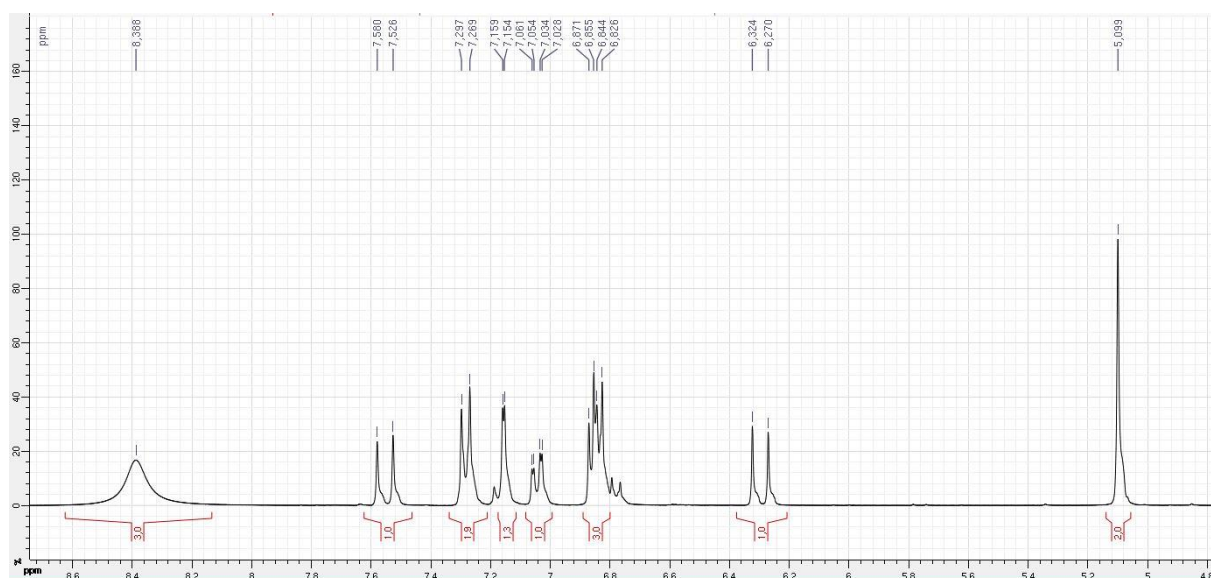
Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
1	3,393	3,46	3,61	199,4	584,604	100	100



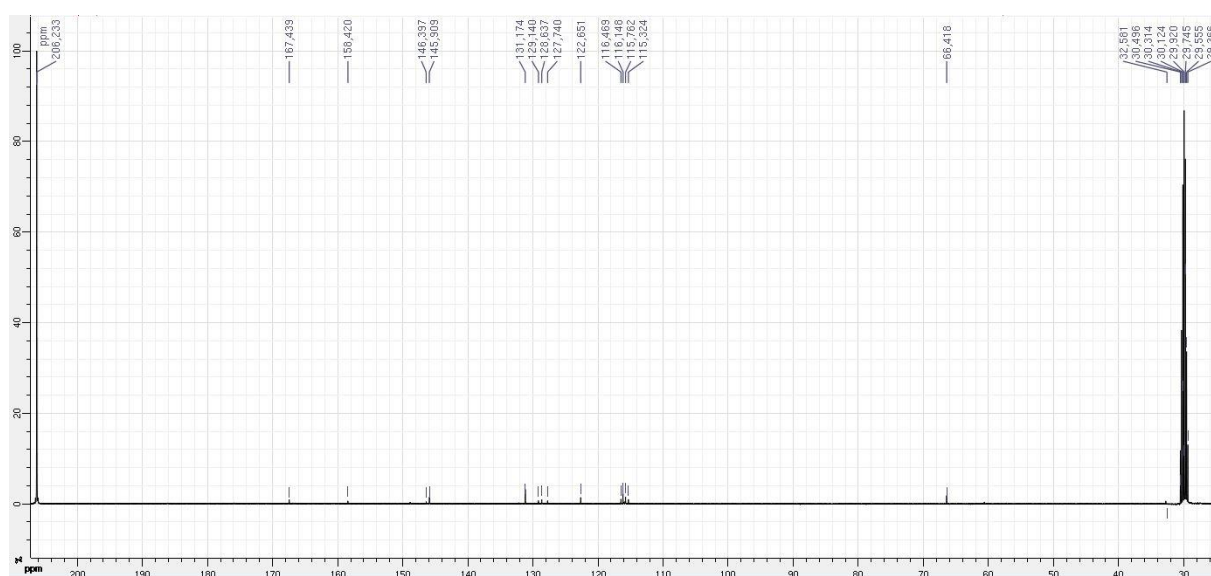
Composé (65)



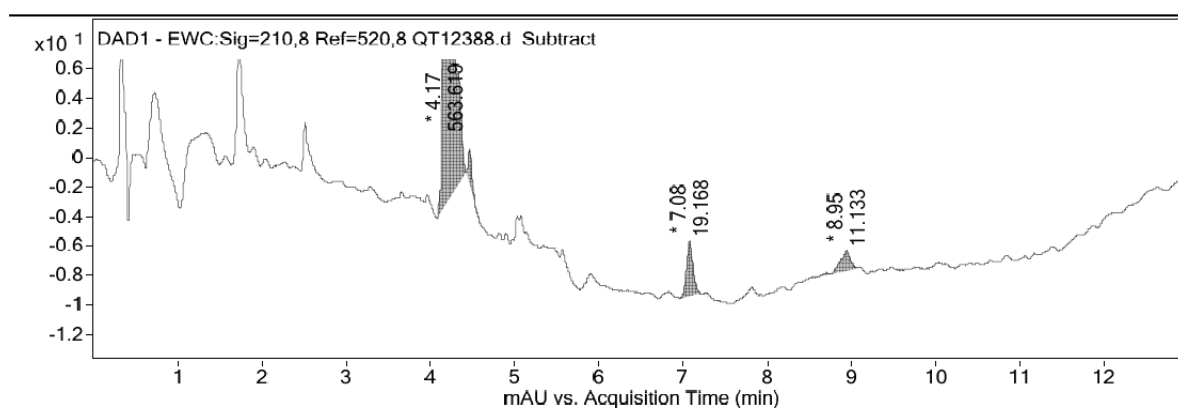
^1H -RMN (Acétone- d_6 , 300 MHz)



^{13}C -RMN (Acétone- d_6 , 75 MHz)

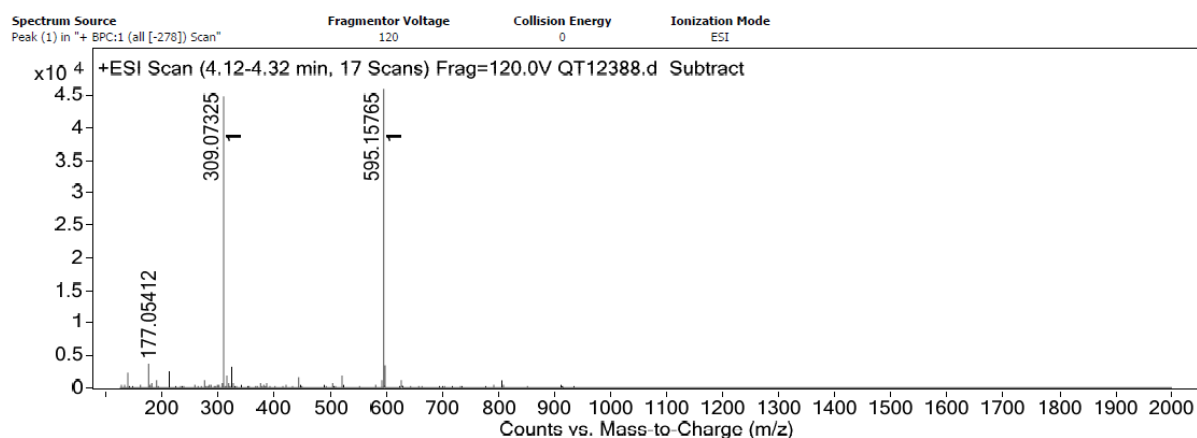


HRMS-ESI

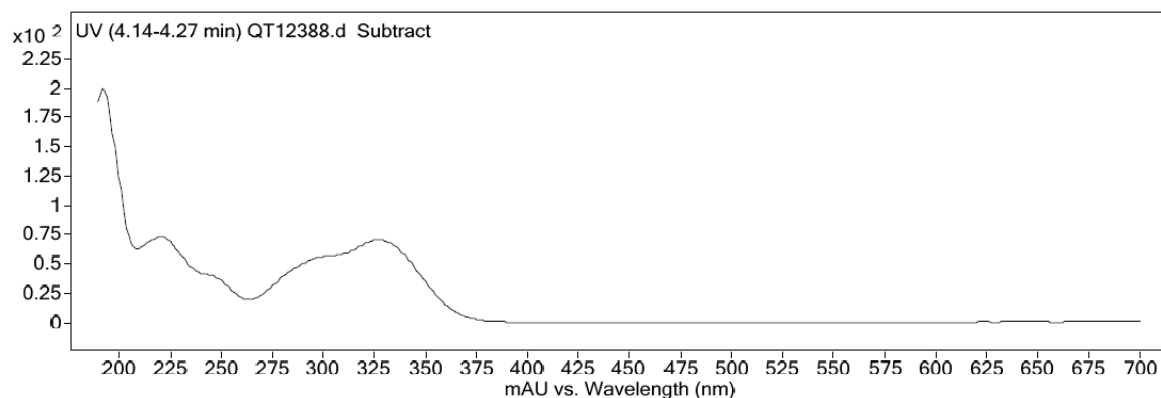


Integration Peak List

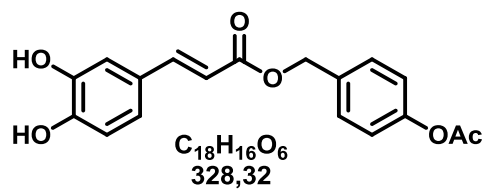
Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
4.07	4.17	4.42	139.95	563.619	100	94
4.43	4.47	4.59	2.35	5.652	1	0.94
6.96	7.08	7.2	3.7	19.168	3.4	3.2
8.58	8.95	9.12	1.38	11.133	1.98	1.86



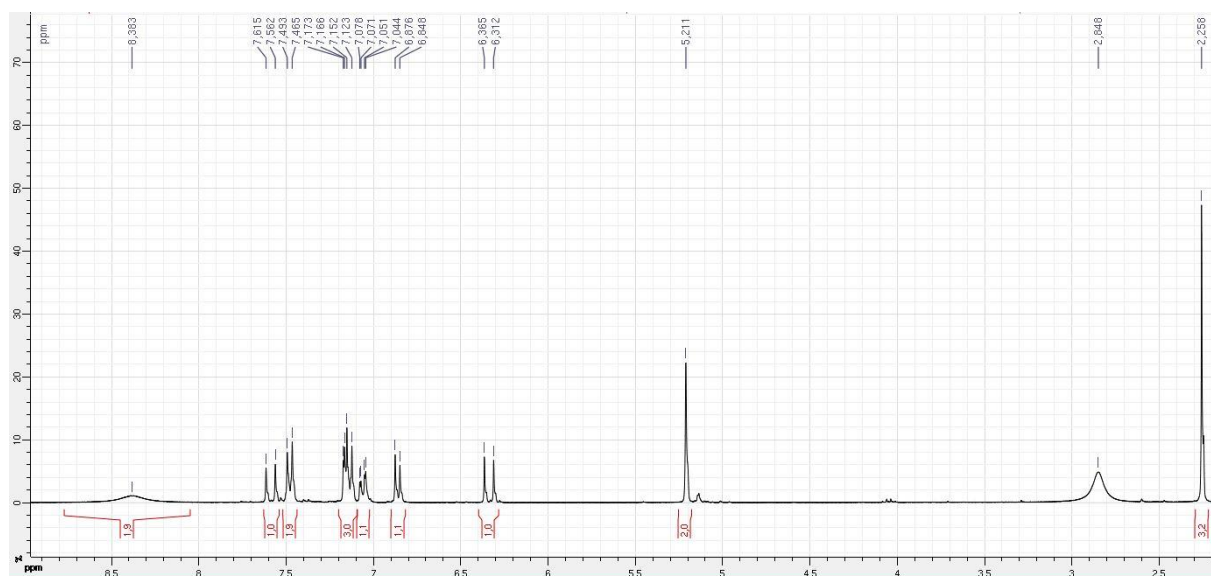
Spectrum Source: Peak (1) in "DAD1 - EWC:Sig=210,8 Ref=520,8 Sub"



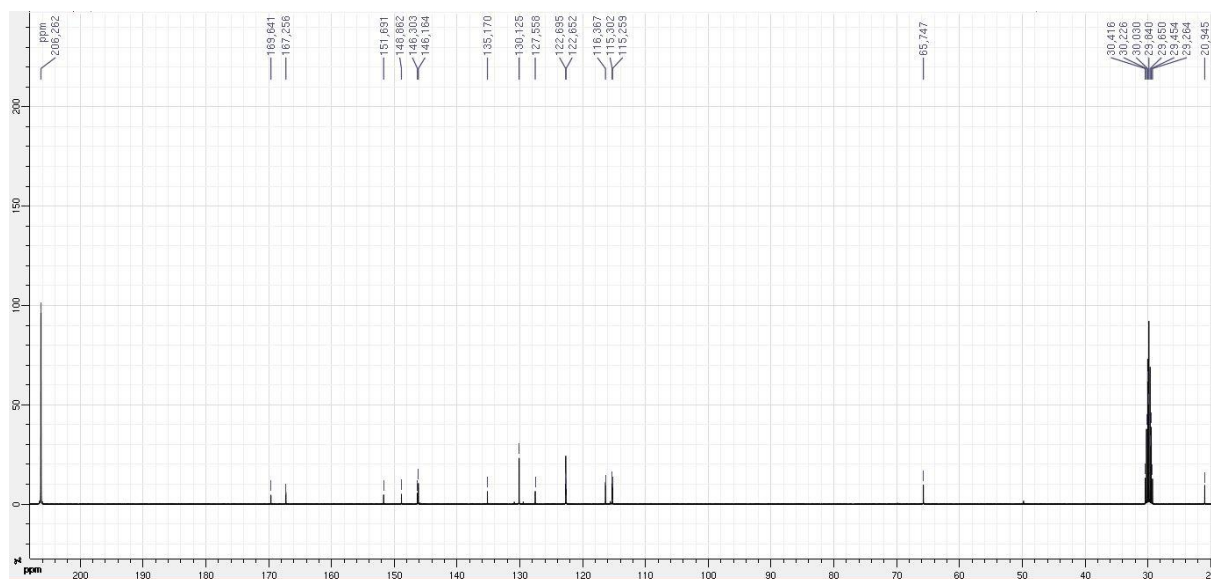
Composé (66)



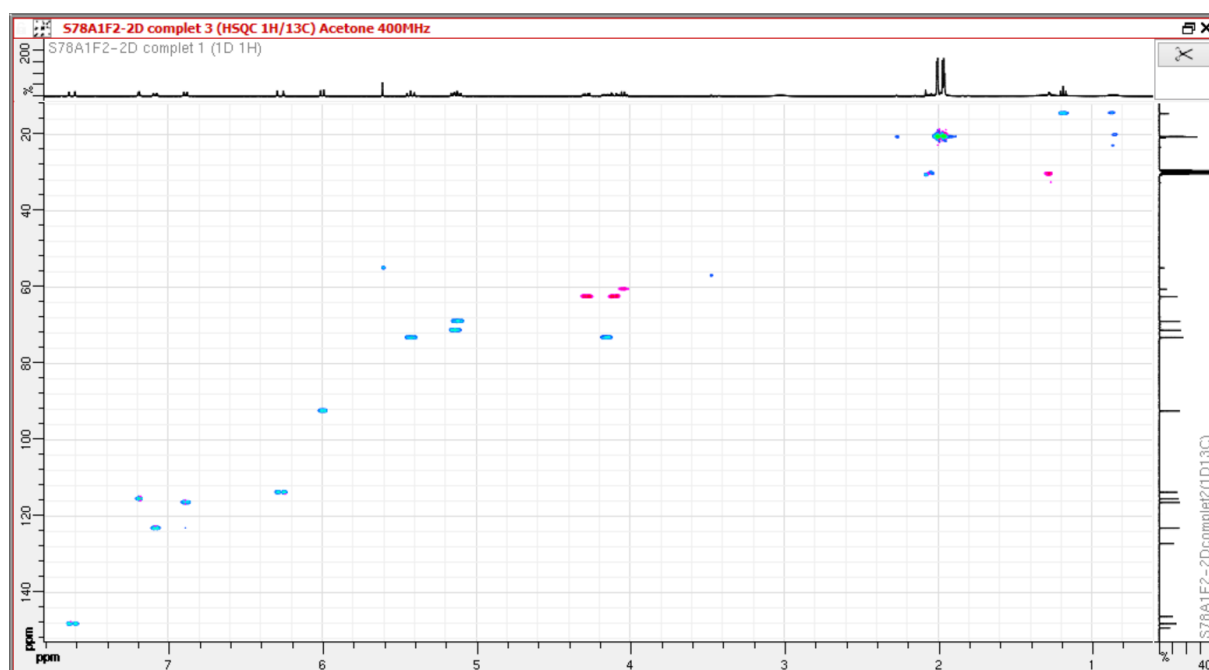
^1H -RMN (Acétone- d_6 , 300 MHz)



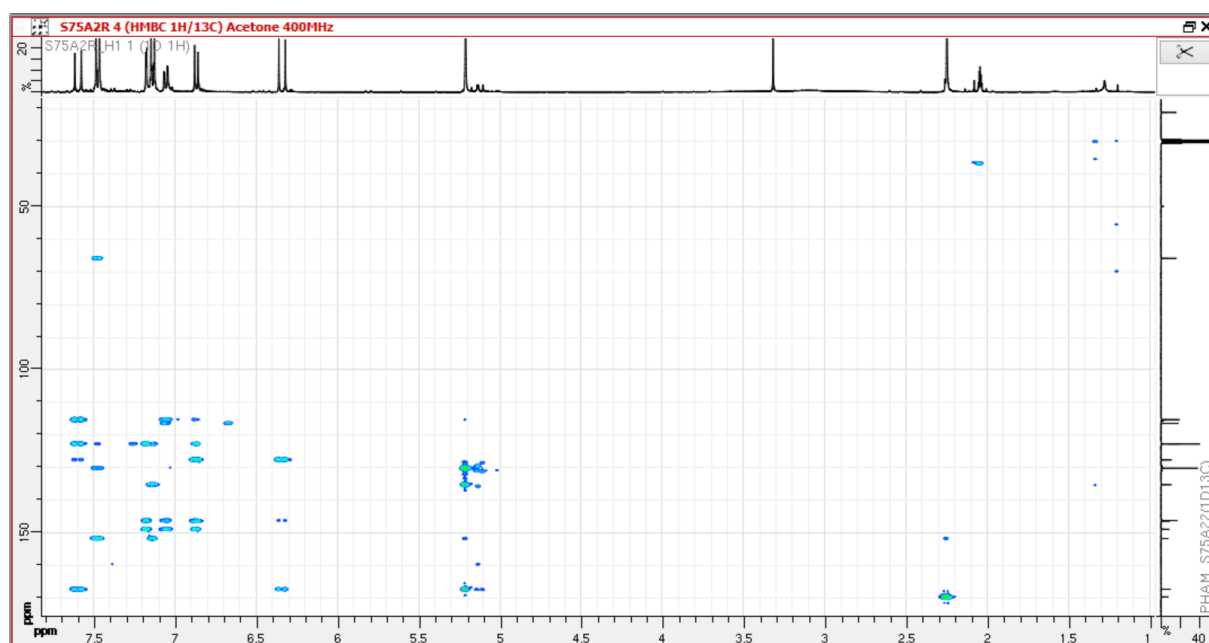
^{13}C -RMN (Acétone- d_6 , 75 MHz)



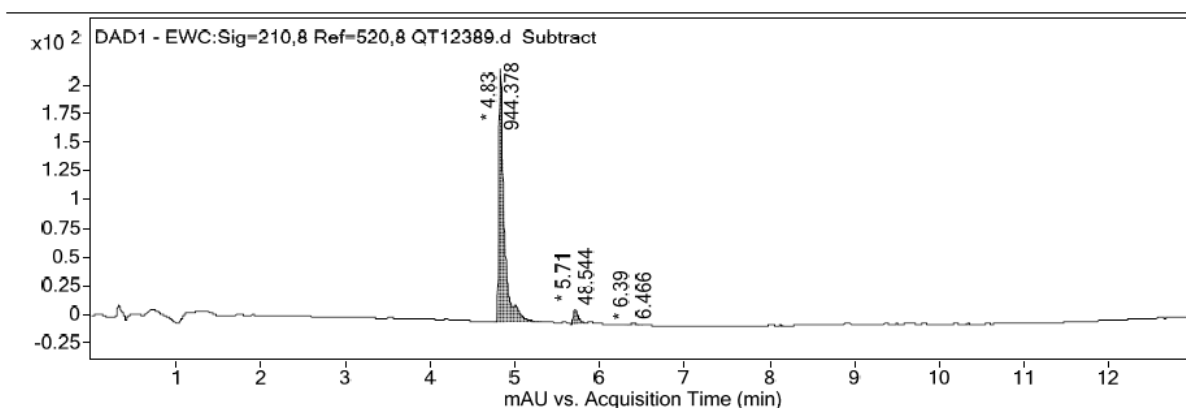
HSQC (Acétone-*d*₆, 400 MHz)



HMBC (Acétone-*d*₆, 400 MHz)



HRMS-ESI



Integration Peak List

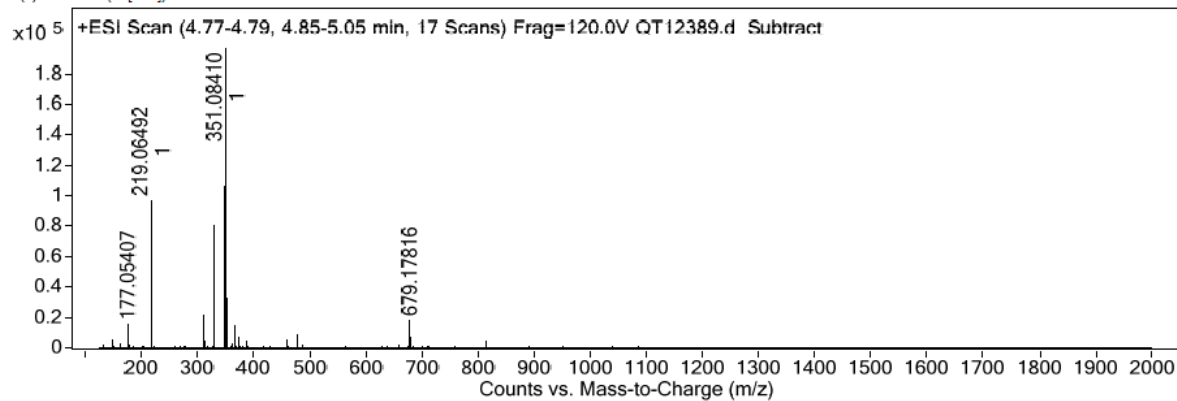
Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
4.75	4.83	5.31	220.39	944.378	100	94.5
5.66	5.71	5.85	12.57	48.544	5.14	4.86
6.3	6.39	6.51	1.21	6.466	0.68	0.65

Spectrum Source
Peak (1) in "+ BPC:1 (all [-278]) Scan"

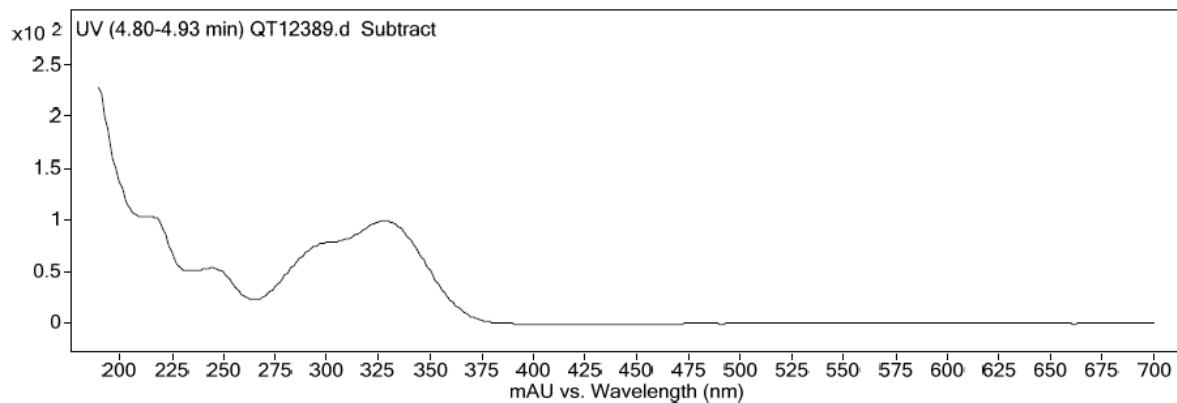
Fragmentor Voltage
120

Collision Energy
0

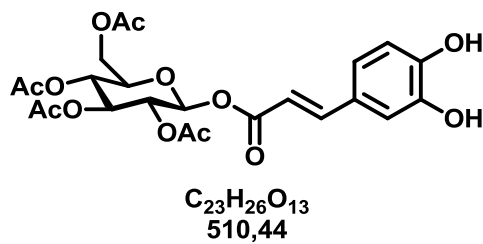
Ionization Mode
ESI



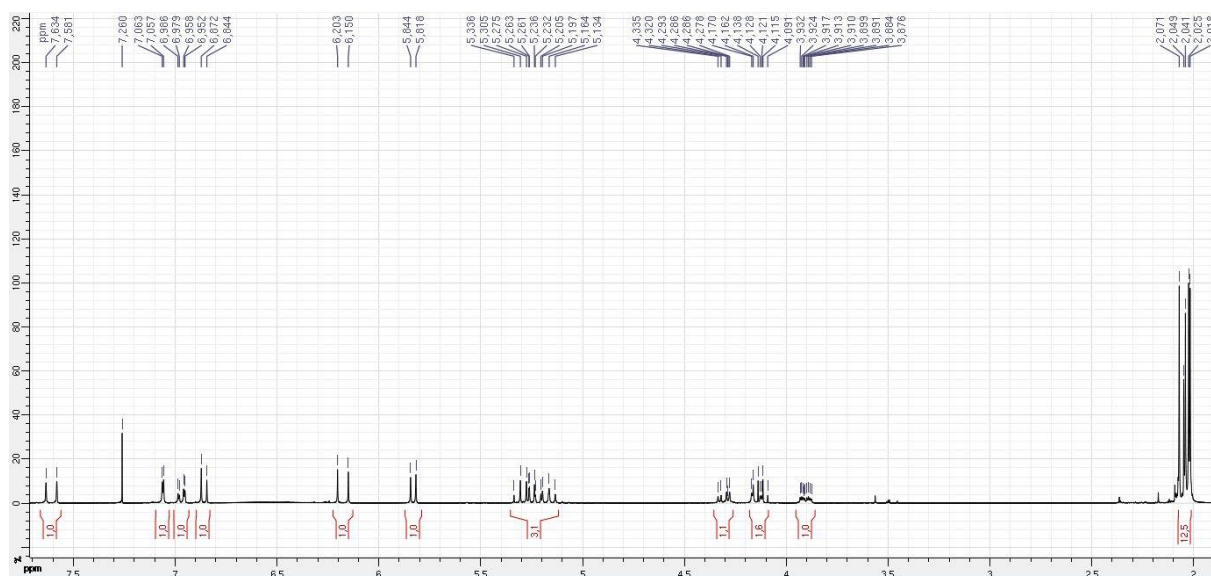
Spectrum Source
Peak (1) in "DAD1 - EWC:Sig=210,8 Ref=520,8
Sub"



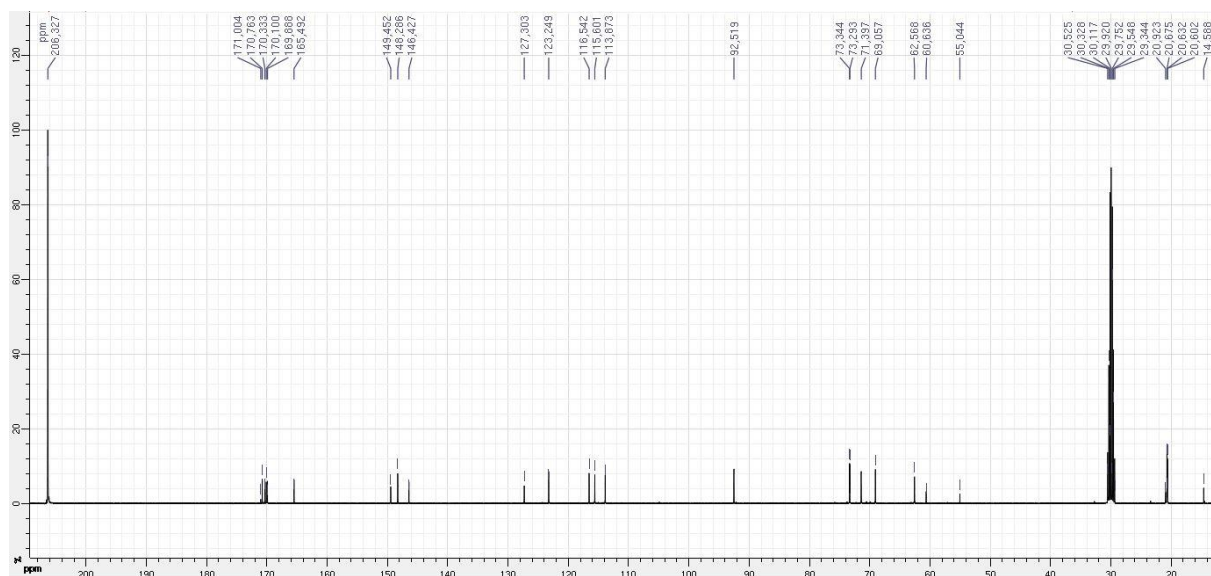
Composé (68)



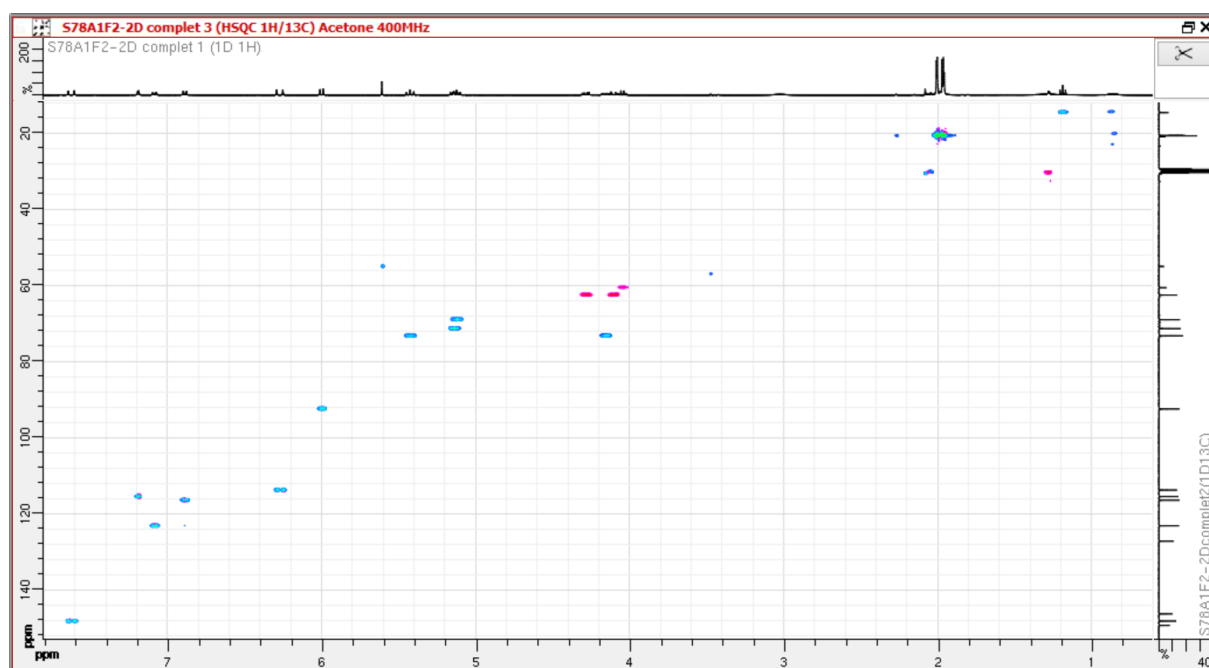
^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz)



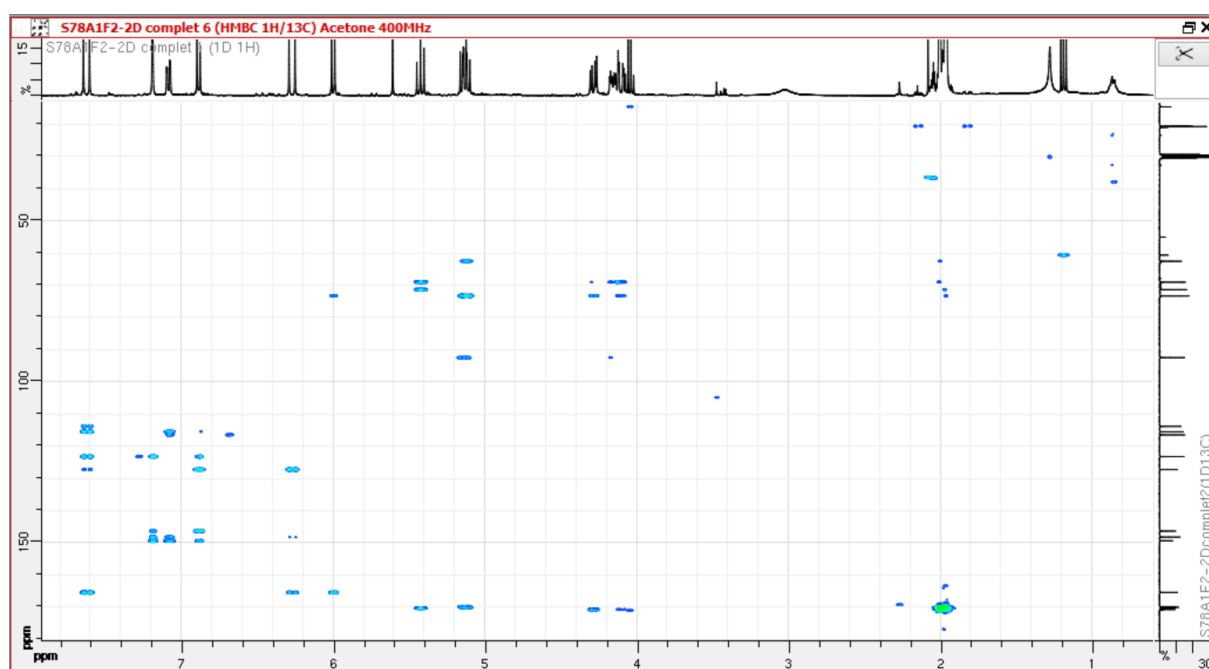
^{13}C -RMN (CDCl_3 , 400 MHz)



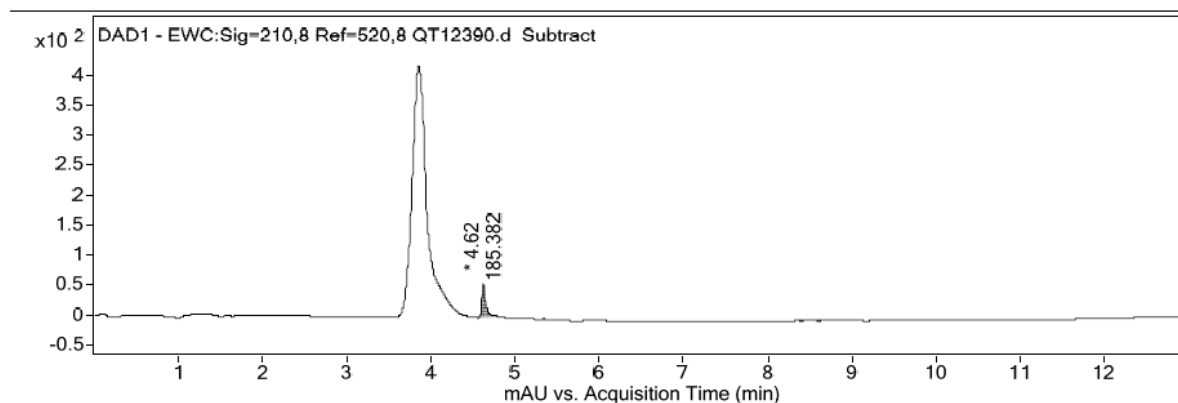
HSQC (Acétone-*d*₆, 400 MHz)



HMBC (Acétone-*d*₆, 400 MHz)



HRMS-ESI



Integration Peak List

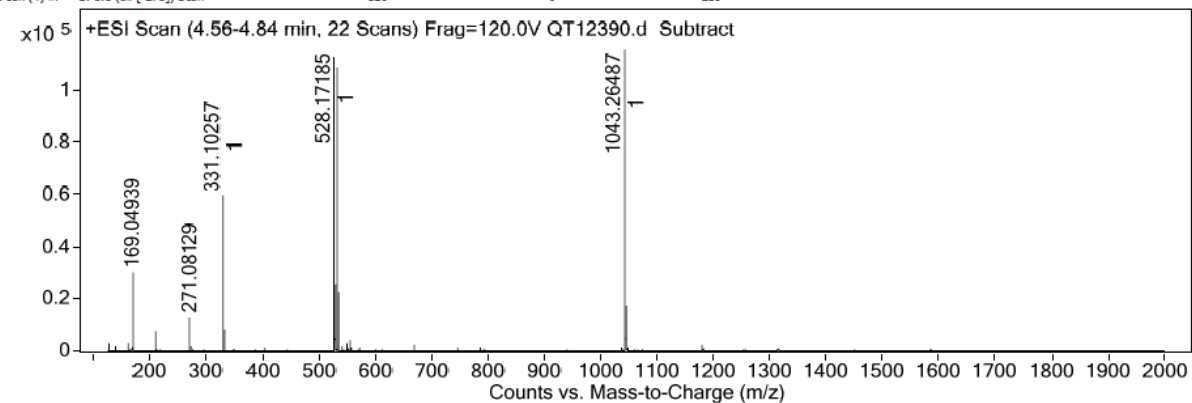
Start	RT	End	Height	Area	Area %	AreaSum%
4.56	4.62	4.83	55.22	185.382	100	100

Spectrum Source
Peak (4) in "+ BPC:1 (all [-278]) Scan"

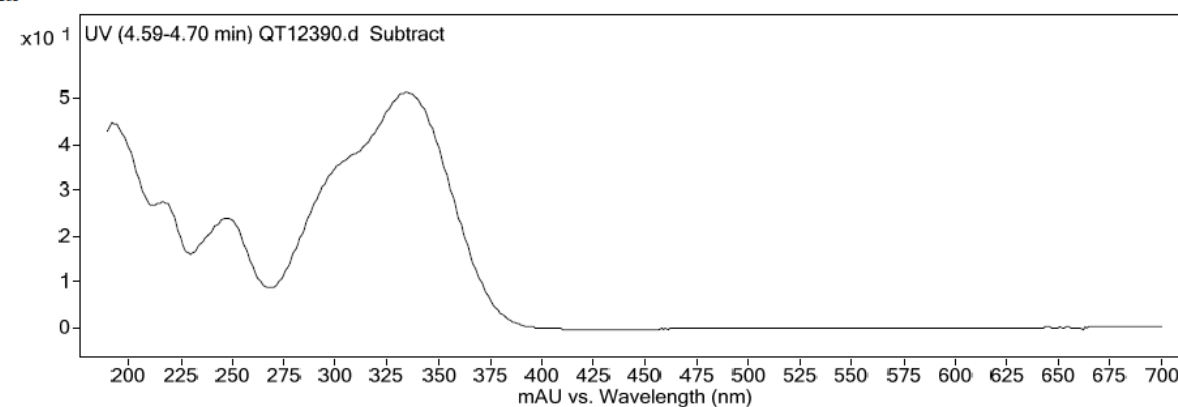
Fragmentor Voltage
120

Collision Energy
0

Ionization Mode
ESI



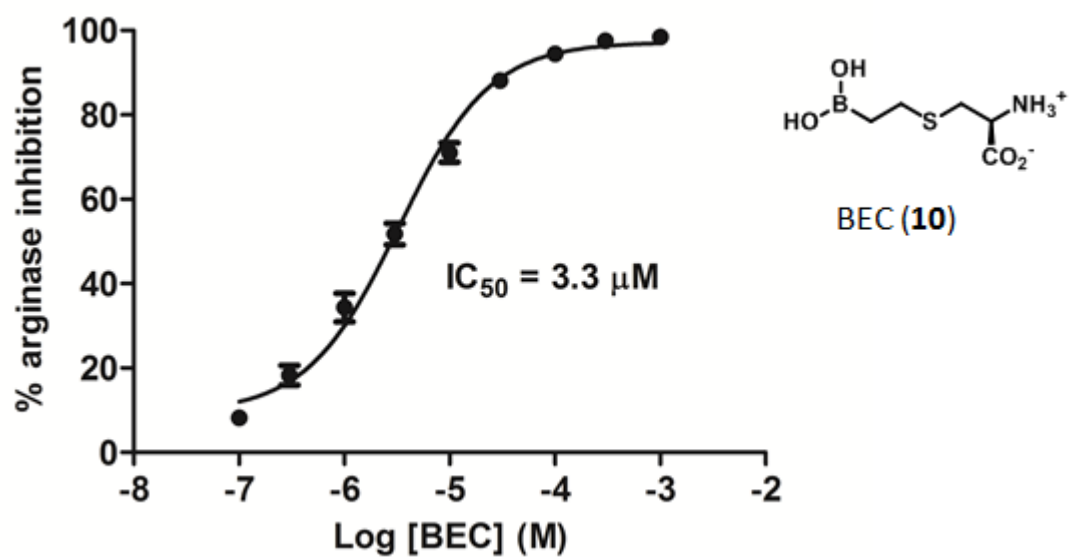
Spectrum Source
Peak (1) in "DAD1 - EWC:Sig=210,8 Ref=520,8
Sub"



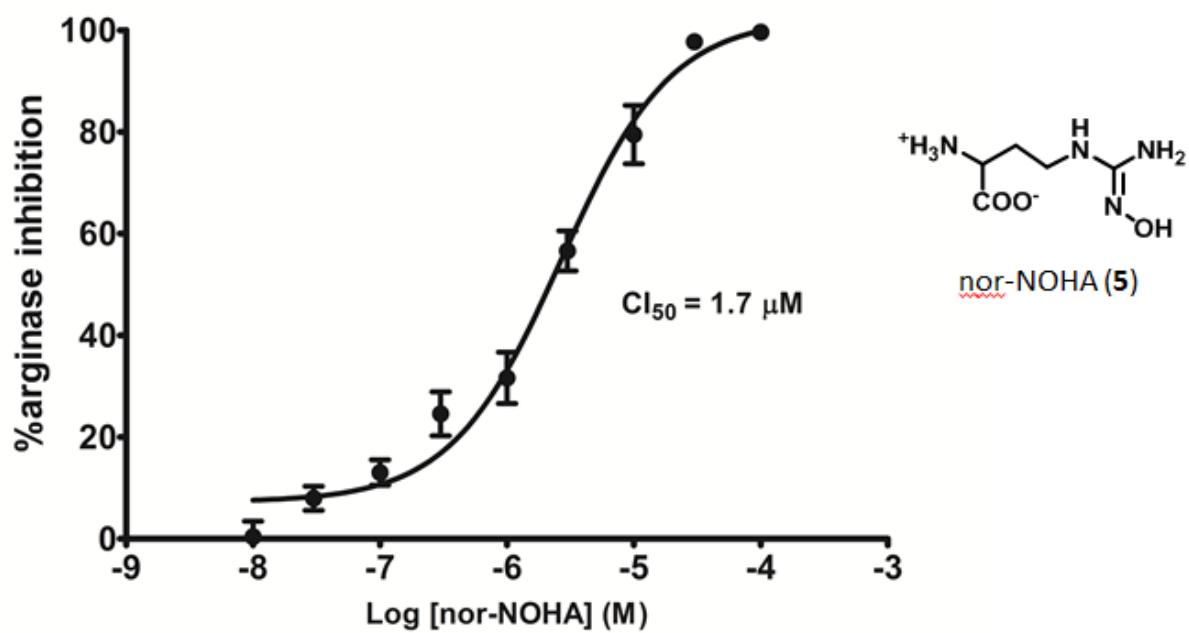
Annexe 2 : Courbes CI_{50} des composés étudiés sur b-ARG I

Inhibiteurs de référence :

BEC (10)

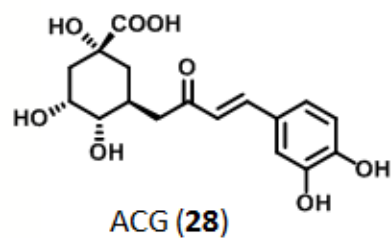
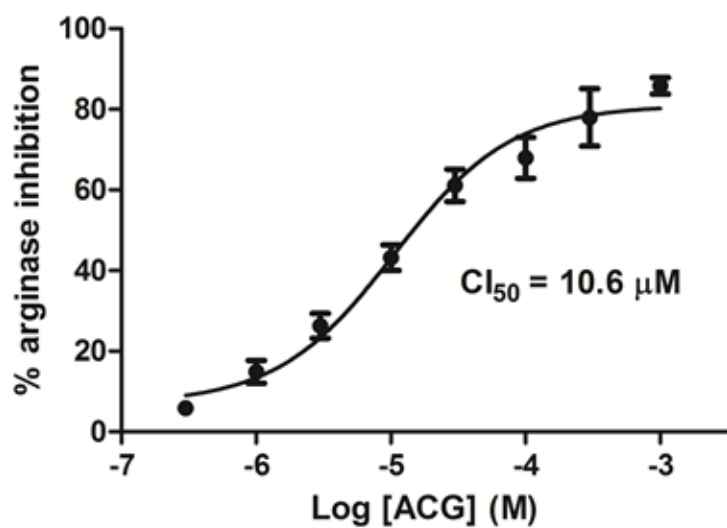


nor-NOHA (5)

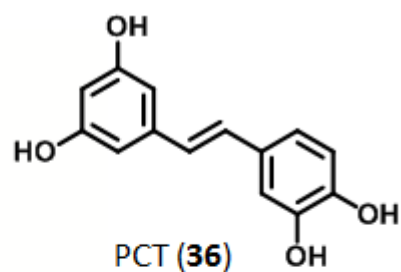
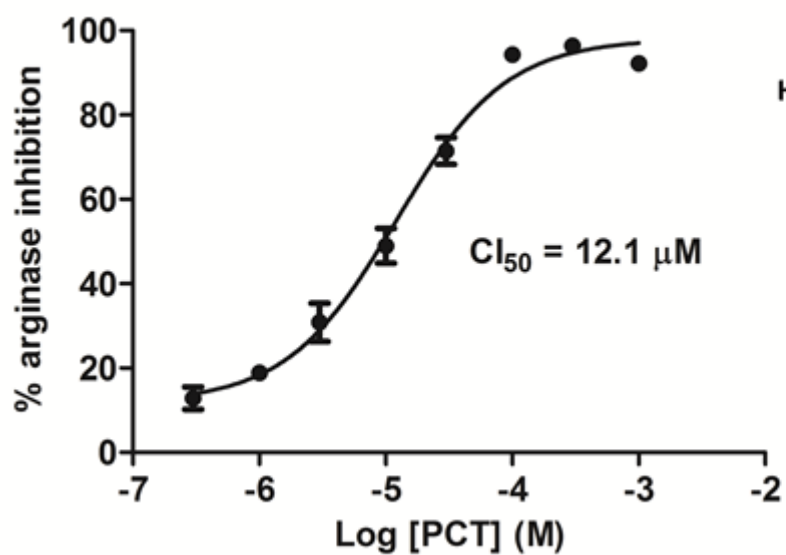


Polyphénols naturels :

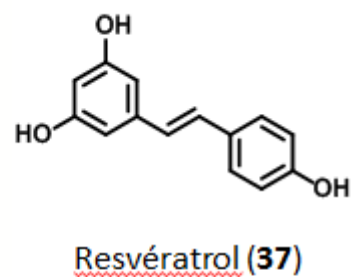
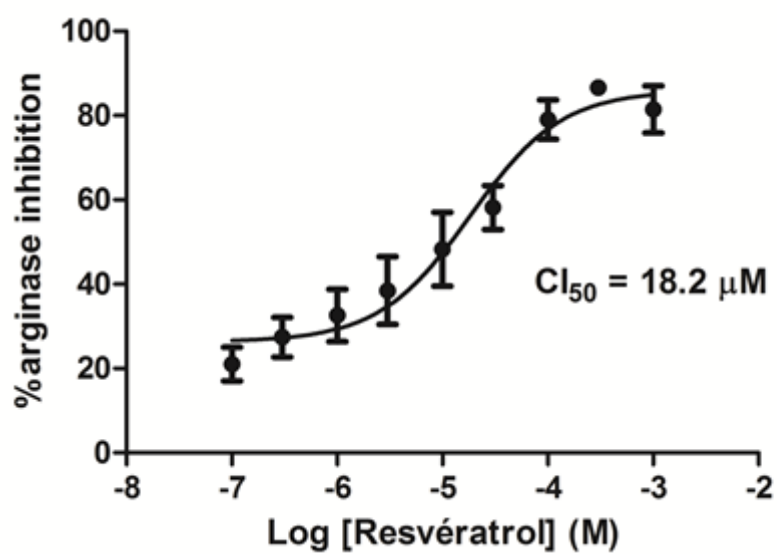
Acide chlorogénique, ACG (28)



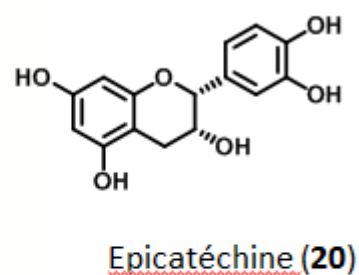
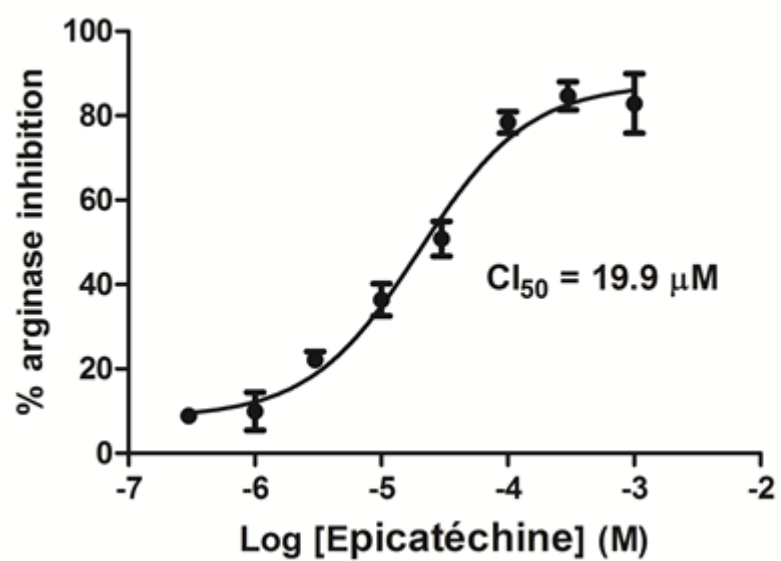
Picéatannol, PCT (36)



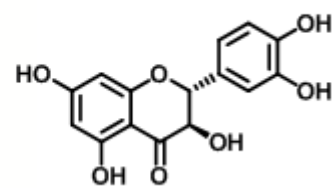
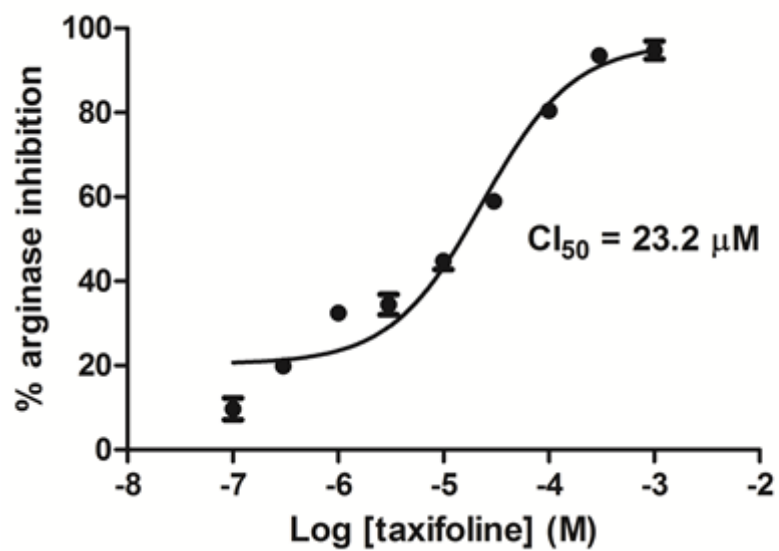
Resvératrol (37)



(-)-épicatéchine (20)

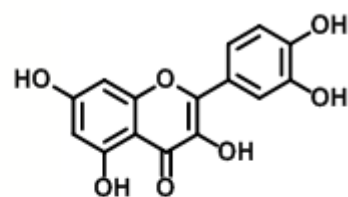
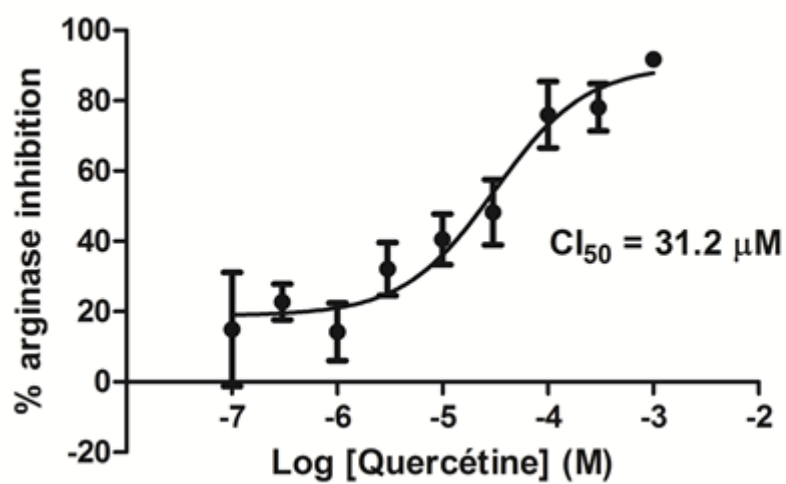


Taxifoline (38)



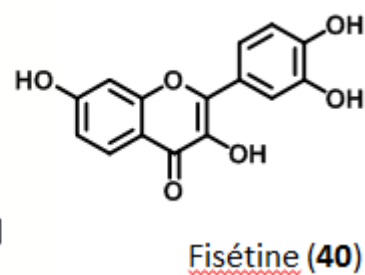
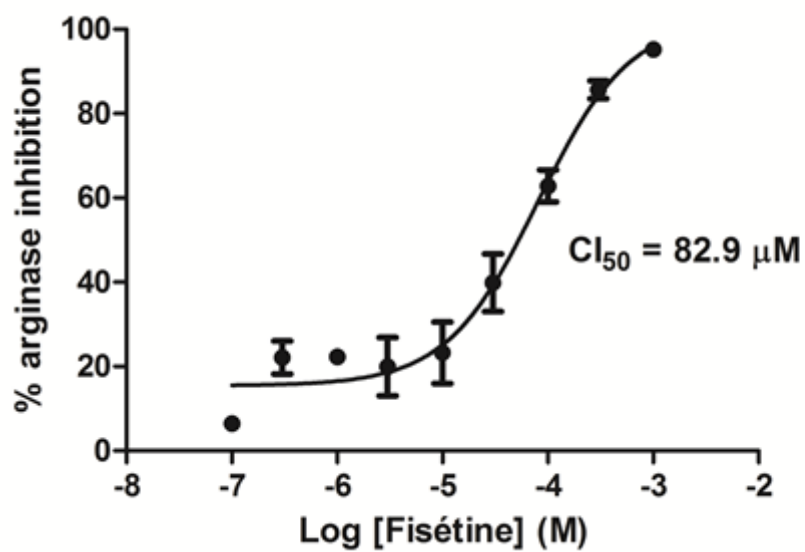
Taxifoline (38)

Quercétine (39)

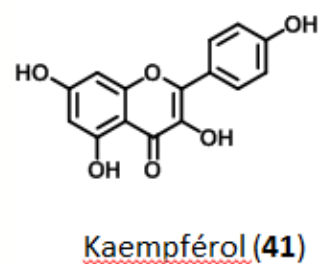
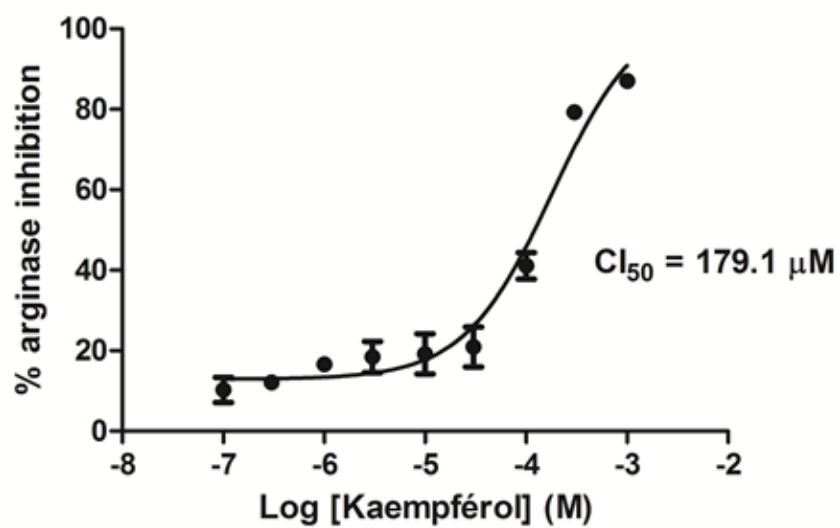


Quercétine (39)

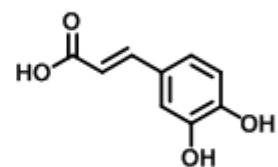
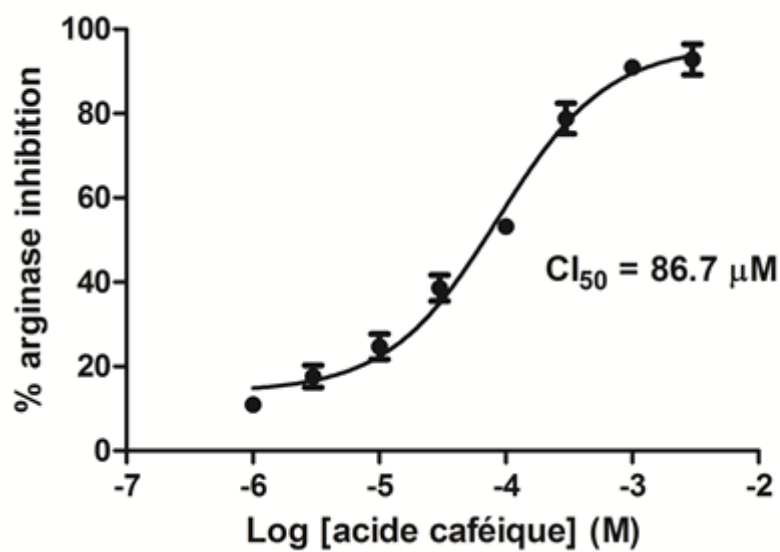
Fiséline (40)



Kaempférol (41)

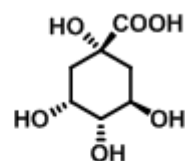
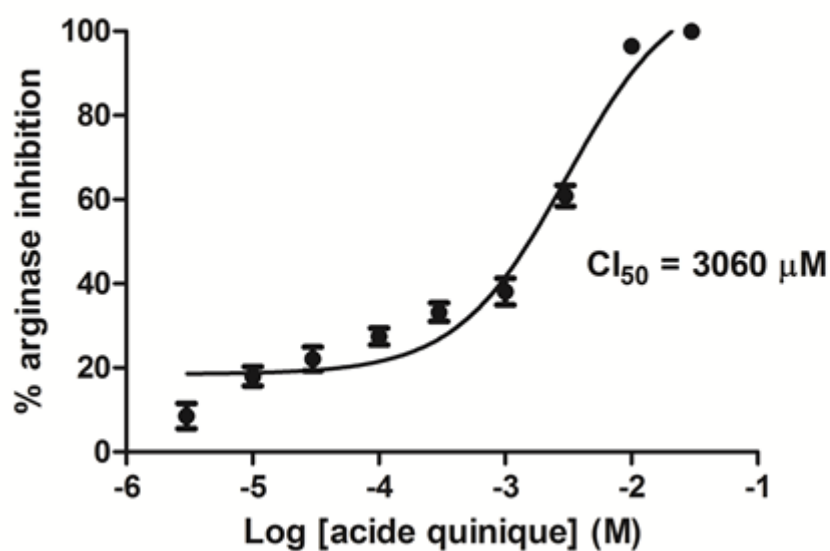


Acide caféique (42)



Acide caféique (42)

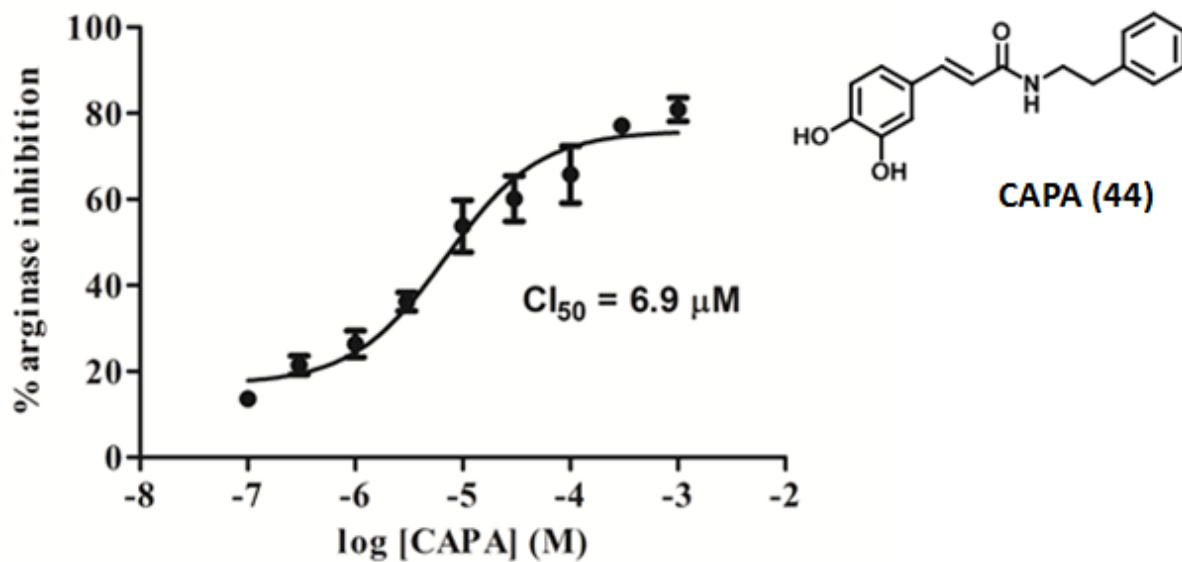
Acide quinique (43)



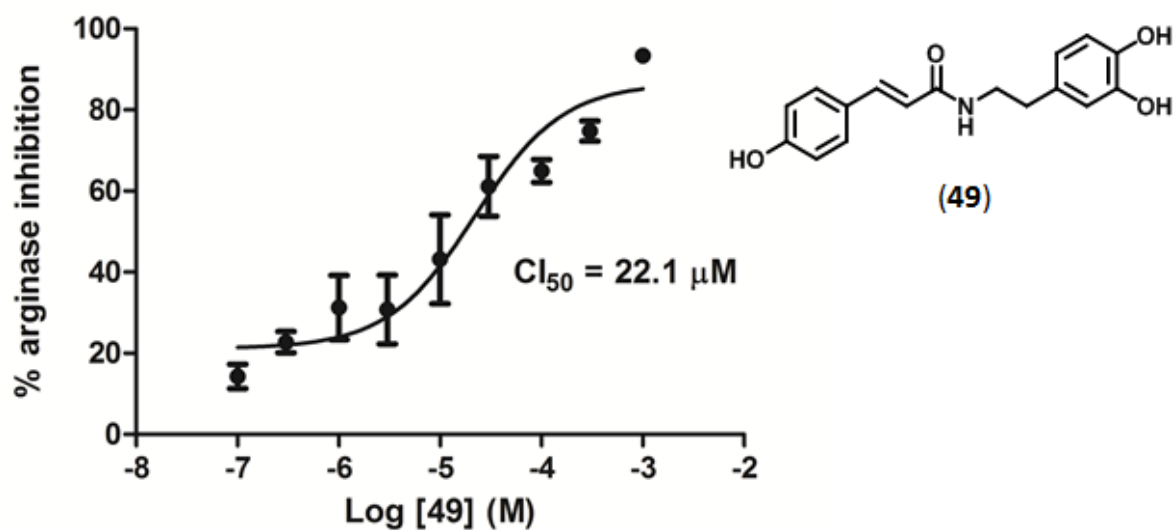
Acide quinique (43)

Dérivés d'amide de l'acide caféique :

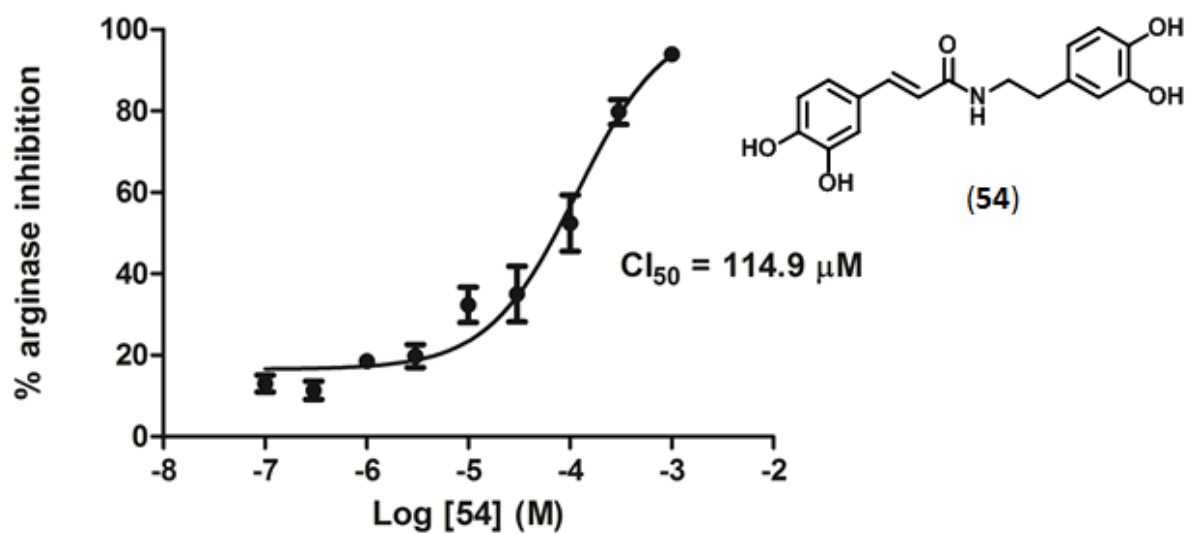
CAPA (44)



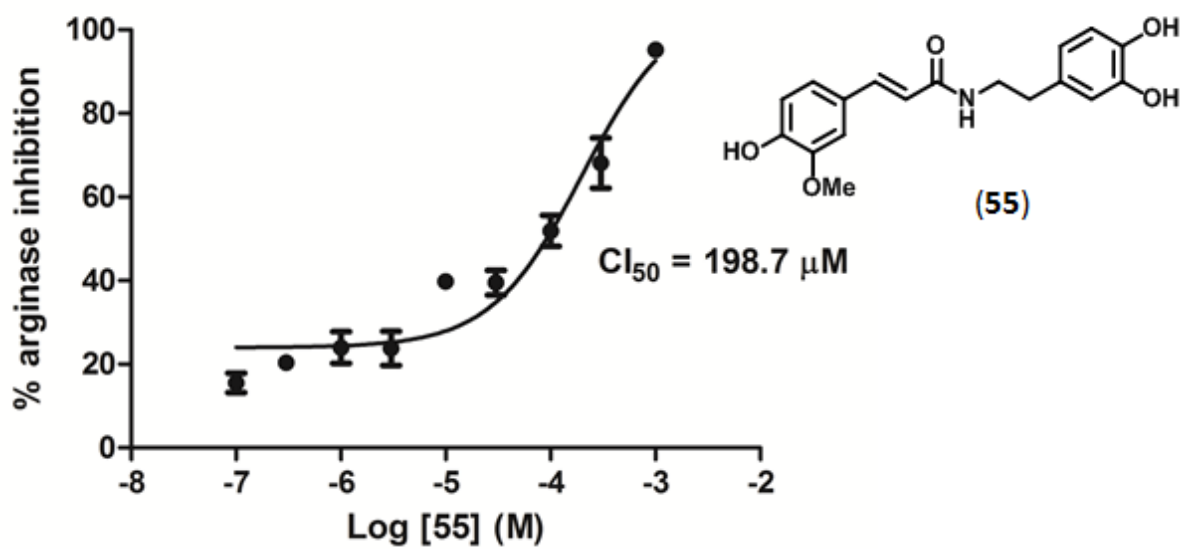
Composé (49)



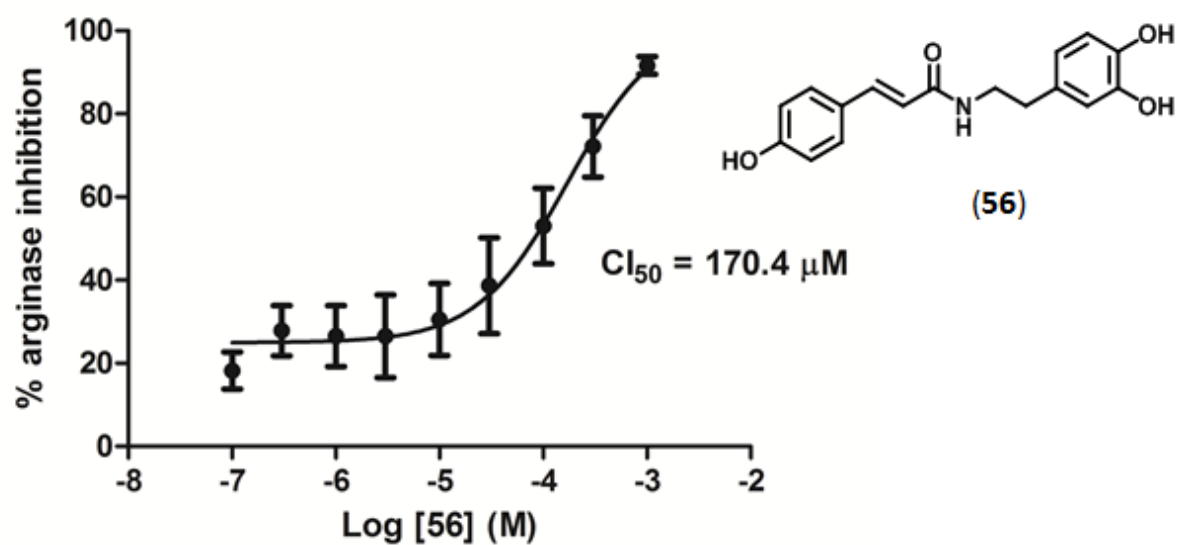
Composé (54)



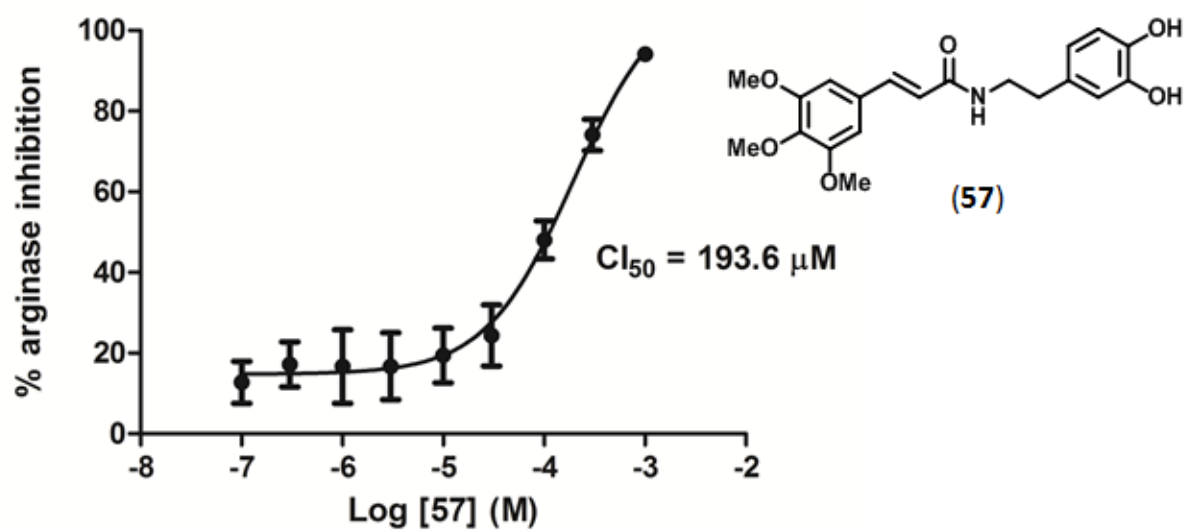
Composé (55)



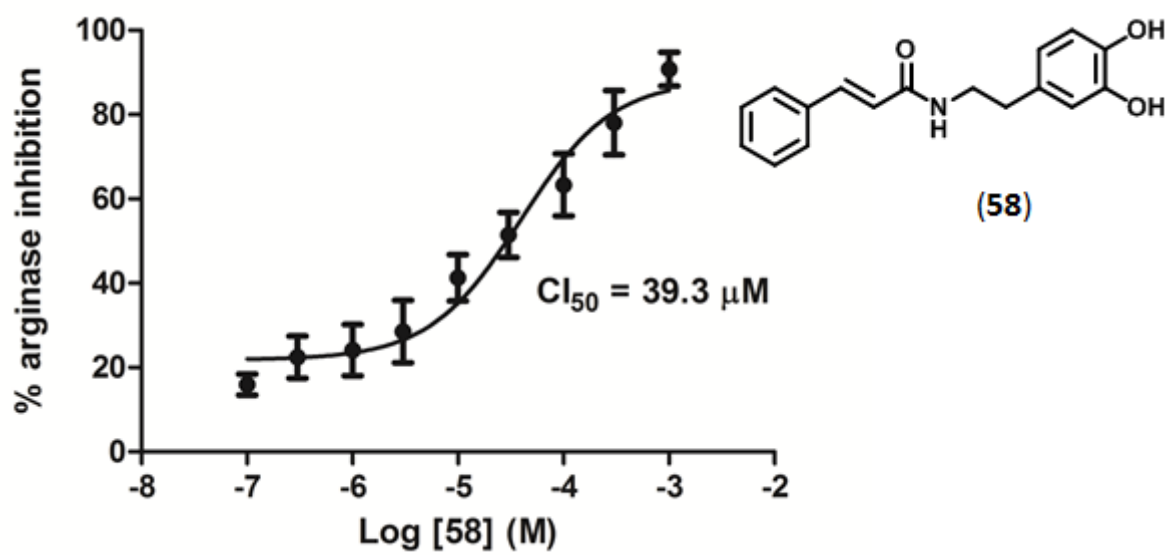
Composé (56)



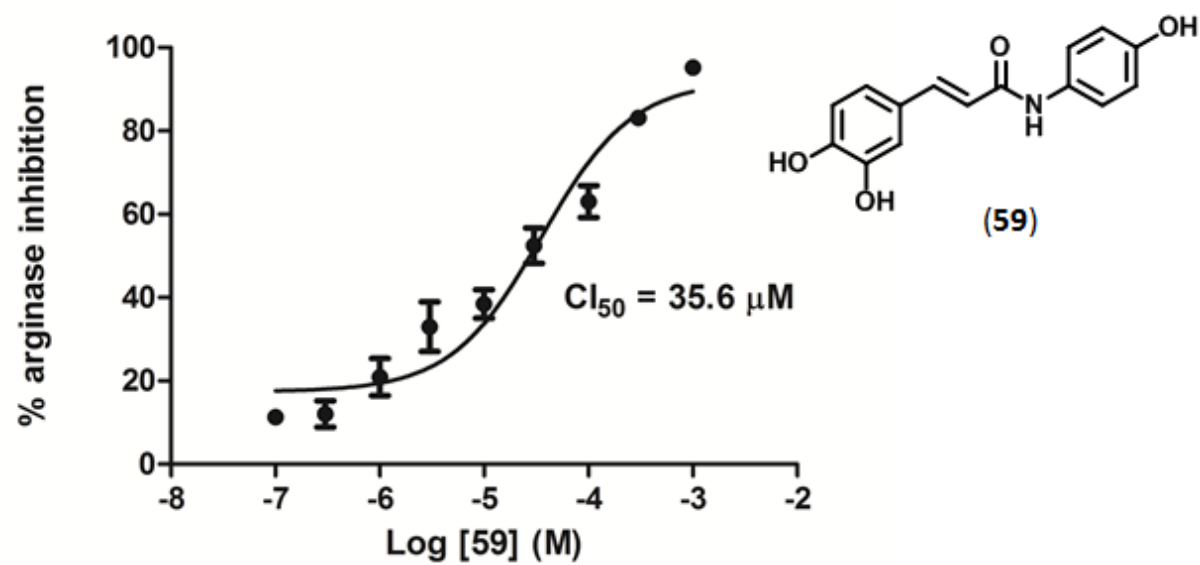
Composé (57)



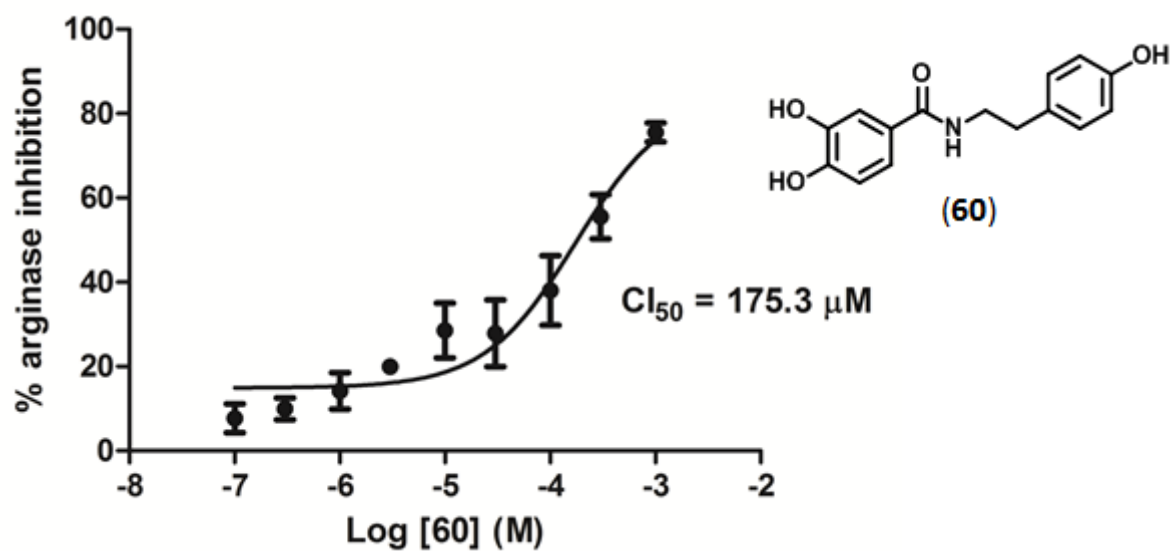
Composé (58)



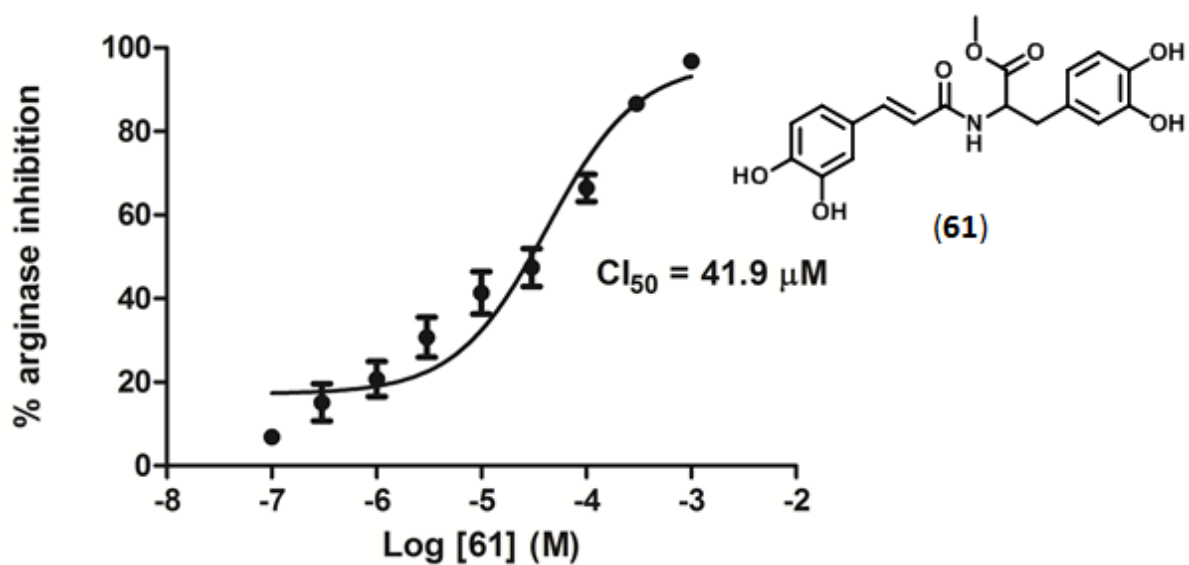
Composé (59)



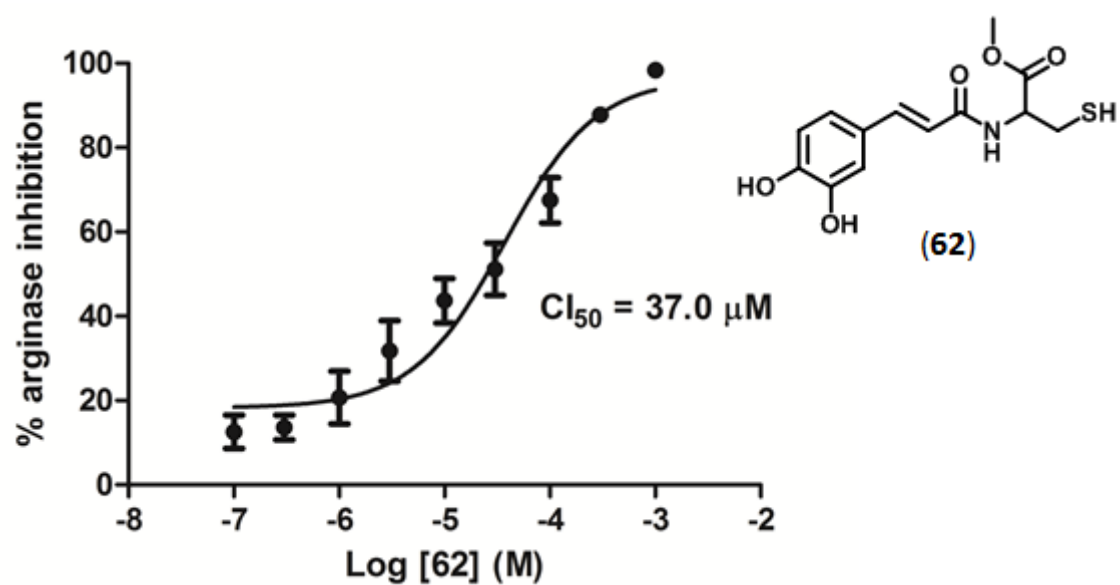
Composé (60)



Composé (61)

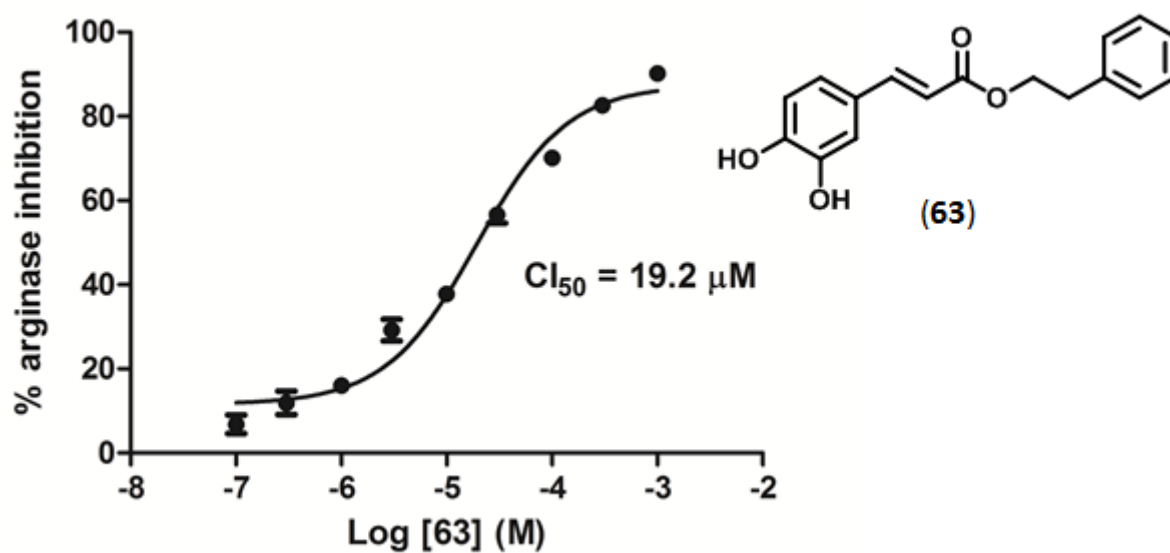


Composé (62)

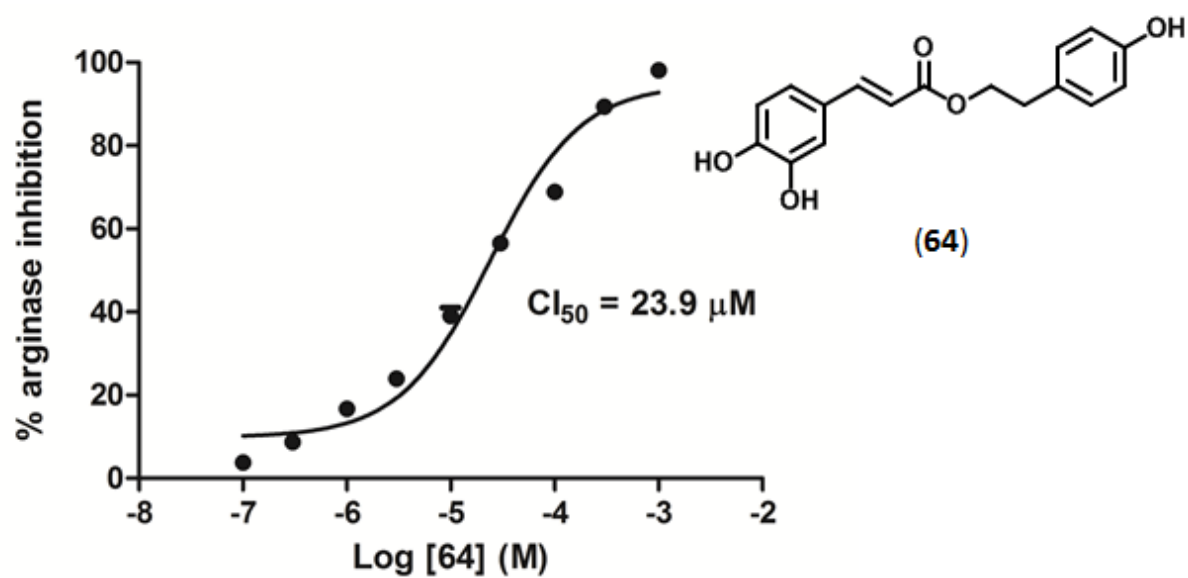


Dérivés d'ester de l'acide caféique :

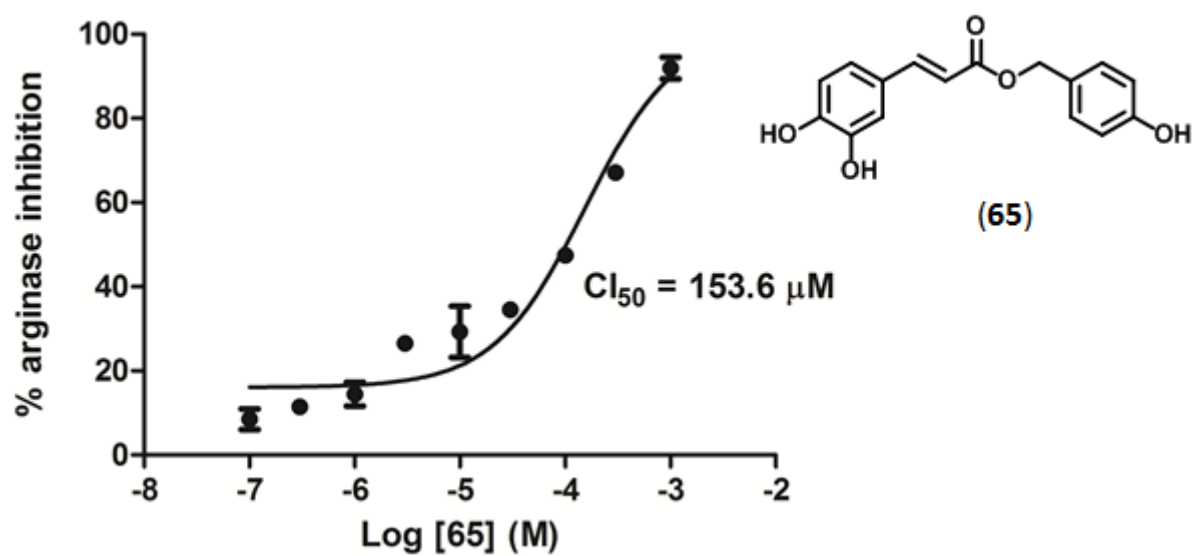
Composé (63)



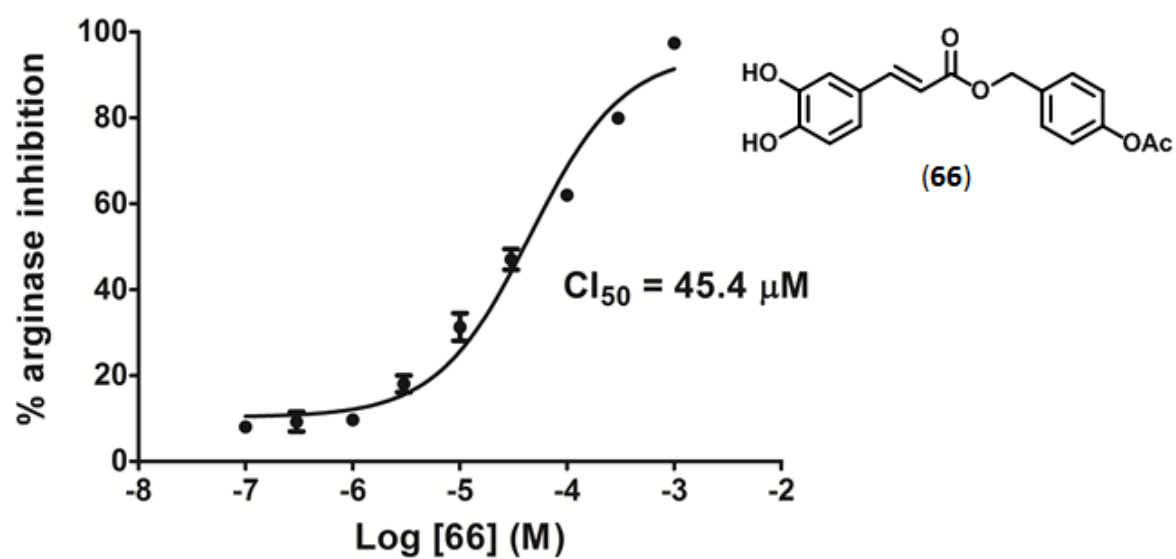
Composé (64)



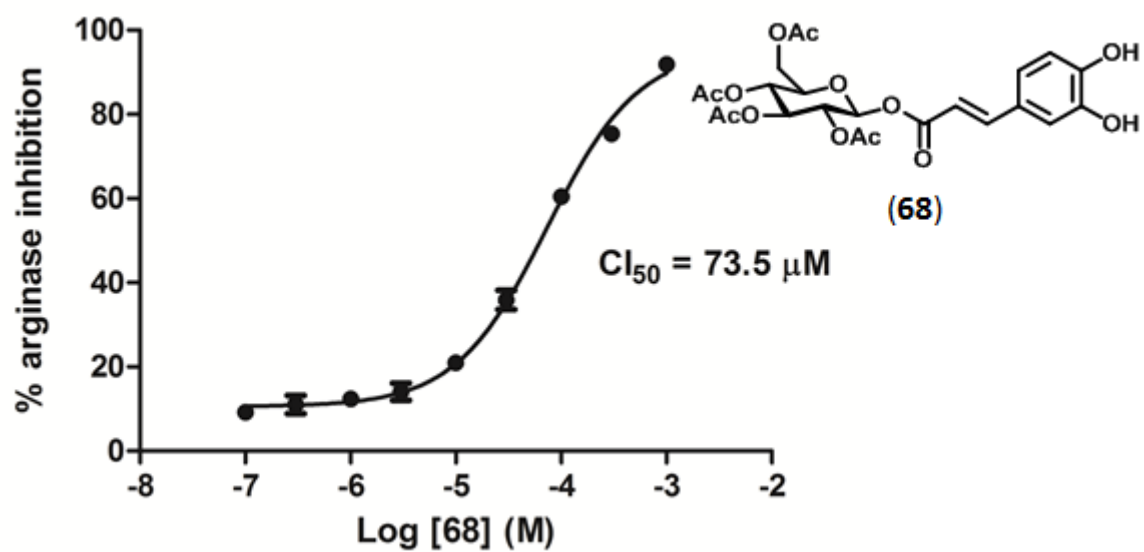
Composé (65)



Composé (66)

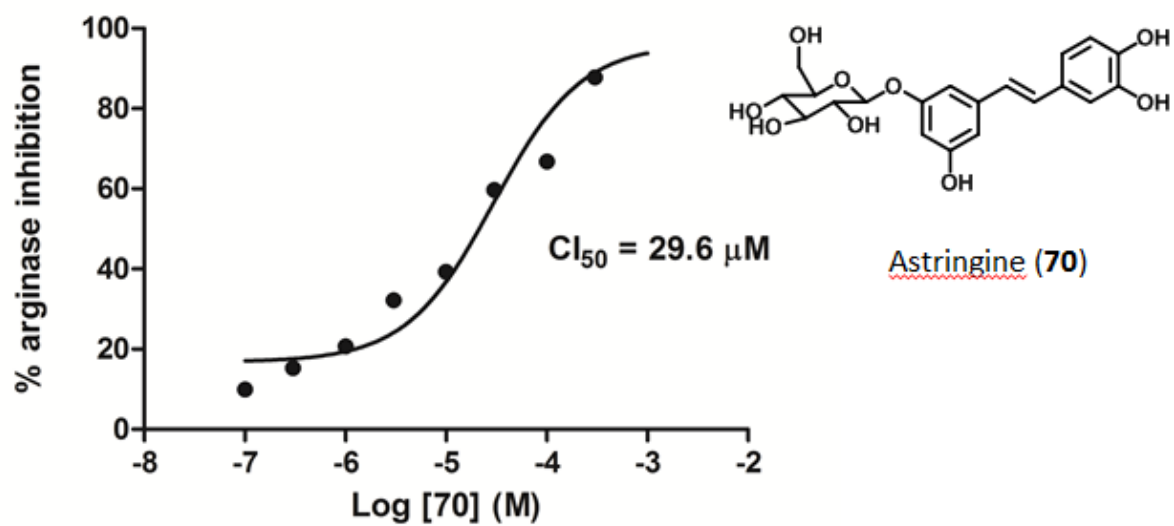


Composé (68)

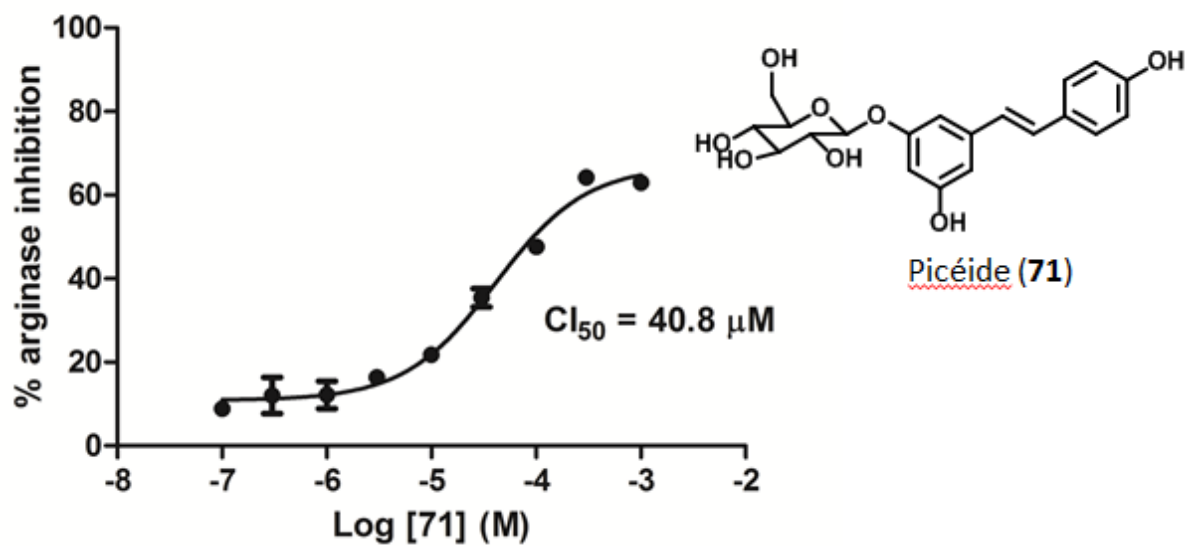


Glucosides du picéatannol :

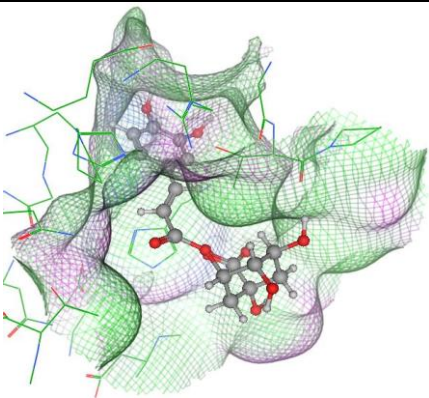
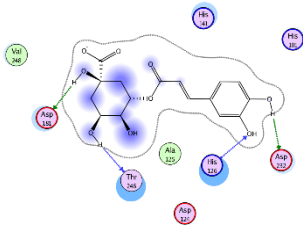
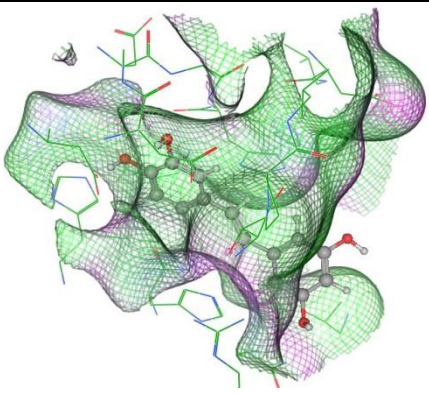
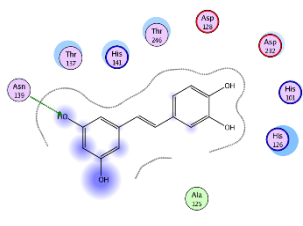
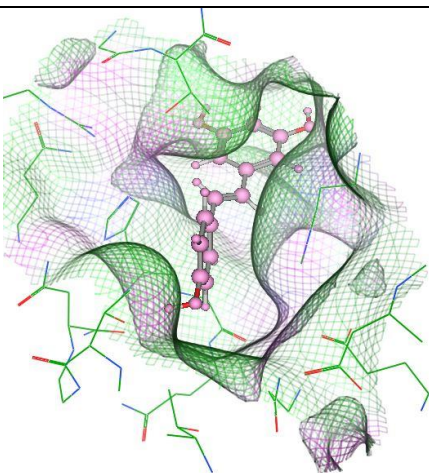
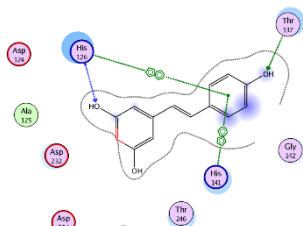
Astringine (70)

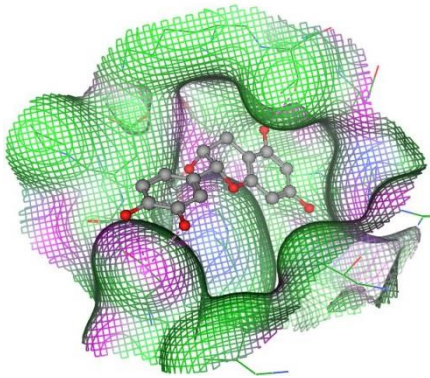
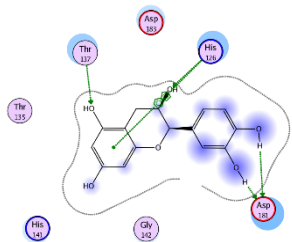
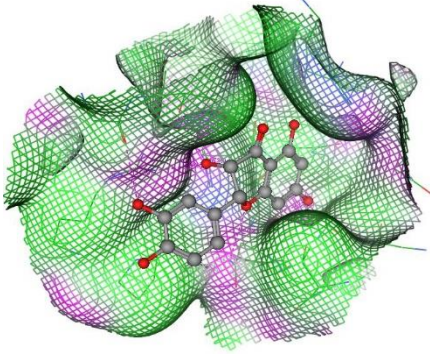
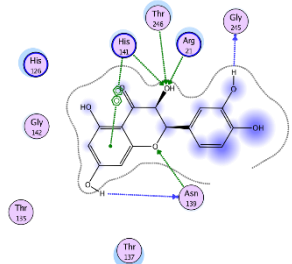
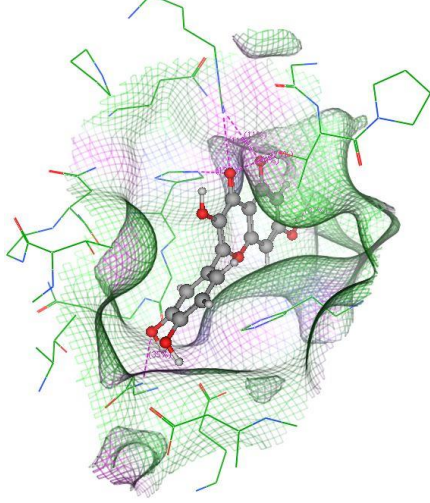
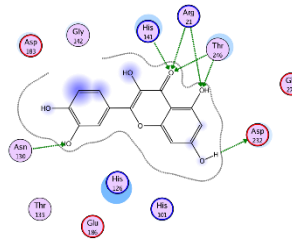
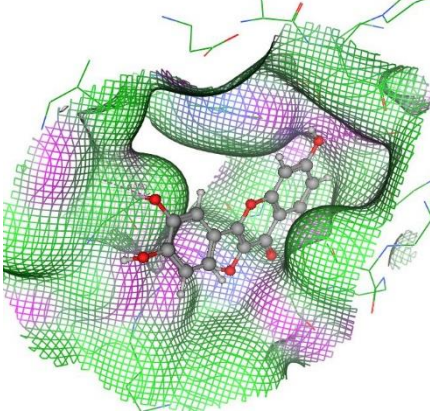
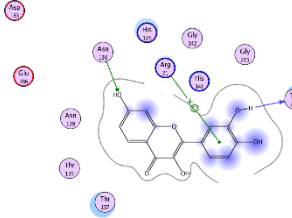


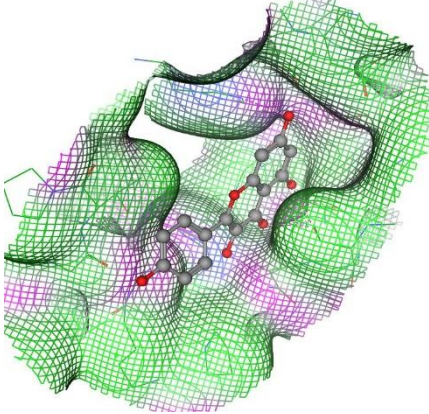
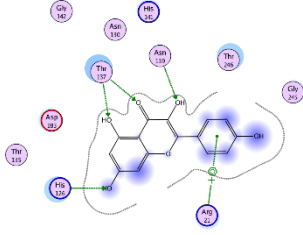
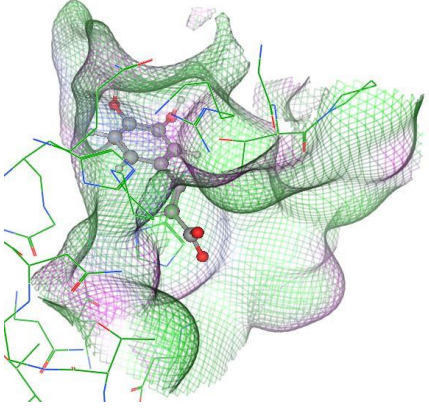
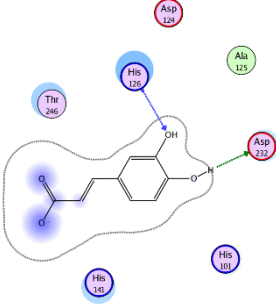
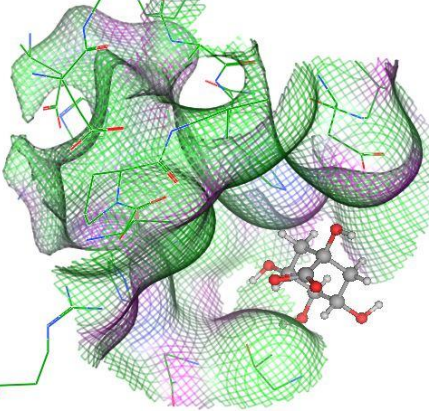
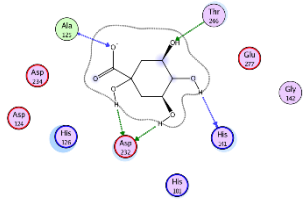
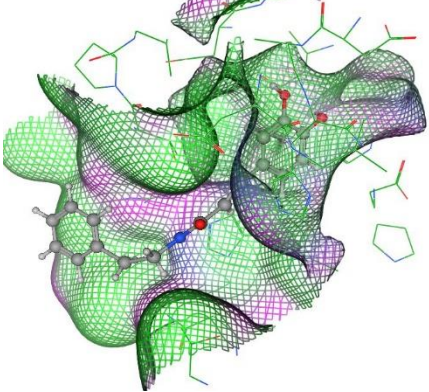
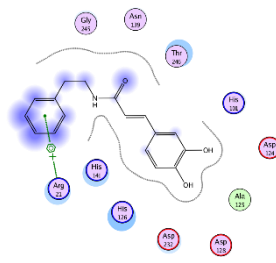
Picéide (71)

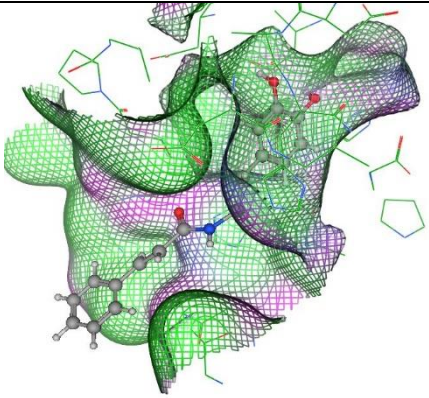
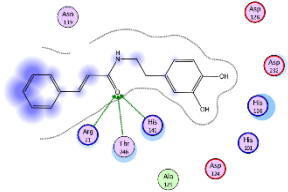
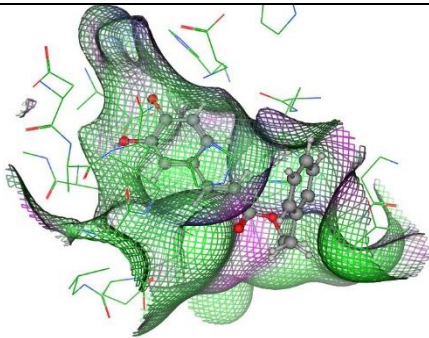
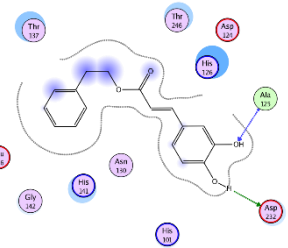
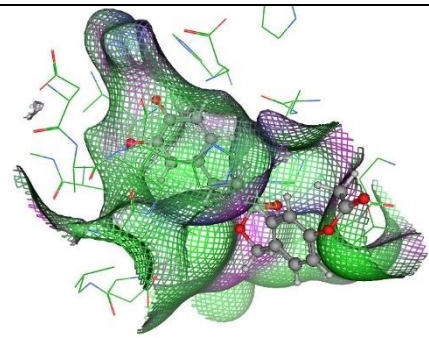
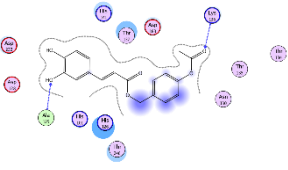


Annexe 3 : Modes de liaisons et scores de docking des molécules étudiées sur b-ARG I

Composé	Score (kJ/mol)	Mode de liason en 3D	Mode de liason en 2D
(28)	-15.6		
(36)	-21.1		
(37)	-17.8		

(20)	-14.2		
(38)	-15.2		
(39)	-17.2		
(40)	-14.8		

(41)	-17.1		
(42)	-15.9		
(43)	-8.9		
(44)	-20.3		

(58)	-20.7		
(63)	-15.4		
(66)	-21.0		

Résumé :

Recherche de nouveaux inhibiteurs d'arginase, d'origine naturelle et hémisynthétique, inspirés de l'acide chlorogénique et du picéatannol.

L'inhibition de l'arginase a été montrée pour le traitement de la dysfonction endothéliale dans plusieurs pathologies. Des inhibiteurs sont actuellement commercialisés (nor-NOHA, ABH et BEC) mais en dépit de leur potentiel, ils sont incompatibles avec un usage médical *per os*. L'obtention de nouveaux inhibiteurs reste donc un challenge pour le développement de candidats médicaments. La source naturelle et la voie hémisynthétique notamment, restent encore des axes peu explorés.

Visant d'abord le développement d'un test fiable et reproductible pour l'évaluation de la capacité inhibitrice de molécules, nous avons optimisé un test existant et mis en place un essai colorimétrique miniaturisé et partiellement automatisé, utilisant une arginase mammifère commerciale, purifiée de foie de bœuf. Ce test a été validé *via* l'utilisation d'inhibiteurs de référence (CI_{50} : nor-NOHA 1,7 μM / BEC 3,3 μM), avant d'être utilisé pour l'évaluation biologique d'une série de polyphénols naturels, mettant en évidence les potentialités inhibitrices de l'acide chlorogénique (acide caféoylquinique / CI_{50} 10,6 μM) et du picéatannol (stilbène / CI_{50} 12,1 μM). Des études de cinétique enzymatique ont montré que l'inhibition était réversible et compétitive tandis que des études de docking moléculaire ont montré l'intérêt de la partie caféique pour l'activité inhibitrice. Nous nous sommes alors focalisés sur l'obtention de dérivés d'hémisynthèse. Dix-neuf dérivés cinnamides ont été préparés ainsi qu'une série de cinq composés esters. Les études de relation structure-activité ont montré le rôle important du groupement catéchol pour l'activité de ces molécules. Le composé (*E*)-N-(2-phényléthyl)-3,4-dihydroxycinnamide ou « *caffeic acid phenyl amide* » (CAPA) a présenté la meilleure activité (CI_{50} 6,9 μM). C'est un inhibiteur réversible et compétitif de l'arginase étudiée et ses études de docking avec le site catalytique de l'enzyme ont confirmé les interactions du catéchol avec des résidus conservés du site actif et les ions manganèse. La préparation des dérivés de stilbènes cibles n'a pas été couronnée de succès mais grâce à des collaborations, deux stilbènes naturels, l'astringine et le picéide, ainsi qu'une série de stilbénoides synthétiques ont pu être évalués. Cependant, aucun de ces composés n'a révélé d'activité intéressante.

Finalement, notre projet de thèse a mis en évidence les activités prometteuses de deux composés naturels, l'acide chlorogénique et le picéatannol, ainsi que celle d'un composé hémisynthétique dérivé cinnamide de l'acide caféique (CAPA). Ces molécules ont en commun, au niveau structural, la présence d'une partie 3,4-dihydroxycinnamique (caféoyle), révélant l'intérêt de ce motif pour la conception d'autres molécules à capacité inhibitrice d'arginase. Ces résultats obtenus *in silico* et *in vitro* sur l'arginase bovine b-ARG I devront être confirmés sur l'arginase humaine h-ARG avant d'envisager d'éventuelles études *in vivo* pour ces candidats-médicaments potentiels.

Mots-clés : inhibiteur d'arginase, *test in vitro*, modélisation moléculaire, criblage, substances naturelles.

Abstract:

Research of novel arginase inhibitors from natural and semisynthetic origins, inspired by chlorogenic acid and piceatannol.

Inhibition of the enzyme arginase has been shown its evidences for the treatment of endothelial dysfunction in several pathologies. Some arginase inhibitors are currently being marketed (nor-NOHA, ABH and BEC) but despite their potency, they are incompatible with an oral administration. Research of new arginase inhibitors remains a challenge for the development of drug candidates. Natural source and semisynthetic compounds, in particular, still remain widely unexplored avenues.

Firstly focusing on development of a reliable and reproducible *in vitro* assay for evaluation of arginase inhibitory capacity of molecules, we optimized a previously published protocol, which resulted in a colorimetric, miniaturized and partially automated assay by using a commercial mammalian arginase, purified bovine liver arginase (b-ARG I). This test was validated by evaluating the reference inhibitors (IC₅₀: nor-NOHA 1.7 μ M / BEC 3.3 μ M). Then we used it for the biological evaluation of a series of natural polyphenols. The most active compounds were chlorogenic acid (caffeoylquinic acid / IC₅₀ 10.6 μ M) and piceatannol (stilbene / IC₅₀ 12.1 μ M). Enzyme kinetic studies showed that the inhibition mechanism of these two polyphenols was reversible and competitive, whereas molecular docking studies demonstrated the importance of caffeic moiety for the inhibitory activity. We then continued on synthesis and biological evaluation of semisynthetic derivatives, which were inspired by natural arginase inhibitors. Nineteen cinnamide derivatives and a series of five ester compounds were prepared. Structure-activity relationships (SARs) have shown the important role of catechol group for arginase inhibitory activity of these molecules. The compound (*E*)-N-(2-phenylethyl)-3,4-dihydroxycinnamide or "*caffeic acid phenyl amide*" (CAPA) showed the best activity (IC₅₀ 6.9 μ M). This compound was characterized as a reversible and competitive inhibitor of arginase by enzyme kinetics. Docking studies suggested several interactions between catechol function of CAPA with crucial residues of the arginase active site and manganese ions. The preparation of stilbene derivatives was not successful during this work. However thanks to collaborations, two natural stilbenoid glucosides (astringin and piceid), as well as a series of synthetic stilbenoid derivatives were evaluated for their arginase inhibition. Nevertheless, none of these stilbenoids has revealed an interesting activity.

Finally, our thesis project showed potential arginase inhibitory activity of two natural compounds, chlorogenic acid and piceatannol, as well as a semisynthetic cinnamide derivative (CAPA). Considering their structures, these molecules have the presence of 3,4-dihydroxycinnamoyl (caffeoyl) moiety in common, revealing the importance of this moiety for the design of new arginase inhibitors. The results obtained from *in silico* and *in vitro* studies on bovine arginase (b-ARG I) should be confirmed on human arginase assay, before being evaluated in *in vivo* models for the druggable candidates.

Keywords: arginase inhibitor, *in vitro* assay, docking, screening, drug design, natural substances.