



HAL
open science

De nouveaux inhibiteurs de l'enzyme IspD comme solution contre *Bacillus anthracis*

Barbara Laborie

► **To cite this version:**

Barbara Laborie. De nouveaux inhibiteurs de l'enzyme IspD comme solution contre *Bacillus anthracis*. Chimie organique. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAF047 . tel-04264627

HAL Id: tel-04264627

<https://theses.hal.science/tel-04264627>

Submitted on 30 Oct 2023

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut de Chimie de Strasbourg - UMR 7177

THÈSE

présentée par :

Barbara LABORIE

soutenue le : **26 octobre 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie Bio-Organique

**De nouveaux inhibiteurs de l'enzyme
IspD comme solution contre *Bacillus
anthracis***

THÈSE dirigée par :

Dr Myriam SEEMANN

Directeur de recherche, CNRS

RAPPORTEURS :

Pr Jean-Bernard BEHR

Professeur, Université de Reims Champagne Ardenne

Dr Martine PUGNIERE

Chargée de recherche Inserm, Institut de Recherche en
Cancérologie de Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr Philippe CHAIGNON

Maître de conférences, Université de Strasbourg

Table des matières

Liste des figures	vi
Liste des tableaux	xii
Liste des schémas.....	xiv
Abréviations.....	xv
Remerciements	xvii
Résumé	xix
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 <i>BACILLUS ANTHRACIS</i>	1
1.1.1 <i>Origine et virulence</i>	1
1.1.2 <i>L'anthrax comme arme biologique</i>	3
1.1.3 <i>Traitement et résistance</i>	3
1.1.3.1 <i>Vaccination avant et après exposition</i>	3
1.1.3.2 <i>Les antibiotiques et l'antibiorésistance</i>	4
1.1.3.3 <i>Les antibiotiques utilisés contre Bacillus anthracis</i>	5
1.2 <i>LA SYNTHÈSE DES ISOPRÉNOÏDES</i>	7
1.3 <i>LA VOIE DU MÉVALONATE (MVA)</i>	9
1.4 <i>LA VOIE DU MÉTHYLÉRYTHRITOL PHOSPHATE (MEP)</i>	11
1.4.1 <i>La 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase : DXS</i>	15
1.4.2 <i>La 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate réductoisomérase : IspC</i>	19
1.4.3 <i>La 4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol synthase : IspD</i>	22
1.4.4 <i>La 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol-2-phosphate kinase : IspE</i>	23
1.4.5 <i>La 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase : IspF</i>	26
1.4.6 <i>IspDF enzyme bifonctionnelle</i>	28
1.4.7 <i>La (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate synthase : IspG</i>	29
1.4.8 <i>La 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate réductase : IspH</i>	32
1.5 <i>LES INHIBITEURS DE ISPD</i>	35
1.6 <i>L'APPROCHE PAR FRAGMENT</i>	39
1.6.1 <i>Recherche de nouveaux médicaments et criblage à haut débit</i>	40
1.6.2 <i>Le principe de l'approche par fragment</i>	41
1.6.2.1 <i>Librairie de fragments</i>	42

1.6.2.2	Criblage et identification des touches	45
1.6.2.3	Les différents types d'optimisations de fragments	52
1.6.2.4	Optimisation : des fragments au médicament	53
2.	LE CRIBLAGE DE FRAGMENTS EN UTILISANT LA RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE	58
2.1	LA RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (SPR)	58
2.1.1	<i>Découverte et applications de la SPR</i>	58
2.1.2	<i>Un peu de sciences physiques</i>	59
2.1.2.1	Les plasmons de surface	59
2.1.2.2	Conditions d'excitation des plasmons de surface à une interface plane métal-diélectrique	61
2.1.2.3	La réflexion totale interne	64
2.1.3	<i>Instrument, mesure et modélisation</i>	65
2.1.3.1	Le biocapteur	65
2.1.3.2	La surface du biocapteur	67
2.1.3.3	Le système microfluidique	68
2.1.4	<i>Mise en œuvre d'une expérience et analyse des données</i>	68
2.1.4.1	Immobilisation du ligand sur la surface d'or	68
2.1.4.2	Le sensorgramme	69
2.1.4.3	La surface de référence	71
2.1.4.4	Modélisation des interactions	71
2.2	UTILISATION DE LA SPR POUR LE CRIBLAGE DE FRAGMENT	76
2.2.1	<i>Production et purification de l'enzyme Ba-IspD</i>	76
2.2.2	<i>Le Biacore T200</i>	77
2.2.3	<i>Développement de la méthode pour détecter les interactions avec Ba-IspD par SPR</i>	77
2.2.3.1	La stratégie d'immobilisation des biomolécules	78
2.2.3.2	La courbe de correction du DMSO	81
2.2.4	<i>Validation de la méthode SPR en utilisant un substrat de l'enzyme IspD</i>	83
2.2.5	<i>Criblage par SPR de la librairie de fragments</i>	87
2.2.6	<i>Sélection des fragments à retenir et détermination des K_D</i>	94
2.2.6.1	Détermination des meilleurs fragments	94
2.2.6.2	La détermination des K_D	99

2.2.7	<i>L'efficacité du ligand (LE)</i>	112
2.2.8	<i>L'efficacité de liaison (BE)</i>	113
2.3	CONCLUSION	119
2.4	PARTIE EXPÉRIMENTALE	120
2.4.1	<i>Production de l'enzyme Ba-IspD</i>	120
2.4.2	<i>Purification de Ba-IspD sur une colonne Ni-NTA</i>	120
2.4.3	<i>Criblage</i>	121
2.4.3.1	Les différents tampons	121
2.4.3.2	Immobilisation	122
2.4.3.3	Expérience avec le CTP	123
2.4.3.4	Solutions de DMSO	123
2.4.3.5	Criblage des fragments	124
2.4.3.6	Mesure des réponses en variant la concentration des fragments.....	124
3.	ÉTUDES COMPLÉMENTAIRES DE L'INTERACTION DES FRAGMENTS AVEC BA-ISP D ET DÉTERMINATION DE LEUR POUVOIR D'INHIBITION.....	125
3.1	SPECTROSCOPIE DE DIFFÉRENCE DE TRANSFERT DE SATURATION (STD).....	125
3.1.1	<i>Principe</i>	125
3.1.2	<i>Détermination de l'interaction entre l'enzyme Ba-IspD et le CTP</i>	127
3.1.3	<i>Détermination de l'interaction entre Ba-IspD et les fragments</i>	129
3.2	LA CRISTALLOGRAPHIE ET LE « DOCKING »	136
3.2.1	<i>La cristallographie</i>	136
3.2.2	<i>Expériences de docking des fragments sélectionnés en utilisant la structure de Ba-IspD comme cible</i>	137
3.2.1.1	Les spécifications du docking	137
3.2.1.2	Le criblage des fragments par docking en utilisant Ba-IspD comme cible..	138
3.3	LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE DE BA-ISP D	142
3.3.1	<i>Introduction à la cinétique enzymatique</i>	142
3.3.2	<i>L'inhibition enzymatique</i>	144
3.3.3	<i>IspD, une enzyme bi-substrat</i>	145
3.3.4	<i>Les tests enzymatiques de IspD</i>	147
3.3.5	<i>Principe du test enzymatique utilisé pour déterminer l'activité de Ba-IspD</i>	149
3.3.6	<i>Détermination de l'activité de l'enzyme Ba-IspD</i>	149
3.3.6.1	La courbe d'étalonnage : $P_i = f(DO)$	149

3.3.6.2	Conditions du test enzymatique pour déterminer l'activité de Ba-IspD.	150
3.3.7	<i>Test d'inhibition sur les fragments criblés</i>	151
3.3.7.1	Test de l'activité de l'enzyme Ba-IspD en présence des fragments.....	151
3.3.7.2	Test de l'activité de la pyrophosphatase en présence des fragments	152
3.3.7.3	Test d'activité en association lente.....	153
3.3.7.4	Détermination des IC ₅₀	155
3.4	CONCLUSION	159
3.5	PARTIE EXPÉRIMENTALE	161
3.5.1	<i>Spectroscopie RMN STD</i>	161
3.5.1.1	Enregistrement des spectres	161
3.5.1.2	Préparation des échantillons.....	162
3.5.2	<i>Expériences de docking</i>	163
3.5.3	<i>Cinétique</i>	164
3.5.3.1	Préparation du réactif colorant.	164
3.5.3.2	Réalisation de la droite d'étalonnage du phosphate.	164
3.5.3.3	Test d'activité de la pyrophosphatase	164
3.5.3.4	Les tests cinétiques classiques.....	165
3.5.3.5	Test de l'inhibition des fragments sur la pyrophosphatase	166
3.5.3.6	Les tests d'activité en association lente (Slow binding).....	166
4.	DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES MOLÉCULES À PARTIR DE FRAGMENTS CLÉS	167
4.1	POURQUOI CHOISIR CES FRAGMENTS CLÉS ?.....	167
4.2	STRATÉGIE D'ÉVOLUTION DES FRAGMENTS CLÉS	169
4.2.1	<i>Précurseurs pour optimiser les fragments clés par synthèse</i>	169
4.2.1.1	Synthèse des précurseurs non commerciaux	170
4.2.1.2	Des acides carboxyliques choisis et leurs caractéristiques.....	171
4.2.2	<i>Méthodologie de synthèse</i>	173
4.2.2.1	Stratégie de couplage des amines (1), (5), (6).....	173
4.2.2.2	Stratégie de couplage de l'amine (4).....	174
4.3	SYNTHÈSES DES NOUVELLES MOLÉCULES DÉRIVÉES DES FRAGMENTS CLÉS	175
4.3.1	<i>Analogues du fragment B6D12</i>	175
4.3.2	<i>Analogues du fragment B6G02</i>	176
4.3.3	<i>Analogues du fragment B3D04</i>	176

4.3.4	<i>Analogues du fragment BID02</i>	177
4.4	CONCLUSION	178
4.5	PARTIE EXPÉRIMENTALE	179
	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	194
	RÉFÉRENCES	200
	ANNEXES	228
	<i>ANNEXE 1 : RÉOLUTION DES ÉQUATIONS DE MAXWELL</i>	228
	<i>ANNEXE 2 : LES STRUCTURES DES 23 FRAGMENTS SÉLECTIONNÉS ET LEURS NOMS ASSOCIÉS ...</i>	232
	<i>ANNEXE 3 : ANALYSE DE LA RÉPONSE SPR DES FRAGMENTS, AJUSTEMENT DES COURBES SELON UNE RÉGRESSION LINÉAIRE (À DROITE) ET NON LINÉAIRE (À GAUCHE).</i>	233
	<i>ANNEXE 4 : STRUCTURES DES MOLÉCULES SYNTHÉTISÉES</i>	240
	<i>ANNEXE 5 : SPECTRES RMN DES MOLÉCULES SYNTHÉTISÉES</i>	241

Liste des figures

Figure 1 : <i>Bacillus Anthracis</i>	1
Figure 2 : Incorporation des toxines PA, LF et EF dans une cellule.....	2
Figure 3 : Cibles des antibiotiques et les mécanismes de résistance.	5
Figure 4 : Structure chimique du lipopeptide cyclique, la daptomycine.	6
Figure 5 : Isoprène et exemples d'isoprénoïdes.	7
Figure 6 : Structure de l'IPP et du DMAPP	8
Figure 7 : Biosynthèse des terpénoïdes à partir de l'IPP et du DMAPP.	9
Figure 8 : La dégradation du glucose dans <i>Z. mobilis</i> selon la voie d'Entner-Doudoroff.	12
Figure 9 : Structure cristallographique de DXR chez <i>D. radiodurans</i>	17
Figure 10 : Optimisation de fragment réussi.	18
Figure 11 : Structure du dérivé de la D-phénylalanine (D-PheTrAP).....	18
Figure 12 : Réarrangement et réduction du DXP en MEP catalysés par IspC.	19
Figure 13 : Structure cristallographique d'IspC d' <i>E. coli</i>	20
Figure 14 : Inhibiteurs de la DXR d' <i>E. coli</i> (Ec) et <i>Plasmodium falciparum</i> (Pf).	21
Figure 15 : Structures et constantes d'inhibition K_i des fragments analogues de phosphate synthétisés à partir du docking.	21
Figure 16 : Structure cristallographique d'IspD d' <i>E. coli</i> en présence du CDP-ME et de Mg^{2+} (PDB : 1INI).....	23
Figure 17 : Adénylyl-imidodiphosphate (AMP-PNP).....	24
Figure 18 : Structure cristallographique de l'enzyme IspE d' <i>E.coli</i> et de son site actif (PDB : 1OJ4).	24
Figure 19 : Inhibiteurs de l'enzyme IspE.	26
Figure 20 : Structure cristallographique de l'enzyme IspF avec ses produits de réaction MEcPP et CMP (PDB : 1H48).	27
Figure 21 : Inhibiteurs de l'enzyme IspF.	28
Figure 22 : Structure cristallographique de l'enzyme IspDF de <i>Campylobacter jejuni</i> (PDB : 1W57).	29
Figure 23 : Représentation cristallographique de l'homodimère d'IspG de <i>Thermus thermophilus</i> en présence du substrat et d'un inhibiteur.....	31
Figure 24 : Structure cristallographique d'IspH d' <i>E. coli</i>	34
Figure 25 : Processus de développement de médicaments.....	39
Figure 26 : Les étapes principales de l'approche par fragment.	42

Figure 27 : Exemples de fragments issus de la librairie utilisée dans cette thèse avec leurs masses molaires (MM) associées.	43
Figure 28 : Schématisation du mode de liaison de touches issues d'un criblage par une approche par fragments ou par HTS.	44
Figure 29 : Comparaison de l'affinité et de la masse molaire des touches entre les méthodes HTS et approche par fragment.	44
Figure 30 : Comparaison des différentes techniques de criblage en fonction de leurs limites de détection.	46
Figure 31 : Exemples de molécules PAINS.	50
Figure 32 : Stratégie d'optimisation de fragment : agrandir, fusionner, auto-assembler et raccorder.	53
Figure 33 : Représentation de la méthode de relation structure activité par RMN utilisée par Shuker et al. ¹³¹	54
Figure 34 : Développement du médicament Vénétoclax à partir d'une approche par fragment. ...	54
Figure 35 : Développement du médicament Vémurafénib à partir d'une approche par fragment. ...	55
Figure 36 : Superposition des trois modes de liaison et optimisation du fragment A vers un candidat-médicament anticancéreux à partir d'une approche par fragment.	56
Figure 37 : Onde électromagnétique et oscillation à l'interface métal/diélectrique.	59
Figure 38 : Configurations d'Otto et de Kretschmann.	61
Figure 39 : Conditions d'excitation des plasmons de surface dans la configuration de Kretschmann.	62
Figure 40 : Représentation des relations de dispersion.	63
Figure 41 : Schéma illustrant la réflexion totale interne.	64
Figure 42 : Illustration du phénomène de résonance plasmonique de surface.	65
Figure 43 : Présentation schématique de fonctionnement d'un biocapteur SPR.	66
Figure 44 : « Sensor chip » vendu par Cytiva, avec sa surface d'or.	67
Figure 45 : La nanoarchitecture d'une surface SPR composé de dextrane carboxyméthylé dont la structure est représentée (à droite).	67
Figure 46 : Schématisation d'un système microfluidique de l'appareil Biacore T200.	68
Figure 47 : Réaction de couplage entre les amines primaires de l'enzyme et les groupements carboxyliques présents à la surface via une activation par NHS / EDC.	69
Figure 48 : Exemple de sensorgramme ou suivi cinétique en temps réel de la lumière réfléchie décrivant successivement une phase d'association et une phase de dissociation.	70
Figure 49 : Sensorgramme et équations associées.	72

Figure 50 : Courbe de saturation des réponses à l'équilibre d'après le modèle d'interaction de Langmuir (1:1).	75
Figure 51 : Sensorgramme et tracé des réponses à l'équilibre à différentes concentrations de l'analyte A.	75
Figure 52 : Gel SDS-PAGE de l'enzyme Ba-IspD après purification sur une colonne Ni ²⁺ -NTA.	76
Figure 53 : Image d'un système Biacore T200 et de son logiciel de contrôle.	77
Figure 54 : Illustration des interactions électrostatiques entre la protéine et la surface lors d'une pré-concentration.	79
Figure 55 : Sensorgramme de l'immobilisation des enzymes Ba-IspD, Ec-IspD et de la BSA....	80
Figure 56 : Élaboration des courbes de calibration comprises entre 4,5 % et 5,8 % en DMSO. ...	82
Figure 57 : Exemple de corrections de la réponse d'un analyte injecté sur la surface couplée avec Ba-IspD..	83
Figure 58 : Réponses de la gamme de concentration en CTP sur les 4 surfaces de la puce CM5 avec un temps d'injection de 60 s.	84
Figure 59 : Tracés des réponses du CTP en (A) de Ba-IspD et en (B) de Ec-IspD, en fonction des concentrations 4,69 (rouge), 9,38 (vert), 18,8 (bleu), 37,5 (rose), 75 (cyan), 150 (jaune), 300 μM (violet).	85
Figure 60 : Sensorgrammes des 500 fragments sur la surface greffée avec l'enzyme Ba-IspD....	88
Figure 61 : Expérience de criblage et tracé des R _{éq} en fonction du cycle d'analyse.	89
Figure 62 : Les différentes corrections apportées pour traiter les données.	90
Figure 63 : Superposition des réponses à l'équilibre corrigées et ajustées en fonction du cycle d'analyse des surfaces Ba-IspD (Fc2) et BSA (Fc4).	91
Figure 64 : Normalisation des réponses corrigées et ajustées des 500 fragments.	92
Figure 65 : Second criblage des 500 fragments avec les réponses normalisées en fonction du cycle.	93
Figure 66 : Réponses de différents fragments à des concentrations comprises entre 3,91 et 500 μM en fonction de leurs cycles de passage lors de l'expérience.	96
Figure 67 : Représentation des structures chimiques des 23 fragments sélectionnés.	97
Figure 68 : Représentation des réponses d'une expérience des 23 fragments sélectionnés à une concentration de 100 μM.	98
Figure 69 : Sensorgramme du fragment B4H08 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).	99
Figure 70 : Sensorgramme du fragment B4D12 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).	100

Figure 71 : Sensorgramme du fragment B5E07 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	100
Figure 72 : Sensorgramme du fragment B3F10 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	101
Figure 73 : Sensorgramme du fragment B4B12 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	101
Figure 74 : Sensorgramme du fragment B1F11 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	102
Figure 75 : Sensorgramme du fragment B3D04 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	102
Figure 76 : Sensorgramme du fragment B6D12 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	103
Figure 77 : Sensorgramme du fragment B3H05 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	103
Figure 78 : Sensorgramme du fragment B5E12 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	104
Figure 79 : Sensorgramme du fragment B3E01 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	104
Figure 80 : Sensorgramme du fragment B3E03 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	105
Figure 81 : Sensorgramme du fragment B1B10 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	105
Figure 82 : Sensorgramme du fragment B1B02 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	106
Figure 83 : Sensorgramme du fragment B1H10 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	106
Figure 84 : Sensorgramme du fragment B1D02 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	107
Figure 85 : Sensorgramme du fragment B5E06 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	107
Figure 86 : Sensorgramme du fragment B5G02 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite).....	108
Figure 87 : Courbe de saturation du fragment B4H08..	110
Figure 88 : Calcul du LE pour les dix fragments montrant les meilleurs K_D	112
Figure 89 : Représentation schématique d'une expérience RMN STD..	126

Figure 90 : Expérience de RMN STD entre le ligand CTP et l'enzyme Ba-IspD.....	128
Figure 91 : Représentation des sensorgrammes du CTP et des fragments avec des phases d'association et de dissociation rapides.	129
Figure 92 : Résultats de la RMN STD pour le fragment B6D12.	130
Figure 93 : Spectres RMN-STD des fragments B5E07, B1B10, B1B02, B1D02 (de haut en bas).	131
Figure 94 : Spectres de l'expérience de RMN STD pour le fragment B5E06.	131
Figure 95 : Sensorgrammes de fragments présentant une phase de dissociation lente.	132
Figure 96 : Spectres de l'expérience de RMN STD pour le fragments B5E12.....	133
Figure 97 : Spectres RMN STD des fragments B4D12, B3E01 et B3H05 (de haut en bas).	133
Figure 98 : Spectres RMN STD des fragments B3D04 et B4H08 (de haut en bas), enregistrés sur 4000 scans.	134
Figure 99 : Spectres RMN STD du fragment B5G02 enregistré sur 4096 scans.	135
Figure 100 : Représentation de la structure tridimensionnelle de l'homodimère de l'enzyme Ba- IspD en présence du ligand CTP (jaune) et de Mg ²⁺ (violet).....	137
Figure 101 : Les fragments retenus par docking.	141
Figure 102 : Réaction catalysée par IspD et libération du diphosphate (PPi).	142
Figure 103 : Courbe cinétique de Michaelis-Menten.	143
Figure 104 : Les différents modes d'inhibition et les équations de vitesses associées.	144
Figure 105 : Détermination du mécanisme séquentiel de l'enzyme IspD chez <i>E. coli</i>	146
Figure 106 : Conversion enzymatique du 2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine riboside (MESG) en ribose 1-phosphate et 2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine par la purine nucléoside phosphorylase (PNP).....	147
Figure 107 : Principe du test pour la détection du PPi formé dans le test enzymatique.	149
Figure 108 : Droite d'étalonnage pour quantifier la concentration de Pi en fonction de l'absorbance à 630 nm.	150
Figure 109 : Activités de l'enzyme Ba-IspD sans (bleu) et avec (rouge) les fragments à 200 µM (n=1).....	151
Figure 110 : Taux d'inhibition des fragments à 200 µM sur l'enzyme Ba-IspD.....	152
Figure 111 : Structures des neuf fragments montrants un taux d'inhibition supérieur à 50 % à 200 µM.....	152
Figure 112 : Taux de conversion du PPi en Pi par la pyrophosphatase avec (orange) et sans (bleu) fragment (n=1).	153
Figure 113 : Sensorgrammes des fragments testés en slow binding.	153

Figure 114 : Activités de l'enzyme Ba-IspD en mode d'association lente avec (rouge) et sans (bleu) fragment à 200 μ M et le taux d'inhibition associé (vert).	154
Figure 115 : Détermination de l'IC ₅₀ et structure chimique du fragment B4H08.....	155
Figure 116 : Détermination de l'IC ₅₀ et structure chimique du fragment B1D02.....	156
Figure 117 : Détermination de l'IC ₅₀ et structure chimique du fragment B3D04.....	156
Figure 118 : Taux d'inhibition des fragments à 200 μ M (vert) et 1000 μ M (orange) sur Ba-IspD (n=1).....	157
Figure 119 : Détermination de l'IC ₅₀ et structure chimique du fragment B1D02.....	158
Figure 120 : Séquence de l'analyse RMN STD stddiffesgp fourni par Bruker ²³⁴	161
Figure 121 : Précurseurs pour l'évolution des fragments choisis.	170
Figure 122 : Les différents sites de fixation du fragment B3D04 révélés par docking.....	172
Figure 123 : Représentation des sept acides carboxyliques mis en jeu lors des couplages.....	172
Figure 124 : Représentation des cinq molécules synthétisées à partir de l'amine (6).....	175
Figure 125 : Représentation des six molécules synthétisées à partir de l'amine (1).....	176
Figure 126 : Représentation des quatre molécules synthétisées à partir de l'amine (5).....	176
Figure 127 : Représentation des trois molécules synthétisées à partir de l'amine (4).	177
Figure 128 : Exemple d'une stratégie de synthèse par catalyse au cuivre (I) CuAAC.	199

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques de quelques inhibiteurs d'IspD.....	36
Tableau 2 : Résumé des paramètres importants des différentes techniques biophysiques utilisées pour le criblage.....	46
Tableau 3 : Résumé des avantages et inconvénients relatifs aux différentes méthodes biophysiques utilisées pour l'approche par fragment.....	49
Tableau 4 : L'efficacité de ligand comme outil pour l'optimisation des fragments.	51
Tableau 5 : Composition des tampons d'analyse utilisés dans les expériences de SPR.	78
Tableau 6 : Composition des tampons d'immobilisation en fonction du point isoélectrique des différentes enzymes et protéines.	78
Tableau 7 : Le taux d'immobilisation des enzymes IspD et de la BSA en fonction du temps d'injection et la conversion en concentration massique.....	80
Tableau 8 : Constantes cinétiques K_M et K_D des deux enzymes Ba-IspD et Ec-IspD.....	85
Tableau 9 : Détermination du pourcentage de site actif accessible.	86
Tableau 10 : Valeurs des taux d'immobilisation selon les expériences réalisées.	91
Tableau 11 : Noms des fragments sélectionnés à 100 μ M par boîtes.	94
Tableau 12 : Résultats des réponses $R_{\text{éq}}$ et calcul des RNORM du fragment B4H08.	109
Tableau 13 : Classement des fragments en fonction de la valeur de leur K_D (ordre croissant). .	111
Tableau 14 : Valeurs de BE_1 pour les fragments avec une courbe de saturation correcte..	115
Tableau 15 : Valeurs de BE_2 et BE_3 pour les fragments avec la droite correspondant aux cinq premières concentrations.....	116
Tableau 16 : Résultats des différents paramètres définissant l'affinité de liaison des 18 fragments pour l'enzyme Ba-IspD.	117
Tableau 17 : Les fragments avec un K_D intéressant.....	118
Tableau 18 : Les fragments avec un BE_3 intéressant.	118
Tableau 19 : Les différents tampons utilisés lors du criblage par SPR.....	121
Tableau 20 : Composition des tampons acétate utilisés pour solubiliser les protéines.....	122
Tableau 21 : Préparation des solutions de DMSO à 4,5% et 5,8%.....	123
Tableau 22 : Préparation des huit solutions de DMSO utilisées pour établir la courbe de correction DMSO.	124
Tableau 23 : Structure des neuf fragments confirmés par STD.	136
Tableau 24 : Enzymes IspD présentés dans la PDB et leurs pourcentages d'homologie et d'identité avec Ba-IspD.	136
Tableau 25 : Résultats du docking réalisé sur les vingt-trois fragments sélectionnés par SPR. .	139

Tableau 26 : Les différentes méthodes de quantification des phosphates par spectrophotométrie..	148
Tableau 27 : Activités de Ba-IspD à 0 % et 1 % de DMSO.	150
Tableau 28 : Structures des huit fragments dont l'inhibition a été confirmée.	158
Tableau 29 : Récapitulatif des paramètres d'analyses.	162
Tableau 30 : Préparation des solutions de phosphate pour la courbe d'étalonnage.	164
Tableau 31 : Résumé des résultats obtenus sur Ba-IspD pour le CTP et les quatre fragments, B3D04, B6D12, B1D02, B6G02 par : SPR, STD, docking et cinétique..	168
Tableau 32 : Résumé des résultats obtenus pour les quatre fragments choisis pour l'évolution de fragment. Seul le meilleur DS a été indiqué.	196

Liste des schémas

Schéma 1 : Voie du mévalonate (MVA).....	10
Schéma 2 : Voie alternative à la voie classique MVA..	11
Schéma 3 : Voie du méthylérythritol phosphate.	13
Schéma 4 : Le cofacteur TDP et la formation de l'ylure.....	15
Schéma 5 : Conversion du pyruvate et du G3P en DXP en présence du TDP activé.	16
Schéma 6 : Mécanisme catalysé par l'enzyme IspD.	23
Schéma 7 : Mécanisme catalytique d'IspE.....	25
Schéma 8 : Mécanisme catalytique d'IspF.....	27
Schéma 9 : Mécanisme proposé pour la réaction catalysée par l'enzyme IspG.....	30
Schéma 10 : Mécanisme catalytique de l'enzyme IspH.....	33
Schéma 11 : Synthèse du fragment B4H08 décrit par Klapars et al ²⁰⁹	167
Schéma 12 : Synthèse du composé β -lactame décrit par Colvin et al ²⁴⁰	168
Schéma 13 : Stratégie de synthèse du précurseur pour la synthèse des analogues du fragment B3D04.....	170
Schéma 14 : Stratégie de synthèse du précurseur pour la synthèse des analogues du fragment B6D12.....	171
Schéma 15 : Synthèse générale du couplage des amines (1), (5), (6) en présence de l'activateur HBTU.....	173
Schéma 16 : Mécanisme réactionnel du couplage entre l'amine et l'acide carboxylique en utilisant l'activateur HBTU et la base DIPEA.....	174
Schéma 17 : Synthèse générale du couplage des amines aromatiques (4) avec l'activateur HOBt.	174
Schéma 18 : Mécanisme réactionnel du couplage entre une amine et un acide carboxylique en utilisant les activateurs EDC/HCl et HOBt.....	175

Abréviations

Å	Ångström	DS	Score de docking
AACT	Acétoacétyl-CoA thiolase	DSF	Fluorimétrie différentielle à balayage
AcOEt	Acétate d'éthyle	DTT	Dithiothréitol
ADN	Acide désoxyribonucléique	DXP	1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate
AMP-PNP	Adénylyl-imidodiphosphate	Ec-IspD	IspD d' <i>Escherichia coli</i>
ARN	Acide ribonucléique	EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
At-IspD	IspD de <i>Arabidopsis thaliana</i>	EF	Facteur d'œdème
ATP	Adénosine triphosphate	EP	Éther de pétrole
Ba-IspD	IspD de <i>Bacillus anthracis</i>	ET	Toxine d'œdème
BE	Efficacité de la liaison	FBDD	Approche par fragment
BSA	Albumine de sérum bovin	Fc	Cellule d'écoulement
CCM	Chromatographie sur couche mince	FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
CDP	Cytidine diphosphate	FPP	Diphosphate de farnésil
CDP-ME	4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol	G3P	3-phosphoglyceraldéhyde
CDP-MEP	4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol-2-phosphate	GGPP	Diphosphate de géranylgeranyle
CM	Dextrane carboxyméthylé	GHMP	Galactose, Homosérine, Mévalonate, Phosphomévalonate
cm ²	Centimètre carré	GPP	Diphosphate de géranyle
CMP	Cytidine monophosphate	HBTU	Hexafluorophosphate de O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tétraméthyluronium
CTP	Cytidine triphosphate	HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
Da	Dalton	HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimide	HTS	Criblage à haut débit
DIPEA	N,N-Diisopropyléthylamine	HYSCORE	Corrélation de sous-niveau hyperfine
DMF	Diméthylformamide	Hz	Hertz
DMAPP	Diphosphate de diméthylallyle	IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
DMSO	Diméthylsulfoxyde	IDI	Isomérase de diphosphate
DO	Densité optique	IPP	Diphosphate d'isopentényle
DOSY	Spectroscopie ordonnée par diffusion	ITC	Titration calorimétrique isotherme

J	Constante de couplage (Hz)	NOE	Effet Overhauser nucléaire
k_a	Constante d'association ($M^{-1}.s^{-1}$)	PA	Antigène protecteur
kcal	Kilocalories	PDB	Banque de données sur les protéines
k_d	Constante de dissociation (s^{-1})	Pf-IspD	IspD de <i>Plasmodium falciparum</i>
kDa	Kilodalton	PGA	Acide poly- γ -D-glutamique
K_D	Constante de dissociation (M)	pH	Potentiel hydrogène
K_i	Constante d'inhibition	Pi	Phosphate inorganique
K_M	Constante de Michaelis-Menten	pI	Point isoélectrique
LE	Efficacité du ligand	pKa	Constante d'acidité
LF	Facteur létale	PPi	Diphosphate inorganique
LT	Toxine létale	ppm	Partie par million
M	Molaire	Pv-IspD	IspD de <i>Plasmodium vivax</i>
μ M	Micromolaire	R_{act}	Activité de la surface
ME	2-C-méthyl-D-érythritol	$R_{\acute{e}q}$	Réponse à l'équilibre
MEcPP	2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate	R_F	Rapport frontal
MeOH	Méthanol	R_{max}	Réponse maximale
MEP	Méthylérythritol phosphate	RMN	Résonance magnétique nucléaire
mg	Milligramme	R_{NORM}	Réponse normalisée
ml	Millilitre	RPE	Résonance paramagnétique électronique
mM	Millimolaire	RU	Unité de résonance
MM	Masse molaire	SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
mm ²	Millimètre carré	STD	Différence de transfert de saturation
mol	Mole	T.A.	Température ambiante
MVA	Mévalonate	TDP	Diphosphate de thiamine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	THF	Tétrahydrofurane
NHS	N-hydroxysuccinimide	VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
ng	Nanogramme		
nm	Nanomètre		
nM	Nanomolaire		
nM	Nanomolaire		

Remerciements

Je remercie le Professeur **Jean-Bernard Behr** et le Docteur **Martine Pugnère** de m'avoir fait l'honneur de juger ces travaux de thèse. Je tiens également à remercier l'Agence Nationale de la Recherche d'avoir financé ce projet durant ces trois années.

J'aimerais remercier ma directrice de recherche, Docteur **Myriam Seemann**, pour m'avoir donné l'opportunité d'accomplir cette thèse dans son laboratoire de recherche et pour son intérêt et son soutien et ses nombreux conseils durant la rédaction de ma thèse. Je remercie également le Docteur **Philippe Chaignon** pour son aide durant la thèse et lors de la rédaction.

Je remercie le Docteur **Danièle Altschuh** et **Camille Kostmann** de l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire pour m'avoir aidée à découvrir la technique de SPR et pour leurs précieux conseils.

Je remercie le Docteur **Franck Borel** et le regretté Docteur **Jean-Luc Ferrer** de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble pour m'avoir accueillie pendant un bref moment dans leur laboratoire et de m'avoir initiée à la cristallisation de protéine et à la diffraction aux rayons X.

Je souhaite remercier le service de RMN. **Bruno** pour sa générosité et son implication dans la thèse, **Lionel** pour ses mails rigolos et **Maurice** pour sa gentillesse et sa bonne humeur sans limite.

Je remercie chaleureusement **Magali**, une collègue et une amie avec qui j'ai eu le plaisir de partager un bureau durant ma première année de thèse. Merci pour son aide précieuse, sa bonne humeur, son soutien et ses conseils aussi bien professionnels que personnels.

Je remercie mes collègues et amis du laboratoire. **Mickaël** pour son soutien sans faille, son expertise médicale essentielle à ma survie et pour ces nombreux restaurants japonais à volonté partagé ensemble. Merci à **Clea** pour sa gentillesse et pour avoir accepté la garde partagée de Mickaël. Merci aussi à **Geneviève** qui a toujours été une oreille attentive et m'a soutenue tout au long de ma thèse.

Je voudrais également remercier les nombreuses personnes faisant partie de l'Institut Le Bel avec qui les pauses midi et les apéros du vendredi soir furent très animés et accompagnés d'innombrables fous rires.

Tout d'abord, merci au Professeur **Peter Fallor** et toute sa merveilleuse équipe, **Angélique**, **Enrico**, **Maxime**, **Merwan**, **Michael**, **Ryan**, **Thibault** et **Vincent**, ainsi qu'aux anciens

membres de cette équipe, **Paulina, Nina, Alice, Capucine, Elodie** et **Lucie** avec qui j'ai passé des moments inoubliables. Un remerciement spécial pour le King du laboratoire, **Laurent** qui a toujours été présent pour m'encourager et me soutenir mais surtout pour m'embêter. Merci pour toutes ces conversations instructives sur l'art de la négociation, pour tes histoires farfelues et inattendues ainsi que pour les nombreuses blagues et jeux de mots très très recherchés qui me font toujours beaucoup rire.

Ensuite, je souhaite remercier **Élise** et **Morane**, membre du laboratoire du Professeur **Bechinger**, pour leurs bonnes humeurs, leurs conseils et leurs encouragements, ainsi qu'aux anciens membres de ce groupe **Justine** et **Dennis** avec qui j'ai eu la chance de partager de précieux moments.

Merci à **Nolwenn** et **Christophe**, des amis formidables rencontrés pendant la thèse et qui ont toujours été disponible pour aller prendre une bière ou un Coca après le travail. Merci à **Geordie** d'être présent et de m'avoir toujours soutenue même dans les moments difficiles, surtout pendant la rédaction de la thèse.

Je tiens à remercier également **Éric Brenner**, la personne qui m'a fait découvrir la recherche lors des stages de master et qui m'a encouragée à réaliser cette thèse. Merci infiniment pour toutes ces discussions autour de la machine à café et de la bienveillance dont tu as fait preuve durant ces nombreuses années.

Je voudrais remercier mes amis du master, **Andrea, Claire, Megan, Valentin, Vincent** et **Jérôme** qui sont pour la plupart également en thèse, éparpillés un peu partout dans le monde, merci pour votre soutien.

Je remercie tout particulièrement **Sridévi Maalika Ramanoudjame**, une amie précieuse rencontré également pendant le master et qui depuis a toujours été présente. Merci **Sri** pour tous ces moments passés en ta compagnie, que ce soit pour décompresser après une journée, difficile ou pas, et pour m'avoir donnée l'occasion de partir avec toi au Japon, ce voyage restera à jamais un souvenir merveilleux. Ces trois dernières années n'auraient pas été les mêmes sans toi. Un duo c'est bien, mais un trio c'est mieux, ainsi je tiens à remercier **Lucie Esteouille**, une amie sur qui on peut compter et avec qui nous avons partagé de précieux moment, que ce soit les super week-ends passés toutes les trois ou encore les vacances en Ardèche trop géniales.

Je souhaite remercier toute ma famille et plus particulièrement mes parents, **Martine** et **Bruno**, qui ont cru en moi et mon soutenu durant toutes mes études. Je remercie mon frère **Vincent** pour ces encouragements.

Résumé

Les récentes épidémies (Ébola, Zika ou la COVID-19) ont mis en évidence notre vulnérabilité face aux épidémies de maladies infectieuses. De nos jours, les menaces terroristes et bioterroristes augmentent et des bactéries, des virus ou des toxines peuvent être utilisées à ces fins. Parmi ces agents, *Bacillus anthracis* responsable de la maladie du charbon plus communément appelée « anthrax », est l'un des plus dangereux. Actuellement, les personnes contaminées par ce pathogène sont traitées par des antibiotiques tels que les bêta-lactamines, les fluoroquinolones et les tétracyclines. Cependant, l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques actuels représente un réel problème de santé publique et le développement de nouveaux antimicrobiens est devenu une priorité.

Une cible prometteuse pour le développement de nouveaux antibiotiques est IspD, la troisième enzyme de la voie du méthylérythritol (MEP). IspD catalyse la formation du 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol (CDP-ME) et du diphosphate inorganique (PPi) à partir du MEP et du triphosphate de cytidine (CTP). Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse des isoprénoïdes, une famille de molécules essentielles à la survie de chaque espèce. IspD est présente chez la plupart des bactéries et surtout chez certains pathogènes comme *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis* (responsable de la tuberculose) et *Plasmodium falciparum* (responsable de la malaria), mais elle est absente chez les humains qui utilisent la voie du mévalonate (MVA) pour la synthèse des isoprénoïdes. Ainsi, le développement d'un nouvel inhibiteur qui cible IspD devrait limiter les effets secondaires.

L'objectif de ma thèse est la conception et la synthèse de nouveaux inhibiteurs d'IspD de *Bacillus anthracis* (Ba-IspD) en utilisant une approche par fragment. À partir d'une librairie constituée de 500 fragments, 23 fragments ont été sélectionnés par résonance plasmonique de surface (SPR) puis leur affinité avec Ba-IspD a été déterminée.

Des analyses complémentaires en utilisant des expériences de RMN STD et docking ont été réalisées afin de confirmer les interactions entre les fragments et Ba-IspD. Le potentiel d'inhibition des fragments sélectionnés a été déterminé en utilisant un test enzymatique basé sur la détection du PPi produit. Des premiers résultats ont permis d'obtenir les IC₅₀ de 3 fragments. Ces derniers semblent être des points de départ intéressants pour l'optimisation de fragment.

La dernière partie de ce manuscrit décrit l'optimisation de 4 fragments sélectionnés d'après les résultats obtenus par SPR, STD, docking et inhibition. Au final, 18 molécules ont été synthétisées et leur pouvoir d'inhibition doit encore être évalué.

Chapitre 1

Introduction Générale

1. Introduction Générale

1.1 *Bacillus anthracis*

1.1.1 Origine et virulence

L'anthrax est l'une des plus anciennes maladies infectieuses documentées et serait à l'origine de la 5^{ème} Plaie d'Égypte « la mort des troupeaux », décrit dans le livre de la Genèse (Exode 9)¹. Le nom anglais « anthrax » vient du grec *anthrakos* qui signifie charbon et représente la couleur noirâtre du sang des animaux infectés. En France, cette maladie est connue sous le nom de maladie du charbon ou de fièvre charbonneuse.

Pendant la deuxième partie du XIX^{ème} siècle, la maladie du charbon a été caractérisée et l'agent pathogène en forme de « bâtonnets » ou « petits corps filiformes » (Figure 1) a été décrit indépendamment par Pierre Rayer - Casimir-Joseph Davaine (1850)² et par Aloys Pollender (1849).



Figure 1 : Bacillus Anthracis

L'origine bactérienne de cette maladie fut démontrée en 1863 par C.-J. Davaine. En 1876, Robert Koch étudie la bactérie présente dans du sang animal et découvre l'agent étiologique responsable de la maladie du charbon en retraçant le cycle de vie complet du bacille responsable de cette maladie. Il est le premier à découvrir cette bactérie et nomme le pathogène *Bacillus anthracis*. Ses recherches sur ce pathogène ont donné naissance au concept de la microbiologie médicale³. *Bacillus anthracis* est une maladie qui touche principalement les herbivores, transmissible à l'homme et qui est souvent fatale pour les animaux domestiques et sauvages (comme le bétail, les moutons, les chèvres, les bisons, les antilopes). C'est une bactérie en forme de bâtonnet, aérobie ou parfois anaérobie, à Gram positive qui peut former des spores extrêmement résistants⁴. Elle est présente mondialement et reste enzootique dans de nombreuses régions, en particuliers en Afrique subsaharienne, Asie, Amérique centrale et du Sud⁵. Les humains sont le plus souvent contaminés par exposition à des animaux infectés ou

leurs produits dérivés, tels que la viande, les os ou la peau. De 2000 à 20 000 personnes sont contaminées chaque année dans le monde^{6,7}.

Dans la nature, lorsque les conditions ne sont pas propices à la croissance et à la multiplication des bacilles, *Bacillus anthracis* survit généralement sous forme de spores dans le sol. Ces dernières peuvent être soit sous une forme dormante et survivre des dizaines d'années dans le sol avec une très grande résistance aux désinfectants et à la température, soit sous une forme végétative, responsable de la maladie, lorsque les spores ont contaminé un hôte et que les conditions sont propices à leur germination⁸. Après avoir contaminé l'hôte par voie cutanée, gastro-intestinale, inhalation⁸ ou intraveineuse⁹, les bactéries se développent rapidement et produisent des grandes quantités de toxines qui se repandent dans le sang et provoquent plusieurs symptômes, allant de la nécrose à la septicémie et aux collapsus veineux⁴.

La virulence de *Bacillus anthracis* est liée à deux larges plasmides, pXO1 et pXO2. Le plasmide pXO1 conduit à la production de trois chaînes polypeptidiques indépendantes, le facteur létal (LF), le facteur œdème (EF) et l'antigène protecteur (PA) qui sont responsables de la létalité et des symptômes associés à l'anthrax^{10,11}. Le PA peut soit former un complexe avec le LF pour donner une toxine létale (LT) soit former un complexe avec EF et conduire à la formation d'une toxine d'œdème (ET).

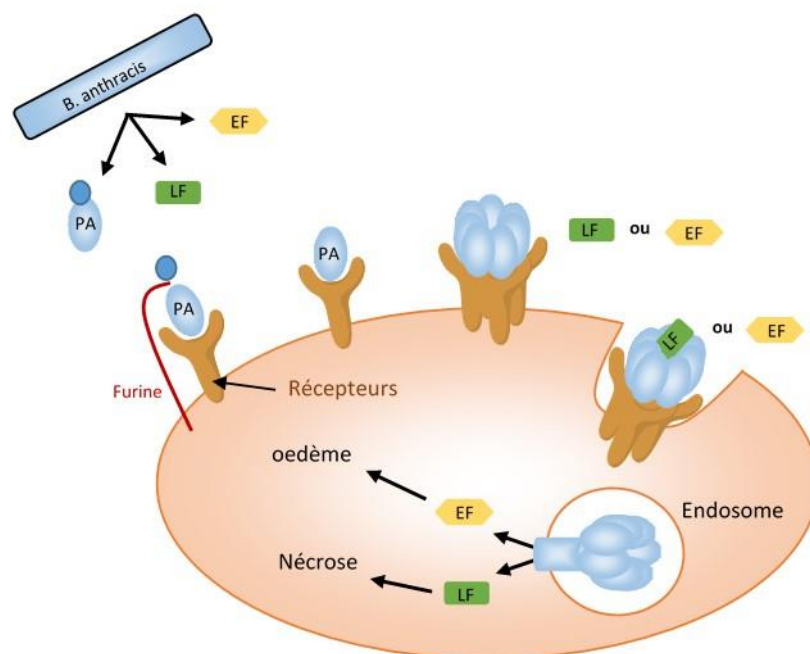


Figure 2 : Incorporation des toxines PA, LF et EF dans une cellule. L'antigène protecteur (PA) se lie aux récepteurs puis est clivé par la furine. Le PA clivé produit un site de liaison pour les toxines EF et LF. Le complexe subit une endocytose, LF et EF sont transférées dans le cytosol.

Le plasmide pXO2 est responsable de la formation de l'acide poly- γ -D-glutamique (PGA) qui permet la formation de la capsule protectrice du bacille¹² et protège de la phagocytose et de la surveillance immunitaire¹³. Le PGA est essentiel lors de la phase de prolifération de l'anthrax dans l'hôte. Ainsi, les antibiotiques ciblant la capsule PGA de la bactérie deviennent inefficaces après une prolifération importante car les toxines sont déjà présentes en grande quantité.

La contamination de l'humain ou de l'animal se produit lorsque la bactérie est sous forme de spores et qu'elle pénètre dans l'organisme par voie cutanée, digestive ou respiratoire. La contamination par voie aérienne est la plus létale car les spores sont transportées directement dans les ganglions lymphatiques par les macrophages alvéolaires et la germination de ces spores conduit à la formation des toxines LT et ET⁴ très rapidement.

1.1.2 L'anthrax comme arme biologique

L'utilisation de spores comme arme biologique remonte à la seconde guerre mondiale. Les premiers tests ont été effectués par l'armée japonaise qui a expérimenté ce pathogène sur des prisonniers de guerre. L'armée britannique a également expérimenté l'anthrax sur des moutons, en 1942, en bombardant l'île de Gruinard (Ecosse) ce qui a conduit à la mort des moutons et à la contamination des sols pendant plus de 45 ans^{3,14}. En avril 1979, des spores de *Bacillus anthracis* ont été accidentellement relâchées à partir d'un centre de recherche sur les armes biologiques en Union Soviétique, provoquant la mort de soixante-six personnes^{3,14}. En 2001, juste après les attentats du 11 septembre, des spores de *Bacillus anthracis* contenues dans des enveloppes ont été envoyées par courrier postal à des représentants du gouvernement et aux médias. Cette attaque a infecté vingt-deux personnes qui a conduit au décès de cinq d'entre elles¹⁴. *Bacillus anthracis* est actuellement considéré comme un agent de catégorie A par le Centre de prévention et de contrôle des maladies (CDC).

La résurgence de *Bacillus anthracis* chaque année dans le monde⁷ et son utilisation en tant que potentielle arme biologique sont des faits inquiétants et de nouvelles solutions pour lutter contre cet organisme sont primordiales.

1.1.3 Traitement et résistance

1.1.3.1 Vaccination avant et après exposition

En 1881, Louis Pasteur réalisa la première expérience publique de vaccination contre *Bacillus anthracis* sur une cinquantaine de moutons¹⁵. Il vaccina la moitié d'entre eux avec une

souche atténuée de *Bacillus anthracis* et après quelques semaines, seuls les moutons vaccinés survécurent. En 1937, Max Sterne développa une souche atténuée de *Bacillus anthracis* qui ne peut pas synthétiser de capsule car la souche ne possède pas le gène codant pour pX02. Cette souche, appelée souche Sterne, est utilisée comme vaccin mais seulement pour un usage vétérinaire¹⁶. De nos jours, la FDA (Food and Drug Administration) a autorisé l'utilisation du vaccin BioThrax® (Anthrax Vaccine Absorbed : AVA) pour les personnes dont l'exposition à l'anthrax est un risque important comme les militaires et les personnes travaillant avec les animaux. En 2015, la FDA autorise l'utilisation de ce vaccin après exposition à l'anthrax en combinaison avec des antibiotiques.

1.1.3.2 Les antibiotiques et l'antibiorésistance

Les antibiotiques sont des substances utilisées pour lutter contre les infections bactériennes. Les antibiotiques agissent selon cinq modes d'action (Figure 3) : l'inhibition de la synthèse de la paroi (ex. β -lactamines), l'inhibition de la synthèse de l'ADN ou de l'ARN (ex. fluoroquinolones), l'inhibition de la synthèse protéique (ex. tétracyclines), l'inhibition de voie métabolique (ex. sulfamides) et la dépolarisation de la membrane (ex. daptomycine).

Bien que ces médicaments aient sauvés de nombreuses vies, les bactéries ont développé différents mécanismes de résistance suite à leurs utilisations répétées et excessives. La résistance aux antibiotiques rend inefficace un ou plusieurs antibiotiques contre une infection bactérienne. Ce phénomène peut conduire à l'impossibilité de traiter certaines infections. Sur l'année 2015, Cassini *et al.* ont estimé qu'en Europe plus de 670 000 cas d'infection étaient dues à des souches résistantes conduisant à 33 000 décès, ce chiffre est deux fois plus important qu'en 2007¹⁷. L'antibiorésistance constitue une menace grandissante sur la santé mondiale.

Les bactéries ont développé plusieurs modes d'action pour lutter contre les antibiotiques (Figure 3). Un premier mécanisme de résistance est la modification de la cible entraînant une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour la cible. Dans certains cas, la bactérie surexprime la cible de l'antibiotique et conserve ainsi une activité biologique malgré la présence de l'antibiotique. Certaines souches résistantes produisent une enzyme qui modifie ou clive l'antibiotique et le rend ainsi inactif. C'est le mécanisme de résistance principal aux β -lactamines. Un autre mécanisme consiste à diminuer la concentration intracellulaire de l'antibiotique. Pour cela, soit la bactérie empêche les antibiotiques de rentrer dans la cellule en la rendant imperméable, soit elle accélère leur expulsion en augmentant le nombre de pompes à efflux. Ces pompes à efflux exportent les composés toxiques hors de la cellule. C'est l'un des

mécanisme de résistance utilisé par *Pseudomonas aeruginosa*¹⁸ pour éliminer les carbapénèmes (famille des β -lactamines).

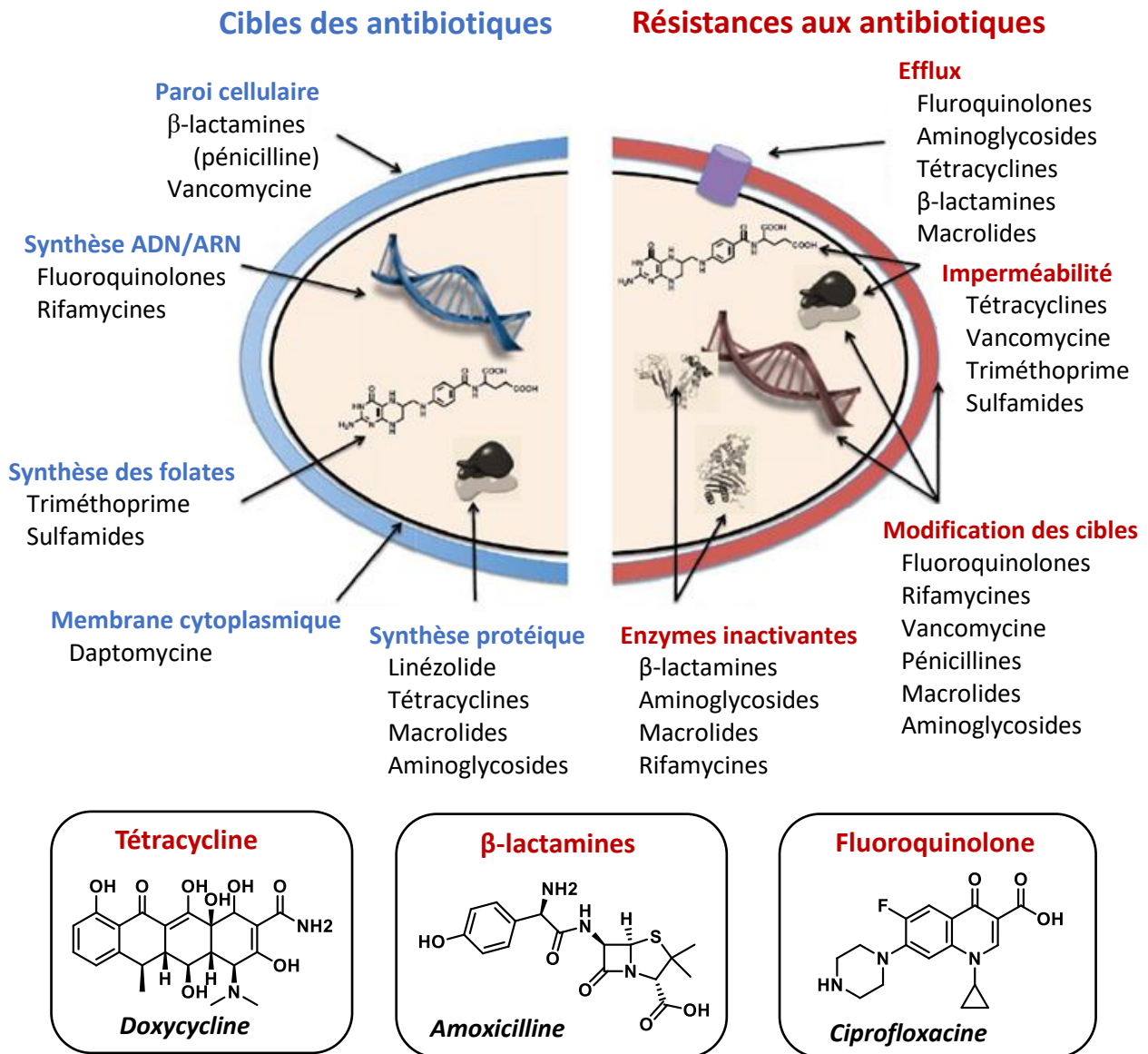


Figure 3 : Cibles des antibiotiques et les mécanismes de résistance. Image extraite et modifiée de Etebu et al¹⁹.

1.1.3.3 Les antibiotiques utilisés contre *Bacillus anthracis*

Un grand nombre d'antibiotiques sont efficaces contre *Bacillus anthracis*. La pénicilline (famille des β -lactamines) est l'antibiotique le plus utilisé à travers le monde, les quinolones et les cyclines sont aussi utilisées. L'utilisation de ces différents antibiotiques dépend de la sévérité et du site de l'infection. Dans les cas de contamination cutanée légère, la pénicilline G, l'amoxicilline, la doxycycline et la ciprofloxacin sont conseillées. Dans le cas de

contamination par inhalation, comme par exemple lors d'une attaque biologique, les antibiotiques recommandés sont la ciprofloxacine et la doxycycline en combinaison parfois avec le vaccin BioThrax®.

En 2001, après l'envoi de courriers contenant de l'anthrax, une campagne de prévention a été lancée. Pendant 60 jours, de la ciprofloxacine et la doxycycline ont été administrés à environ 10 000 personnes exposées à la bactérie²⁰.

Cependant, une utilisation prolongée de ces différents antibiotiques pourrait conduire à des souches résistantes. À ce jour, il a été rapporté plusieurs cas de souches résistantes²¹⁻²³ de *Bacillus anthracis* à la pénicilline, c'est pourquoi la monothérapie n'est pas conseillée. Des études *in vitro* réalisées sur *Bacillus anthracis* ont montré la facilité à créer des souches résistantes à plusieurs antibiotiques, tels que les β -lactames et les fluoroquinolones²⁴. L'utilisation de ces souches résistantes lors d'attaques bioterroristes pourrait être un réel danger, c'est pour cela qu'il est urgent de trouver de nouveaux médicaments avec des modes d'action différents. Par exemple, la daptomycine, un lipopeptide cyclique, est un nouvel antibiotique prometteur qui tue la forme végétative de *Bacillus anthracis* et les spores en germination²⁵.

La daptomycine s'insère dans la membrane bactérienne, agit sur l'efflux des cations K^+ et Na^+ et dissipe le potentiel de la membrane qui conduit à la diminution rapide de la synthèse protéique, d'ADN et d'ARN²⁶.

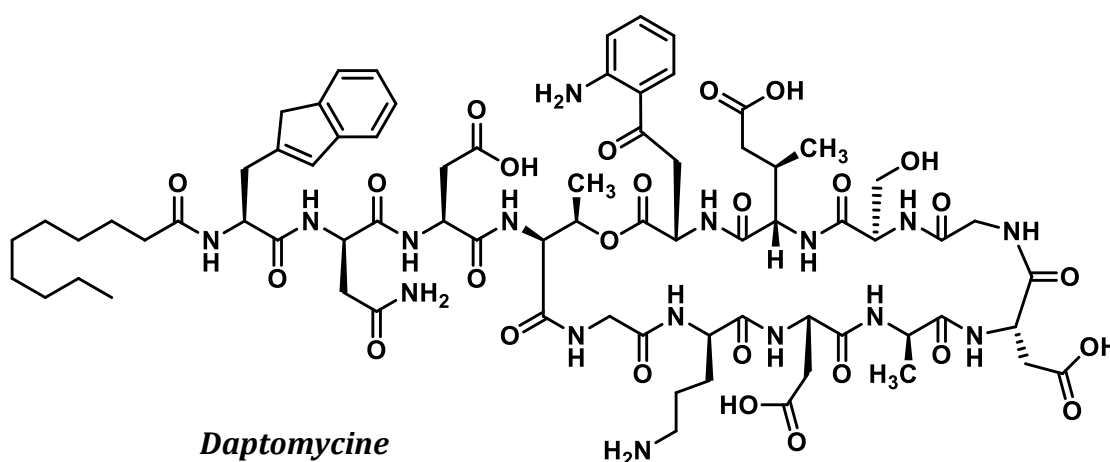


Figure 4 : Structure chimique du lipopeptide cyclique, la daptomycine.

Une cible qui pourrait être exploitée pour le développement de nouveaux antibiotiques est la biosynthèse des isoprénoïdes.

1.2 La synthèse des isoprénoïdes

Les isoprénoïdes, aussi appelés terpénoïdes, représentent la famille de composés naturels la plus vaste et la plus complexe avec plus de 80 000 molécules²⁷. Ils sont présents dans tous les domaines du vivant et ont des rôles biologiques essentiels tels que le transport d'électrons, la constitution des membranes, la reproduction et la photosynthèse. Tous les isoprénoïdes sont issus de la condensation d'isoprène, une molécule à cinq atomes de carbone (C_5) (Figure 5). En 1887, Wallach est le premier à remarquer l'existence d'une répétition d'unité isoprène dans plusieurs composés. Il établit la règle isoprénoïque qui décrit la condensation de type « tête-queue » de plusieurs de ces unités isoprènes (C_5) pour donner des composés à n fois cinq atomes de carbones (C_5)^{28,29} (Figure 5). En 1953, Ruzicka établit la « règle isoprénoïque biogénétique » permettant d'expliquer la synthèse de tous les isoprénoïdes³⁰. Les isoprénoïdes sont nommés d'après le nombre d'unité isoprène les constituant : hémiterpènes ($n = 1$), monoterpènes ($n = 2$), sesquiterpènes ($n = 3$), diterpènes ($n = 4$), sesterterpènes ($n = 5$), triterpènes ($n = 6$) et les tétraterpènes ($n = 8$).

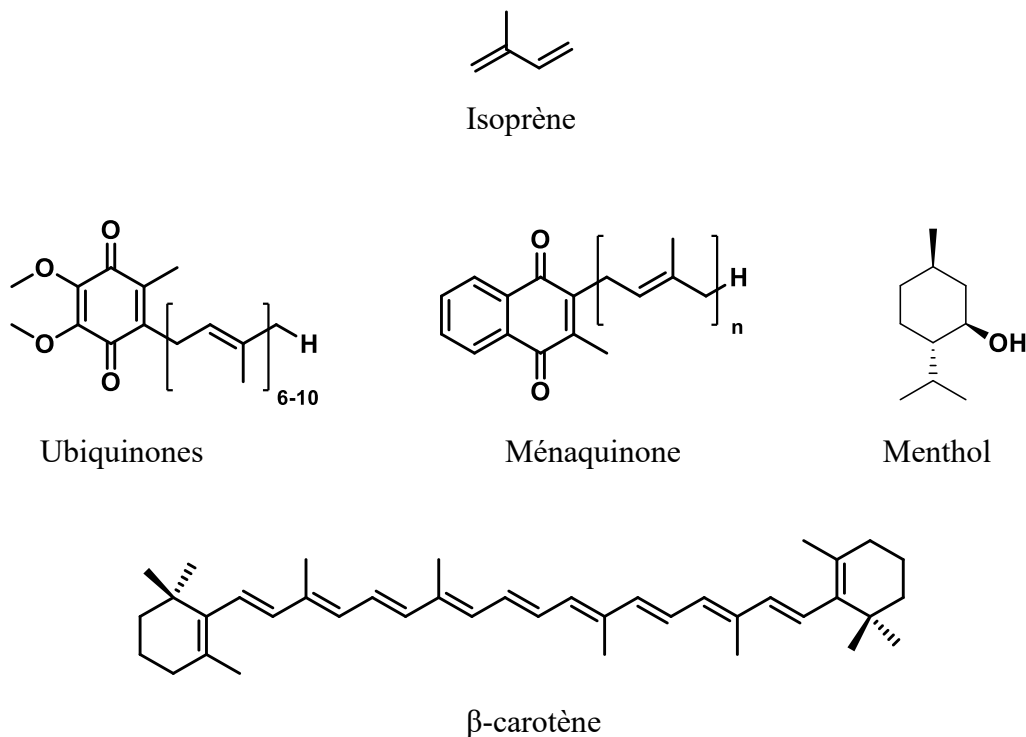


Figure 5 : Isoprène et exemples d'isoprénoïdes.

En biologie, les équivalents de l'isoprène sont le diphosphate d'isopentényle (IPP) et le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) (Figure 6). L'isomérisation de l'IPP en DMAPP est réalisée par une IPP isomérase³¹.



Figure 6 : Structure de l'IPP et du DMAPP

La synthèse des isoprénoïdes débute par une réaction de condensation de ces deux sous unités IPP et DMAPP (Figure 7). La condensation de type « tête-queue » de l'IPP sur le DMAPP permet en premier lieu la synthèse du diphosphate de géranyle (GPP), le précurseur des monoterpènes présent dans les essences végétales telles que le menthol et le limonène. Une condensation de type « tête-queue » de l'IPP et du GPP permet la formation du diphosphate de farnésyle (FPP), précurseur des sesquiterpènes tels que l'humulène. À partir de ce précurseur FPP deux synthèses différentes peuvent avoir lieu, soit « tête-queue », soit « tête-tête ».

Une condensation « tête-queue » de l'IPP sur le FPP conduit à la formation du diphosphate de géranylgeranyle (GGPP), précurseur des diterpènes tels que le taxol. Les différentes réactions d'élongation sont catalysées à l'aide d'enzymes de la famille des prényltransférases³². Une condensation « tête-tête » de deux molécules de FPP conduit à la synthèse de diphosphate de présqualène, précurseur des triterpènes tels que les stérols.

La condensation « tête-tête » de deux molécules de GGPP conduit à la synthèse des tétraterpènes tels que les caroténoïdes. Différentes réactions de cyclisation des précurseurs acycliques suivies de transpositions et d'oxydations permettent d'obtenir des dizaines de milliers d'isoprénoïdes.

Les deux précurseurs IPP et DMAPP permettent donc la synthèse de nombreuses molécules essentielles à la survie des organismes vivants. La synthèse de ces précurseurs dépend de deux voies de biosynthèse : la voie du mévalonate (MVA) et la voie du méthylérythritol (MEP).

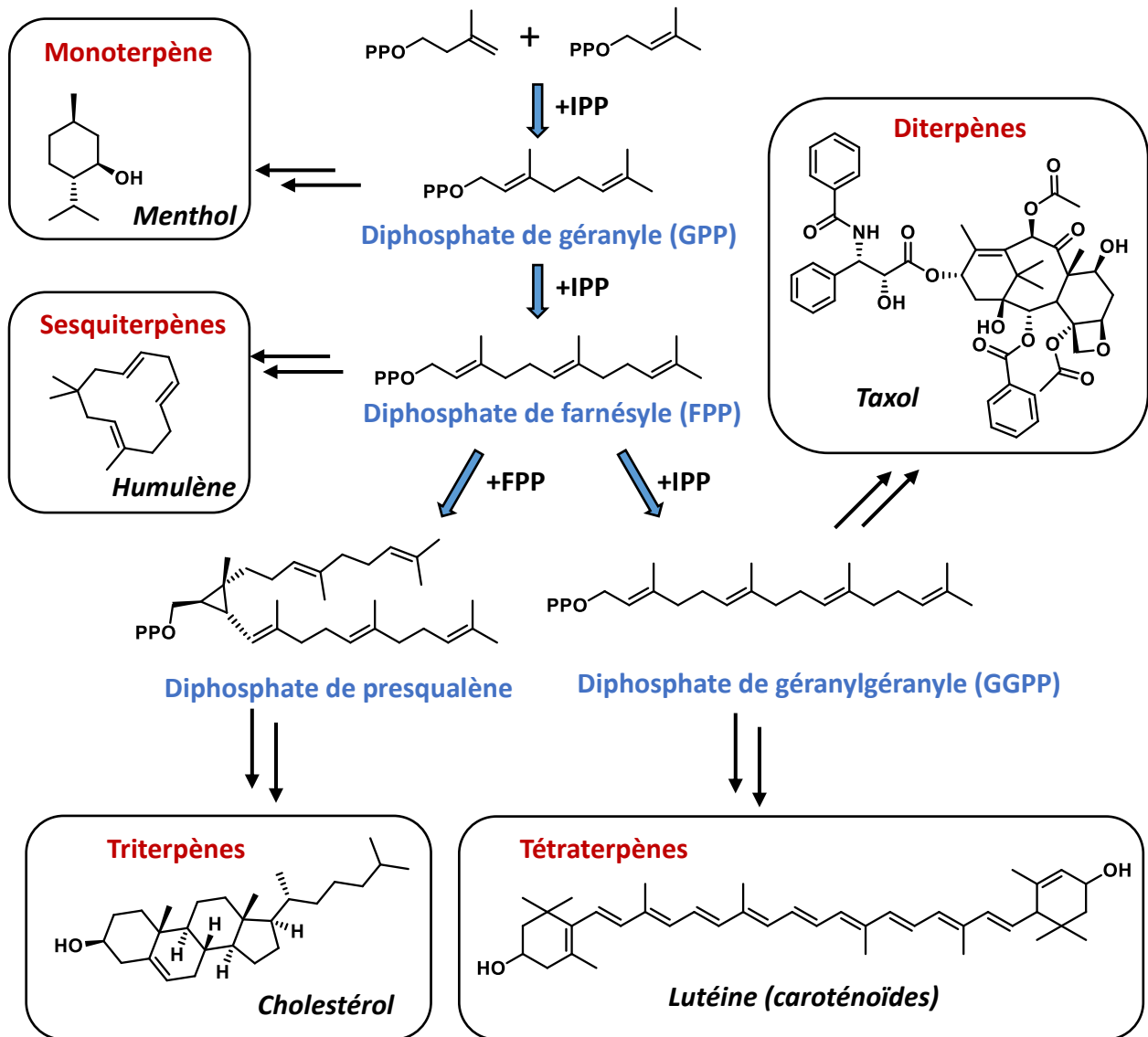


Figure 7 : Biosynthèse des terpénoïdes à partir de l'IPP et du DMAPP.

1.3 La voie du mévalonate (MVA)

Dans les années 1950, l'étude de la biosynthèse du cholestérol a permis la découverte de la voie du MVA³³. De nombreuses recherches ont été effectuées notamment par Konrad Bloch, Feodor Lynen et John Cornforth pour élucider cette voie de biosynthèse des isoprénoïdes³⁴ (Schéma 1).

Cette voie est initiée par une condensation de Claisen de deux molécules d'acétyl-CoA catalysée par l'acétoacétyl-CoA thiolase (AACT) suivie d'une deuxième condensation entre le β -cétothioester et une autre molécule d'acétyl-CoA catalysée par la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A synthase (HMG-CoAS). Deux réactions successives de réduction

de l'HMG-CoA par le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) catalysées par la HMG-CoA réductase (HMGR) permettent d'obtenir le mévalonate (MVA) et la libération d'une molécule de HS-CoA. Cette dernière réaction est la cible d'inhibiteur de la famille des statines³⁵ utilisées pour réduire la production de cholestérol chez l'humain. Les étapes suivantes mettent en jeu deux molécules d'adénosine triphosphate (ATP). Les formations du mévalonate 5-phosphate et du mévalonate 5-diphosphate sont catalysées respectivement par la mévalonate kinase (MK) et la phosphomévalonate kinase (PMK)³⁵. Le mévalonate 5-diphosphate après phosphorylation de l'alcool tertiaire par l'ATP est converti en IPP par la diphosphomévalonate décarboxylase (MDD). L'IPP est isomérisé en DMAPP par une isomérase diphosphate (IDI).

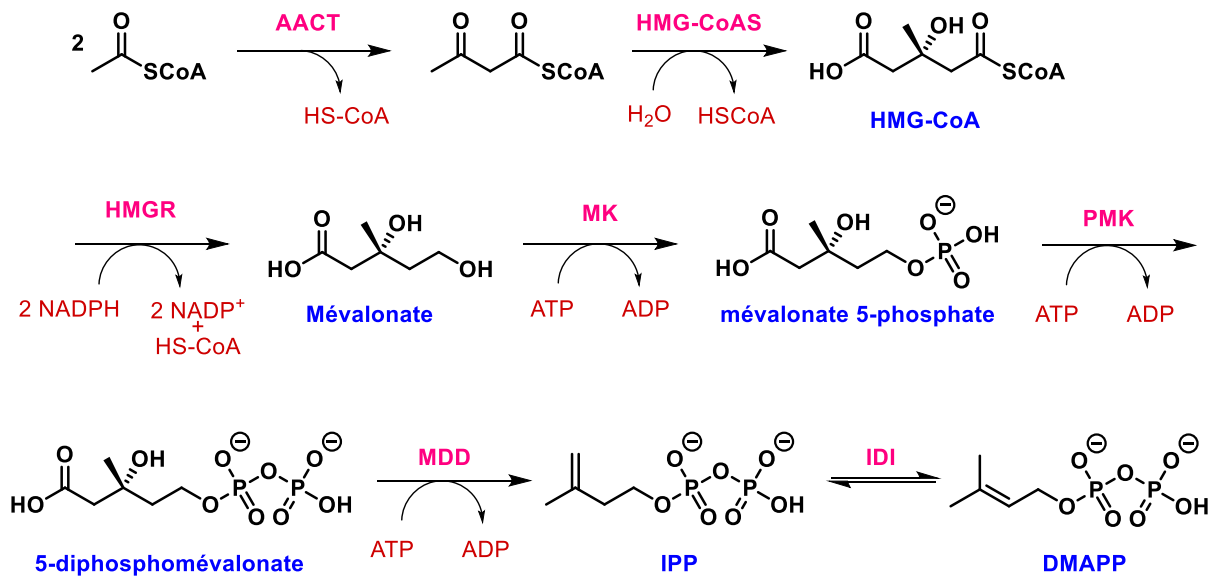


Schéma 1 : Voie du mévalonate (MVA).

Des études récentes ont montré que la plupart des archées et certaines bactéries Chloroflexi possèdent des enzymes et des intermédiaires relativement différents de la voie classique (MVA). À ce jour, trois voies modifiées différentes ont été découvertes : la voie MVA de type haloarchée³⁶, la voie MVA de type Thermoplasma³⁷ et la voie MVA des archées (type *aeropyrum*). En effet, une nouvelle voie passant par le trans-anhydromévalonate (Schéma 2) a été découverte récemment dans une archée hyperthermophile *Aeropyrum pernix*³⁸. Suite à des alignements de séquences, il semblerait que cette voie type *aeropyrum* soit présente chez la plupart des archées et a donc été renommée par les auteurs³⁸, voie des archées.

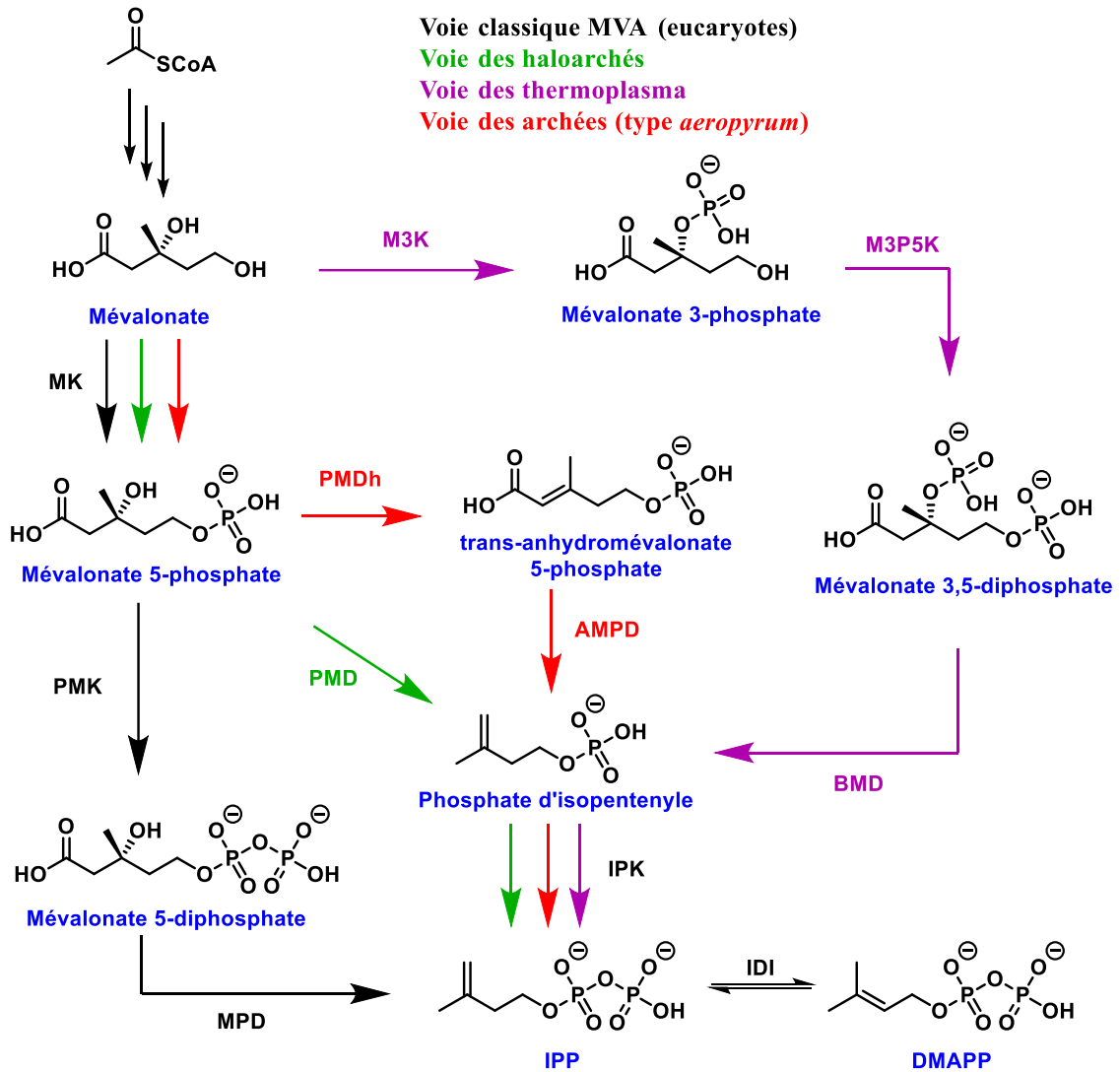


Schéma 2 : Voie alternative à la voie classique MVA. M3K : mévalonate 3-kinase; M3P5K : mévalonate 3-phosphate 5-kinase; BMD : bisphosphomévalonate décarboxylase; IPK : isopentényle phosphate kinase; PMDh : phosphomévalonate déhydratase; AMPD : anhydromévalonate phosphate décarboxylase; PMD : phosphomévalonate décarboxylase.

1.4 La voie du méthylérythritol phosphate (MEP)

Pendant longtemps la voie du mévalonate était considérée comme l'unique voie de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP, les précurseurs de tous les isoprénoïdes. Cependant, des études réalisées sur des bactéries, des algues et des plantes viennent contredire cette certitude. À la fin des années 50, J. W. Porter et collaborateurs ont montré que le [2-¹⁴C]MVA ne semblent pas être incorporés dans le β-carotène de l'algue verte unicellulaire *Chlorella pyrenoidosa*³⁹. T. Ramasarma et T. Ramakrishnan ont montré que *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium phlei* n'incorporent pas les molécules marquées [2-¹⁴C]MVA et [2-¹⁴C]acétate dans la vitamine

K_2^{40} . Suite à ce défaut d'incorporation, l'hypothèse d'une voie de synthèse différente de la voie MVA a été posée. Padian *et al.*⁴¹ ont émis l'hypothèse d'une autre voie de biosynthèse chez les bactéries, appelée la voie de l'acétolactate, en étudiant l'incorporation de $[1-^{14}C]$ et $[2-^{14}C]$ acétate dans la chaîne latérale polyprénylle des ubiquinones chez les bactéries *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas sesami*, *Escherichia coli* et *Rhodopseudomonas capsulata*. Cependant, cette théorie a été réfutée quelques années plus tard par les travaux de Zhou et White qui ont démontré l'absence d'incorporation de [méthyl- 2H_6]valine, un intermédiaire de la voie de l'acétolactate proposée, dans l'ubiquinone⁴².

Finalement, dans les années 1990, une nouvelle voie de synthèse de l'IPP et du DMAPP a été découverte en parallèle par le groupe de M. Rohmer et le groupe de D. Arigoni.

L'équipe du Prof. Rohmer a identifié les précurseurs initiaux responsables de la formation de l'IPP et leur origine métabolique en utilisant des expériences de marquage au $[^{13}C]$ -glucose chez *Zymomonas mobilis* suivies de l'analyse des triterpènes⁴³. Le glucose est métabolisé par cette bactérie selon la voie d'Entner-Doudoroff qui conduit à la production du pyruvate et du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Ce dernier est ensuite converti en plusieurs phosphates de trioses. En utilisant du glucose marqué en position C-1, C-2, C-3, C-5 et C-6 l'origine de chaque carbone de l'IPP chez *Z. mobilis* a pu être suivi. Il a pu être montré que le carbone C-3 de l'IPP provient du C-2 ou du C-5 du glucose et le C-5 de l'IPP provient du C-1 ou du C-4 du glucose (Figure 8). Les C-1 et C-2 de l'IPP proviennent respectivement des C-4 et C-5 du glucose et C-4 de l'IPP provient du C-6 du glucose. Les carbones C-4, C-5 et C-6 proviennent d'un intermédiaire de la voie des phosphates de trioses.

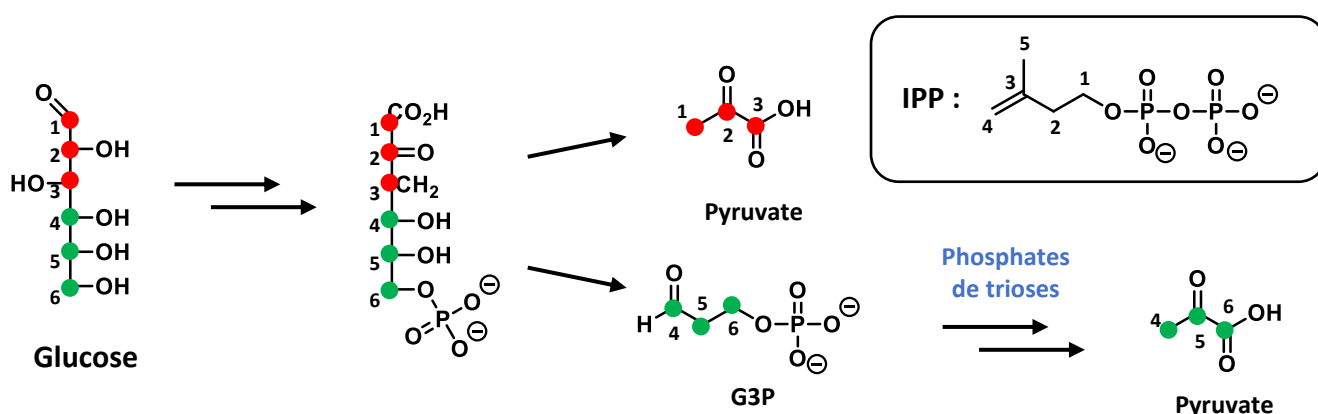


Figure 8 : La dégradation du glucose dans *Z. mobilis* selon la voie d'Entner-Doudoroff.

Afin d'identifier cet intermédiaire, différents mutants d'*E. coli* présentant une déficience pour une des enzymes de la voie des phosphates de trioses ont été construits. Ces mutants ont besoin de glycérol et de pyruvate pour croître. Des expériences d'incorporation de glycérol ou de

pyruvate marqué au ^{13}C suivie de analyse de l'ubiquinone par ^{13}C -RMN ont permis de conclure que les carbones C-4, C-5 et C-6 proviennent du glycéraldéhyde-3-phosphate⁴⁴.

En parallèle, l'équipe du Prof. D. Arigoni a incorporé du D-[5,5- $^2\text{H}_2$] et du [1- ^2H]-D-1-déoxyxylulose dans *E. coli* en présence de glucose non marqué et a montré que ces molécules marquées sont incorporées dans l'ubiquinone laissant entrevoir que le déoxyxylulose-phosphate pourrait être un intermédiaire de cette voie⁴⁵. Cette équipe a aussi montré en utilisant des cultures d'embryons de la plante *Ginkgo biloba* que les deux voies de biosynthèse de l'IPP étaient présentes dans ce végétale. En effet, les auteurs ont montré que l'unité isoprénoïque des stérols était synthétisée selon la voie du MVA alors que les Ginkgolides (diterpènes) étaient synthétisés selon la nouvelle voie⁴⁶.

Depuis la découverte de cette voie de biosynthèse qui a été appelée voie du MEP, de nombreuses études ont été réalisées et toutes les enzymes et substrats ont été identifiés (Schéma 3).

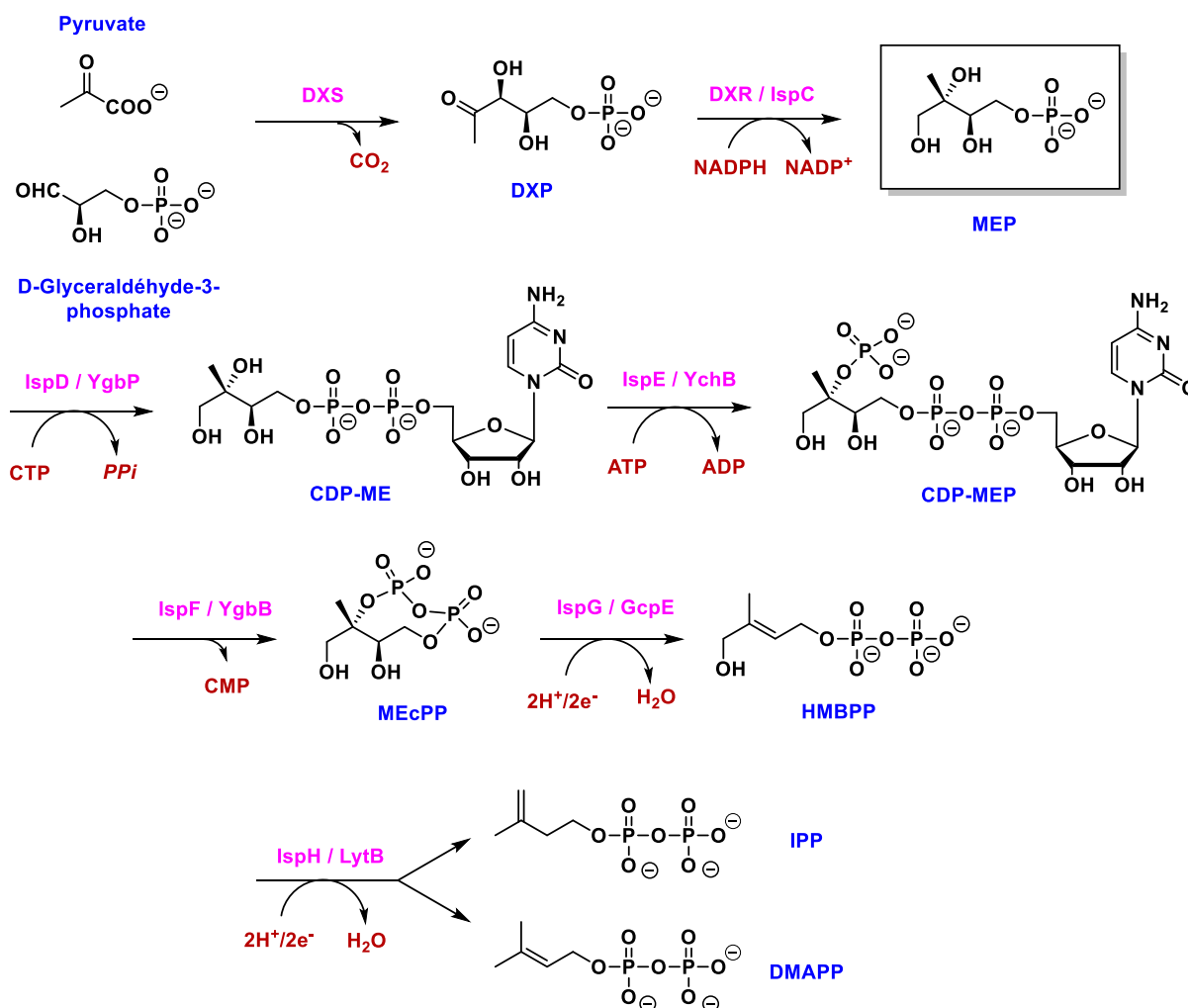


Schéma 3 : Voie du méthylérythritol phosphate.

La voie du MEP débute par la condensation du G3P avec le pyruvate pour former le 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS). Le DXP subit ensuite un réarrangement et une réduction par l'enzyme 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate réductoisomérase (IspC ou DXR) en présence de NADPH pour former le 2-C-méthylérythritol-4-phosphate (MEP). Le MEP est alors transformé en 4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol (CDP-ME) par l'enzyme 4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol synthase (IspD ou YgbP) en présence de cytidine triphosphate (CTP). Puis, le CDP-ME est phosphorylé par l'enzyme 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol-2-phosphate kinase (IspE ou YchB) pour conduire au 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol-2-phosphate (CDP-MEP). L'enzyme 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF ou YgbB) catalyse la cyclisation du CDP-MEP par la libération d'un cytidine monophosphate (CMP) pour former le 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate (MEcPP). Ce dernier est converti en diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-3-méthyl-but-2-ényle (HMBPP) par une enzyme sensible à l'oxygène, la (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate synthase (IspG ou GcpE). La dernière étape est la formation simultanée des molécules d'IPP et DMAPP par une autre enzyme sensible à l'oxygène, la 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate réductase (IspH ou LytB).

Cette voie du MEP suscite beaucoup d'intérêt pour la découverte de nouveaux antibactériens et d'herbicides en développant des inhibiteurs d'enzymes appartenant à cette voie. En effet, la voie du MEP est présente chez la plupart des bactéries et des apicomplexes (ex. *Plasmodium vivax*) à l'inverse de la voie du MVA qui est présente chez les eucaryotes (humains, animaux, champignons), les archées et quelques bactéries. Chez les plantes, les deux voies sont présentes. En effet, la voie du MVA, présente dans le cytoplasme permet de synthétiser du FPP précurseur des stérols alors que la voie du MEP, localisée dans les chloroplastes, permet la synthèse des diterpènes comme le phytol et est donc également à l'origine des caroténoïdes⁴⁷.

Cette différence métabolique, entre l'être humain et les bactéries possédant la voie du MEP, peut être exploitée afin de développer des médicaments spécifiques et ainsi limiter les effets secondaires chez l'Homme.

Les différentes enzymes de la voie du MEP seront présentées dans les paragraphes suivants ainsi qu'une sélection d'inhibiteurs.

1.4.1 La 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase : DXS

L'enzyme DXS catalyse la formation de DXP à partir du pyruvate et du G3P (Schéma 3). Cette réaction implique une condensation acyloïne entre le pyruvate décarboxylé et le G3P. Ce type de réaction peut être réalisé par des enzymes dépendantes du cofacteur diphosphate de thiamine (TDP), telles que la pyruvate déshydrogénase (PDHC- sous unité E1), la pyruvate décarboxylase ou une transcétolase.

Deux travaux indépendants ont étudié le génome d'*E. coli* afin de déterminer l'enzyme responsable de la formation de DXP. Sprenger *et al.* ont identifié un cadre de lecture ouvert (ORF en anglais) ayant une homologie avec des transcétolases et la sous unité E1 de PDHC⁴⁸. En parallèle, les groupes de M. Rohmer et de A. Boronat ont émis l'hypothèse qu'un opéron pouvait regrouper les gènes de plusieurs enzymes impliquées dans la voie du MEP et se sont intéressés aux gènes entourant *ispA* d'*E. coli*⁴⁹. Le gène *ispA* code pour une farnésyl-diphosphate synthase qui est connue pour faire partie de la biosynthèse des isoprénoïdes. Après clonage des gènes identifiés et expression des enzymes correspondantes, ces travaux indépendants ont montré que ces enzymes permettaient de catalyser la formation de DXP à partir de pyruvate et de G3P.

La DXS a besoin du diphosphate de thiamine (TDP) pour catalyser la formation de DXP. Ce cofacteur doit être activé avant de pouvoir réagir avec le pyruvate. Lorsqu'il est lié au site actif de l'enzyme, le TDP adopte une conformation en V qui amène le N-4 du cycle aminopyrimidine à proximité immédiate du C-2 du cycle thiazolium. Le N-4 du tautomère imine déprotonne le C-2 pour générer un ylure⁵⁰ (Schéma 4).

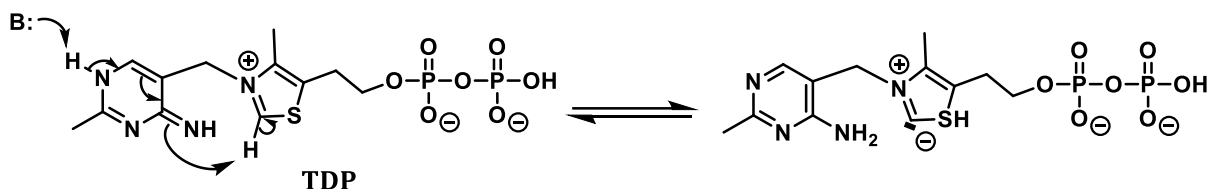


Schéma 4 : Le cofacteur TDP et la formation de l'ylure.

La déprotonation convertit le cycle thiazolium en ylure qui va faire une addition nucléophile sur le pyruvate conduisant après décarboxylation à une énamine. L'addition nucléophile de

l'énamine sur G3P suivie d'une déprotonation conduit à la formation de DXP et la libération de l'ylure de départ. Le mécanisme catalytique de la DXS est illustré par le Schéma 2.

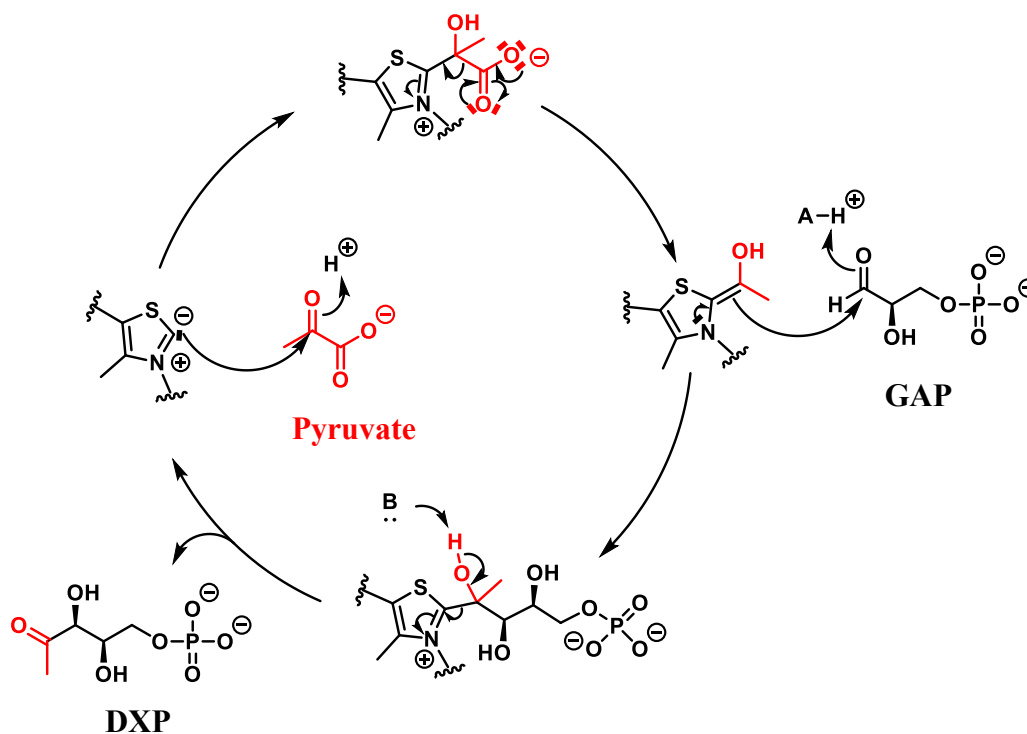


Schéma 5 : Conversion du pyruvate et du G3P en DXP en présence du TDP activé.

Les premières structures cristallographiques de l'enzyme DXS, publiées en 2007, sont celles d'*E. coli* (PDB : 2O1S) et de *Deinococcus radiodurans* (Figure 9A, B) (PDB : 2O1X) en présence de magnésium et du diphosphate de thiamine (TDP).

En 2019, Chen *et al.*⁵¹ cristallisent des structures de DXS en présence de mimes de pyruvate, le méthylacétylphosphonate (MAP), lié au TDP donnant la molécule TDK (Figure 9C) et le diphosphate de 2-acétyl-thiamine (HTL, Figure 9D). Ces différentes structures fournissent des informations pour les futures études structurales et pour la conception rationnelle d'inhibiteurs.

Cependant, il existe peu de structures cristallographiques de DXS. D'autres méthodes ont été développées afin de concevoir de manière rationnelle de nouveaux inhibiteurs sans structures cristallographiques.

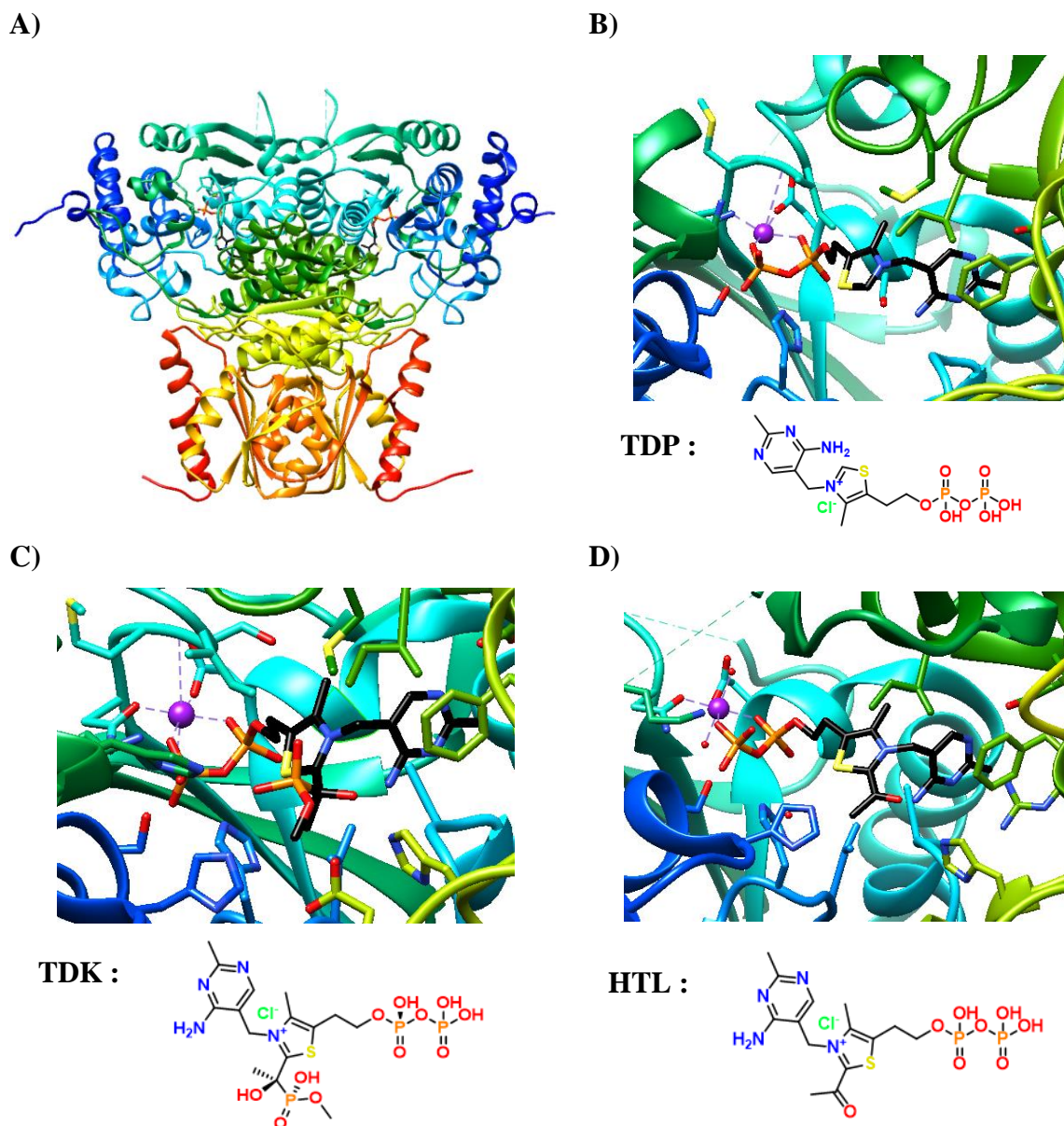


Figure 9 : Structure cristallographique de DXR chez *D. radiodurans*. A) Structure dimérique de DXR (2O1X). B) Cofacteur TDP situé dans le site actif (2O1X). C) TDK situé dans le site actif (6OUV). D) HTL situé dans le site actif (6OUW).

L'équipe d'A. Hirsch a réalisé un design *de novo* de fragment par des calculs de docking à partir de la structure de la DXS de *D. radiodurans*. En complément du docking, une combinaison de trois technique RMN permet l'élucidation du mode de liaison du fragment pour la protéine. C'est une méthode innovante basée sur les ligands qui est appelée STI (STD-TrNOE-INPHARMA). Ainsi, l'optimisation de leur fragment, analogue de la thiamine A (Figure 10) a été réalisé en suivant cette méthode et a permis de synthétiser un inhibiteur, l'analogue de thiamine B montrant une constante d'inhibition K_i de 151 μM de *D. radiodurans*⁵² (Figure 10). La différence de transfert de saturation (STD) et le transfert NOE (trNOE) ont permis de

confirmer la liaison du fragment optimisé et sa conformation, puis la méthode INPHARMA⁵³ (Inter-ligands Nuclear Overhauser Effect for Pharmacophore Mapping) a démontré que ce fragment optimisé se lie dans le même site de fixation qu'un autre fragment (analogue de thiamine) qui se lie dans le site de liaison du TDP (substrat).

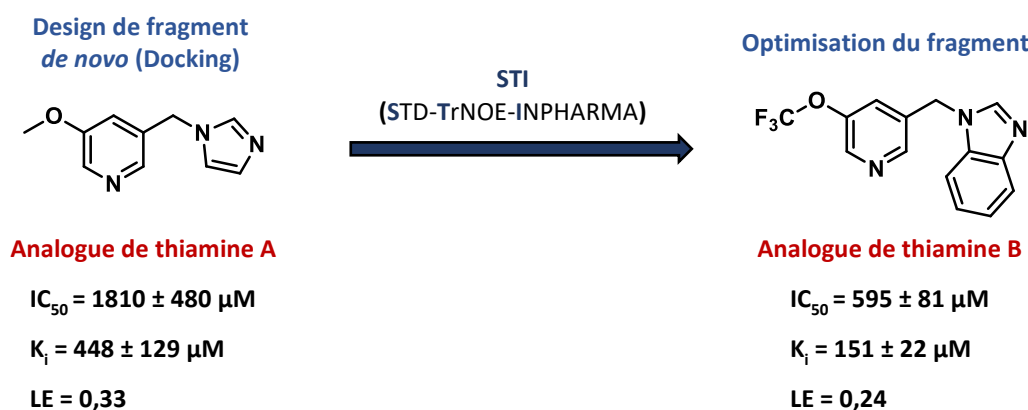


Figure 10 : Optimisation de fragment réussi.

Plus récemment, le groupe de C. Freel Meyers a conçu une série de molécules dans le but de développer un inhibiteur bi-substrat se liant dans le site de fixation de l'adduit pyruvate-TDP et dans le site de fixation de G3P⁵⁴. Pour cela, l'adduit pyruvate-TDP a été mimé par un phosphonate d'acétyle et le phosphate du G3P par un acide carboxylique chargé négativement. Les deux entités ont été liées en utilisant la cycloaddition alcyne-azide catalysée par le cuivre(I) (CuAAC) entre l'alcyne de phosphonate d'acétyle (AP) et l'azoture dérivé de la D-phénylalanine (D-Phe).

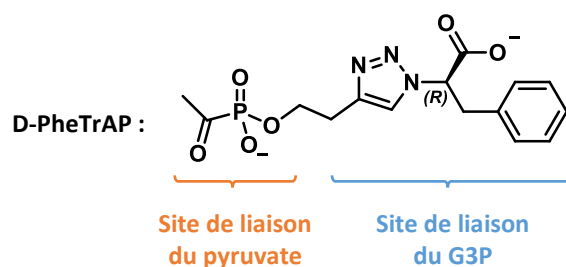


Figure 11 : Structure du dérivé de la D-phénylalanine (D-PheTrAP)

Ainsi, ils ont obtenu un phosphonate d'acétyle de triazole dérivé de la D-phénylalanine (D-PheTrAP, Figure 11) qui est l'inhibiteur bi-substrat le plus efficace à ce jour avec une constante d'inhibition K_i de 90 ± 10 nM pour l'enzyme DXS.

1.4.2 La 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate réductoisomérase : IspC

L'enzyme IspC, appelée également DXR, catalyse la formation de MEP à partir du DXP. La découverte et la caractérisation d'IspC se sont faites en plusieurs étapes. Dans un premier temps, Duvold *et al.*⁵⁵ ont montré que du 2-C-méthyl-D-érythritol (ME) marqué au deutérium a été incorporé dans l'ubiquinone chez *E. coli* montrant ainsi qu'un dérivé du ME est un intermédiaire de la voie du MEP. Dans un second temps, Seto *et al.*⁵⁶ ont identifié le gène *yaeM* codant pour l'enzyme responsable de la synthèse du MEP en sélectionnant des mutants d'*E. coli* qui poussaient sur un milieu minimum contenant du ME mais pas en absence de ME. La surexpression, la purification et la caractérisation de l'enzyme codée par le gène *yaeM* ont montré que l'enzyme catalyse le réarrangement du DXP en un aldéhyde intermédiaire suivi par une réduction en présence du cofacteur NADPH et des ions Mn^{2+} , Co^{2+} ou Mg^{2+} essentiels pour son fonctionnement. L'enzyme a été nommée plus tard DXR ou IspC et sa structure est représentée en Figure 13A en présence du DXP et de NADPH. Le cofacteur naturel de cette enzyme est le Mg^{2+} .

Au début de la caractérisation et de l'élucidation du mode d'action de la DXR, deux mécanismes ont été envisagés pour le réarrangement de DXP en aldéhyde, soit un réarrangement de type α -cétolique soit une réaction de type rétro-aldolisation/aldolisation (Figure 12).

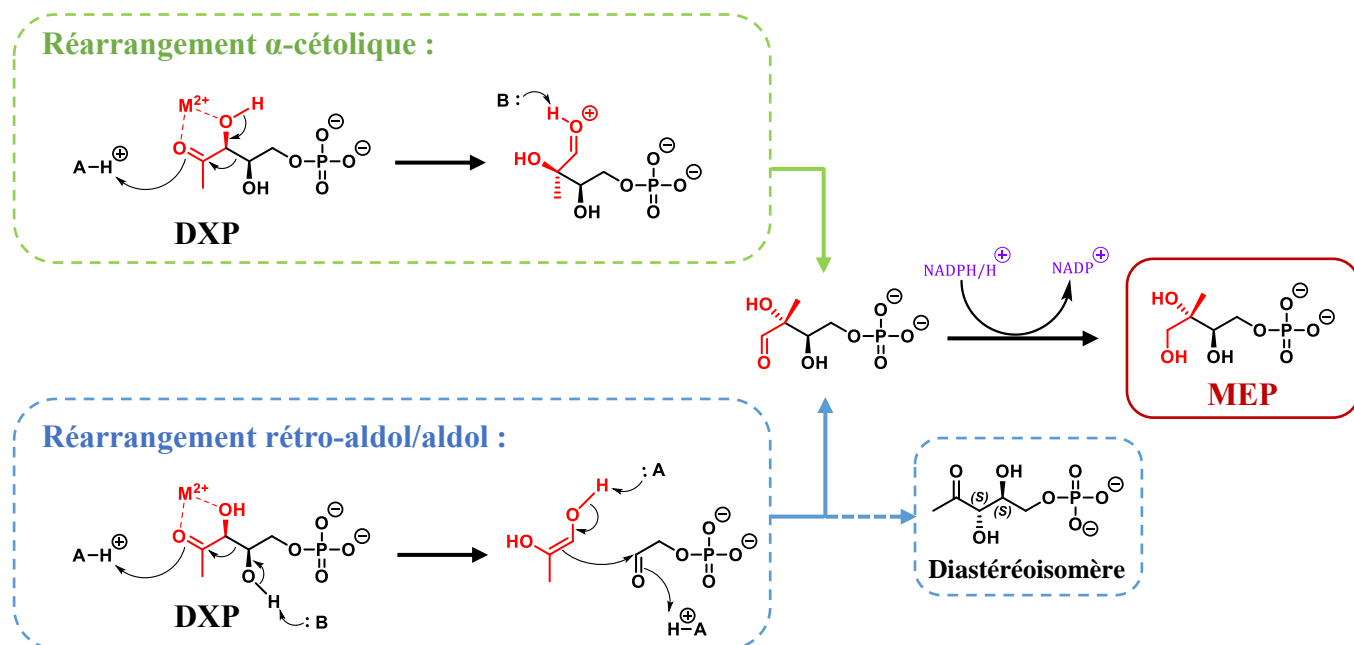


Figure 12 : Réarrangement et réduction du DXP en MEP catalysés par IspC.

En 2007, Cox *et al.* ont confirmé que la réaction catalysée par IspC est de type rétro-aldolisation/aldolisation en étudiant la formation d'un diastéréoisomère, dû à la rotation de l'aldéhyde en l'absence de l'ion Mg^{2+} , qui ne peut pas être synthétisé par une réaction de type α -cétonique⁵⁷.

Dans la même année, Seto *et al.*⁵⁸ ont publié la première structure cristallographique d'un complexe quaternaire de l'enzyme IspC d'*E. coli* en présence de NADPH (Figure 13B) et en présence d'un inhibiteur, la fosmidomycine, de Mg^{2+} et de NADPH (Figure 13C).

Quelques années plus tôt, Seto *et al.* avaient identifié la fosmidomycine, produit naturel de *Streptomyces lavendulae* et *S. rubellomurinus*, comme inhibiteur de la voie du MEP et plus précisément de l'enzyme DXR montrant une IC_{50} de 8,2 nM et un mode d'inhibition mixte conduisant avec un K_i de 38 nM⁵⁹ chez *E. coli*. La fosmidomycine se positionne dans le site actif du DXP (Figure 13 B, C) par complexation de sa fonction *N*-formyl-*N*-hydroxylamine (bidentate) avec l'ion Mg^{2+} .

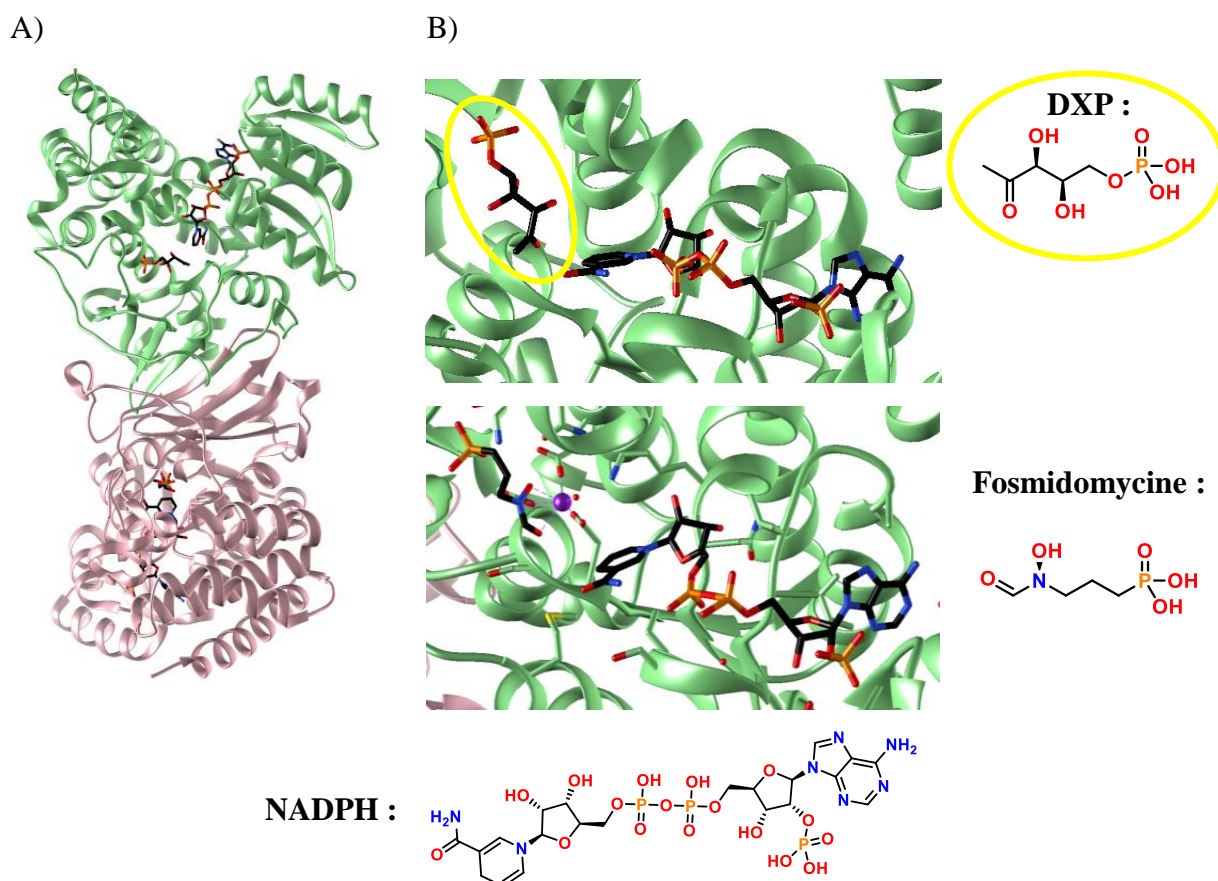


Figure 13 : Structure cristallographique d'IspC d'*E. coli*. A) Représentation de l'homodimère. B) Enzyme IspC d'*E. coli* en présence du substrat DXP et du cofacteur NADPH (PDB : 1Q0Q). C) Enzyme IspC d'*E. coli* en présence de l'inhibiteur fosmidomycine, du cofacteur NADPH et de Mg^{2+} (PDB : 2EGH).

À ce jour, la fosmidomycine est le seul inhibiteur de la voie du MEP à être en phase clinique. La plupart des développements de nouveaux inhibiteurs se basent sur la structure de la fosmidomycine afin d'améliorer l'efficacité de cet inhibiteur en modifiant les différentes parties de la fosmidomycine comprenant le groupement hydroxamate, la chaîne carbonée centrale et le groupement phosphonate⁶⁰. Ces dernières années la fosmidomycine a été étudiée pour le traitement de la malaria. La maladie est causée par cinq espèces de *Plasmodium* dont *Plasmodium falciparum* (Pf) qui est la plus répandue, causant 650 000 décès par an, principalement des enfants d'Afrique subsaharienne⁶¹. Des nouveaux inhibiteurs plus efficaces sur *Plasmodium falciparum* ont été synthétisés par analogie avec la structure de la fosmidomycine (Figure 14) pour lutter contre la malaria.

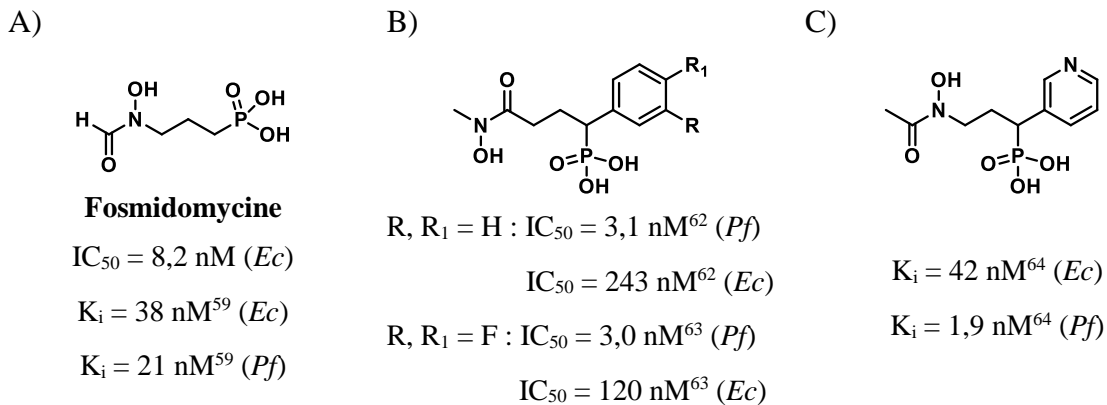


Figure 14 : Inhibiteurs de la DXR d'*E. coli* (*Ec*) et *Plasmodium falciparum* (*Pf*).

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition de la fosmidomycine, une approche par fragment a été essayée par Mercklé *et al.*⁶⁵. Des fragments de la fosmidomycine, plus précisément des analogues de phosphates ont été choisis par docking puis leur potentiel d'inhibition sur la DXS a été testée (Figure 15). Cependant, ces fragments n'ont pas montré d'inhibition supérieure à celle de la fosmidomycine malgré les affinités importantes déterminées par le docking.

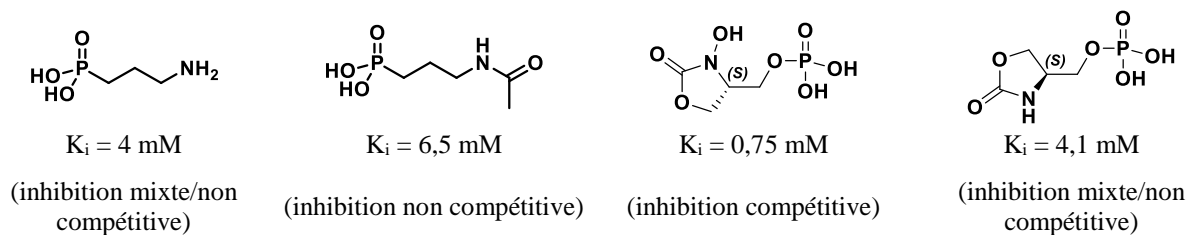


Figure 15 : Structures et constantes d'inhibition K_i des fragments analogues de phosphate synthétisés à partir du docking.

1.4.3 La 4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol synthase : IspD

Les premiers travaux pour identifier la troisième enzyme de cette voie ont été initiés par Rohdich *et al.*⁶⁶ par l'incubation de MEP radiomarqué ($[2-^{14}\text{C}]\text{MEP}$) avec des cellules d'*E. coli*. Ils ont été en mesure de purifier partiellement une enzyme capable de convertir le MEP en un produit inconnu. Ils ont pu montrer que la réaction catalysée fonctionnait mieux en présence de CTP que d'ATP. Après avoir isolé et purifié le produit inconnu, celui-ci a été identifié par RMN comme étant le 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol (CDP-ME, Schéma 3).

En recherchant dans les bases de données, le gène *acsI* de *Haemophilus influenzae* a pu être identifié et l'enzyme correspondante catalyse la formation de CDP-ribitol à partir de ribitol 5-phosphate et de CTP par le transfert d'un groupement cytidine monophosphate. La partie 5' du gène *acsI* de *H. influenzae* présente des homologies de séquences avec le gène *ygbP* non annoté de ce même organisme et pourrait exprimer une enzyme qui catalyse le même type de réaction. Des protéines homologues à YgbP ont également été trouvés dans différents organismes tels que *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Arabidopsis thaliana* et *Plasmodium falciparum* mais pas chez les archées. Ces informations pourraient indiquer que *ygbP* fait partie de la voie du MEP. La protéine YgbP (désignée plus tard IspD) a été purifiée à partir d'une souche recombinante d'*E. coli* surexprimant le gène *ygbP*. La protéine correspondante est un homodimère d'environ 50 kDa et les tests d'activités ont confirmé qu'elle catalyse la formation du CDP-ME à partir de MEP et de CTP en présence des ions Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+} .

Trois structures différentes d'IspD d'*E. coli* ont été résolues, l'apoenzyme (PDB : 1INJ), le complexe avec le CTP (PDB : 1I52) ou le CDP-ME (PDB : 1INI, Figure 16)⁶⁷. En s'appuyant sur ces structures cristallographiques et des bibliothèques de mutants du site actif d'IspD, Richard *et al.*^{67,68} ont caractérisé les acides aminés du site actif et montré que le CTP se lie en premier à l'enzyme, ce qui modifie l'environnement du site actif et favorise ensuite la liaison du MEP. La structure cristallographique du complexe IspD-CDP-ME (Figure 16) confirme un mécanisme impliquant une addition nucléophile du MEP sur le phosphate en α du CTP qui conduit à la formation d'un intermédiaire pentacoordiné⁶⁸.

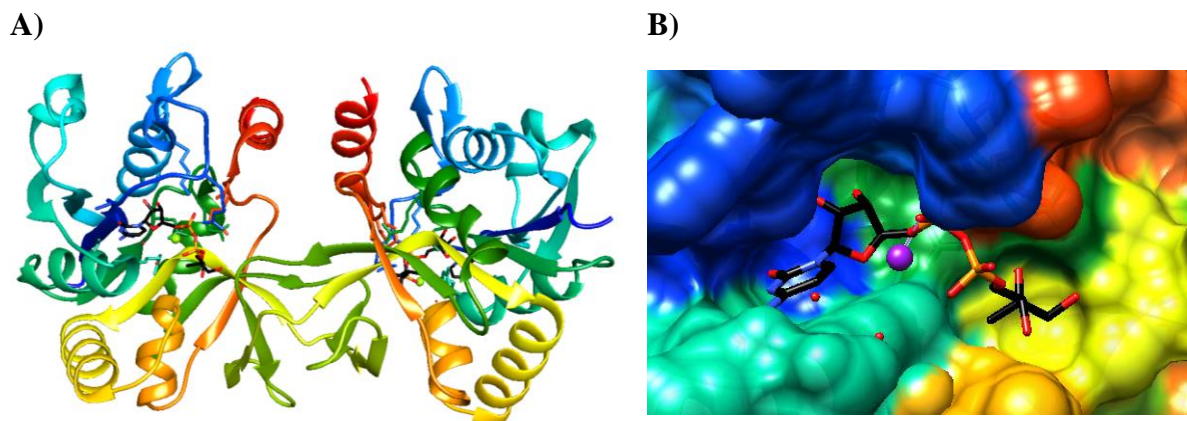


Figure 16 : Structure cristallographique d'IspD d'*E. coli* en présence du CDP-ME et de Mg^{2+} (PDB : 1INI). A) Représentation de l'homodimère. B) Représentation agrandi du site de fixation du CDP-ME en présence de Mg^{2+} qui est aussi le site de fixation du CTP et probablement du MEP.

La présence d'ions divalents est nécessaire à la réalisation du cycle catalytique et à l'obtention du CDP-ME et du diphosphate. Le cation divalent permet de stabiliser la formation de l'intermédiaire pentacoordiné et facilite ensuite le départ du groupe diphosphate⁶⁸. Le mécanisme d'IspD est représenté dans le Schéma 6.

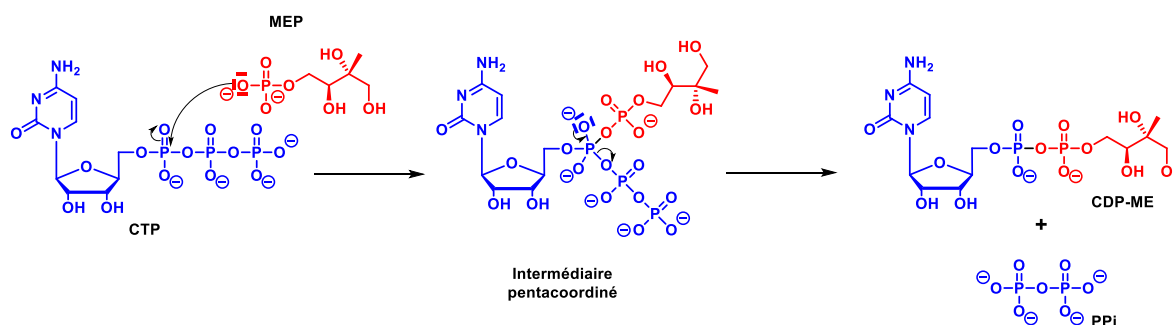


Schéma 6 : Mécanisme catalysé par l'enzyme IspD.

La conception d'un inhibiteur d'IspD de *Bacillus anthracis* est au centre de ces travaux de thèse. Ainsi, une partie concernant les inhibiteurs d'IspD décrits dans la littérature fait l'objet d'une autre sous partie de cette introduction (cf. 1.5).

1.4.4 La 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol-2-phosphate kinase : IspE

Les enzymes de la voie du MEP sont codées uniquement dans les organismes utilisant cette voie. Ainsi, la comparaison des données génomiques entre les organismes possédant la voie du MEP et ceux possédant la voie du MVA a permis d'identifier le gène *ychB* d'*E. coli*. Après surexpression de ce gène, une protéine de 31 kDa a été isolée et elle catalyse la formation

de CDP-MEP à partir de CDP-ME et d'ATP. Les auteurs ont confirmé que cette enzyme faisait partie de la voie du MEP en incubant dans les chloroplastes de *Capsicum annuum* du [2-¹⁴C]CDP-MEP qui a conduit à du β-carotène marqué⁶⁹. En parallèle de ce travail, Kuzuyama *et al.* ont également identifié et cloné le gène *ychB* d'*E. coli*⁷⁰. Ils ont isolé le produit de réaction de cette kinase à l'aide d'une purification par HPLC et ont caractérisé par RMN ¹H, ¹³C et ³¹P, le CDP-MEP⁷¹.

La première structure cristallographique d'un complexe ternaire d'IspE d'*E. coli* en présence de CDP-ME et d'AMP-PNP (Figure 17, adénylyl-imidodiphosphate - analogue structurel non hydrolysable de l'ATP) a été publiée en 2003 par Miallau *et al.*⁷² (Figure 18).

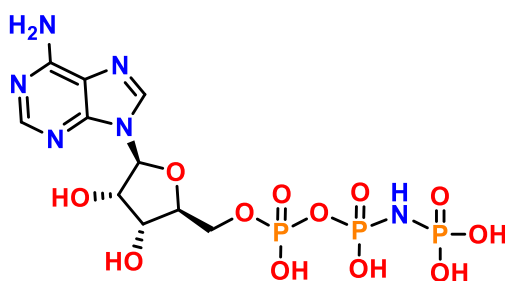
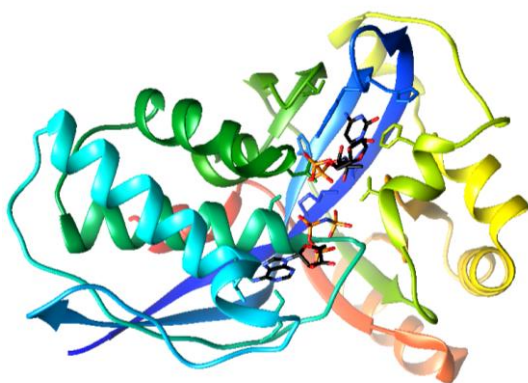


Figure 17 : Adénylyl-imidodiphosphate (AMP-PNP)

L'enzyme IspE est similaire à la famille des kinases GHMP (Galactose, Homosérine, Mévalonate, Phosphomévalonate) qui sont des enzymes ATP dépendantes. Comme les GHMP, IspE possède deux sites de liaison : un site ATP, et un site pour le substrat CDP-ME.

A)



B)

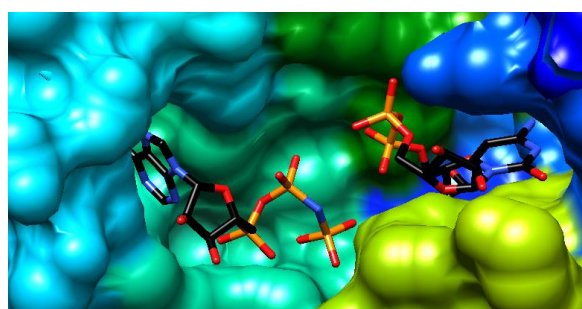


Figure 18 : Structure cristallographique de l'enzyme IspE d'*E. coli* et de son site actif (PDB : 1OJ4).

A) Enzyme IspE formant un complexe avec le CDP-ME et l'AMP-PNP. B) Agrandissement du site actif comprenant l'AMP-PNP (à gauche) et CDP-ME (à droite).

Les données cristallographiques et la ressemblance avec les kinases GHMP ont permis d'élucider le mécanisme d'IspE (Schéma 7) qui débute par l'addition nucléophile de la fonction alcool du C-2-OH du CDP-ME sur le γ -phosphate de l'ATP qui conduit à la formation d'un intermédiaire pentacoordiné qui engendre la formation du CDP-MEP et la libération d'adénosine diphosphate (ADP).

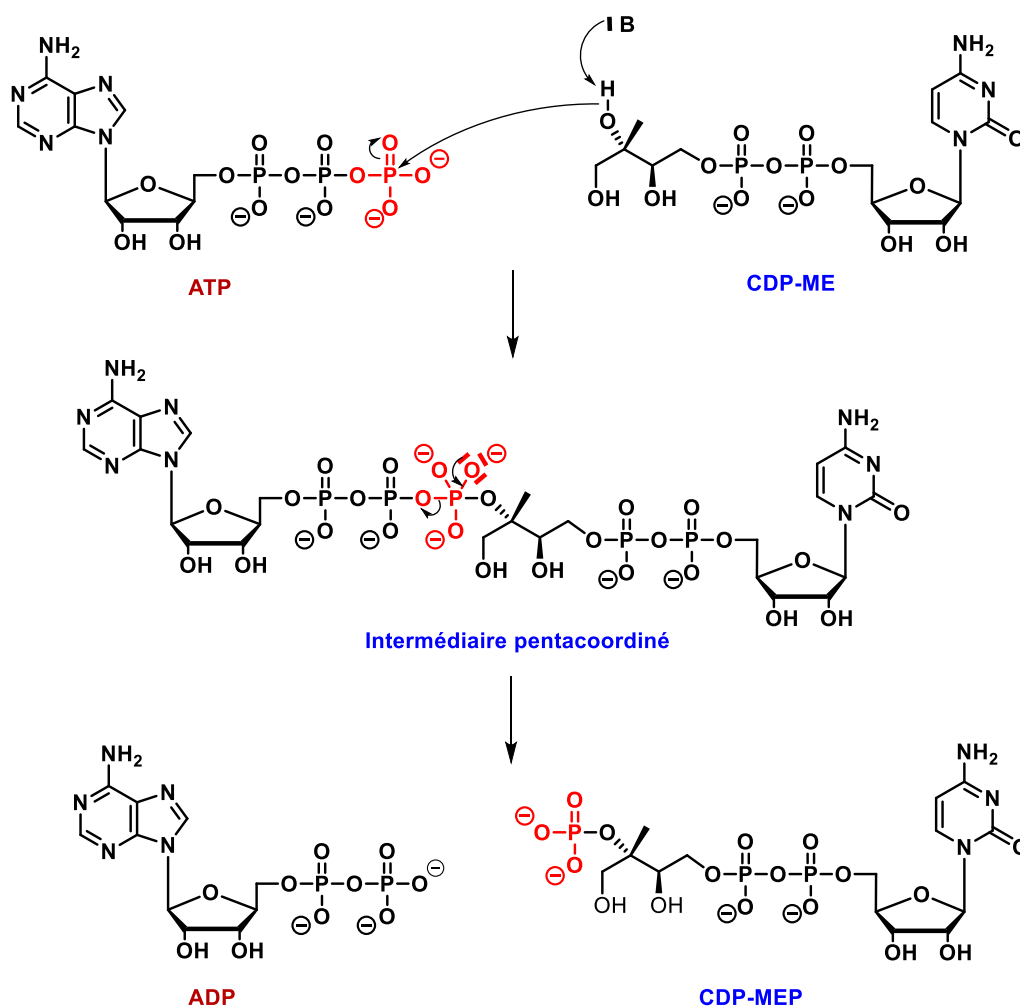


Schéma 7 : Mécanisme catalytique d'IspE.

L'enzyme IspE d'*E. coli* présente entre 30 et 38 % d'identité et montre une structure similaire avec les enzymes IspE de *M. tuberculosis* (PDB : 3PYD), *Thermus thermophilus* (PDB : 1UEK) et *Aquifex aeolicus* (PDB : 2V2Z). La conception d'un inhibiteur spécifique d'IspE devrait cibler les sites de liaison du substrat CDP-ME, et non le site de l'ATP pour des raisons de sélectivité par rapport aux kinases présentes chez l'humain.

En 2007, Hirsch *et al.* ont synthétisé des inhibiteurs ciblant spécifiquement le site CDP-ME. Un inhibiteur, le « Composé 12 » d'IspE d'*E. coli* a ainsi été obtenu et montre une constante K_i

de 290 nM⁷³ (Figure 19A). D'autres exemples d'inhibiteurs d'IspE sont des analogues de la cytidine comme par exemple l'inhibiteur NVG de *A. aeolicus* qui a été cristallisé dans le site de liaison de la partie CDP⁷⁴ (Figure 19B).

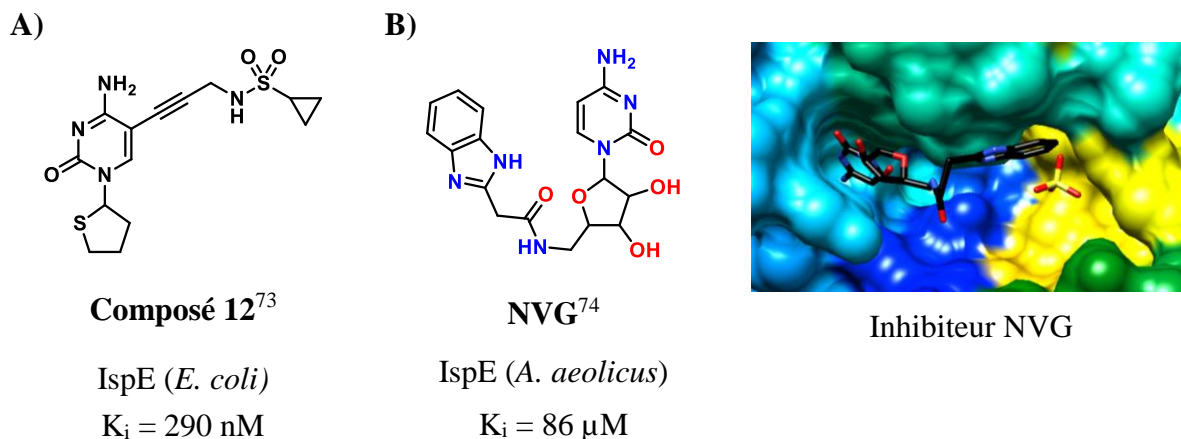


Figure 19 : Inhibiteurs de l'enzyme IspE. A) Structure d'un inhibiteur de IspE d'*E. coli*. B) Représentation de la structure de l'inhibiteur NVG de *A. aeolicus* et de sa représentation tridimensionnelle dans le site actif d'IspE en présence d'ion sulfate SO_4^{2-} (PDB : 2V2Q).

1.4.5 La 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase : IspF

Lors de la découverte du gène *ygbP* codant pour IspD, Rohdich *et al.* ont constaté que ce gène était étroitement lié au gène non annoté *ygbB* sur le chromosome d'*E. coli*⁶⁶, et que ces deux gènes pourraient être co-transcrits. Ces deux gènes ont également été trouvés dans des positions adjacentes sur les chromosomes de 21 autres bactéries, ce qui suggère que la protéine YgbB est impliquée dans la voie du MEP. Le gène *ygbB* surexprimé chez *E. coli* a permis de purifier une protéine de 17 kDa qui catalyse la formation de MEcPP lorsqu'elle est incubée avec du CDP-MEP et en présence d'un cation divalent (Mg^{2+} ou Mn^{2+})⁶⁶.

L'incubation de $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{MEcPP}$ chez des chromoplastes isolés de *Capsicum annuum* conduit à la production de caroténoïdes marqués, confirmant ainsi que le MEcPP est un produit de la voie du MEP. Le mécanisme de l'enzyme YgbP, appelée aussi IspF est décrit dans le Schéma 8.

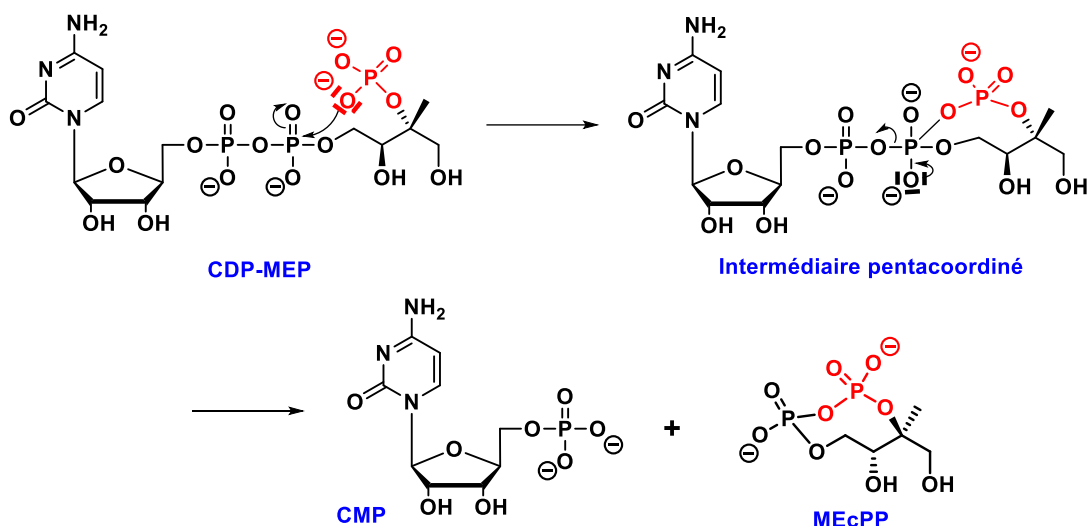


Schéma 8 : Mécanisme catalytique d'IspF.

L'enzyme IspF catalyse l'addition nucléophile du 2-phosphate (C-2 du ME) sur le 4-phosphate (C-4 du ME) conduisant à un intermédiaire pentacoordiné puis à la formation de MEcPP et de CMP⁷⁵.

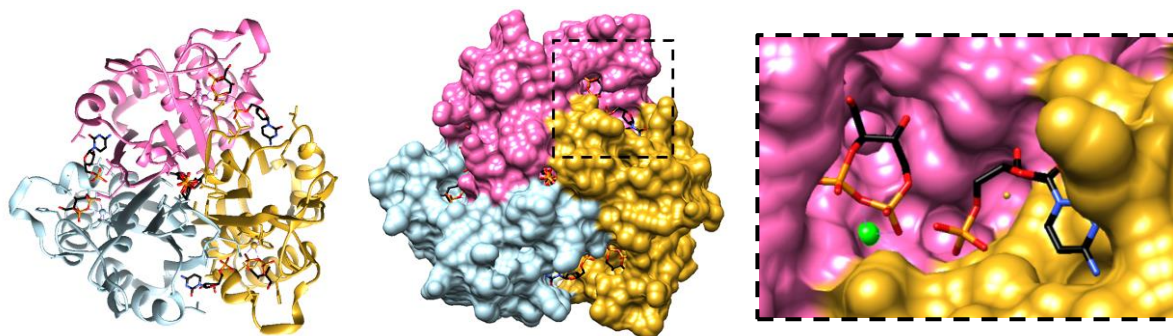


Figure 20 : Structure cristallographique de l'enzyme IspF avec ses produits de réaction MEcPP et CMP (PDB :1H48).

Malgré de nombreuses études sur la structure et le mécanisme d'IspF, peu d'inhibiteurs ont été décrits dans la littérature. Parmi ceux-ci, un composé non analogue de la cytidine, un dérivé de la thiazolopyrimidine, a été décrit par Geist *et al.* en 2010⁷⁶. Il possède des IC₅₀ remarquables de 9.6 μM (*P. falciparum*) et 6.1 μM (*M. tuberculosis*) sur IspF (Figure 21A).

En 2011, Begley et collaborateurs réalisent un criblage de fragments sur IspF de *Burkholderia pseudomallei* par RMN et des structures cristallographiques des complexes IspF-fragments ont ensuite permis de confirmer les modes de liaison des fragments avec l'enzyme^{77a}. Après

optimisation par synthèse de leurs fragments (« fragment linking » cf.1.6.2.3), un composé montrant une constante de dissociation K_D de 70 μM pour le site actif (Figure 21B, C), a été obtenu. Ce K_D est équivalent à celui de la cytidine diphosphate (partie du substrat de l'enzyme, $K_D = 75 \mu\text{M}$). Cependant, ce composé ne montre aucune activité antibactérienne sur *B. pseudomallei*^{77b}.

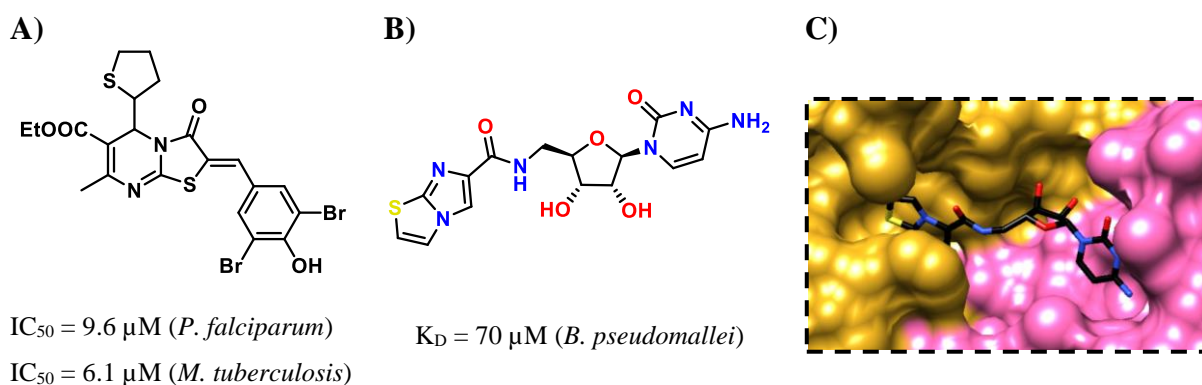


Figure 21 : Inhibiteurs de l'enzyme IspF. A) Dérivé de thiazolopyrimidine. B) Analogue du CTP. C) Structure cristallographique d'IspF de *B. pseudomallei* avec son inhibiteur, analogue du CTP (PDB : 3Q8H).

1.4.6 IspDF enzyme bifonctionnelle

Lorsque les premiers cadres de lecture ouverts (Open Reading Frame, ORF) codant pour les enzymes IspD et IspF ont été découverts, ils ont permis de mettre en évidence que plusieurs bactéries contiennent les deux gènes *ygbP* et *ygbB* fusionnés en une seule séquence⁶⁶, laissant supposer l'expression d'une enzyme bifonctionnelle dotée des activités catalytiques correspondantes à celles de IspD et IspF. La première étude réalisée sur IspDF de *Campylobacter jejuni* par Hunter et collaborateurs a montré que cette enzyme convertit le MEP en CDP-ME et le CDP-MEP en MEcPP. La présence d'IspE et d'ATP sont nécessaires pour transformer le CDP-ME en CDP-MEP. Un marquage au ¹³C du CDP-MEP a permis de caractériser sa transformation en MEcPP par catalyse d'IspDF. La présence d'ion divalent est nécessaire au fonctionnement de l'enzyme⁷⁸. Les mécanismes sont similaires à ceux d'IspD et d'IspF et ne sont donc pas décrits.

La première structure cristalline d'IspDF de l'enzyme *Campylobacter jejuni* montre une architecture claire à deux domaines visibles avec les parties N et C-terminales de la protéine correspondant respectivement à IspD et IspF (Figure 22).

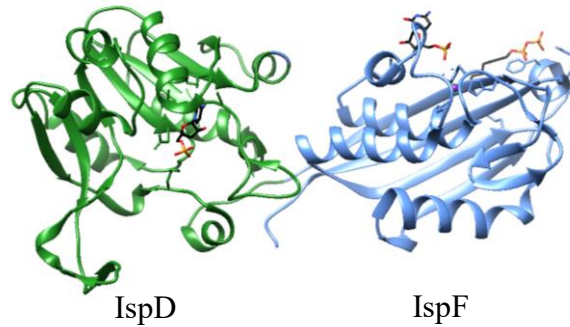


Figure 22 : Structure cristallographique de l'enzyme IspDF de *Campylobacter jejuni* (PDB :1W57).

1.4.7 La (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate synthase : IspG

En 1992, Baker et collaborateurs découvrent un cadre de lecture ouvert inconnu chez *E. coli* et leurs études montrent que ce gène nommé *gcpE* est essentiel à la survie de l'organisme⁷⁹. Des recherches sur les bases de données ont permis d'identifier ce gène comme exclusif aux bactéries et aux chloroplastes de plantes. De plus, un mutant d'*E. coli* contenant les gènes codant pour la mévalonate kinase (MF), la 5-phosphomévalonate kinase (PMK) et la décarboxylase MDD (Schéma 1) a été construit. Ce mutant est capable de synthétiser ses isoprénoïdes à partir de mévalonate en plus de sa voie du MEP endogène. Si on supprime le gène *gcpE* de ce mutant, il est capable de croître uniquement lorsque le milieu est complété par du mévalonate. Cela signifie que *gcpE* est un gène de la voie du MEP⁸⁰. De plus, au laboratoire, l'incubation de [1-³H]méthylérythritol (ME) a été réalisée chez un mutant d'*E. coli* capable d'utiliser le MVA pour synthétiser l'IPP et dont le gène *dxs* a été délété afin de favoriser l'incorporation de ME. Dans ce mutant, le gène *gcpE* a été délété pour essayer d'accumuler le substrat de l'enzyme GcpE. Ce mutant transforme le ME radioactif en [1-³H]méthylérythritol 2-4-cyclodiphosphate montrant que le MEcPP est le substrat de GcpE⁸¹.

L'incubation de [U-¹³C]DX, premier produit de la voie du MEP marqué au ¹³C sous la forme non phosphorylée, avec une souche *E. coli* surexprimant les gènes des enzymes IspC, D, E, F et G et une kinase a permis de caractériser le diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-3-méthyl-but-2-ényle (HMBPP) par RMN du ¹³C, cela suggère que HMBPP est le produit de GcpE⁸². Des études réalisées au laboratoire en collaboration avec le Prof. A. Marquet ont permis de mettre au point le premier test enzymatique de GcpE qui a confirmé que HMBPP est bien le produit de GcpE et à montrer que cette enzyme est sensible à l'oxygène⁸³ et qu'elle contient un centre [4Fe-4S]²⁺^{83,84}.

Le mécanisme de l'enzyme GcpE, appelé aussi IspG, est encore en cours d'élucidation. Des études cristallographiques et de résonance paramagnétique électronique (RPE) ont permis d'obtenir des détails sur le mécanisme.

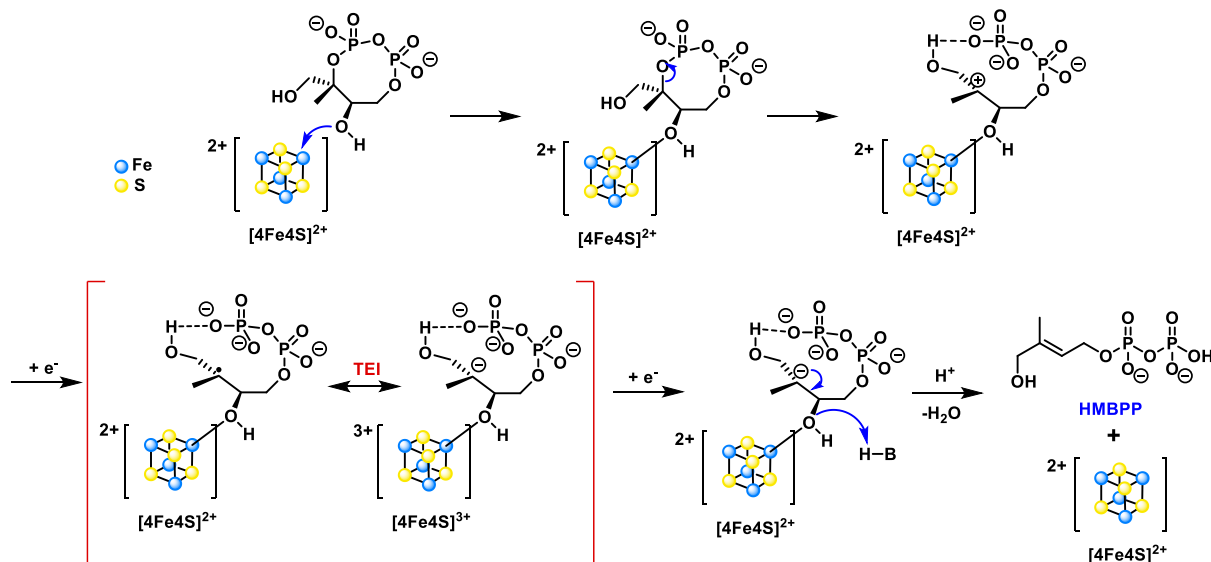
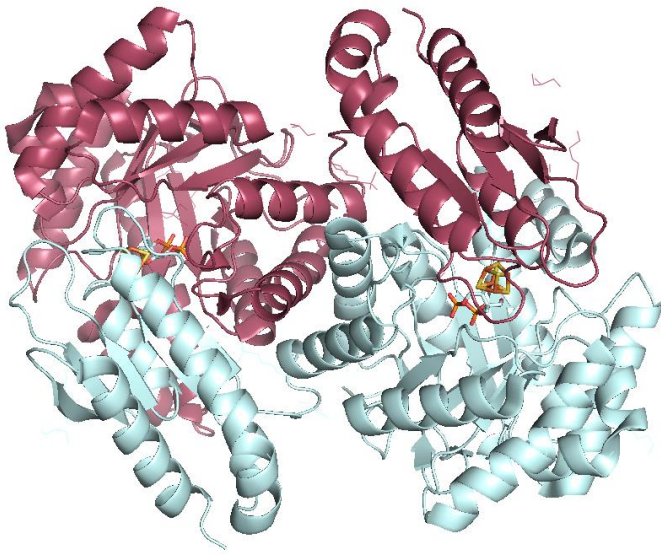


Schéma 9 : Mécanisme proposé pour la réaction catalysée par l'enzyme IspG. TEI, transfère d'électron interne.

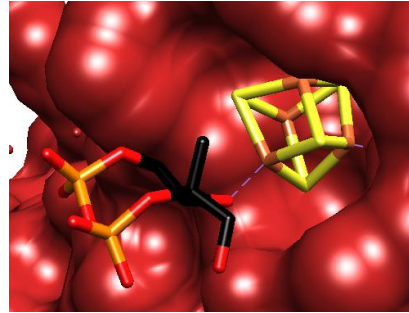
Le mécanisme proposé (Schéma 9) débute par la formation du complexe IspG, MEcPP (I) via la formation d'une liaison de coordination entre un atome de fer du centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ et l'oxygène de l'alcool en position C-4. La rupture de liaison du MEcPP entre le carbone C-4 et le deuxième phosphate conduit à la formation d'un intermédiaire cationique lié au centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$. Le transfert d'un électron conduit au radical ($\text{I}^{\cdot}-[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$) qui est interchangeable avec la forme cationique du centre ($\text{I}^+-[4\text{Fe}-4\text{S}]^{3+}$) via un transfert d'électron interne (TEI)⁸⁵. Le transfert d'un second électron permet d'aboutir à la formation de l'intermédiaire anionique lié au centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ conduisant à la formation de l'HMBPP et à l'élimination d'une molécule d'eau.

Les structures cristallographiques de l'holo-IspG d'*Aquifex aeolicus* (PDB : 3NOY) et de *Thermus thermophilus* (PDB : 2Y0F) sont décrites dans la littérature ainsi que la structure du complexe IspG-MEcPP chez *Thermus thermophilus* (PDB : 4G9P). Parmi les organismes pathogènes pour l'Homme, seule la structure de *Bacillus anthracis* a été déposée dans la PDB en 2013 (PDB : 4MWA) mais sans aucune publication associée.

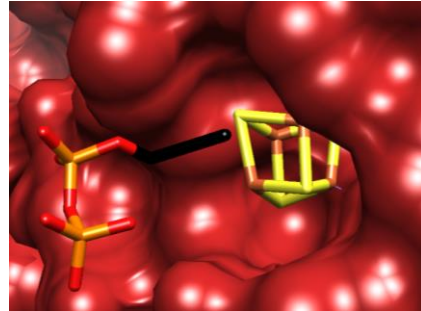
A)



B)

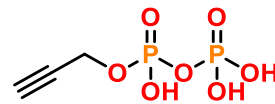


C)



Inhibiteur

Le diphosphate de propargyle :



$$IC_{50} = 770 \text{ nM}^{85}$$

Figure 23 : Représentation cristallographique de l'homodimère d'IspG de *Thermus thermophilus* en présence du substrat et d'un inhibiteur. A) Structure cristallographique de l'homodimère de l'enzyme IspG avec le substrat MEcPP et le centre [4Fe-4S] (PBD :4S38). B) Agrandissement du site actif d'IspG avec le substrat MEcPP (noir) et le centre [4Fe-4S] (jaune) (PBD :4S38). C) Agrandissement du site actif d'IspG avec l'inhibiteur (noir) et le centre [4Fe-4S] (jaune) (PBD :4S3E).

Les différentes structures d'IspG permettent de comprendre d'avantage le fonctionnement de cette enzyme. L'homodimère en position « tête-queue » possède une forme fermée et une forme ouverte⁸⁵. La catalyse se déroule dans les cavités "fermées" du site actif du dimère (Figure 23A). En effet, la fixation du substrat entraîne la formation de la forme fermée. Cette forme fermée permet de protéger les intermédiaires réactionnels du milieu extérieur. La libération du produit nécessite une transition vers la conformation ouverte. Des analyses de RPE et HYSCORE ont démontré que le composé propargyle (Figure 23C) inhibe l'enzyme avec une IC_{50} de 770 nM en se liant à la forme fermée⁸⁶. L'alcyne va faire une liaison de coordination avec un fer du centre [4Fe-4S]. La constante de dissociation K_i et le mode d'inhibition n'ont pas été déterminées. D'après les auteurs, le mode de liaison de l'inhibiteur (Figure 23C) rappelle celui du produit naturel HMBPP et l'inhibition est plus probablement le résultat d'une liaison compétitive au

niveau du site actif de l'enzyme. L'inhibition par le propargyle a été mesurée sur l'enzyme d'*E. coli* et reste à ce jour le meilleur inhibiteur d'IspG.

1.4.8 La 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate réductase : IspH

La dernière enzyme de la voie du MEP est l'enzyme IspH qui catalyse la déshydroxylation réductrice du HMBPP en IPP et DMAPP. Dans les années 1990, le gène codant pour l'enzyme LytB chez *E. coli* a été mentionné la première fois pour son implication dans la résistance à la pénicilline⁸⁷. Des homologues à LytB d'*E. coli* ont été trouvés chez *Haemophilus influenza*, *Synechocystis* et d'autres organismes possédant la voie du MEP. En 2000, Cunningham *et al*⁸⁸ établissent le lien entre LytB et la dernière étape de la voie du MEP en mutant le gène codant pour LytB dans la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803. En effet, ils ont observé que des mutations dans LytB conduisaient à l'absence de survie bactérienne mais que l'addition d'isopenténol et de l'alcool diméthylallyle permettait de restituer la croissance bactérienne. Les cellules d'*E. coli* déficientes en enzyme active formeraient des sphéroblastes en raison du manque d'isoprénoïdes nécessaires à la production du bactoprénol⁸⁹. La fonction de ces lipides dans la biosynthèse de la paroi cellulaire explique également l'observation initiale de l'implication de LytB dans la résistance à la pénicilline. Ces différents résultats démontrent la participation de LytB (appelé plus tard IspH) dans la voie du MEP. Une expérience avec une souche d'*E. coli* mutée qui surexprime les enzymes IspC, D, E, F, G et H et une kinase a permis de suivre la production d'IPP et de DMAPP marqués au ¹³C à partir de [U-¹³C₅]-DX par analyse RMN ¹³C⁹⁰. IspH catalyse le même type de réaction que l'enzyme IspG, ainsi la présence d'un cluster [4Fe-4S] a été supposée.

En 2003, Wolff *et al*⁹¹ ont montré que l'enzyme IspH est active après reconstitution de son centre [4Fe-4S]²⁺ en boîte à gant, sous atmosphère inerte et en présence de FeCl₃, Na₂S et DTT et que l'enzyme convertit l'HMBPP en IPP et DMAPP avec un ratio 6 : 1. Des études complémentaires par RPE⁹¹ et de spectroscopie Mössbauer ont permis de caractériser le centre [4Fe-4S] de IspH⁹².

Le mécanisme d'IspH (Schéma 10) n'est pas entièrement élucidé surtout l'étape de réduction et d'élimination de l'eau. La première étape du mécanisme catalytique d'IspH a été démontrée par spectroscopie Mössbauer⁹³ et implique la liaison du OH de l'HMBPP à l'un des fer du [4Fe-4S]²⁺. De nombreuses études de spectroscopie RPE, de cristallographie et d'enzymologie ont permis de proposer le mécanisme suivant pour la réduction et l'élimination d'eau⁹⁴.

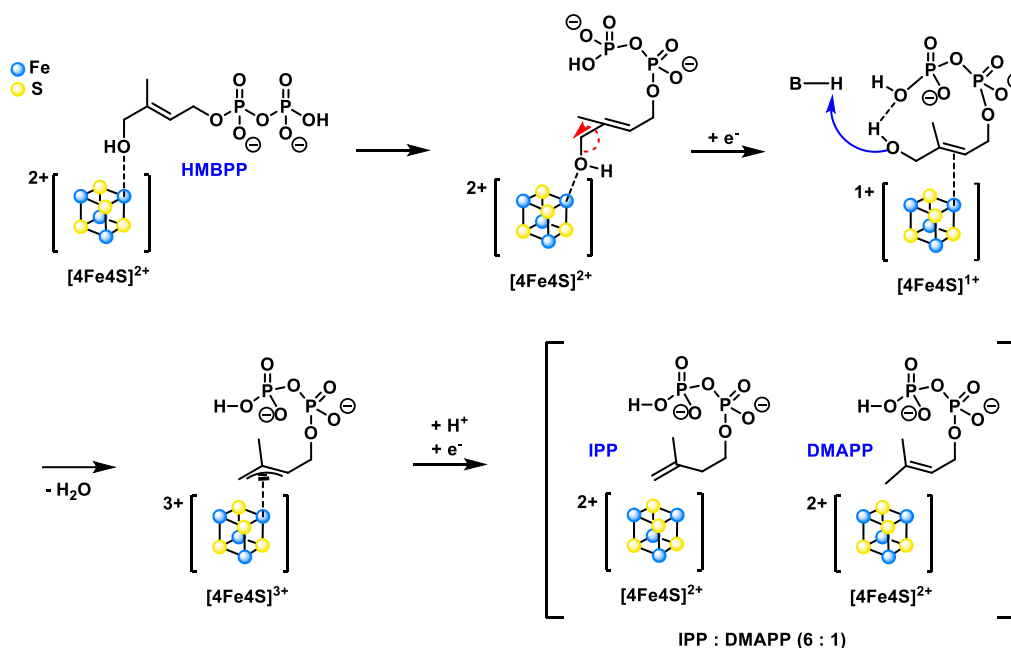


Schéma 10 : Mécanisme catalytique de l'enzyme IspH.

Après la réduction du centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ soufre par un système biologique, un π -complexe est formé après la rotation du $\text{CH}_2\text{-OH}$ ^{95,96}. Le transfert de deux électrons du cluster $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ vers le substrat conduit à l'élimination d'une molécule d'eau et à la formation d'un complexe entre un anion allylique et le cluster $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{3+}$. Un autre électron est apporté au cluster qui passe sous la forme $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ et la protonation de l'anion allylique conduit à la formation d'IPP et de DMAPP. La formation d'IPP ou de DMAPP dépend du carbone qui sera protoné. En effet, l'IPP est produit lorsque le carbone C-2 est protoné et le DMAPP lorsque le carbone C-4 est protoné⁹¹.

Plusieurs structures cristallographiques d'IspH d'*E. coli* et d'*A. aeolicus* sont disponibles⁹⁴ et celle de l'apicomplexe *P. falciparum* a été déposée dans la PDB (4N7B)⁹⁷. Les différentes structures cristallographiques d'IspH d'*E. coli* en présence du substrat ont permis de visualiser le cluster $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ en interaction avec l'HMBPP (Figure 24A, B) et avec différents inhibiteurs (Figure 24C, D).

Les inhibiteurs les plus efficaces à ce jour sont des analogues de l'HMBPP dont le groupement OH est substitué par un thiol (TMBPP) ou une amine (AMBPP) avec respectivement une IC_{50} de 150 nM et 210 nM⁹³ pour l'enzyme d'*E. coli*. Leur K_i et leur mode d'inhibition ont été déterminés au laboratoire. TMBPP est un inhibiteur compétitif montrant une valeur de K_i de 24 nM pour IspD d'*E. coli* et AMBPP est un inhibiteur de type « slow-binding » d'IspH d'*E. coli* avec un K_i de 54 nM⁹⁸ (Figure 24C, D).

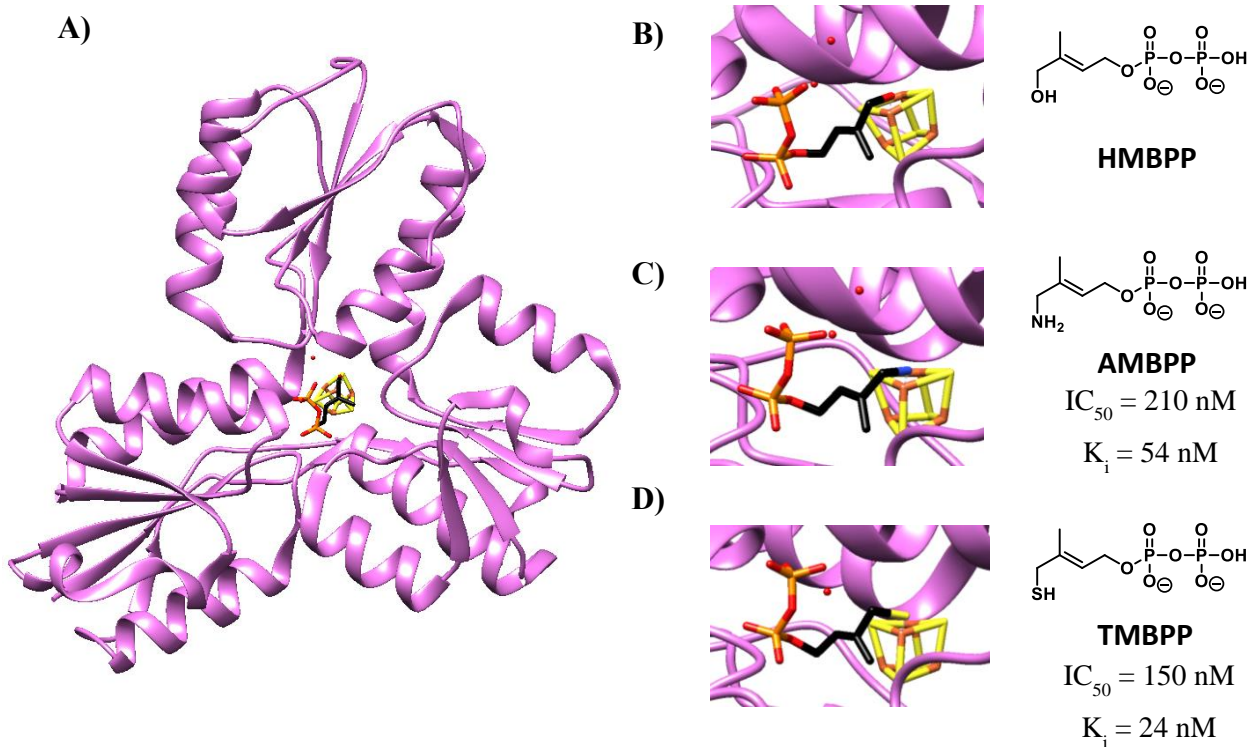


Figure 24 : Structure cristallographique d'IspH d'E. coli. A) L'enzyme IspH. B) Liaison entre l'HMBPP et le cluster (PDB : 3KE8). C) Liaison entre l'AMBPP et le cluster (PDB : 4H4D). D) Liaison entre le TMBPP et le cluster (PDB : 4H4E).

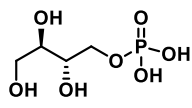
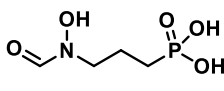
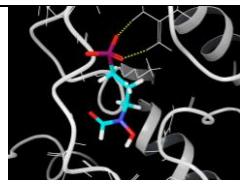
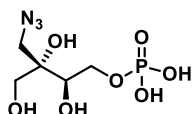
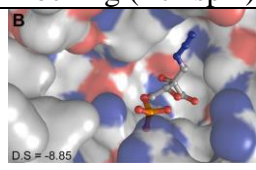
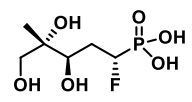
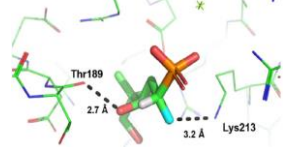
La résolution des structures cristallographiques des complexes de IspH-AMBPP et IspH-TMBPP chez *E. coli*^{99,100} ainsi que des études de spectroscopies Mössbauer de ces complexes ont permis de montrer que ces inhibiteurs forment une liaison de coordination avec un fer du centre $[4Fe-4S]^{2+}$ ⁹².

Ces voies métaboliques, MVA et MEP, sont essentielles à la survie de tous les organismes vivants. Les études réalisées jusqu'à présent ont démontré que la voie du MVA est majoritairement présente chez les animaux, les humains, les archées, les champignons et dans le cytoplasme des plantes alors que la voie du MEP est présente dans les chloroplastes des plantes, les protozoaires apicoplastes comme *P. falciparum* responsable de la malaria, de nombreuses bactéries pathogènes comme *M. tuberculosis* et *B. anthracis* responsable respectivement de la tuberculose et de l'anthrax¹⁰¹. La découverte de la voie du MEP et sa différence métabolique par rapport à la voie du MVA en fait une cible pour le développement de nouveaux agents anti-infectieux et herbicides¹⁰².

1.5 Les inhibiteurs de IspD

L'objectif de cette thèse est le développement d'antibiotiques ciblant la troisième enzyme de la voie du MEP, IspD chez le pathogène *Bacillus anthracis*. La conception d'inhibiteurs de l'enzyme IspD d'organismes comme *Arabidopsis thaliana* (At-IspD), *Plasmodium vivax* (Pv-IspD), *Plasmodium falciparum* (Pf-IspD) et *E. coli* (Ec-IspD) a déjà été exploré. Cependant, aucun inhibiteur d'IspD de *B. anthracis* (Ba-IspD) n'a encore été décrit. Un résumé des molécules publiées ciblant IspD est donné ci-dessous afin de comprendre les différents mécanismes d'inhibition mis en jeu.

Le site actif d'IspD est hautement conservé entre les différents organismes (bactéries et plantes). Il est situé à l'interface du dimère, ce qui le rend plutôt exposé aux solvants. De plus, le site de fixation du CTP a un caractère hydrophile dominant¹⁰³. L'exposition au solvant et le caractère hydrophile important du site actif ne sont pas toujours en faveur du développement d'inhibiteur compétitif d'IspD. On peut également cibler un site allostérique avec un inhibiteur plus « drug-like », c'est-à-dire avec des propriétés similaires aux médicaments déjà commercialisés. Des inhibiteurs du site actif ainsi que des inhibiteurs allostériques ont été trouvés et étudiés par plusieurs groupes et quelques exemples sont illustrés dans le Tableau 1.

N°	Organisme	Site de liaison	Inhibition	Structure 2D	Structure 3D
1	<i>E. coli</i>	Site actif	IC ₅₀ = 1,38 mM ¹⁰⁴	 L-E4P	/
2	<i>E. coli</i>	Site actif	IC ₅₀ = 20,4 mM ¹⁰⁵	 Fosmidomycine	 Docking (Ec-IspD)
3	<i>E. coli</i>	Site actif	K _i [MEP] = 21 μM ¹⁰⁶ K _i [CTP] = 47 μM ¹⁰⁶	 MEP-N ₃	 Docking (Ec-IspD)
4	<i>E. coli</i>	Site actif	IC ₅₀ = 0,7 mM ¹⁰⁷	 MEP-5F	 Docking (Ec-IspD)
	<i>P. falciparum</i>		IC ₅₀ = 1,3 mM ¹⁰⁷		

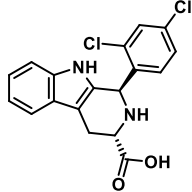
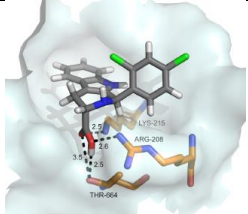
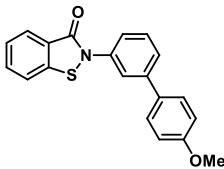
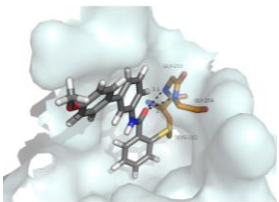
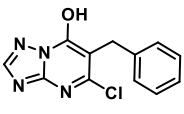
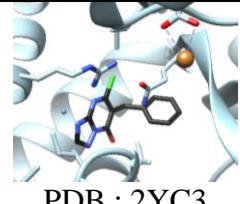
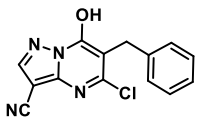
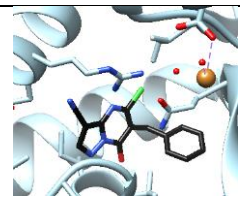
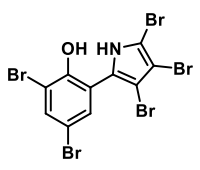
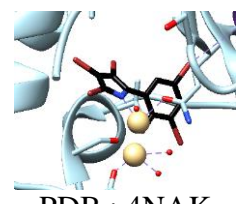
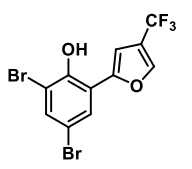
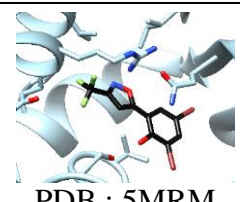
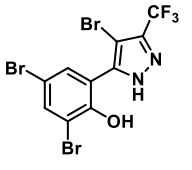
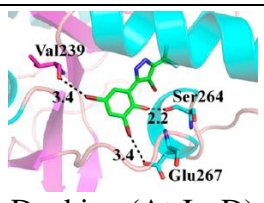
5	<i>P. falciparum</i>	Site actif	$IC_{50} = 7 \text{ nM}^{108}$ $K_{i[CTP]} = 14 \text{ nM}^{109}$	 <chem>O=C(O)[C@@H]1CN2C(=O)C=C(Cl)C=C2N1Cl</chem>	 Docking (Pf-IspD)
	<i>P. vivax</i>		$IC_{50} = 310 \text{ nM}^{109}$ $K_{i[CTP]} = 230 \text{ nM}^{109}$		
6	<i>P. falciparum</i>	Site actif	$IC_{50} = 210 \text{ nM}^{110}$	 <chem>COc1ccc(cc1)-c2ccc(cc2)N3C(=O)c4ccccc4S3</chem>	 Docking (Pf-IspD)
	<i>P. vivax</i>		$IC_{50} = 54 \text{ nM}^{110}$		
7	<i>A. thaliana</i>	Site allostérique	$IC_{50} = 140 \text{ nM}^{111}$	 <chem>Oc1nc2c(c1)nc(Cl)c2Cc3ccccc3</chem>	 PDB : 2YC3
8	<i>A. thaliana</i>	Site allostérique	$IC_{50} = 35 \text{ nM}^{111}$	 <chem>Oc1nc2c(c1)nc(Cl)c2Cc3ccccc3C#N</chem>	 PDB : 2YC5
9	<i>A. thaliana</i>	Site allostérique	$IC_{50} = 1,4 \text{ }\mu\text{M}^{112}$	 <chem>Oc1c(Br)c(Br)c(Br)c(Br)n1</chem>	 PDB : 4NAK
	<i>P. vivax</i>		$IC_{50} = 57 \text{ }\mu\text{M}^{112}$		
10	<i>A. thaliana</i>	Site allostérique	$IC_{50} = 9,3 \text{ }\mu\text{M}^{113}$	 <chem>Oc1c(Br)cc(Br)cc1-c2oc(C(F)(F)F)c2</chem>	 PDB : 5MRM
11	<i>A. thaliana</i>	Site allostérique	$IC_{50} = 3,27 \text{ }\mu\text{M}^{114}$	 <chem>Oc1c(Br)cc(Br)c1-c2nc(C(F)(F)F)n2</chem>	 Docking (At-IspD)

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques de quelques inhibiteurs d'IspD. Les expériences de docking sur Pf-IspD sont basés sur l'homologie de structure avec Ec-IspD, l'ion cadmium est en beige (4NAK) et les ions potassium en marron (2YC3 ; 2YC4). Paramètres : concentration inhibitrice médiane (IC_{50}), constante d'inhibition (K_i).

a. Site actif

Les premières études réalisées afin de développer un inhibiteur compétitif du site actif ont été effectuées par Lillo *et al.* Un analogue du MEP, le L-Erythritol-4-phosphate (L-E4P) a montré une très faible inhibition d'IspD d'*E. coli*, avec une IC_{50} de $1,38 \text{ mM}^{104}$ (Tableau 1, Entrée 1).

En 2011, le groupe du Prof. Audrey Odom a réalisé des expériences de docking de la fosmidomycine sur l'enzyme Ec-IspD et a obtenu un Glide score encourageant de -12,16 pour le site de liaison du CTP. Cependant, après avoir réalisé des tests enzymatiques de la fosmidomycine sur Ec-IspD une IC_{50} de $20,4 \text{ mM}^{105}$ a été déterminée indiquant une inhibition très faible (Tableau 1, Entrée 2).

Plus récemment, un nouvel inhibiteur analogue du MEP portant une fonction azoture (Tableau 1, entrée 3, **MEP-N₃**) a été synthétisé par Z. Baatarkhuu et a montré de meilleurs résultats comme inhibiteur du site actif. Il s'agit d'un inhibiteur mixte par rapport aux deux substrats avec une constante d'inhibition de $21 \text{ }\mu\text{M}$ ($\alpha K_i = 54 \text{ }\mu\text{M}$) lorsque la concentration en MEP est variée et de $47 \text{ }\mu\text{M}$ ($\alpha K_i = 105 \text{ }\mu\text{M}$) lorsque que c'est celle du CTP est variée¹⁰⁶. Jusqu'à présent, c'est le meilleur inhibiteur publié du site actif d'IspD d'*E. coli* (Tableau 1, Entrée 3). Ces résultats montrent que le potentiel d'inhibition très élevé de MEP-N₃ par rapport aux autres inhibiteurs décrits pour Ec-IspD est très probablement dû au fait que le MEPN₃ peut se lier aux deux poches du site actif (site CTP, site MEP).

En 2018, C. Freel Meyers *et al.* ont étudié des substrats alternatifs du MEP dont le phosphonate de (5S)-D-méthylérythritol monofluorométhyle (Tableau 1, entrée 4, **MEP-5F**). Des études cinétiques ont montré que cet analogue inhibe les enzymes Ec-IspD, Pf-IspD avec des IC_{50} respectives de $0,7 \text{ mM}$ et $1,3 \text{ mM}^{107}$. L'inhibiteur étant un analogue du MEP, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'inhibition était compétitive mais aucune analyse ne l'a encore confirmée. Des tests enzymatiques du MEP-5F ont été réalisés également pour l'enzyme IspD de *M. tuberculosis* mais aucune activité inhibitrice n'a été observée.

En 2015, le groupe de A. Odom a étudié le potentiel anti-infectieux du composé 1R,3S-MMV008138 contre la malaria en ciblant l'enzyme Pf-IspD¹⁰⁹ (Tableau 1, Entrée 5). Le composé est issu de la chimiothèque "Malaria Box" constituée de composés antipaludiques qui sont des inhibiteurs de la croissance de *Plasmodium*¹⁰⁸. Il a été montré que cette molécule inhibe Pf-IspD et qu'il s'agit d'un inhibiteur compétitif du CTP montrant un K_i de 14 nM (Tableau 1, entrée 5). Cette molécule est également un inhibiteur non-compétitif du MEP. De plus, les études cinétiques ont montré que cette molécule inhibe aussi l'enzyme IspD de *Plasmodium*

vivax (Pv-IspD) avec une IC₅₀ de 310 nM et une valeur de K_i de 230 μM correspondant à une inhibition compétitive par rapport au CTP¹⁰⁹. Cependant, ce composé 1R,3S-MMV008138 n'a aucune activité inhibitrice sur les autres pathogènes *E. coli* et *M. tuberculosis*.

L'année suivante, ce même groupe, a réalisé un criblage à haut débit afin de découvrir des inhibiteurs sélectifs d'IspD de *Plasmodium*. Après l'identification d'un motif 2-phényl benzo[d]isothiazol-3(2H)-one (BITZ), des analogues ont été synthétisés par relation structure-activité autour de ce motif chimique en améliorant les propriétés inhibitrices. Le composé 2-(4'-méthoxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)benzo[d]isothiazol-3(2H)-one (Tableau 1, entrée 6, **BITZ-8**) est une molécule prometteuse parmi les nombreuses molécules synthétisées et montre des IC₅₀ de 210 nM et 54 nM pour Pf-IspD et Pv-IspD respectivement¹¹⁰. L'inhibition est supposée être compétitive par rapport au substrat CTP. En effet, le docking réalisé sur un modèle de Pf-IspD, obtenu par homologie avec Ec-IspD, a montré que l'inhibiteur se fixe dans le site du CTP.

b. Site allostérique

Le groupe de F. Diederich a étudié l'inhibition de l'enzyme IspD d'*Arabidopsis thaliana* (At-IspD). Trois différentes classes d'inhibiteurs ont été synthétisées, les azolopyrimidines¹¹¹, les pseudilins¹¹² et les phénylisoxazole¹¹³ (Tableau 1, entrée 7, 8, 9, 10) qui ciblent le même site allostérique.

Les dérivés azolopyrimidines 1 et 2 ont été identifiés par une méthode de criblage à haut débit (HTS) et sont les inhibiteurs les plus efficaces sur At-IspD montrant des IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire et une forte activité herbicide¹¹¹ (Tableau 1, entrée 7 et 8). Les dérivés pseudilins et phénylisoxazoles montrent des IC₅₀ sur At-IspD respectivement de 1,4 μM en présence de Cd²⁺ et de 9,3 μM (Tableau 1, Entrée 9, 10). Ces trois classes d'inhibiteurs très différents structurellement ciblent le même site allostérique relativement malléable. Des études cristallographiques ont montré qu'après liaison des inhibiteurs, des changements de conformation de l'enzyme, plus précisément d'une boucle proche du site actif empêchent l'approche du CTP. Le dérivé pseudilin a également été testé sur Pv-IspD et a montré une IC₅₀ plus faible de 57 μM en présence de Cd²⁺. Cette molécule est également active sur la souche Pf-IspD NF54, qui est une souche sensible à la chloroquine (antipaludique) et montre une EC₅₀ de 1,27 μM¹¹². La comparaison des structures cristallographiques d'*E. coli* et d'At-IspD semblent indiquer que les acides aminés (Asp179 et Glu262) impliqués dans la liaison entre les

inhibiteurs à At-IspD ne sont pas orientés favorablement chez Ec-IspD et non conservés car Glu262 correspond à un Asp262 chez *E. coli*.

À la suite des travaux, Wang *et al.* ont développé des inhibiteurs de At-IspD en remplaçant, de façon bioisostérique, la structure du noyau de la pseudilin¹¹⁴. L'inhibition a été démontrée avec une IC₅₀ de 3,27 µM pour le meilleur analogue, le 4-Bromo-5-(3,5-dibromo-2-hydroxyphenyl)-3-trifluorométhyl-1H-pyrazole qui a montré une activité herbicide excellente (Tableau 1, entrée 11, **PPZ**).

Ces informations sur les différents inhibiteurs d'IspD de différents organismes permettent de comprendre qu'il est difficile de concevoir un inhibiteur d'IspD. Cette enzyme semble posséder différents sites de fixation possibles, comme le site allostérique découvert chez At-IspD. Afin d'augmenter notre chance de découvrir un inhibiteur qui se lie soit au site actif ou à un site allostérique, nous avons décidé d'utiliser une approche par fragment.

1.6 L'approche par fragment

Le développement d'un nouveau médicament peut prendre plus d'une dizaine d'années et nécessite des investissements conséquents¹¹⁵. Les différentes étapes d'élaboration d'un médicament commencent par le choix de la cible, suivi de la sélection de molécules qui sont ensuite optimisées en molécules candidat-médicament pour terminer par des études précliniques et cliniques. Si la molécule dépasse l'étape des phases cliniques, le médicament est enfin approuvé par la FDA (Figure 25).

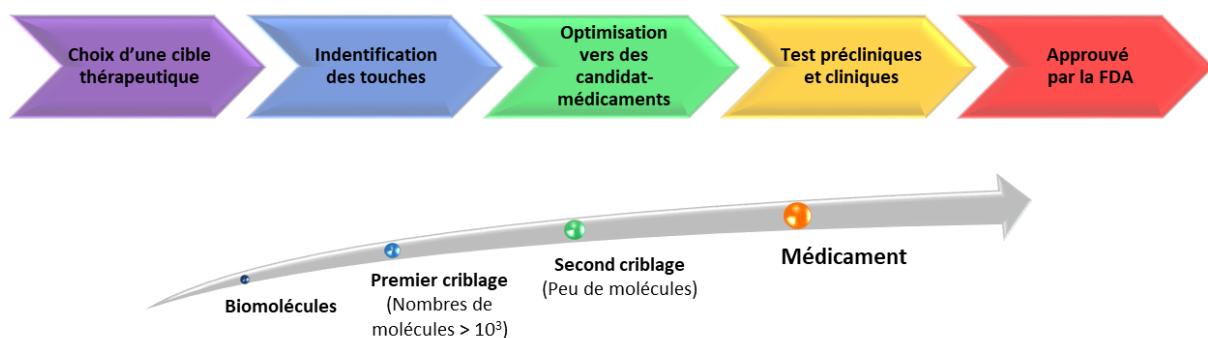


Figure 25 : Processus de développement de médicaments.

Les tests de criblage sont initialement effectués *in vitro* sur les cellules, les lysats cellulaires ou dans notre cas sur l'enzyme purifiée IspD de *Bacillus anthracis*. Les tests *in vivo* (animaux/humains) ont un coût élevé. Il est donc nécessaire de restreindre le nombre de molécules et de s'assurer de leur légitimité à entrer dans les phases cliniques.

1.6.1 Recherche de nouveaux médicaments et criblage à haut débit

Afin d'élaborer de nouveaux médicaments, différentes approches sont utilisées telles que la modification de médicaments existants, l'étude de molécules naturelles bioactives, ou encore la chimie combinatoire et/ou le criblage à haut débit ou HTS (*high throughput screening*). L'HTS permet de cribler des millions de molécules sur une ou plusieurs cibles biologiques afin de sélectionner des composés biologiquement actifs, appelés « touches » (*hits* en anglais) qui après optimisation conduisent à des molécules « têtes de série » (*lead* en anglais), suivi de leur développement en candidat médicament et médicament.

Dans les années 1990, la technique HTS fut très utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour la génération de touches sur certaines cibles thérapeutiques. Sa mise en œuvre avec les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) a permis l'avènement du Maraviroc dans la lutte contre le VIH. Lorsque les cibles étaient des kinases le Lapatinib a été découvert et a permis de lutter contre le cancer¹¹⁶. Cependant, malgré la grande quantité de molécules touches ou têtes de série testées par HTS très peu avaient les caractéristiques physico-chimiques adéquates pour entrer en phases précliniques et cliniques. De plus, l'HTS n'est pas suffisant pour cribler toute l'étendue de l'espace chimique possible, avec une quantité de molécules pouvant exister estimée à 10^{63} , ce qui est beaucoup plus important que les millions déjà criblés par HTS¹¹⁷. Cet espace chimique est défini comme le nombre théorique de molécules réalisables en tenant compte de toutes les combinaisons d'atomes et de fonctionnalités disponibles.

La recherche de médicaments par HTS a permis de créer des chimiothèques de molécules et des bases de données de médicaments donnant accès à de nombreuses informations sur les propriétés physico-chimiques des molécules têtes de série. En 1997, Lipinski s'intéressa aux médicaments administrés par voie orale afin de déterminer s'ils avaient des propriétés distinctives¹¹⁸. À partir de ces données, des règles ont été établies pour guider la conception de molécules ayant des propriétés pharmacocinétiques adéquates au niveau de l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME)¹¹⁹.

Ces règles ont été appelées règles de Lipinski ou la règle des 5 :

- Poids moléculaire (MM) ≤ 500 Da (ou g/mol)
- Nombre de donneurs de liaison H ≤ 5
- Nombre d'accepteurs de liaison H ≤ 10
- Caractère lipophile, Log P ≤ 5

À la suite de ces règles, de nombreux groupes ont étudié les propriétés des molécules types médicaments. Verber *et al* proposent deux nouvelles règles en se basant sur des expériences de biodisponibilité orale chez le rat¹²⁰ :

- Nombre d'angles de rotation ≤ 10
- Surface polaire ≤ 140 Å²

Ces recommandations sont utiles pour déterminer des têtes de série qui ont une biodisponibilité orale viable pour le développement de médicament mais ne sont pas forcément pertinentes pour les médicaments. Hann *et al*, ont démontré que plusieurs médicaments sur le marché avaient des masses molaires et des lipophilies (LogP) différentes des recommandations établies¹²¹. De plus, ces travaux ont aussi montré que des composés avec une masse molaire comprise entre 100-350 Da et un LogP inférieur à 3 étaient à l'origine de meilleures touches. Cette différence de propriétés physico-chimiques entre le composé touche et le médicament s'explique par l'étape d'optimisation qui augmente le poids moléculaire (MM) et la lipophilie (LogP). Ainsi, si la touche initiale possède déjà des propriétés physiques analogues à celles d'un médicament, le processus d'optimisation est susceptible de conduire à des composés ayant des propriétés moins intéressantes. L'optimisation de molécules plus simples et plus petites que les composés touches est préférable afin d'obtenir des bonnes propriétés pharmacocinétiques. L'approche par fragment (Fragment-Based Drug Design : FBDD) a été initié d'après ce concept.

1.6.2 Le principe de l'approche par fragment

Durant les vingt dernières années, l'approche par fragment est devenue une méthode courante pour développer de nouveaux composés biologiquement actifs, qui contrairement à l'HTS, conduit à un plus grand nombre de touches avec des propriétés physico-chimiques acceptables pour les essais cliniques¹¹⁷. La principale caractéristique de cette méthode est l'identification de petites molécules, d'environ 150-300 Da appelés fragments, se liant à une

cible biologique. La structure de ces fragments peut entre autre chose s'inspirer de parties de médicaments existants¹²².

Les principales étapes du FBDD sont le choix d'une librairie de fragments, le criblage et l'optimisation vers un candidat-médicament comme illustré en Figure 26.

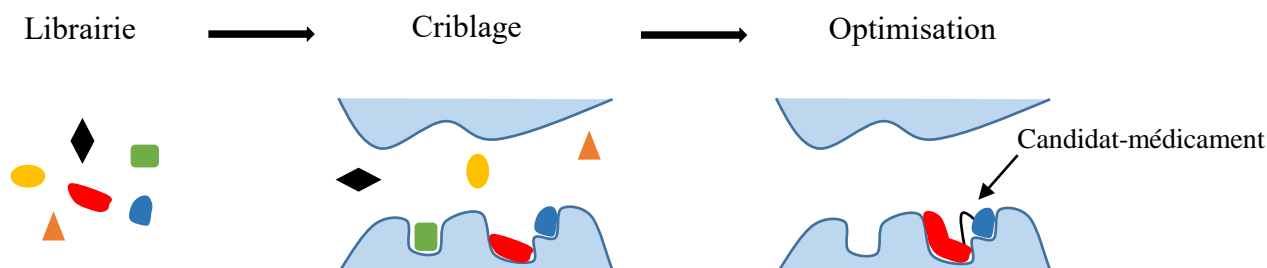


Figure 26 : Les étapes principales de l'approche par fragment.

L'étape cruciale pour développer un médicament par cette méthode est l'identification d'une molécule touche comme point de départ pour l'évolution en candidat-médicament.

1.6.2.1 Librairie de fragments

L'un des paramètres les plus importants lors de l'élaboration d'une librairie est la petite taille des fragments, plus précisément, le nombre d'atomes lourds (tous les atomes sauf l'hydrogène, « heavy atom » : HA) présents dans la molécule. Des études computationnelles ont suggéré que le nombre de molécules touches possibles, est multiplié approximativement par huit pour chaque atome lourd ajouté^{123,124}. Cette augmentation possible de l'espace chimique selon la taille des molécules est un paramètre important lors de la sélection des fragments composant la librairie. Par exemple, une librairie composée de 500 fragments avec 14 HA correspond approximativement à l'espace chimique d'une librairie de 10^8 composés avec 21 HA et 10^{18} composés avec 33 HA. Une librairie de 500 à 2000 molécules avec un nombre de HA autour de 14 est suffisante pour recouvrir un large espace chimique. De plus, une librairie de fragments doit être composée de molécules qui ne réagissent pas chimiquement avec la cible thérapeutique, qui sont solubles même à haute concentration, typiquement supérieure à 1 mM, et qui présentent une diversité chimique importante. Certains composés sont connus pour avoir des interactions non-spécifiques, être des chélatants et former des agrégats, comme par exemple les accepteurs de Michael, les anhydrides, des halogénures d'alkyles et les époxydes¹¹⁷ et ils sont exclus des librairies.

En 2003, Congreve *et al.*¹²⁵ établissent la « règle des trois » inspirée de la règle de Lipinski mais adaptée aux petites molécules :

- Poids moléculaire ≤ 300 Da (ou g/mol)
- Nombre de donneurs de liaison H ≤ 3
- Nombre d'accepteurs de liaison H ≤ 3
- Log P ≤ 3
- Nombre d'angles de rotation ≤ 3
- Surface polaire ≤ 60 Å²

La plupart des librairies commerciales s'appuie sur cette « règle des trois ». Ces critères permettent d'évaluer les fragments dans leurs aptitudes à être optimisés en candidat-médicament obéissant à la règle des cinq. Ces deux règles permettent d'aider à la conception de médicaments biodisponibles par voie orale. Comme dit auparavant, de nombreux médicaments ne suivent pas ces règles. Elles sont donc sources de nombreuses discussions, et ne doivent pas être suivie à la lettre.

Contrairement aux molécules plus complexes et plus grandes sélectionnées par HTS, la simplicité structurale des fragments (Figure 27) permet d'augmenter les probabilités d'interaction avec la cible thérapeutique¹²⁶ et ainsi d'augmenter le nombre de touches.

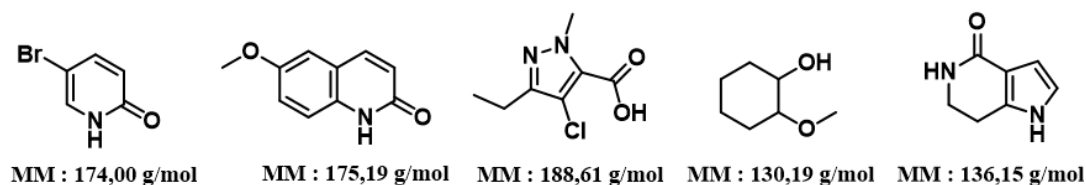


Figure 27 : Exemples de fragments issus de la librairie utilisée dans cette thèse avec leurs masses molaires (MM) associées.

En effet, les fragments sont de petites tailles et interagissent plus aisément avec la cible sans être gênés par un possible encombrement stérique (Figure 28).

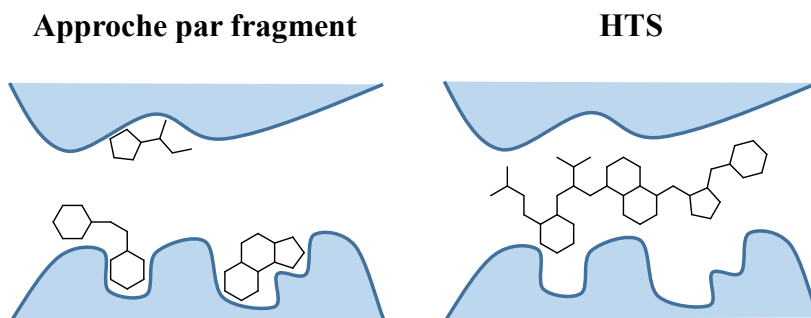


Figure 28 : Schématisation du mode de liaison de touches issues d'un criblage par une approche par fragments ou par HTS.

La diminution de la quantité d'atomes lourds réduit le nombre d'interactions avec la cible ce qui se traduit par une affinité du fragment pour la cible plus faible (de l'ordre du millimolaire) que pour les molécules touches en HTS (de l'ordre du micromolaire)¹²⁷. Cependant, les interactions fragments/cible sont de hautes qualités et leurs efficacités de liaison sont meilleures (Figure 28).

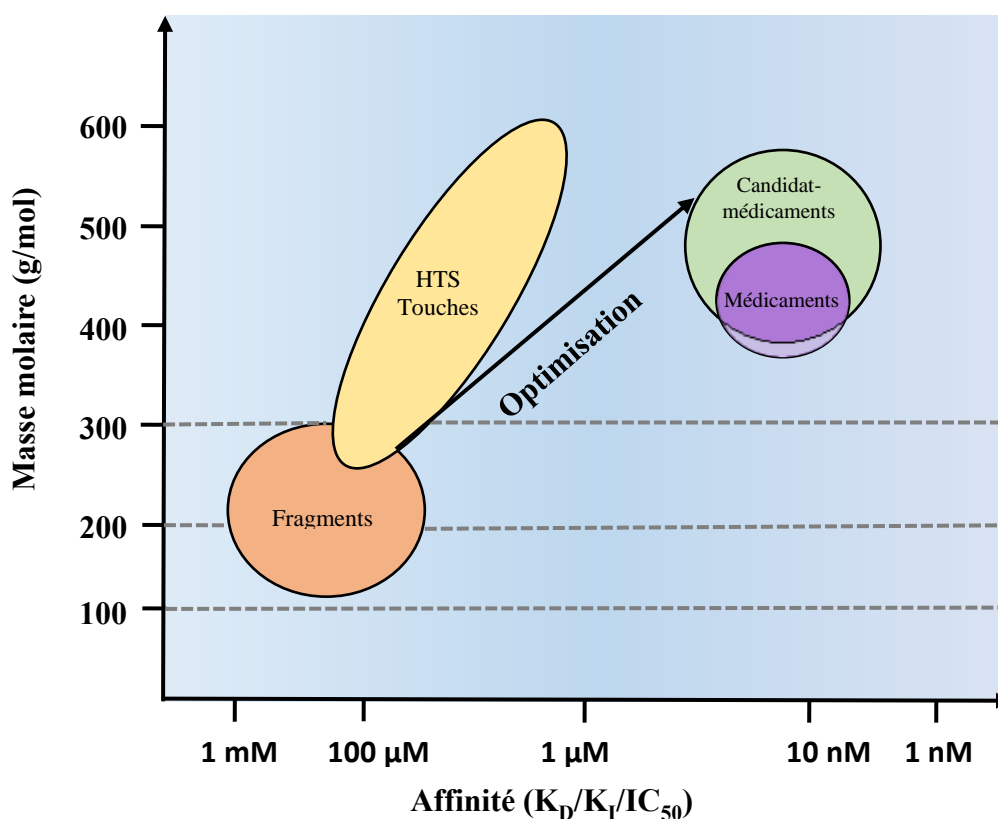


Figure 29 : Comparaison de l'affinité et de la masse molaire des touches entre les méthodes HTS et approche par fragment. Images reproduite de Rees et al.¹²⁸.

La Figure 29 représente les masses molaires typiques des fragments, des touches en HTS et des candidat-médicaments et médicaments. La masse molaire des fragments est comprise entre 100 et 300 g/mol avec de faibles affinités (mM à μ M) et leurs optimisations nécessitent une importante amélioration de leur affinité pour la cible, obtenue presque toujours par l'augmentation du poids moléculaire. Au contraire, les molécules touches en HTS ont des poids moléculaires plus importants (300-600 g/mol) avec des affinités plus importantes (μ M). Une diminution de leur nombre d'atomes et l'augmentation de leur affinité est nécessaire pour conduire à des candidat-médicaments. En général, les candidat-médicaments ont tendance à avoir un poids moléculaire inférieur à 500 g/mol avec une grande affinité de l'ordre du nanomolaire.

Les techniques de criblage utilisées en HTS ne sont pas transposables aux fragments car leurs limites de détection ne permettent pas forcément d'évaluer des affinités de l'ordre du millimolaire. C'est pourquoi de nouvelles techniques ont été développées afin de pouvoir mettre en évidence ces faibles affinités et aider à la conception des candidat-médicaments.

1.6.2.2 Criblage et identification des touches

Différentes techniques biophysiques (RMN, SPR, cristallographie, DSF, ITC) et biochimiques (tests enzymatiques) sont utilisées de façon orthogonale (Figure 30) pour évaluer les interactions entre des fragments et une cible, déterminer leurs modes de liaison et leurs potentiels d'inhibition.

Différentes techniques biophysiques telles que la cristallographie aux rayons X (RX), la résonance plasmonique de surface (SPR), la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), la dénaturation thermique à base de fluorescence (DSF), la titration calorimétrique isotherme (ITC) ont été utilisées dans des approches par fragments, et elles dépendent de plusieurs paramètres qui peuvent être complémentaires (Tableau 2).

L'utilisation de plusieurs techniques biophysiques en parallèle permet d'obtenir différentes informations sur le mode de liaison des fragments. Par exemple, l'utilisation de la SPR comme technique de criblage permet de trouver rapidement un ligand et de déterminer son affinité avec l'enzyme cible. La cristallographie permet ensuite d'obtenir des informations structurales qui peuvent s'avérer intéressantes pour faire évoluer le fragment.

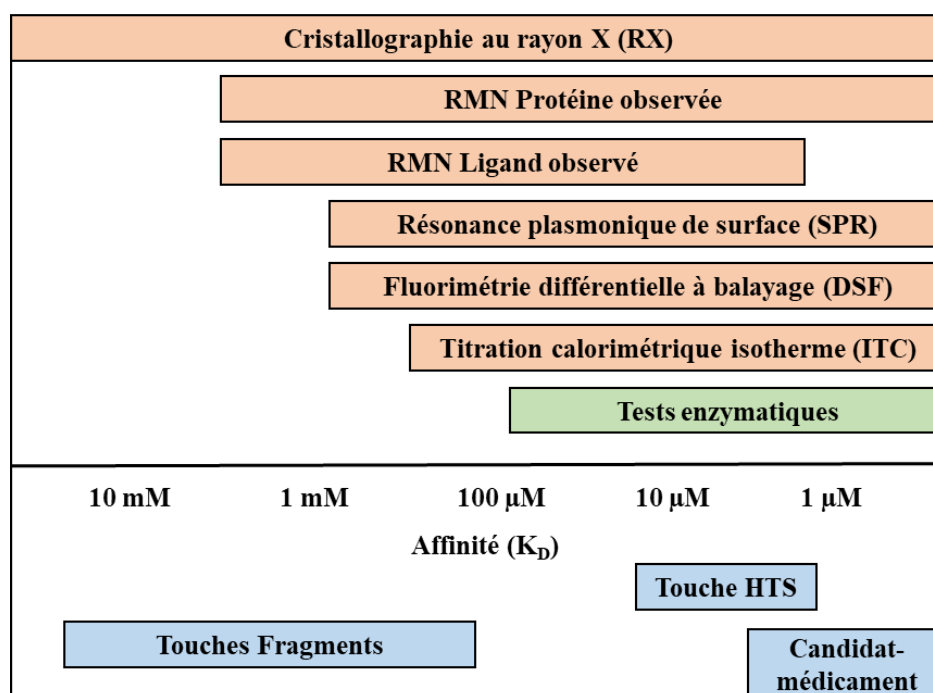


Figure 30 : Comparaison des différentes techniques de criblage en fonction de leurs limites de détection. Les différents types de touches (en bleu) criblés sont représentés en fonction des affinités détectées. Image adaptée de Price et al.¹²⁹.

Les trois techniques les plus utilisées sont la RMN et la SPR qui permettent de détecter des affinités comprises entre 1 nM et 5 mM, ainsi que la cristallographie aux rayons X. Ces trois outils biophysiques ont été utilisés lors de ces travaux et une description rapide de leurs avantages et inconvénients est faite dans les paragraphes suivants mais chaque technique est décrite plus en détails dans les Chapitres 2 (SPR) et 3 (RMN, cristallographie/docking).

Technique	Débit du criblage	Consommation de protéine	Immobilisation covalente	Intervalle de K_D détectable	Information sur le site actif
RX	Bas	Moyenne	Non	Jusqu'à la solubilité du ligand	Excellente
RMN	Moyen	Moyenne	Non	1 nM < K_D < 5 mM	Bonne
SPR	Moyen	Faible	Requise	1 nM < K_D < 2 mM	Limité à la compétition
ITC	Moyen	Élevée	Non	1 nM < K_D < 5 mM	Limité à la compétition
DSF	Haut	Moyenne	Non	K_D < 5 mM	Aucune

Tableau 2 : Résumé des paramètres importants des différentes techniques biophysiques utilisées pour le criblage. Tableau adapté de Ciulli et al.¹³⁰.

a. La radiocristallographie

Cette technique permet d'obtenir des informations structurales dont la position du fragment dans la poche de liaison de la cible et peut servir à guider l'optimisation du fragment. Cependant, l'affinité du fragment pour la cible (protéine) ne pourra pas être déterminée par cette technique. Cette technique est rarement utilisée lors du premier criblage car une quantité très importante de protéine est nécessaire (> 50 mg) pour produire les cristaux des complexes protéine-fragment par co-cristallisation ou par trempage. De plus, elle requiert l'obtention de cristaux de très bonne qualité pour résoudre la structure et observer les interactions protéine-ligand après un processus d'obtention et de traitement des données long et difficile. Le débit du criblage est relativement faible même si de nouvelles techniques d'automatisation du traitement des données se développent ces dernières années¹³¹. La cristallographie aux rayons X peut être utilisée lors d'un second criblage comme technique complémentaire pour accéder à des informations structurales sur des fragments déjà sélectionnés et la cible grâce à une autre méthode biophysique.

Des expériences de criblage virtuel (« *docking* ») peuvent également être utilisées lorsque la structure cristallographique de la cible biologique est connue. Cette méthode informatique permet de prédire les molécules qui vont se lier à la cible parmi des bibliothèques de millions de composés. La grande précision de ces programmes informatiques a conduit à une utilisation de plus en plus courante du criblage virtuel en FBDD.

b. La résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique souvent utilisée pour étudier les interactions protéine-ligand ainsi que la structure et la dynamique des protéines en solution. Elle permet de déterminer des affinités comprises entre le micro et le millimolaire avec une concentration en fragment proche de la valeur de la constante de dissociation (K_D).

En 1996, Shuker *et al.* publient les premiers travaux sur le criblage et l'optimisation de fragments à l'aide d'une technique RMN. Le marquage isotopique au ^{15}N de la protéine permet de déterminer une liaison entre un fragment et une protéine par un changement du déplacement chimique des signaux de la protéine marquée sur les spectres 2D de ^{15}N -HSQC¹³² lorsque le fragment se lie à la protéine. Cette technique a plusieurs inconvénients. En effet, elle nécessite le marquage de la protéine et la taille de celle-ci est limitée à 30 kDa. Shuker *et al.* se sont intéressés aux signaux de la protéine, ce qui induit des limites d'utilisation¹³².

Une autre technique RMN, la différence de transfert de saturation (STD) permet de prendre en compte uniquement les signaux du ligand (fragment). C'est une méthode simple et puissante

pour détecter les faibles interactions d'un complexe cible-ligand¹³³. Cette technique peut être utilisée lors des différents criblages, pour la confirmation des touches et pour leurs optimisations car des informations sur l'orientation de la liaison entre le ligand et la cible peuvent être obtenues¹³⁴. De plus, aucun marquage isotopique n'est nécessaire. L'affinité du ligand pour la cible peut être mesurée par des expériences de titration et des constantes de dissociation du micromolaire au millimolaire peuvent être mesurées. Des expériences de compétition entre différentes touches peuvent également être effectuées pour déterminer si ces molécules sont dans le même site de liaison. Le fonctionnement de cette méthode est expliqué plus en détail dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

c. La résonance plasmonique de surface

Cette technique permet de cribler de nombreux composés simultanément sur plusieurs cibles biologiques et de déterminer les événements de liaison associés (association et dissociation) en temps réel. Cette technique met en jeu très peu de quantité de protéine (cible). Le criblage de 500 molécules nécessite peu de protéine, environ 3 mg, cela en fait donc une méthode idéale pour effectuer le criblage de milliers de composés. La protéine est immobilisée sur une surface métallique et les fragments sont injectés en flux continu. La surface greffée avec la protéine peut être réutilisée pour plusieurs expériences sans subir de dégradation importante. Le principe de cette technique repose sur la mesure d'un changement de l'indice de réfraction provoqué par la liaison d'une molécule à la protéine. Les affinités des fragments pour la cible biologique sont mesurées par des analyses de concentration dépendance et sont fiables lorsque les concentrations en fragment sont de 5 à 10 fois le K_D . De ce fait, les constantes de vitesse d'association (k_a) et de dissociation (k_d) peuvent être déterminées. Une description de cette méthode est détaillée dans le chapitre suivant. De plus, la SPR est la méthode la plus commercialisée pour l'analyse des événements de liaison sans marquage préalable^{135,136}.

d. Les autres techniques biophysiques

La fluorimétrie différentielle à balayage (DSF) est une méthode spectroscopique qui permet un criblage rapide et peu coûteux des fragments qui se lient et stabilisent les protéines. Cette technique permet de quantifier la dénaturation d'une protéine en fonction de la température en présence d'un fluorophore. Le fluorophore se lie aux parties hydrophobes de la protéine et lorsque la protéine se déplie sous l'effet de l'augmentation de la température, l'intensité du signal augmente jusqu'à une température de fusion T_m . La présence d'un fragment qui se lie à l'enzyme change cette valeur de T_m et permet de discriminer les fragments qui ne se lient pas¹³⁷.

La titration Calorimétrique Isotherme (ITC) est une méthode qui permet de déterminer les paramètres thermodynamiques (K_D , n , ΔH , ΔS) de la liaison protéine-ligand en solution¹³⁸. Le principe de l'ITC est la mesure d'une différence de température entre une cellule de référence et une cellule avec le complexe protéine-ligand d'intérêt. Cette technique utilise une grande quantité d'enzyme et de temps qui est un inconvénient pour le criblage de fragment. Cependant, les informations thermodynamiques qu'elle apporte permettent de valider et d'optimiser des fragments présélectionnés par d'autres techniques biophysiques.

Les avantages et inconvénients de toutes ces techniques biophysiques de criblage ont été résumés dans le tableau 2.

Technique	Avantages	Inconvénients
RX	<ul style="list-style-type: none"> Débit de criblage faible Identification rapide du site et du mode de liaison du ligand 	<ul style="list-style-type: none"> Requiert des sources émettrices de rayons X (couteux) Les protéines doivent être solubles et cristallisables
RMN (protéine observée)	<ul style="list-style-type: none"> Débit de criblage moyen Identification du site actif possible (requiert assignation des pics) Mesure de K_D possible par un titrage du ligand 	<ul style="list-style-type: none"> Limitée aux petites protéines solubles (< 30 kDa) Marquage isotopique de protéines (couteux) Appareillage lourd
RMN (ligand observé)	<ul style="list-style-type: none"> Débit de criblage moyen Applicable à la plupart des protéines (> 10 kDa) Essais de compétition de liaisons directes Mesure de K_D possible par un titrage du ligand 	<ul style="list-style-type: none"> Sujet aux faux positifs causés par des agrégations ou des effets non spécifiques
SPR	<ul style="list-style-type: none"> Débit de criblage élevé Détection sans marquage Automatisation facile de la méthode Essais de compétition de liaisons directes Nécessite peu de matériel Multiplés informations fournies (K_D, k_a, k_d et n) 	<ul style="list-style-type: none"> Immobilisation d'un des deux partenaires de liaison sur une surface Artéfacts causés par des agrégations ou des effets non spécifiques Longue optimisation du criblage
ITC	<ul style="list-style-type: none"> Essais de compétition de liaisons directes Multiplés informations fournies (K_D, ΔH, ΔS et n) 	<ul style="list-style-type: none"> Criblage à bas débit Importants changements de température pour des mesures fiables Appareillage lourd
DSF	<ul style="list-style-type: none"> Débit de criblage élevé Essai de liaison directe 	<ul style="list-style-type: none"> Sujet aux faux positifs et négatifs Appareillage lourd

Tableau 3 : Résumé des avantages et inconvénients relatifs aux différentes méthodes biophysiques utilisées pour l'approche par fragment. Tableau adapté de Ciulli et al.¹³⁰.

Bien que les diverses méthodes biophysiques telles que la RMN, la SPR et la radiocristallographie fournissent des informations sur la liaison cible-ligand, le but principal d'un criblage de fragments est d'identifier les fragments qui se lient à la cible en utilisant une concentration la plus faible possible et qui montrent de préférence une activité biologique d'inhibiteur ou d'activateur. L'obtention de ces dernières informations nécessite de disposer d'un test enzymatique qui permet de déterminer l'effet du fragment sur l'activité enzymatique de la cible¹³⁹. Cette méthode d'enzymologie peut être utilisée lors d'un second criblage sur les touches afin de les valider en tant que ligand et évaluer leur pouvoir inhibiteur en déterminant leur IC_{50} et/ou la constante d'inhibition K_i . L'inconvénient de cette méthode est souvent le manque de sensibilité du test enzymatique pour détecter des faibles affinités, ou des faibles différences d'activité. L'augmentation de la concentration en fragment, pour améliorer l'effet du fragment, peut interférer dans les tests à cause de la formation d'agrégats. Ces tests biochimiques sont réalisés le plus souvent par des mesures de fluorescence¹⁴⁰ ou par spectrophotométrie d'absorbance¹⁰⁶ et nécessitent donc la présence d'un composé qui absorbe à une longueur d'onde donnée. L'inconvénient principal de ces tests est la présence de molécules pouvant générer des faux positifs appelés PAINS (*Pan Assay Interference Compounds*)¹⁴¹. Ils interfèrent avec les essais biochimiques par différents mécanismes, par exemples en chélatant les métaux (Salicylate) nécessaires au fonctionnement de l'enzyme ou en ayant des propriétés photochimiques qui modifient l'absorbance ou la fluorescence du milieu indépendamment de l'interaction avec l'enzyme.

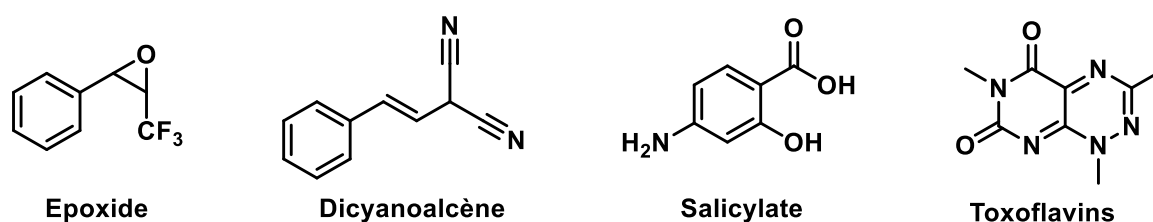


Figure 31 : Exemples de molécules PAINS.

L'identification des touches peut être effectuée par le calcul d'un paramètre, appelé efficacité de ligand (LE). Il correspond à l'énergie de liaison du complexe cible-ligand divisé par le nombre d'atomes lourds (HA)¹⁴². Ce paramètre permet de comparer les qualités des interactions en fonction des masses molaires des ligands. L'efficacité de ligand relie l'affinité d'un ligand à son nombre d'atomes lourds et peut être calculée à partir de la constante de dissociation K_D d'après l'équation suivante :

$$LE = \frac{\Delta G}{HA} \quad (1)$$

avec $\Delta G = -RT \ln K_D$

$$LE = \frac{-RT \ln K_D}{HA} \quad (2)$$

ΔG (kJ.mol^{-1}) est l'énergie libre de liaison d'un ligand avec une cible, HA est le nombre d'atomes lourds du ligand, LE ($\text{kJ.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$) est l'efficacité de ligand, R ($\text{kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) est la constante des gaz parfaits, T (K) est la température. Pour faciliter l'utilisation du paramètre LE, l'unité en $\text{kJ.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$ est convertie en $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$.

Le LE définit la qualité de l'interaction entre le ligand et la cible biologique. Reynolds *et al* ont étudié l'efficacité de ligand de 8000 ligands en interaction avec 28 cibles différentes¹⁴³. Ils en ont conclu qu'un LE de $0,3 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$ est considéré comme adéquat pour un fragment avec au moins 30 HA mais très mauvais pour un fragment de 75 HA (Tableau 4). Le LE peut être utilisé pour estimer si un fragment est un point de départ viable pour obtenir une molécule plus élaborée.

		K _D							
		10 mM	1 mM	100 μM	10 μM	1 μM	100 nM	10 nM	1 nM
LE ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$)	0,15	18	27	36	45	55	64	73	82
	0,20	14	20	27	34	41	48	55	61
	0,25	11	16	22	27	33	38	44	49
	0,30	9	14	18	23	27	32	36	41
	0,35	8	12	16	19	23	27	31	35
	0,40	7	10	14	17	20	24	27	31
	0,45	6	9	12	15	18	21	24	27
	0,50	5	8	11	14	16	19	22	25
	0,55	5	7	10	12	15	17	20	22
	0,60	5	7	9	11	14	16	18	20
			Nombre d'atomes lourds (HA)						

Tableau 4 : L'efficacité de ligand comme outil pour l'optimisation des fragments. La taille typique des fragments sont en rouge. Tableau reproduit de Davis et al.¹⁴⁴.

Lors de l'optimisation du fragment vers un candidat médicament, la masse du composé va augmenter. Ainsi, il a été proposé que pour un fragment contenant 14 à 18 HA un LE de $0,3 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$ est convenable. Ces fragments devraient alors conduire à des valeurs de K_D comprises entre 1 mM et 100 μM (Tableau 4) pour les fragments détectables par les techniques biophysiques précédemment décrites.

Pour résumer, les techniques biophysiques permettent de déterminer les propriétés cinétiques et thermodynamiques d'un ligand spécifique à une cible biologique alors que les techniques biochimiques permettent de définir si ce ligand a des propriétés inhibitrices. Ces deux techniques, biophysiques et biochimiques, sont complémentaires et doivent être utilisées de façon orthogonale pour réduire la présence de faux positifs et augmenter l'efficacité du criblage des fragments. L'obtention de touches avec des propriétés d'affinités et d'inhibitions intéressantes et des efficacités de ligands supérieures à $0,3 \text{ kcal.mol}^{-1} \cdot \text{HA}^{-1}$ est essentielle pour conduire à une optimisation réussie de fragment vers un candidat-médicament.

1.6.2.3 Les différentes types d'optimisations de fragments

Plusieurs méthodes existent pour l'optimisation de fragment vers une molécule plus affine (Figure 32).

La stratégie de « fragment growing » : c'est la méthode la plus directe. L'agrandissement du fragment consiste à augmenter sa taille en attachant des groupes fonctionnels pour améliorer les interactions avec la cible. Cette méthode nécessite de disposer d'une structure cristallographique ou obtenue par modélisation du complexe enzyme/fragment pour connaître l'environnement du fragment et son orientation. Ces connaissances structurales guident la synthèse et le choix des groupements à ajouter pour augmenter les interactions enzyme/fragment¹⁴⁵ (Figure 32A).

La stratégie de « fragment linking » : cette méthode de raccordement de fragments est utilisée pour relier deux ou plusieurs fragments se liant dans deux sites de liaison adjacents (Figure 32B). Un espaceur permet de relier les deux fragments et de les orienter favorablement. L'association des deux fragments peut conduire à une augmentation significative de l'affinité¹⁴⁶.

La stratégie de « fragment self-assembly » : l'auto assemblage de fragments est similaire à la stratégie de « *fragment linking* ». Cependant, les fragments dans des sites adjacents ont des fonctions chimiques susceptibles de réagir entre elles au sein de l'enzyme (Figure 32C). Des exemples d'auto-assemblage sont décrits dans la littérature comme l'utilisation de la chimie combinatoire^{147,148} en créant des liaisons réversibles avec des imines ou des ponts disulfures ou l'utilisation de la chimie Click *in situ*¹⁴⁹ qui conduit à la formation de liaisons irréversibles.

La stratégie de « fragment merging » : cette méthode de fusion de fragment peut être utilisée lorsque deux fragments se lient à un même site actif avec une similarité de structures¹⁵⁰ et conduisent à une seule molécule avec une meilleure affinité (Figure 32D).

Les méthodes qui nécessitent deux fragments ou plus sont les plus complexes. En effet, les fragments doivent avoir des sites de liaison différents et être assez proches pour être reliés.

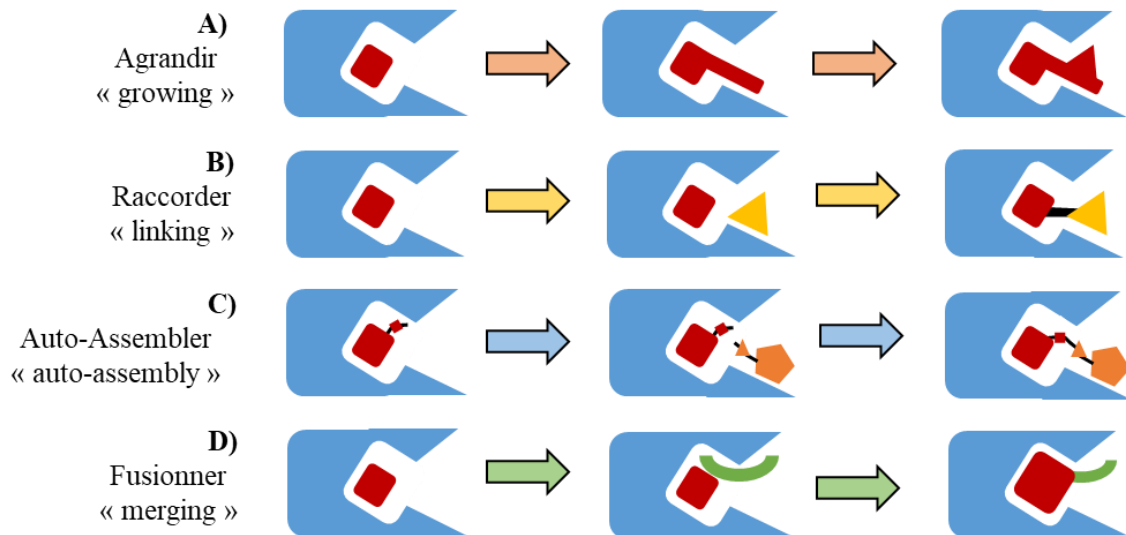


Figure 32 : Stratégie d'optimisation de fragment : agrandir, fusionner, auto-assembler et raccorder. Image reproduite de Lamoree et al.¹⁵¹.

1.6.2.4 Optimisation : des fragments au médicament

Après avoir identifié et confirmé les fragments touchés par différentes techniques orthogonales, leur optimisation est nécessaire afin d'augmenter leur affinité et leur pouvoir d'inhibition. Différentes stratégies sont possibles : le fragment *linking*, *growing* et *merging* qui sont illustrées par des exemples publiés et ayant conduit à des médicaments ou des candidat-médicaments en phase clinique ou préclinique.

a. Fragment linking

Comme cité précédemment, Shuker *et al.* ont été les premiers à publier des travaux sur l'utilisation de la FBDD afin de développer des ligands de haute affinité pour une cible biologique, la FKBP (FK506 binding protein)¹³². Pour cela, un premier criblage par une technique de RMN (protéine observée) a permis de sélectionner un premier fragment et des analogues ont ensuite été criblés pour augmenter l'affinité du fragment avec la poche de liaison identifiée. Un second criblage, toujours par RMN, en présence du premier fragment, a ensuite

été réalisé, ce qui a permis de sélectionner et d'optimiser un deuxième fragment qui se lie dans une deuxième poche de liaison à proximité de la première. Pour finir, les informations d'orientation des deux ligands ont été obtenues par RMN et cristallographie et ont guidé la synthèse de plusieurs molécules *via* des espaceurs de 3 à 6 atomes de carbones.

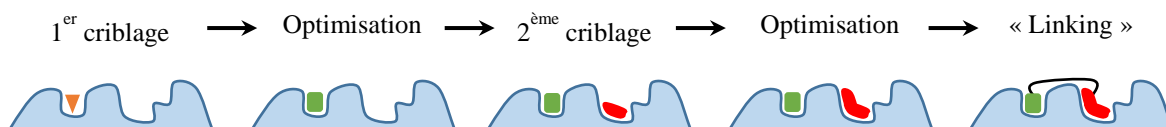


Figure 33 : Représentation de la méthode de relation structure activité par RMN utilisée par Shuker *et al.*¹³².

Plus récemment, la synthèse du Vénétoclax (VenclextaTM), un médicament contre la leucémie lymphoïde chronique (LLC) a été conçu en utilisant la FBDD et une méthode RMN similaire à celle décrite précédemment et comprenait aussi une étape d'optimisation par « fragment linking ». C'est le deuxième médicament approuvé par la FDA provenant d'une approche par fragment¹⁴⁰.

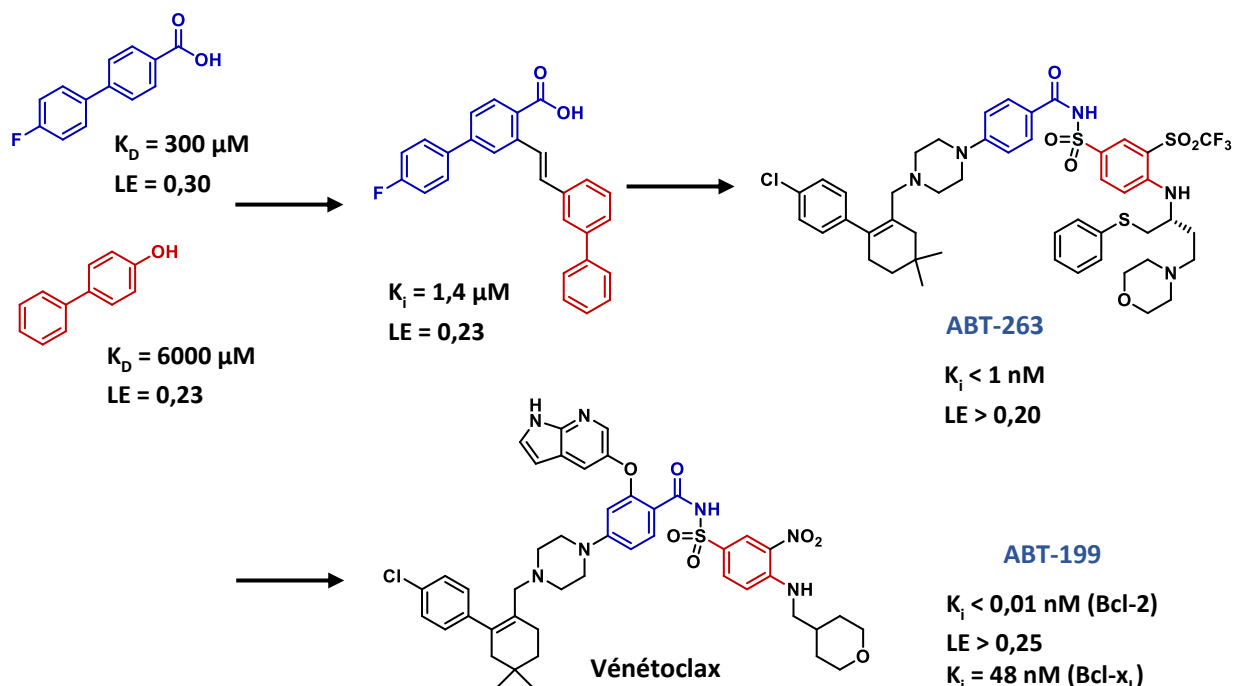


Figure 34 : Développement du médicament Vénétoclax à partir d'une approche par fragment.

Paramètres : efficacité de ligand (LE), concentration inhibitrice médiane (IC_{50}), constante de dissociation (K_D), constante d'inhibition (K_i).

La Figure 34 représente les différentes étapes de développement du Vénétoclax. Les deux fragments de départ ont été criblés par RMN et se trouvaient dans deux sites de liaison différents

mais proches et ont été reliés. Après de nombreuses optimisations structurales le candidat-médicament (Phase II) ABT-263 (Navitoclax) et le médicament ABT-199 (Vénétoclax) ont été testés respectivement sur la cible BCL- α L et BCL-2 (protéines à activité anti-apoptotique) et le Vénétoclax a montré des valeurs de K_i inférieurs à 48 nM et 0,01 nM respectivement pour ces deux cibles.

b. Fragment growing

En 2001, le premier médicament découvert par une approche par fragment a été approuvé par la FDA après seulement six ans de développement¹⁵². Il s'agit du Vémurafénib qui inhibe la kinase B-Raf, une protéine impliquée dans la prolifération cellulaire responsable de tumeurs cancérigènes. Un premier criblage de 20 000 fragments en utilisant des tests biochimiques a permis d'obtenir 238 touches. Des co-cristallisations avec différentes kinases, Pim-1, récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR1) et la protéine, sans mutation BRAF^{WT} et avec mutation BRAF^{V600E} avec ces touches ont permis d'obtenir des structures cristallographiques et d'observer les sites d'interaction des fragments. Les études se sont dirigées vers le composé 7-azaindole (**I**) et des optimisations de « fragment growing » dirigées par des structures cristallographiques ont permis d'aboutir au composé (**II**), (**III**) puis au Vémurafénib (**IV**) (Figure 35). L'efficacité de ligand du fragment d'origine était supérieure à $0,59 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$ et les différentes optimisations ont permis d'obtenir une valeur de $0,31 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$ avec 33 HA. L'inhibition a aussi été grandement améliorée avec une IC_{50} de $200 \mu\text{M}$ pour le composé 7-azaindole (**I**) à une IC_{50} de 30 nM pour le Vémurafénib¹⁵³.

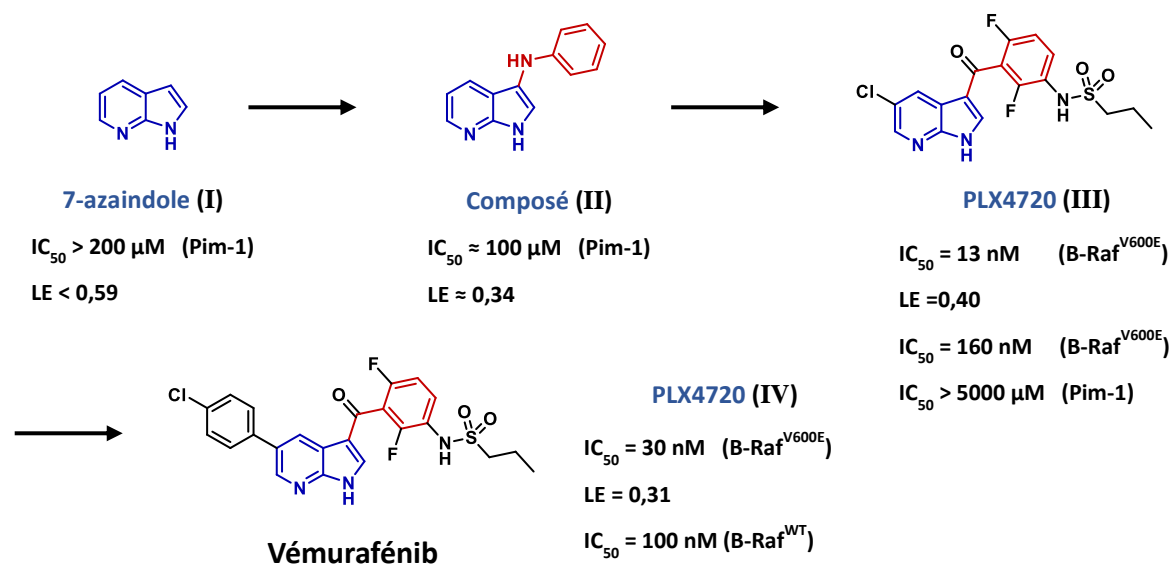


Figure 35 : Développement du médicament Vémurafénib à partir d'une approche par fragment.

Paramètres : efficacité de ligand (LE), concentration inhibitrice médiane (IC_{50}).

c. Fragment merging

Très récemment, Su *et al.* ont étudié l'affinité d'un fragment qui se lie de façon multiple dans un site de protéine transporteuse d'acides gras (FABP4)¹⁵⁴. FABP4 est principalement exprimée dans les adipocytes matures et les macrophages, agissant comme un régulateur important dans les voies de signalisation liées à l'inflammation. Récemment, Li *et al.* ont signalé que la FABP4 favorisait la croissance et les métastases du cancer du sein¹⁵⁵. Par conséquent, des inhibiteurs sélectifs de la FABP4 pourraient être utilisés comme traitement du cancer. Le criblage d'une librairie de 500 fragments a été effectué par une technique de fluorescence. Le fragment (A) a montré une très bonne inhibition de FABP4 ($K_i = 51 \mu\text{M}$ et $LE = 0,37 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$) dès le premier criblage (Figure 36). Les chercheurs ont caractérisé le mode de liaison à l'aide de la cristallographie, ce qui était en soi un défi car la protéine était co-purifiée avec des acides gras liés. Ils ont dû dénaturer la protéine, éliminer les acides gras, puis la replier pour obtenir la forme apo. Lorsqu'ils ont finalement pu déterminer la structure cristalline, ils ont été surpris de constater que le composé (A) adopte trois modes de liaison différents dans deux conditions différentes (pH 6,5 et 7,5).

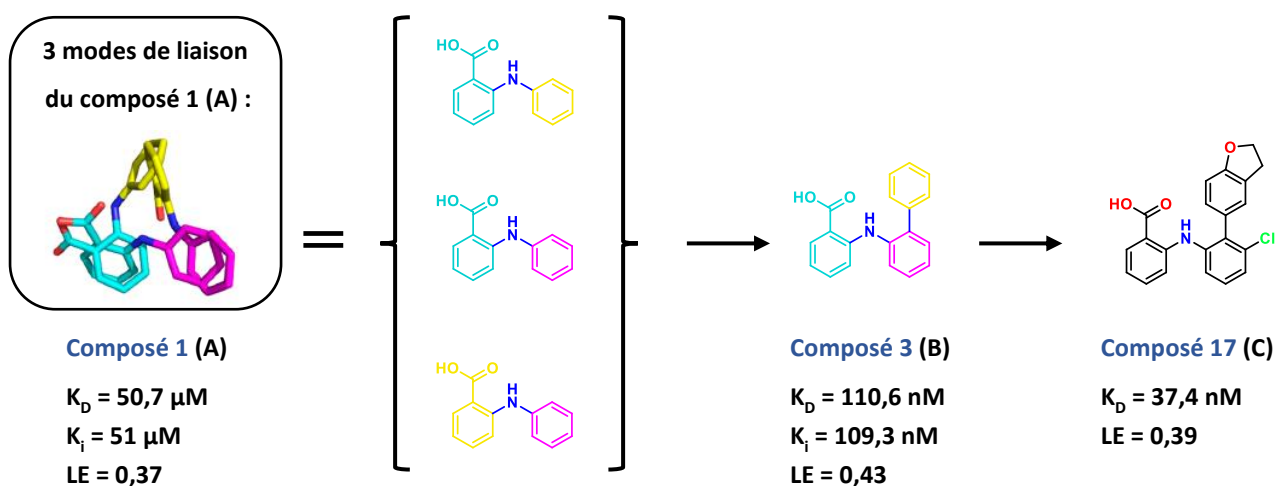


Figure 36 : Superposition des trois modes de liaison et optimisation du fragment A vers un candidat-médicament anticancéreux à partir d'une approche par fragment. Paramètres : efficacité de ligand (LE), constante de dissociation (K_D), constante d'inhibition (K_i).

Le composé 3 (B) a été conçu, synthétisé et évalué de manière rationnelle à partir des 3 modes de liaison (Figure 36), améliorant d'environ 460 fois l'affinité de liaison par rapport au fragment (A) initial. Une autre amélioration a finalement conduit au composé 17 (C), avec une affinité de 37 nM. Cette molécule est également active dans les tests cellulaires et possède des propriétés anti-inflammatoires et des propriétés pharmacocinétiques étonnamment bonnes chez

la souris. Compte tenu de la bonne efficacité *in vivo*, l'application du composé 17 dans d'autres mécanismes biologiques liés au FABP4 est envisageable, tels que le cancer du sein.

Dans le cadre de ma thèse, la technique biophysique SPR a été utilisée pour effectuer le premier criblage de 500 fragments sur la cible IspD de *Bacillus anthracis*. La technique de RMN STD a ensuite permis de confirmer les interactions de fragment avec l'enzyme IspD et le Docking a apporté des informations structurales sur leurs positionnements dans les sites de liaison. Une technique biochimique enzymatique a été utilisée pour réaliser un second criblage des touches et ainsi déterminer leurs potentiels d'inhibition. Enfin une optimisation de fragment a été réalisée pour les touches les plus prometteuses dans l'objectif de conduire à un candidat-médicament. Ce manuscrit décrit donc dans un premier chapitre le criblage par SPR. Le second regroupe les tests réalisés par RMN, par docking et par technique biochimique. Enfin, le dernier chapitre décrit l'optimisation de fragments.

Chapitre 2

Le criblage de fragments en
utilisant la résonance
plasmonique de surface

2. Le criblage de fragments en utilisant la résonance plasmonique de surface

Après une présentation théorique du phénomène physique de la résonance plasmonique de surface (SPR), ce chapitre sera consacré à l'étude des interactions de l'enzyme IspD avec une collection de fragments.

2.1 La résonance plasmonique de surface (SPR)

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique optique reposant sur l'interaction lumière-matière qui permet la détection d'interactions biomoléculaires entre un ligand (molécule organique, biologique, microorganisme) et un récepteur immobilisé (protéine, enzyme, anticorps) sur une surface.

2.1.1 Découverte et applications de la SPR

Entre 1902 et 1912, R.W. Wood observe des anomalies dans le spectre de diffraction de la lumière polarisée sur un réseau de diffraction métallique : un motif de bandes sombres et claires «anormales» dans la lumière réfléchi¹⁵⁶.

L'interprétation physique de ce phénomène a été initiée par Lord Rayleigh puis des analyses théoriques entreprises par U. Fano¹⁵⁷, en 1941, ont permis de conclure que ces anomalies étaient associées aux ondes de surface (plasmons de surface) supportées par le réseau. En 1965, A. Hessel et A. A. Oliner proposent une théorie plus générale des anomalies observées par R. W. Wood pour les réseaux métalliques. Ils interprètent ces anomalies par des effets de résonance provenant du couplage entre l'onde incidente et les modes propres du réseau¹⁵⁸ (phénomène détaillé ci-après). Trois ans plus tard, E. Kretschmann¹⁵⁹ et A. Otto¹⁶⁰ ont montré indépendamment que des plasmons de surface sont excités en éclairant un prisme ayant un indice de réfraction plus élevé que l'air sous un angle critique dans des conditions de réflexion totale interne. Ces travaux ont permis d'établir une méthode simple et efficace d'excitation des plasmons, ce qui a engendré un intérêt particulier pour ce phénomène. En 1983, Nylander et Liedberg exploitent ce phénomène appelé résonance des plasmons de surface (SPR) pour la détection des gaz et des biomolécules¹⁶¹. Les trois décennies suivantes ont vu le développement considérable de la SPR dans des domaines aussi vastes que l'analyse des aliments^{162,163}, la découverte de médicaments^{164,165}, le diagnostic clinique^{166,167}, la surveillance environnementale¹⁶⁸, la bactériologie¹⁶⁹ et la virologie^{170,171}. Cette technique présente de

nombreux avantages. Elle ne nécessite notamment aucun marquage préalable des molécules cibles et permet la détection en temps réel d'interactions, telles que anticorps-antigène¹⁷², protéine-protéine¹⁷³, enzyme-substrat ou inhibiteur¹⁷⁴, protéine-ADN¹⁷⁵, récepteur-médicament¹⁷⁶, protéine-polysaccharide¹⁷⁷, protéine-virus¹⁷⁸. De plus, des mesures directes de l'affinité et des constantes cinétiques des interactions biomoléculaires sont possibles¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

2.1.2 Un peu de sciences physiques...

2.1.2.1 Les plasmons de surface

Au niveau de la physique, les plasmons de surface sont des ondes électromagnétiques (Figure 37A) de surface qui se propagent dans une direction parallèle à l'interface métal-diélectrique (Figure 37B). Ils correspondent à des oscillations de la densité de charges pouvant exister à l'interface entre ces deux milieux. Le plasmon peut être décrit par une oscillation collective d'électrons.

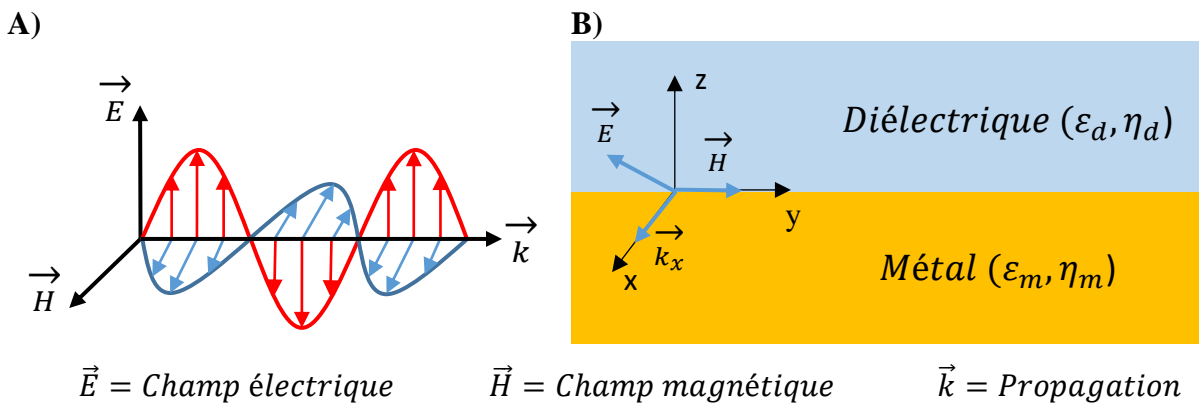


Figure 37 : Onde électromagnétique et oscillation à l'interface métal/diélectrique.

A) Représentation schématique d'une onde électromagnétique selon le vecteur de propagation \vec{k} . B) Schéma de la propagation des oscillations du plasma d'électrons libres à l'interface métal / diélectrique. Le métal et le diélectrique ont des permittivités et des indices de réfractifs notés respectivement ϵ_m , η_m et ϵ_d , η_d .

Il a été montré que le plasmon de surface est un mode magnétique transverse (polarisation TM) décrit par un champ magnétique \vec{H} dans le plan de l'interface métal diélectrique et perpendiculaire à la direction de propagation^{182,183}. Ainsi, si on utilise un repère cartésien (Figure 37B) dans lequel le métal occupe la région $z < 0$, les plasmons de surface se propagent

le long de l'axe x et les vecteurs \vec{H} et \vec{E} sont définis de la manière suivante (avec $i = 1$ pour le métal et $i = 2$ pour le diélectrique) avec les vecteurs champs H_i et E_i s'écrivant¹⁸³ :

Si $z > 0$:

$$H_2 = (0, H_{y2}, 0)e^{i(k_{x2}x+k_{z2}z-\omega t)} \quad (3)$$

$$E_2 = (E_{x2}, 0, E_{z2})e^{i(k_{x2}x+k_{z2}z-\omega t)} \quad (4)$$

Si $z < 0$:

$$H_1 = (0, H_{y1}, 0)e^{i(k_{x1}x-k_{z1}z-\omega t)} \quad (5)$$

$$E_1 = (E_{x1}, 0, E_{z1})e^{i(k_{x1}x-k_{z1}z-\omega t)} \quad (6)$$

Ces champs doivent vérifier les équations de Maxwell (voir Annexe 1 pour la démonstration) et leurs résolutions permettent d'exprimer la constante de propagation des plasmons de surface selon l'équation suivante :

$$k_x = \frac{\omega}{c_0} \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} \quad (7)$$

Avec k_x correspondant à la constante de propagation de l'onde selon l'axe x, c_0 la célérité (m.s⁻¹) de la lumière dans le vide, ω la fréquence angulaire ou pulsation (rad.s⁻¹) et ε_d , ε_m respectivement la permittivité (F.m⁻¹) du diélectrique et du métal.

Il a été montré que pour les métaux ayant une constante diélectrique complexe de la forme $\varepsilon_m = \varepsilon'_m + i\varepsilon''_m$, la constante de propagation des plasmons de surfaces est complexe et correspond à¹⁸⁴ :

$$k_x = k'_x + ik''_x = \frac{\omega}{c_0} \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon'_m}{\varepsilon_d + \varepsilon'_m}} + i \frac{\varepsilon''_m}{2(\varepsilon'_m)^2} \frac{\omega}{c_0} \left(\frac{\varepsilon_d \varepsilon'_m}{\varepsilon_d + \varepsilon'_m} \right)^{3/2} \quad (8)$$

Une relation entre k_x et ω est appelée une relation de dispersion.

La permittivité d'un métal dépend de la longueur d'onde de l'onde électromagnétique qui la traverse. Ainsi, $\varepsilon'_m < 0$, est négatif dans le domaine du visible pour les métaux comme l'or et l'argent. La permittivité d'un diélectrique ε_d étant positive, il faut que $\varepsilon_d < |\varepsilon'_m|$ pour qu'il y ait génération de plasmons de surface (Équation 8). Cette condition est vérifiée avec une interface métal-diélectrique de type or et eau, par exemple.

2.1.2.2 Conditions d'excitation des plasmons de surface à une interface plane métal-diélectrique

L'approche la plus répandue pour l'excitation de plasmons de surface consiste à exploiter la réflexion totale interne de la lumière entre une face plane d'un prisme recouvert d'une couche nanométrique d'un métal noble (le plus souvent l'or ou l'argent) et le milieu extérieur (Figure 38).

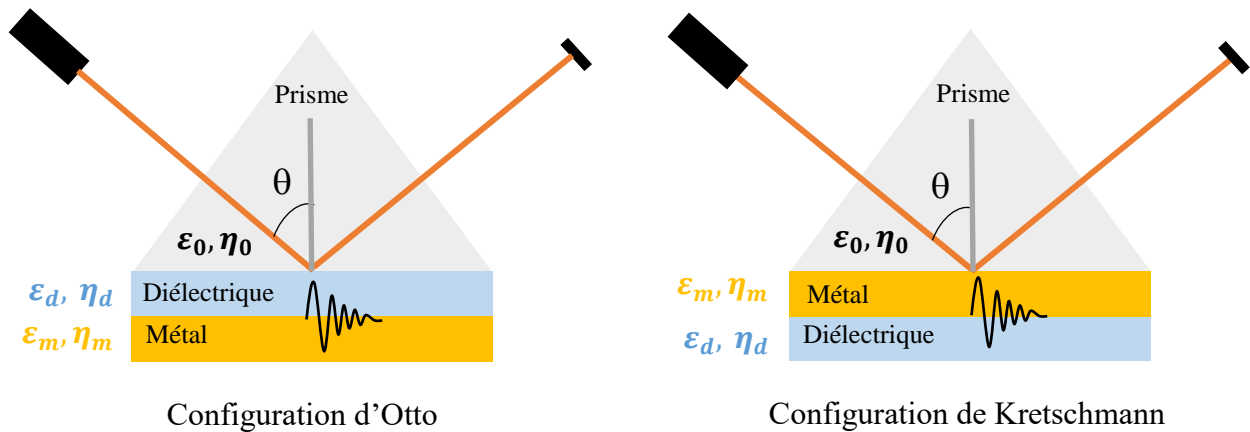


Figure 38 : Configurations d'Otto et de Kretschmann.

E. Kretschmann et A. Otto ont développé indépendamment, en 1968, deux systèmes différents pour l'excitation des plasmons de surface (Figure 38).

Dans la configuration d'Otto, une des faces d'un prisme d'indice de réfraction élevé (η_0) est recouverte d'une couche diélectrique (ϵ_d, η_d) de quelques microns d'épaisseur, et cette couche est elle-même recouverte d'une couche métallique nanométrique (ϵ_m, η_m). Lorsque un faisceau lumineux de polarisation TM traverse le prisme sous un angle d'incidence θ supérieur à l'angle critique (aussi appelé angle de réflexion totale), une onde évanescente est produite à l'interface entre le prisme et le milieu diélectrique. Cette onde peut se coupler avec un plasmon de surface à l'interface entre le milieu diélectrique et la couche métallique lorsque les constantes de propagation de l'onde évanescente et du plasmon sont identiques.

La configuration de Kretschmann est basée sur le même dispositif (Figure 38) que précédemment mais une face du prisme est directement recouverte d'une couche métallique nanométrique. Le plasmon se propage à l'interface entre cette couche et le milieu diélectrique externe.

Lorsque une onde évanescente est produite à l'interface prisme-métal (cas Kretschmann, Figure 39), elle excite le plasmon de surface lorsque la composante de sa constante de propagation

parallèle (ou tangentielle) à la surface métallique (k_x du prisme : $k_{x \text{ prisme}}$) est égale à celle du plasmon (k_{SP}). Cette condition revient à vérifier la relation suivante :

$$k_{x \text{ prisme}} = k_{SP} \quad (9)$$

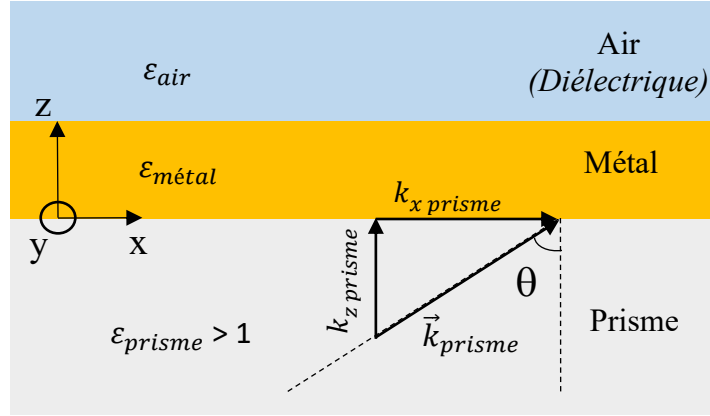


Figure 39 : Conditions d'excitation des plasmons de surface dans la configuration de Kretschmann.

La constante $k_{lumière \text{ incidente}}$ de la lumière qui arrive sur le prisme s'écrit :

$$k_{lumière \text{ incidente}} = \frac{\omega}{c_0} \quad \text{avec sa constante tangentielle :} \quad k_{x \text{ lumière \text{ incidente}}} = \frac{\omega}{c_0} \sin \theta \quad (10)$$

Cette lumière traverse le prisme et la composante tangentielle $k_{x \text{ lumière \text{ incidente}}}$ de la lumière incidente

augmente par passage dans le prisme d'un facteur $\sqrt{\epsilon_p}$ et on obtient :

$$k_{x \text{ prisme}} = \frac{\omega}{c_0} \sqrt{\epsilon_p} \sin \theta = \frac{\omega}{c_0} n_p \sin \theta \quad (11)$$

Avec $k_{x \text{ prisme}}$ la composante tangentielle de l'onde incidente dans le prisme, ω la fréquence angulaire de l'onde électromagnétique, c_0 la vitesse de la lumière dans le vide, ϵ_p la permittivité du prisme ($\epsilon_p = n_p^2$ avec n_p l'indice de réfraction du prisme) et θ l'angle d'incidence de la lumière dans le prisme^{159,183,185}.

Cette onde évanescente générée lors de la réflexion totale interne de l'onde incidente dans le prisme va permettre d'exciter le plasmon de surface.

La permittivité d'un métal (ϵ_m) est fonction de la fréquence angulaire ω . Les constantes de propagation aux interfaces métalliques ne sont donc pas des fonctions linéaires de ω .

Les relations de dispersion sont représentées dans la Figure 40^{159,183,185}. Cette figure permet d'expliquer géométriquement le principe de couplage.

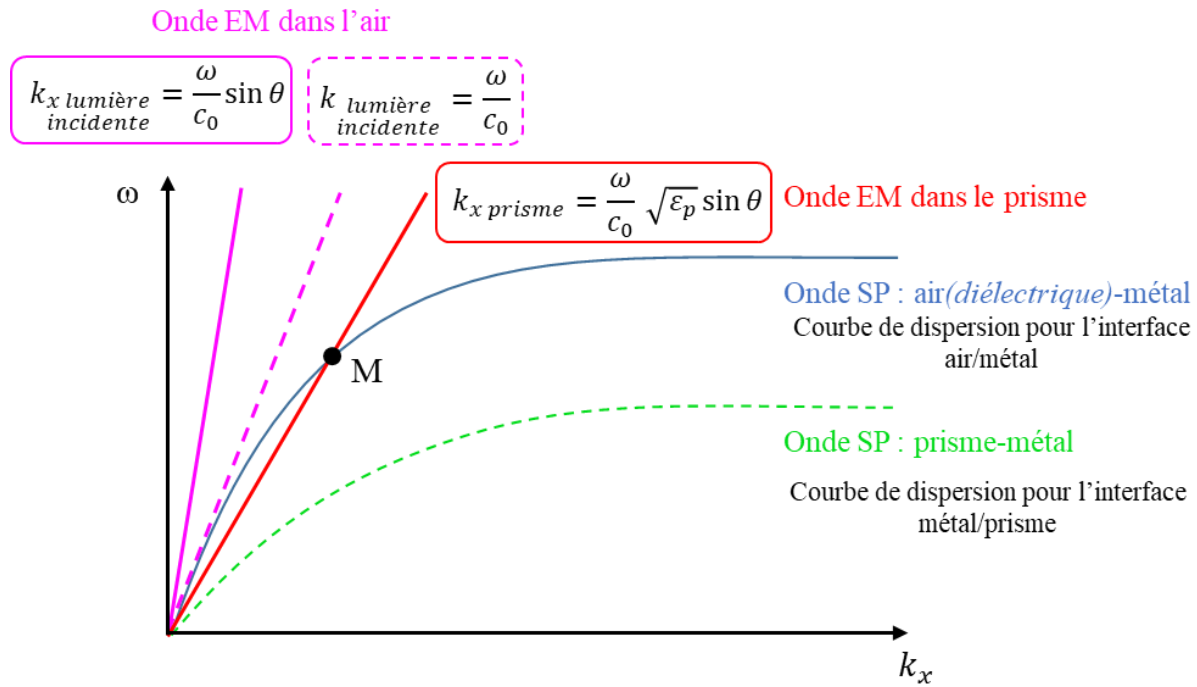


Figure 40 : Représentation des relations de dispersion. Onde EM : onde électromagnétique de la lumière incidente, Onde SP : onde électromagnétique des plasmons de surface.

D'après ce dispositif, le phénomène d'excitation du plasmon a lieu à l'angle d'incidence tel que deux courbes de dispersion se croisent (le point M) :

soit

$$k_{SP} = \frac{\omega}{c_0} \sqrt{\frac{\epsilon_{\text{air}} \epsilon_{\text{métal}}}{\epsilon_{\text{air}} + \epsilon_{\text{métal}}}} = \frac{\omega}{c_0} \sqrt{\epsilon_{\text{prisme}}} \sin \theta \quad (12)$$

soit

$$\sqrt{\frac{\epsilon_{\text{air}} \epsilon_{\text{métal}}}{\epsilon_{\text{air}} + \epsilon_{\text{métal}}}} = \sqrt{\epsilon_{\text{prisme}}} \sin \theta \quad (13)$$

La Figure 40 montre que la courbe de dispersion à l'interface air-métal et la ligne de lumière ne se coupent pas. Cette absence d'intersection interdit tout couplage ou résonance entre une onde électromagnétique du domaine visible en particulier, et un mode de propagation des plasmons de surface. Il n'est pas possible d'exciter les plasmons de surface en éclairant directement le métal avec une source de lumière. Nous pouvons également remarquer sur la Figure 40 qu'il ne sera pas possible d'exciter les plasmons à l'interface prisme-métal.

La relation (12) est obtenue pour un angle d'incidence θ et une fréquence (ou longueur d'onde) donnée. Il faut également que la lumière passant à travers le prisme soit polarisée radialement à l'interface (polarisation TM).

En plus de ces conditions, pour que l'onde évanescente puisse passer au travers de la couche métallique et se coupler avec le plasmon de surface à l'interface métal-diélectrique, il est nécessaire que l'épaisseur de la couche métallique soit suffisamment mince (30 à 70 nm).

2.1.2.3 La réflexion totale interne

Lorsqu'un rayon lumineux incident traverse un milieu d'indice n_1 avec un angle θ_1 supérieur à l'angle critique θ_c , il ne pénètre pas dans le milieu d'indice optique n_2 ($n_1 > n_2$) mais est totalement réfléchi dans le milieu d'indice n_1 ; c'est la réflexion totale interne (Figure 41).

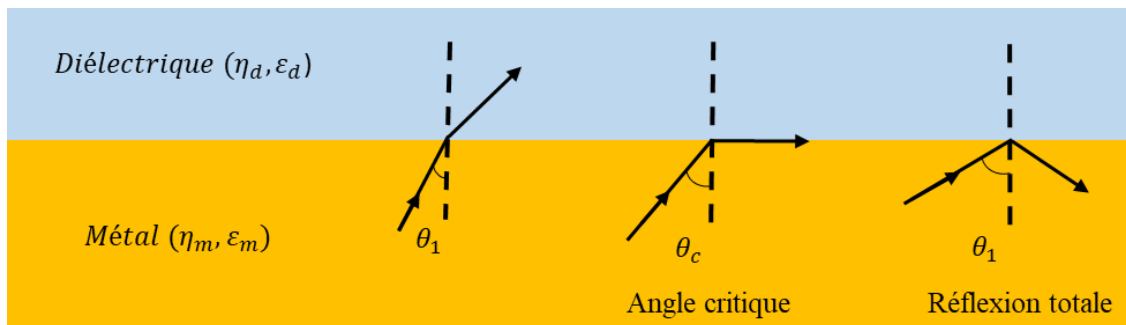


Figure 41 : Schéma illustrant la réflexion totale interne.

Pour une longueur d'onde définie et un angle d'incidence θ_1 de réflexion totale interne particulier, l'énergie apportée par le rayon incident va créer une onde évanescente. Quand θ_1 vérifiera l'équation (13), cette dernière sera capable de résonner avec l'onde électromagnétique du plasmon de surface. Une diminution de l'intensité du rayon lumineux réfléchi est alors observée due à l'absorption de cette énergie photonique (Figure 42).

L'angle correspondant au minimum d'intensité lumineuse réfléchie est appelé l'angle de résonance (θ_R). La valeur de cet angle de résonance dépend des indices de réfraction n des deux milieux entourant le métal. L'indice de réfraction du prisme restant inchangé, toute modification de l'indice de réfraction de la partie diélectrique entraînera un changement de l'indice de réfraction et une variation de l'angle de résonance allant d'un angle A à B (Figure 42).

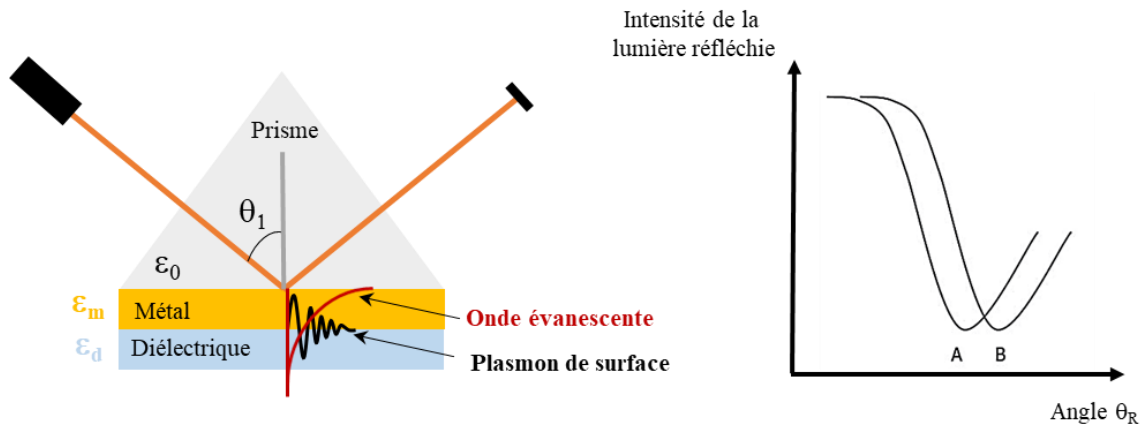


Figure 42 : Illustration du phénomène de résonance plasmonique de surface.

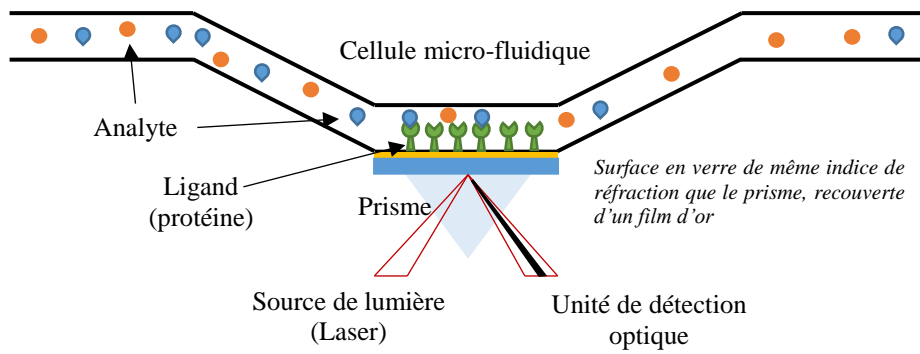
2.1.3 Instrument, mesure et modélisation

2.1.3.1 Le biocapteur

Les appareils de SPR utilisés généralement en biologie sont composés de plusieurs composants : une source lumineuse, un détecteur, une surface métallique (un film d'or), un prisme dans la configuration de Kretschmann (Figure 38) et un système fluidique (Figure 43). Comme discuté précédemment la SPR permet de détecter un changement d'indice de réfraction très proche d'une surface métallique. Lorsqu'on étudie l'interaction entre une petite molécule et une protéine, la surface métallique contient la protéine d'intérêt greffée et la partie diélectrique correspond à de l'eau (Tampon). Le système microfluidique permettant d'injecter en continu la molécule en solution. Si la molécule interagit avec la protéine greffée, il y a une augmentation de la masse à la surface. Cette variation entraîne un changement d'indice de réfraction à la surface donc de l'énergie nécessaire pour exciter les plasmons de surface. Le principe de la SPR consiste à mesurer cette variation d'indice de réfraction.

Trois méthodes de mesure de modification de l'indice de réfraction sont utilisées dans les biocapteurs :

- à longueur d'onde fixe, l'angle de résonance varie.
- pour un angle d'incidence fixe, la longueur d'onde d'excitation va changer.
- à angle d'incidence et longueur d'onde fixe, l'intensité lumineuse va changer (Figure 43A et B).



Une variation d'angle de 10^{-4} degré = 1 RU

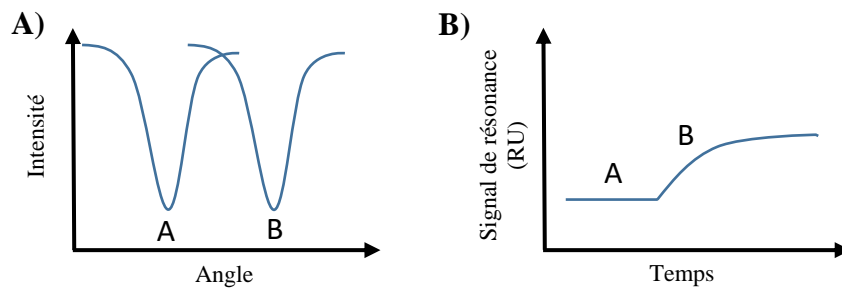


Figure 43 : Présentation schématique de fonctionnement d'un biocapteur SPR.

La méthode la plus utilisée dans les appareils commerciaux est la mesure du changement de l'angle de résonance (Figure 43A) qui peut être suivi en temps réel grâce à un détecteur optique qui mesure le changement d'intensité lumineuse. Cette variation d'angle est traduite en unité de résonance (RU) qui correspond à une variation de l'angle de résonance de 10^{-4} degré. Les signaux sont compilés dans un graphique nommé sensorgramme (Figure 43B). Il est donc possible de mesurer en temps réel, à l'aide des sensorgrammes, l'affinité ainsi que la cinétique des interactions entre les molécules injectées et les biomolécules (ligands, Figure 43) fixées à la surface¹⁸⁶⁻¹⁸⁸.

Cette technologie utilisant la configuration de Kretschmann (Figure 38) a été commercialisée pour la première fois en 1990 par la société Pharmacia Biosensor sous le nom de Biacore¹⁸⁹. Cette configuration est plus avantageuse en pratique, compte tenu que le plasmon peut dans ce cas révéler des changements d'indice du milieu extérieur (diélectrique). C'est pourquoi cette configuration est la plus rencontrée dans les dispositifs expérimentaux de SPR dont le Biacore (groupe Cytiva). Depuis, plusieurs plateformes ont été développées et commercialisées. Les études SPR au cours de cette thèse ont été réalisées sur un appareil Biacore T200.

2.1.3.2 La surface du biocapteur

Comme décrit auparavant, la SPR permet de détecter une variation de matière sur une surface métallique. Ce phénomène est exploité dans les biocapteurs afin de détecter les interactions entre une biomolécule immobilisée sur cette surface et un partenaire biologique. La surface de transduction développée par Biacore est constituée d'une fine couche d'or (50-100 nm) sur une lamelle de verre (avec le même indice de réfraction que le prisme). L'or a été préféré à d'autres métaux comme l'argent, le cuivre ou l'aluminium en raison de sa stabilité chimique. Il s'agit d'un système jetable (sensor chip) qui vient se positionner sur le prisme lorsqu'il est introduit dans l'appareil. (Figure 44).



Figure 44 : « Sensor chip » vendu par Cytiva, avec sa surface d'or.

Des études de chimie de surface ont permis la modification de l'or par une couche auto-assemblante de thiols à longue chaîne à laquelle une matrice constituée de dextrane carboxyméthylé a été immobilisée à la surface et forme un hydrogel. L'épaisseur de cette couche d'hydrogel de dextrane (100 à 200 nm) est compatible avec le champ évanescent, et crée un environnement favorable pour la plupart des interactions biomoléculaires^{190,191}. De plus, les groupements acides carboxyliques des chaînes saccharidiques permettent de greffer de façon covalente des ligands (une enzyme dans notre projet) à la surface du biocapteur (Figure 45).

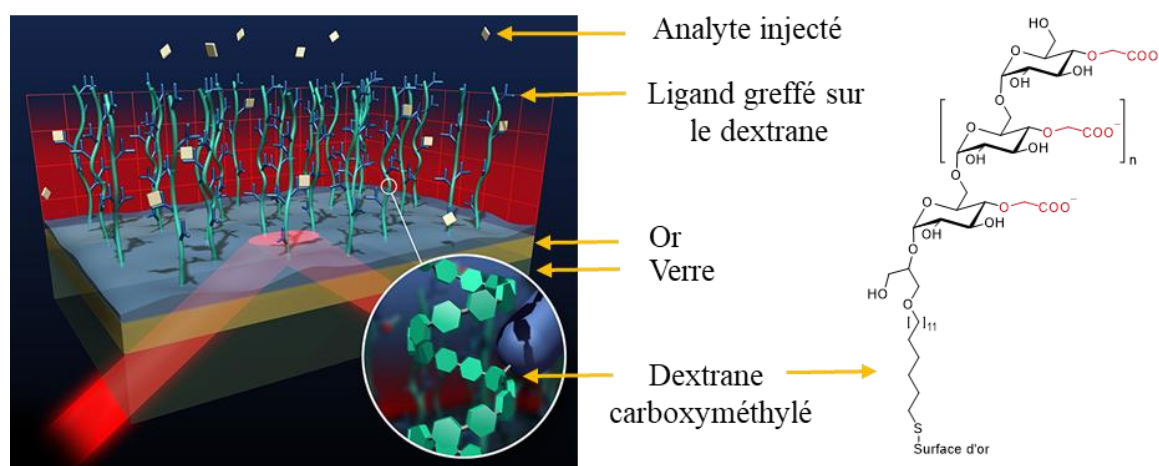


Figure 45 : La nanoarchitecture d'une surface SPR composé de dextrane carboxyméthylé dont la structure est représentée (à droite). Image (à gauche) reproduite de Schasfoort and Tudos¹⁹².

2.1.3.3 Le système microfluidique

Un système à deux seringues contrôle l'apport des différentes solutions. Ces dernières sont contenues dans des tubes déposés sur un support alphanumérique (microplaques de 96 ou 384 puits) dans un caisson thermostaté. Le système microfluidique est constitué de quatre canaux (Figure 46) qui une fois pressés contre la surface d'or (sensor chip) forment quatre surfaces distinctes, Fc1 pour la surface de référence et Fc2, Fc3 et Fc4 pour la fixation des protéines, d'anticorps ou de molécules.

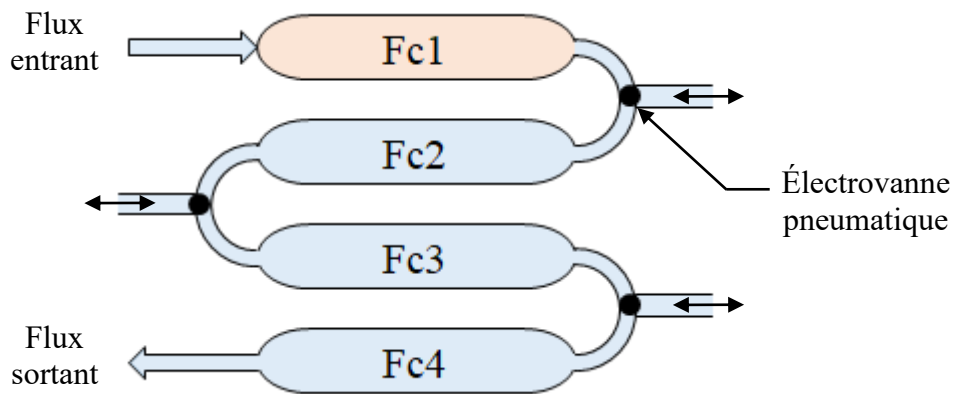


Figure 46 : Schématisation d'un système microfluidique de l'appareil Biacore T200.

Le logiciel informatique permet de programmer les séquences d'injection à l'aide d'un système d'électrovalves pneumatiques (points noirs sur la Figure 46) qui contrôlent les débits d'injection et les solutions injectées.

2.1.4 Mise en œuvre d'une expérience et analyse des données

2.1.4.1 Immobilisation du ligand sur la surface d'or

Les biomolécules comme les enzymes peuvent perdre une partie ou toute leur « bioactivité » lors de leur immobilisation. Ce phénomène peut être attribué à plusieurs causes : changement de conformation de l'enzyme lors de son immobilisation, gêne stérique, orientation non favorable. Plusieurs méthodes d'immobilisation sur la surface d'or ont été développées, notamment sur une surface d'or recouverte de dextrane. On décrira uniquement dans ce chapitre la méthode de couplage utilisée dans ce projet (bien que d'autres aient été envisagées si celle-ci avait posé problème).

Le dextrane carboxyméthylé (CM) est un polymère flexible, dont la carboxyméthylation permet d'avoir une charge nette négative, limitant ainsi l'adsorption non spécifique. L'absence de réticulation entre les chaînes permet d'avoir un environnement tridimensionnel ouvert où la matrice de CM peut être utilisée pour la fixation covalente des protéines¹⁹³. En effet, les groupements carboxyles permettent une immobilisation des biomolécules *via* une liaison covalente sur la surface. Cette méthode est la plus utilisée en SPR car elle permet de fixer directement les protéines à la surface, *via* les groupements amines des résidus lysines¹⁹⁴. Ce couplage consiste à faire réagir les groupements amines primaires des lysines avec les groupements acides carboxyliques présents à la surface suite à une réaction avec l'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) et le NHS (N-hydroxysuccinimide)¹⁹⁵. Finalement de l'éthanolamine permet de bloquer les sites activés n'ayant pas réagi¹⁹⁶ (Figure 47).

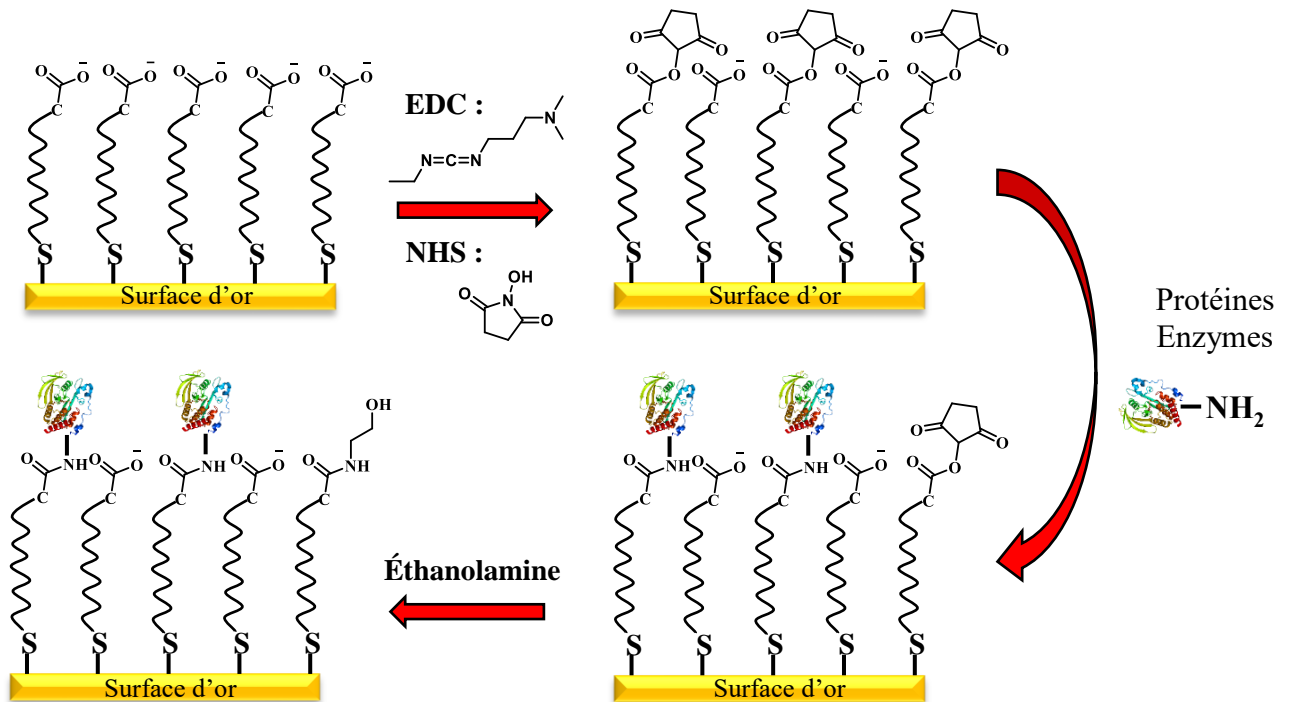


Figure 47 : Réaction de couplage entre les amines primaires de l'enzyme et les groupements carboxyliques présents à la surface via une activation par NHS / EDC.

2.1.4.2 Le sensorgramme

Une mesure en continu des variations de l'angle de résonance permet d'obtenir un sensorgramme qui est représentatif des interactions entre les biomolécules immobilisées et les composés injectés dans la cellule microfluidique (Figure 48). Les changements de masse dus à

l'association ou à la dissociation des complexes modifient l'angle de résonance. Cette variation d'angle est exprimée en unité de résonance (RU ; 1RU = 10^{-4} degré) et rend compte de ce qui est présent à un instant t sur la surface métallique. Ce signal permet de recueillir les données cinétiques d'association et de dissociation entre les biomolécules immobilisées (les protéines dans notre cas) et les analytes injectés.

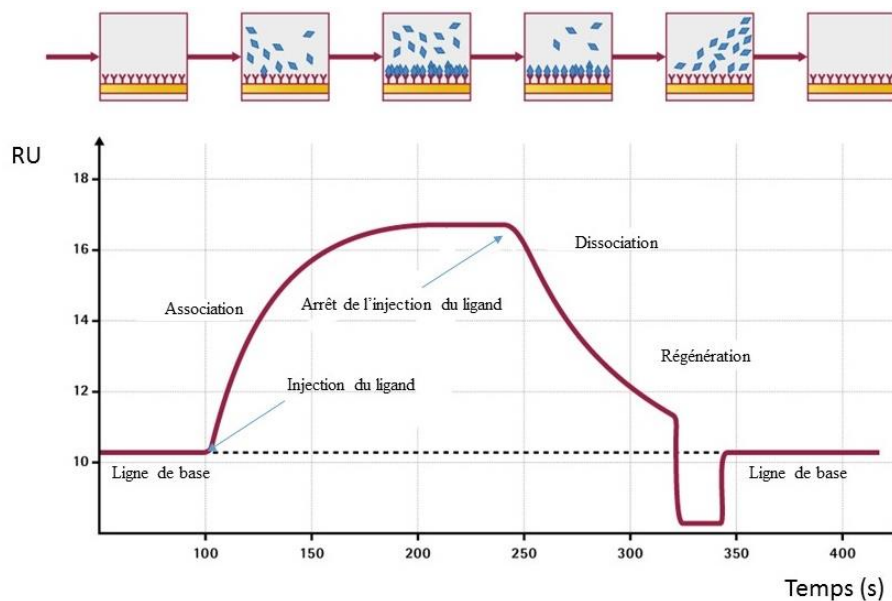


Figure 48 : Exemple de sensorgramme ou suivi cinétique en temps réel de la lumière réfléchie décrivant successivement une phase d'association et une phase de dissociation.

Un sensorgramme est composé de plusieurs phases :

La ligne de base correspond au signal en présence de tampon (injection de tampon) lorsque la biomolécule est immobilisée.

La phase d'association correspond à la formation d'un complexe entre l'analyte injecté et la « biomolécule » immobilisée (injection du ligand). La réponse atteint un plateau correspondant à l'équilibre entre association et dissociation du complexe.

La phase de dissociation commence lorsque l'analyte n'est plus injecté. Les complexes formés se dissocient lors de l'injection de tampon.

Une solution de régénération peut être injectée si la dissociation du complexe n'est pas complète.

On appellera un cycle la réalisation d'un sensorgramme (Figure 48) : de l'injection du ligand au retour à la ligne de base. On notera expérience : l'accomplissement de plusieurs cycles.

2.1.4.3 La surface de référence

La qualité des données obtenues par SPR dépend de nombreux paramètres, notamment de la surface de référence qui permet de corriger certains *artefacts*. Des réponses incorrectes peuvent être observés en SPR pour différentes raisons telles que : (i) l'existence d'une différence d'indice de réfraction entre le tampon circulant et celui de l'échantillon injecté ; (ii) la présence d'interactions non spécifiques ; (iii) le changement de l'indice de réfraction au début de chaque cycle.

L'appareil Biacore que nous avons utilisé permet de suivre le signal sur 4 canaux en même temps. La surface d'or peut être « découpée » en 4 surfaces différentes ce qui permet de traiter les 4 surfaces séparément. On peut ainsi prévoir une expérience avec une surface de référence (sans protéine greffée), une surface avec 1 ou 2 protéines étudiées greffées et une surface avec une protéine témoin greffée. La surface de référence subit les mêmes traitements que les surfaces activées lors de la fixation de la protéine (même traitement chimique que lors de l'immobilisation). L'appareil permet de suivre en temps réel les signaux des 4 surfaces. Un traitement informatique permet de soustraire le signal de référence aux autres signaux afin d'améliorer les données.

Cependant, une légère déviation du signal au cours de l'expérience (composée de plusieurs cycles) est souvent observée. Cette déviation est unique à chaque cellule microfluidique, surface et conditions opératoires. L'injection de tampon à intervalle régulier au cours de l'expérience permet d'observer ce décalage et de le corriger. La moyenne des réponses du tampon est soustraite aux données récoltées afin de les normaliser. Cette correction ajoutée à la correction par la surface de référence (Fc1) permet d'obtenir de meilleurs résultats et est connue sous le nom de double-référencage.

2.1.4.4 Modélisation des interactions

La SPR est utilisée pour l'étude des cinétiques d'interaction protéine-petite molécule, protéine-peptide, protéine-ADN, protéine-protéine. À partir des sensorgrammes les constantes cinétiques k_a (constante d'association) et k_d (constante de dissociation) et la constante de dissociation K_D peuvent être déterminées.

Le signal mesuré en SPR correspond à une variation de l'indice de réfraction (η) à la surface du biocapteur. Lorsque des interactions se produisent au niveau de la surface d'or, comme la formation d'un complexe entre l'analyte (A) et le ligand (B, dans notre cas une protéine), la masse augmente et l'indice de réfraction est modifié. Cette variation est rapportée en unité de résonance en fonction du temps, formant ainsi un sensorgramme qui est décrit selon trois équations (Figure 49).

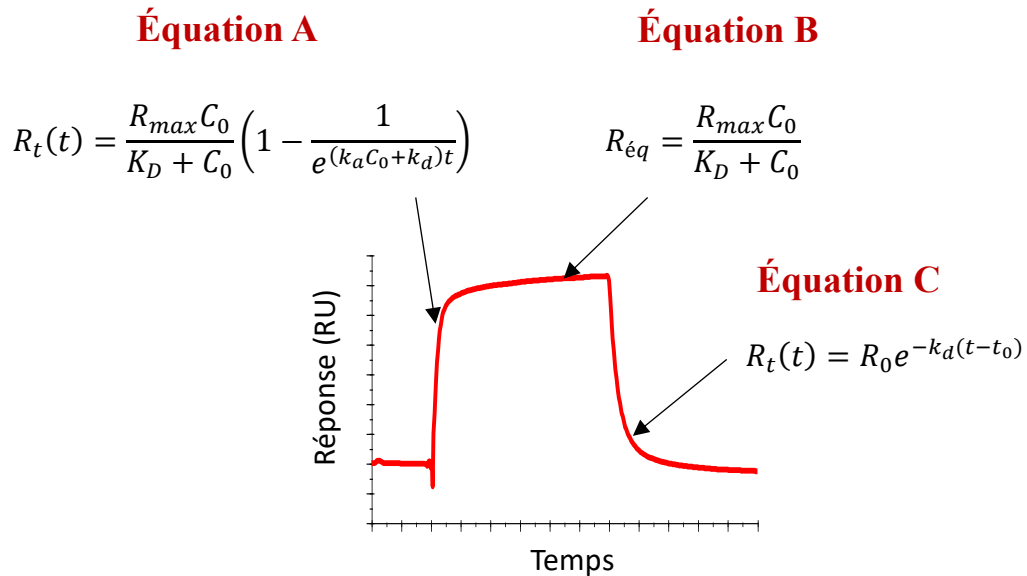


Figure 49 : Sensorgramme et équations associées.

Dans la Figure 49, C_0 est la concentration en analyte A, R_t est la réponse à un instant t , R_{max} est la réponse maximal de l'analyte et $R_{\text{éq}}$ est la réponse mesurée à l'équilibre.

Les différentes phases d'association, de dissociation et d'équilibre sont décrites selon les équations de la Figure 49 et découlent des lois de cinétique suivantes pour une interaction biomoléculaire simple :



avec, $v_a = k_a[A][B]$ et $v_b = k_d[AB]$ et la constante de dissociation K_D associé :

$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{k_d}{k_a}$$

a. La phase d'association :

Si on considère que $[A]$ correspond à la concentration l'analyte injecté et $[B]$ à la concentration du ligand immobilisé :

$$[A] = \text{constante} = C_0 ; \quad [B]_t = [B]_{\max} - [AB]_t \quad (15)$$

$$\text{or} \quad \frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] - k_d[AB] \quad (16)$$

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a C_0 ([B]_{\max} - [AB]) - k_d [AB] \quad (17)$$

$$\text{d'où} \quad \frac{d[AB]}{dt} = -[AB](k_a C_0 + k_d) + k_a C_0 [B]_{\max} \quad (18)$$

Si on considère R la réponse obtenue par l'appareil SPR, et reportée sur le sensorgramme,

$$R_t \propto [AB] \text{ et } R_{\max} \propto [B]_{\max} \quad \text{avec } \propto \text{ signifiant proportionnel}$$

alors

$$\frac{dR_t}{dt} = -R_t(k_a C_0 + k_d) + k_a C_0 R_{\max} \quad (19)$$

Or pour une équation de type $\frac{dy}{dt} = ay + b$, la solution de l'équation est $y(x) = Ce^{ax} - \frac{b}{a}$

$$\text{donc} \quad R_t(t) = Ce^{-(k_a C_0 + k_d)t} + \frac{k_a C_0 R_{\max}}{k_a C_0 + k_d} \quad (20)$$

$$\text{Si on considère que à } t = 0, R_t = 0, \text{ on obtient : } C = -\frac{k_a C_0 R_{\max}}{k_a C_0 + k_d} = -\frac{C_0 R_{\max}}{C_0 + K_D} \quad (21)$$

$$\text{On obtient finalement l'équation A : } R_t(t) = \frac{C_0 R_{\max}}{C_0 + K_D} \left(1 - \frac{1}{e^{(k_a C_0 + k_d)t}}\right) \quad (22)$$

b. La phase de dissociation :

Le fragment A n'est plus injecté à $t = t_0$: $[A] = 0$

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][AB] - k_d[AB] = -k_d[AB] \quad (23)$$

Si on considère R_t la réponse obtenue par l'appareil SPR, et reportée sur le sensorgramme,

$$\frac{dR_t}{dt} = -k_d R_t \quad (24)$$

$$\text{On obtient finalement l'équation C : } R_t(t) = R_0 e^{-k_d(t-t_0)} \quad (25)$$

avec R_0 la valeur du sensorgramme à la fin de la phase d'association,

$$\text{d'où} \quad R_t(t) = \frac{C_0 R_{\max}}{C_0 + K_D} e^{-k_d(t-t_0)} \quad (26)$$

c. À l'équilibre :

L'équation B (Figure 49) décrit l'état d'équilibre entre un analyte A et un ligand immobilisé B, elle permet de déterminer la constante de dissociation K_D .

Cet équilibre implique que les vitesses d'association et de dissociation soient égales :

$$k_a[A][B] = k_d[AB] \quad (27)$$

avec la constante d'équilibre qui s'écrit :

$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{k_d}{k_a} \quad (28)$$

Lorsque le K_D est mesuré à partir des valeurs à l'équilibre ($R_{\text{éq}}$), l'équation peut se simplifier comme suit :

$$K_D = \frac{[A]([B]_{\max} - [AB])}{[AB]} \quad (29)$$

avec

$$[B]_{\max} \propto R_{\max} \quad \text{et} \quad [AB] \propto R_{\text{éq}} \quad \text{et} \quad [A] = C_0 \quad (30)$$

$$K_D = \frac{C_0(R_{\max} - R_{\text{éq}})}{R_{\text{éq}}} \quad (31)$$

Après réarrangement de l'équation (31), l'équation B est obtenue :

$$R_{\text{éq}} = \frac{C_0 R_{\max}}{C_0 + K_D} \quad (32)$$

À l'équilibre, si

$$R_{\text{éq}} = \frac{R_{\max}}{2} = \frac{C_0 R_{\max}}{C_0 + K_D} \quad (33)$$

alors

$$K_D = C_0 \quad (34)$$

Ainsi, le K_D peut être déterminé comme la concentration en A pour laquelle 50 % de l'enzyme B est saturée (Figure 50).

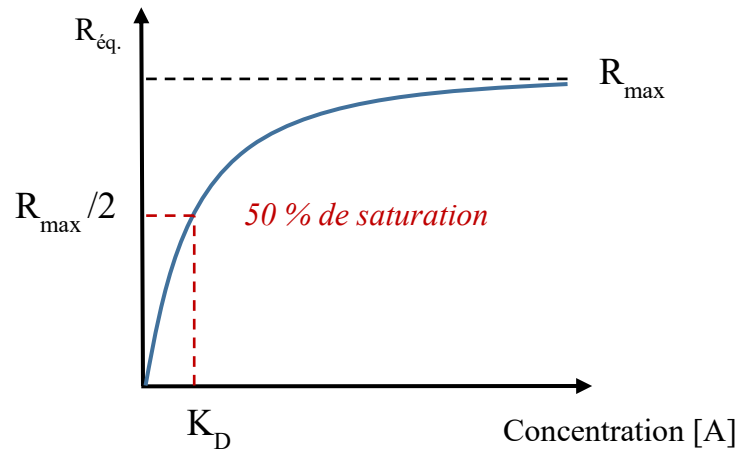


Figure 50 : Courbe de saturation des réponses à l'équilibre d'après le modèle d'interaction de Langmuir (1:1).

La courbe de saturation correspond aux réponses à l'équilibre ($R_{\text{éq}}$) des sensorgrammes obtenus pour différentes concentrations en analyte A. Les $R_{\text{éq}}$ correspondent aux valeurs en RU à l'équilibre, c'est-à-dire lorsque le sensorgramme atteint un plateau (Figure 51A, rectangle gris).

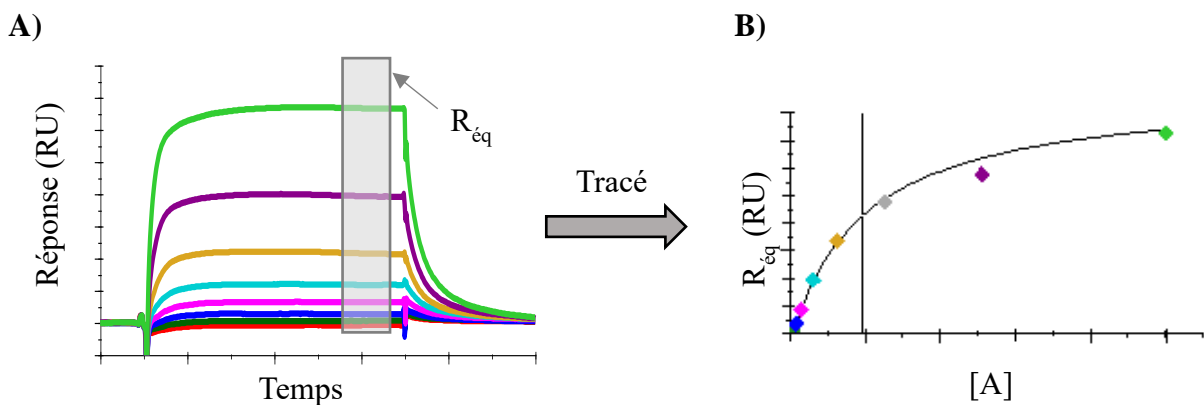


Figure 51 : Sensorgramme et tracé des réponses à l'équilibre à différentes concentrations de l'analyte A. A) Sensorgrammes obtenus pour 8 concentrations différentes en analyte. Le rectangle gris représente l'intervalle dans lequel le $R_{\text{éq}}$ est mesuré. B) Tracé des réponses à l'équilibre en fonction des concentrations en analyte [A]. Le K_D est représenté par la ligne verticale noire.

Tous les systèmes biologiques ne suivent pas le modèle cinétique biomoléculaire simple décrit ci-dessus.

Plusieurs paramètres expérimentaux peuvent être source de problème dont l'hétérogénéité de la surface provenant généralement d'une orientation aléatoire des macromolécules greffées mais aussi de la fixation trop importante des macromolécules à la surface de la puce qui engendre une mauvaise estimation des constantes cinétiques de dissociation des complexes¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. De

plus, des stœchiométries différentes de 1:1²⁰⁰ et des changements de conformation²⁰¹ peuvent également expliquer certains effets expérimentaux.

Cependant, dans le cas des interactions entre protéines et petites molécules, comme enzyme-fragment, le modèle de la Figure 49 décrit de façon adéquate les interactions dans la grande majorité des cas¹⁹⁶.

Au cours de cette thèse, la SPR a été utilisée dans le but de cribler une chimiothèque de petites molécules appelées fragments pour sélectionner ceux qui se lient à l'enzyme Ba-IspD. Cette enzyme catalyse la conversion du MEP et du CTP en CDP-ME (Schéma 6). La partie suivante se concentrera sur l'étude réalisée.

2.2 Utilisation de la SPR pour le criblage de fragment

2.2.1 Production et purification de l'enzyme Ba-IspD

Le gène codant pour l'enzyme IspD de *Bacillus anthracis* a été synthétisé, après optimisation des codons, par la société Genscript, puis cloné dans le vecteur pET-28a. Des cellules compétentes d'*Escherichia coli* BL21(DE3) ont été transformées avec ce vecteur. L'enzyme Ba-IspD a été surexprimée avec une étiquette Histidine afin d'utiliser une colonne d'affinité Ni²⁺-NTA (Qiagen) pour sa purification. L'enzyme Ba-IspD est une enzyme de 25944 Da (Figure 52) contenant 19 lysines.

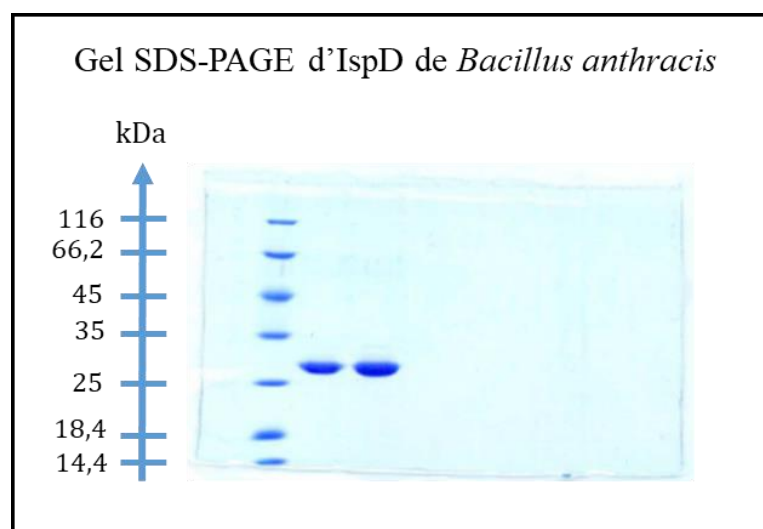


Figure 52 : Gel SDS-PAGE de l'enzyme Ba-IspD après purification sur une colonne Ni²⁺-NTA.

2.2.2 Le Biacore T200

L'appareil utilisé lors de nos études est le Biacore T200 (Cytivia) installé dans l'équipe du Dr Gilles Travé (UMR 7242) à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg.

C'est un appareil automatisé de très haute sensibilité doté du logiciel de contrôle Biacore T200 Control Software et du logiciel de traitement de données Biacore T200 Evaluation Software (Figure 53).



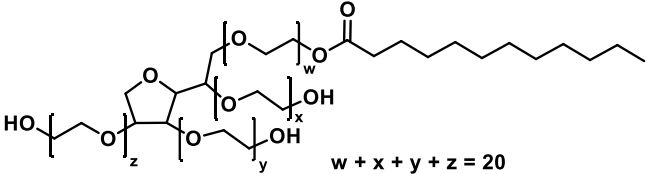
Figure 53 : Image d'un système Biacore T200 et de son logiciel de contrôle.

2.2.3 Développement de la méthode pour détecter les interactions avec Ba-IspD par SPR

Avant d'effectuer le criblage de la librairie de fragments, il a fallu développer la méthode utilisée en SPR et la valider. Deux protéines ont été immobilisées sur une puce CM5 *via* un couplage peptidique. Il s'agit des enzymes Ba-IspD et Ec-IspD (disponible au laboratoire) dans le but de savoir si des fragments sélectifs de chacune des enzymes pouvaient être sélectionnés. La protéine de sérum bovine (BSA) a aussi été fixée afin d'éliminer du criblage les fragments non spécifiques à IspD. Plusieurs tampons (Tableau 5) ont été utilisés à différentes étapes du processus de SPR notamment lors de l'immobilisation des protéines et du criblage.

Tampon	Phosphate (mmol/L)	NaCl (mmol/L)	MgCl ₂ (mmol/L)	Surfactant P20 (v/v)	DMSO (v/v)	pH
Immobilisation	50	150	2,5	0,005 %	0 %	7,4
Analyse	50	150	2,5	0,005 %	5 %	7,4

Structure du Surfactant P20 :



$w + x + y + z = 20$

Tableau 5 : Composition des tampons d'analyse utilisés dans les expériences de SPR.

Le tampon utilisé lors du criblage contient 5% de DMSO afin d'améliorer la solubilisation des fragments. Une courbe de correction a été réalisée afin d'éliminer les variations de concentration de ce solvant (cf. 2.2.3.2). Une fois ces problèmes techniques résolus, la méthode a été validée en mesurant la constante de dissociation (K_D) entre les enzymes Ba-IspD et Ec-IspD et la cytidine triphosphate (CTP) qui est un des deux substrats naturels d'IspD.

2.2.3.1 La stratégie d'immobilisation des biomolécules

Les enzymes Ba-IspD et Ec-IspD ainsi que la BSA ont été immobilisées sur la puce CM5 par couplage peptidique entre les amines des protéines et les acides carboxyliques de l'hydrogel (Figure 47) sur les surfaces Fc2, Fc3 et Fc4 respectivement.

Le pH et la molarité du tampon dans lequel est solubilisée la protéine sont des paramètres importants pour la réussite du processus de fixation sur la puce CM5. Le pH du tampon d'immobilisation a été déterminé selon le point isoélectrique (pI) de la protéine (Tableau 6).

Protéines	Ba-IspD	Ec-IspD	BSA
pI	6,53	6,16	4,70
Tampon	Acétate de sodium 10 mM pH = 5,0	Acétate de sodium 10 mM pH = 5,0	Acétate de sodium 10mM pH = 4,0

Tableau 6 : Composition des tampons d'immobilisation en fonction du point isoélectrique des différentes enzymes et protéines.

Dans la plupart des méthodes d'immobilisation, la protéine est concentrée à la surface par un processus de pré-concentration électrostatique. Ce phénomène se produit lorsque le pH du

tampon d'immobilisation de la protéine est inférieur au point isoélectrique de la protéine. En effet, la protéine est alors globalement chargée positivement, mais le pH doit être supérieur au pKa des groupes carboxyles de la surface (pKa = 3,5) de sorte que ces groupements restent chargés négativement (Figure 54).

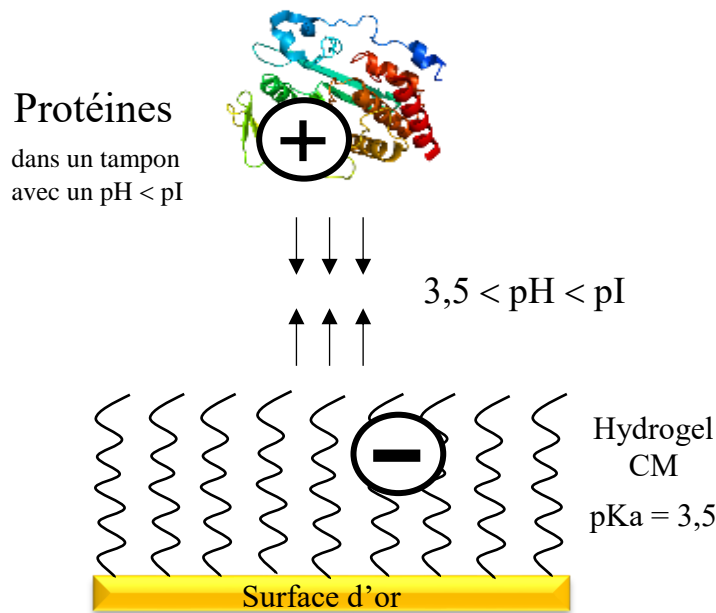


Figure 54 : Illustration des interactions électrostatiques entre la protéine et la surface lors d'une pré-concentration.

De plus, une faible force ionique favorise ces interactions électrostatiques, ce qui explique que les tampons utilisés ont une faible molarité (10 mM). Le couplage covalent se fait dans des conditions douces afin qu'une petite fraction des groupes nucléophiles (amines) soit réactive, ce qui conduit à très peu de points d'immobilisation, avec peu ou pas de réticulation et une forte probabilité de préserver l'activité²⁰². À noter que d'après une étude de Papalia *et al.*²⁰³ sur l'anhydrase carbonique II, les constantes cinétiques (k_a , k_d , K_D) déterminées par la SPR étaient corrélées à celles obtenues par ITC en solution. Ainsi, les auteurs en ont conclu que la liaison covalente entre les biomolécules et la surface ne semble pas modifier les mesures des constantes cinétiques.

Le sensorgramme issu de la fixation des trois protéines est illustré dans la Figure 55. On peut y observer les différentes étapes de la fixation : injection de la solution NHS/EDC, puis des différentes protéines et enfin de l'éthanolamine. Il permet d'évaluer les différents niveaux d'immobilisation des protéines. Le taux d'immobilisation (TI) d'une protéine est mesuré en

faisant la soustraction entre la valeur RU avant injection de la protéine (t = 700 s) et la valeur RU obtenue après désactivation de la surface par l'éthanolamine (t = 1450 s) (Figure 55).

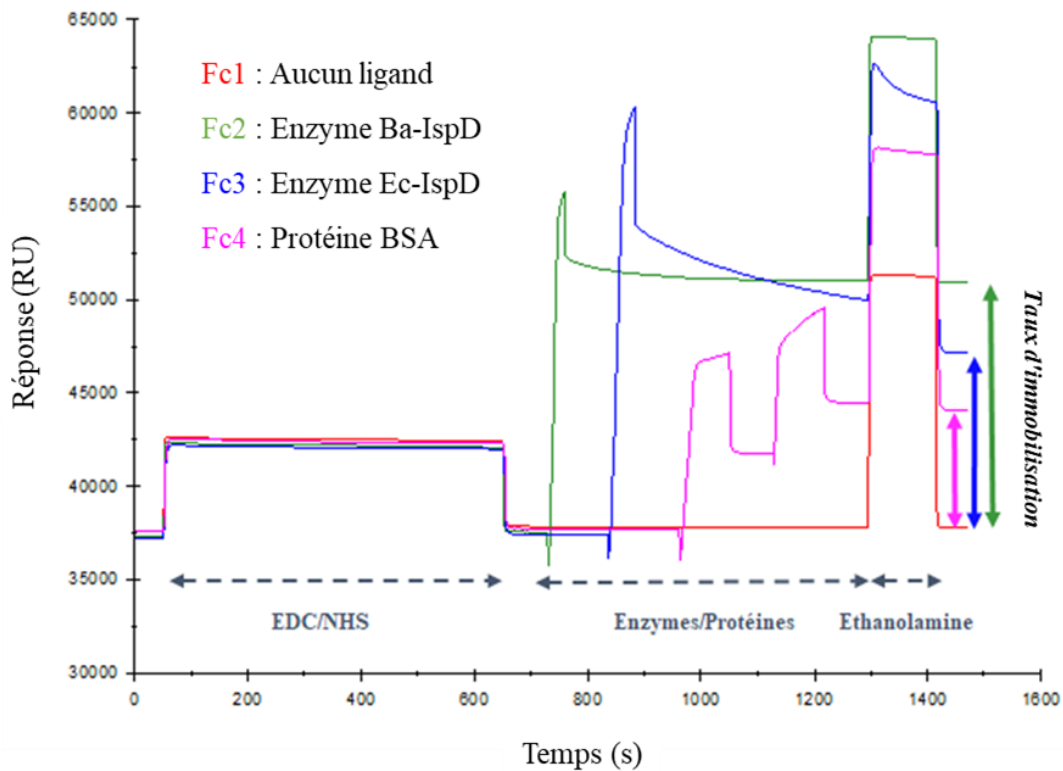


Figure 55 : Sensorgramme de l'immobilisation des enzymes *Ba-IspD*, *Ec-IspD* et de la BSA. La solution d'EDC/NHS est injectée pendant 10 min, les enzymes sont injectées respectivement pendant 30 s, 45 s, 90 s (x2) et pour l'éthanolamine 120 s. Les doubles flèches représentent le taux d'immobilisation de *Ba-IspD* (vert), *Ec-IspD* (bleu) et BSA (rose).

Le taux d'immobilisation moyen diffère selon les enzymes IspD de *Bacillus anthracis*, d'*Escherichia coli* et de la BSA. Ce taux est corrélé à la quantité d'enzyme fixée. Une réponse de 1000 RU correspond à une variation de la masse d'environ 1 ng/mm² (100 ng/cm²) sur une puce CM5 (surface 1 cm²). En considérant la hauteur de l'hydrogel CM5 à 100 nm, une réponse de 1000 RU lors de la fixation d'une protéine correspond à une concentration de 10 mg/ml (100 ng de protéine fixée pour un volume de 1x10⁻⁵ ml) de protéine (Tableau 7) :

Protéines	Ba-IspD	Ec-IspD	BSA
Temps d'injection (s)	30	45	90 (x2)
Taux d'immobilisation moyen (RU)	12894 ± 186	9053 ± 300	5831 ± 380
Concentration en protéine (mg/ml)	129 ± 2	91 ± 3	58 ± 4

Tableau 7 : Le taux d'immobilisation des enzymes *IspD* et de la BSA en fonction du temps d'injection et la conversion en concentration massique.

D'après le taux d'immobilisation d'une enzyme (Tableau 7), la réponse R_{max} théorique d'un analyte, s'il occupe tous les sites de fixation du ligand, peut être calculée selon l'équation suivante :

$$R_{max} \text{ théorique} = \frac{MM_A}{MM_L} * TI * n \quad (35)$$

avec MM_A la masse molaire de l'analyte (Da), MM_L la masse molaire du ligand (Da), TI le taux d'immobilisation (RU) et n la stœchiométrie de liaison.

Cependant, selon leur immobilisation, toutes les enzymes ne sont pas orientées de la même façon et leurs sites actifs sont plus ou moins accessibles. Une activité de la surface (R_{act}) correspondant au pourcentage de site actif accessible peut être déterminée selon l'équation suivante :

$$R_{act} (\%) = \frac{R_{max} \times 100}{R_{max} \text{ théorique}} \quad (36)$$

avec R_{max} , le R_{max} expérimentale (RU) et R_{max} théorique la réponse maximale théorique calculée ci-dessus.

2.2.3.2 La courbe de correction du DMSO

Le signal mesuré en SPR correspond à une variation de l'indice de réfraction (η) à la surface du biocapteur. Lorsque des interactions se produisent au niveau de la surface d'or, comme la formation d'un complexe enzyme-molécule, la masse augmente entraînant une modification de l'indice de réfraction et un signal SPR. Un signal supplémentaire peut être obtenu lorsque le tampon d'analyse diffère du tampon d'injection de l'analyte. Ce signal est appelé effet de solvant. Lorsque ce signal est faible, il peut être corrigé par soustraction du signal de la surface de référence (Fc1). Cependant, la présence d'un solvant avec un indice de réfraction plus élevé que celui du tampon, comme le DMSO, conduit à un effet de solvant très important : la présence de 1 % de DMSO engendre une variation d'environ 1200 RU.

Ces variations sont trop importantes pour être corrigées uniquement par soustraction du signal de la surface de référence. C'est pourquoi des courbes de calibration ont été réalisées avec des pourcentages compris entre 4,5 et 5,8 % de DMSO (Figure 56). Ces valeurs encadrent le pourcentage de DMSO du tampon de criblage (tampon phosphate, 50 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 0,005% Surfactant P20, 2,5 mM MgCl_2 , pH 8,0) qui est de 5%.

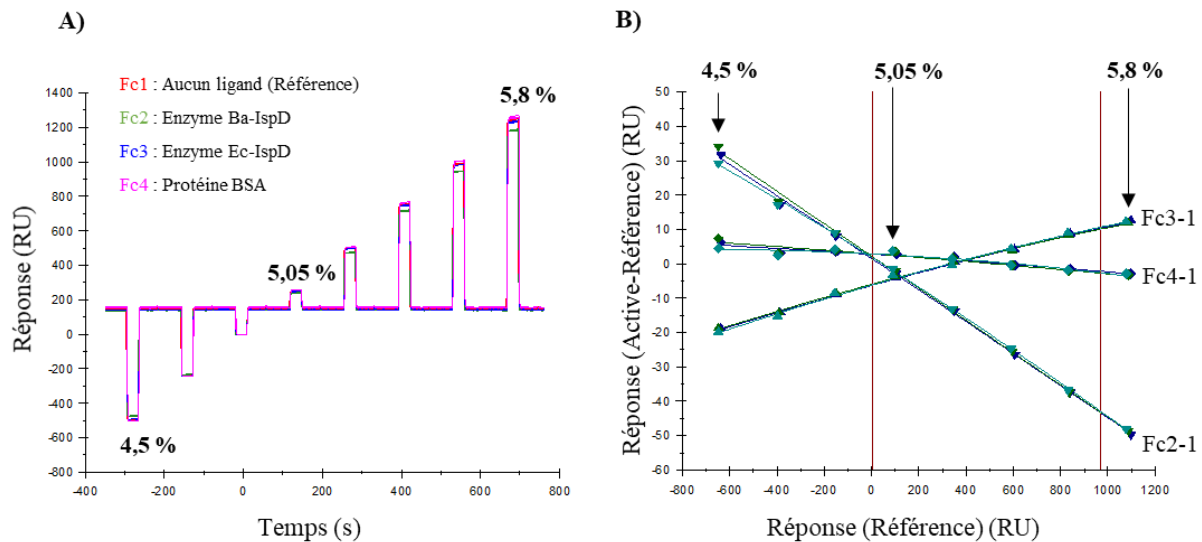


Figure 56 : Élaboration des courbes de calibration comprises entre 4,5 % et 5,8 % en DMSO.

A) Réponses de la gamme de DMSO sur les 4 surfaces de la puce CM5. B) Ajustement des réponses du DMSO des surfaces Fc2-1, Fc3-1 et Fc4-1 issues de A).

Lors de la réalisation d'une expérience, une gamme de DMSO composée de 8 solutions comprises entre 4,5 et 5,8 % en DMSO est injectée sur chaque surface donnant une réponse en RU (Figure 56A). Après soustraction des réponses de la surface de référence, les réponses du DMSO (Active-Référence) sont tracées en fonction de la réponse de la surface de référence et correspondent aux courbes de calibrations (Figure 56B). Pour chaque surface la courbe de calibration est réalisée en triplicata en début, milieu et fin de l'expérience.

Les réponses des analytes (fragments ou CTP) sur les surfaces Fc2, Fc3 et Fc4 sont corrigées une première fois avec la surface de référence (Figure 57A) puis une seconde fois par rapport à la courbe de calibration de DMSO (Figure 57C).

Dans l'exemple de la Figure 57, un analyte montre une réponse de 212,2 RU sur Fc1 (Référence) et une réponse de 256,6 RU sur Fc2 (Ba-IspD) : la réponse corrigée par la surface de référence correspond à la soustraction de Fc2-Fc1 (256,6 - 212,2 RU) qui conduit à une réponse de 44,4 RU (Figure 57A). La correction par la courbe de calibration du DMSO pour la réponse de 212,2 RU sur Fc1 conduit à une correction de - 7,4 RU sur Fc2-1 (Figure 57B). Ainsi, la réponse corrigée 44,4 RU se voit soustraire - 7,4 RU de correction et la réponse de l'analyte notée Fc2-1 corrigée est de 51,8 RU (Figure 57C).

Ces corrections ont été effectuées pour toutes les expériences, de la mise en place de la méthode, au criblage des fragments et à la détermination des K_D . Ces corrections sont nécessaires car les réponses attendues pour les fragments sont de l'ordre de quelques RU.

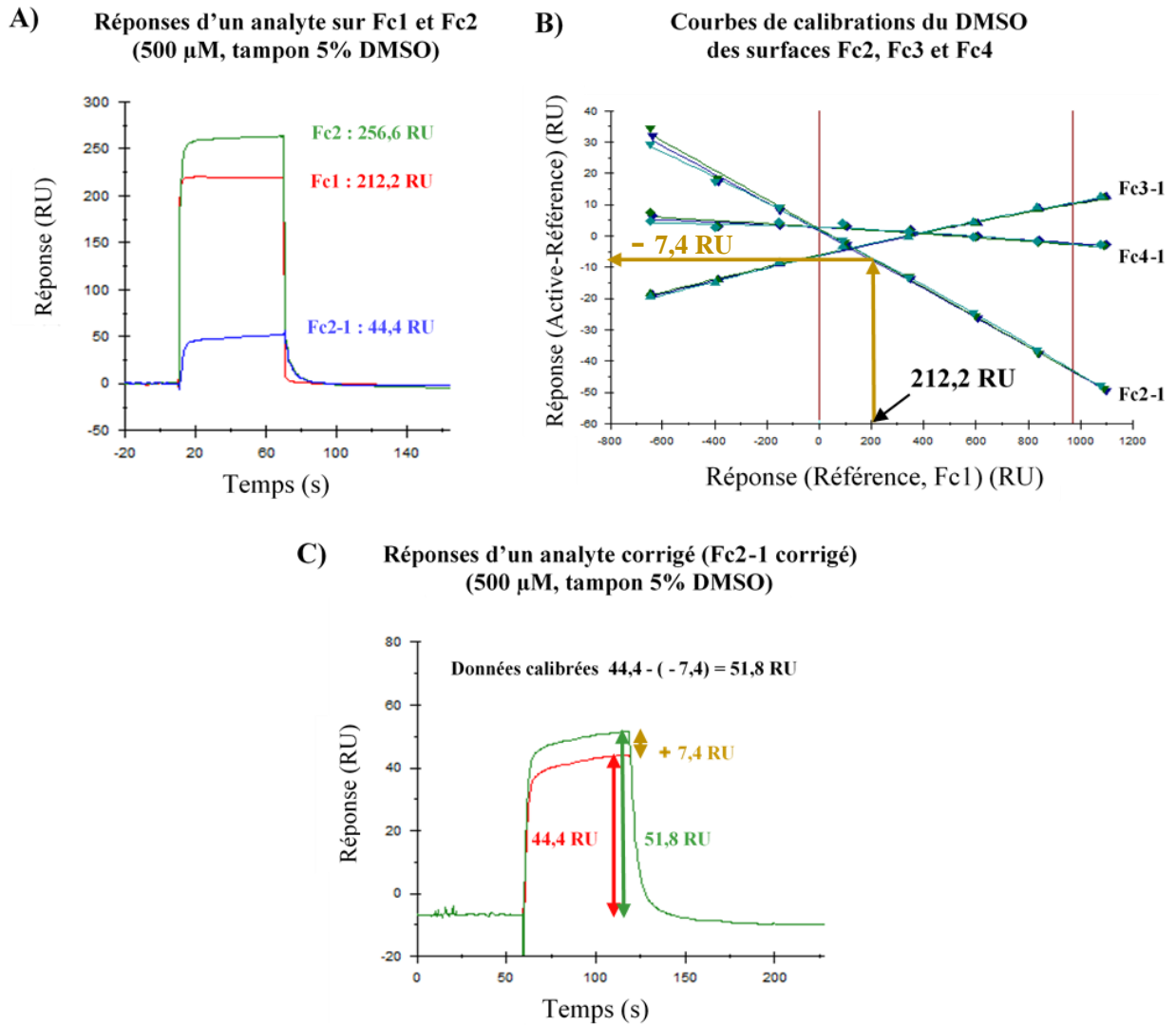


Figure 57 : Exemple de corrections de la réponse d'un analyte injecté sur la surface couplée avec *Ba-IspD*. A) Sensorgramme de la réponse de l'analyte sur la surface de référence (rouge) et sur la surface couplée à l'enzyme *Ba-IspD* (vert) ainsi que la réponse soustraite Fc2-1 (bleu). B) Courbes de corrections du DMSO pour les trois surfaces, *Ba-IspD*, *Ec-IspD* et la BSA. Les réponses soustraites (active-référence) sont tracées en fonction de la réponse de la surface de référence. Sensorgramme de la réponse d'un analyte après correction par la surface de référence (rouge) et la réponse après la correction par la courbe de calibration du DMSO (vert).

2.2.4 Validation de la méthode SPR en utilisant un substrat de l'enzyme *IspD*

Afin de s'assurer que la fixation des protéines est correcte et n'a pas engendré la dénaturation des deux enzymes *IspD*, une première étude a été réalisée en injectant du CTP. Cette molécule étant l'un des deux substrats de l'enzyme *IspD*, elle devrait avoir une affinité avec les enzymes *IspD* fixées et engendrer un signal en SPR.

Après avoir confirmé que l'injection de CTP conduit bien à une réponse en SPR pour les surfaces contenant IspD, les K_D de Ba-IspD et d'Ec-IspD ont été déterminés par SPR. D'après la Figure 49, la partie du sensorgramme obtenue après un temps suffisamment long d'injection du CTP correspond à l'équation :

$$R_{\text{éq}} = \frac{[\text{CTP}]R_{\text{max}}}{[\text{CTP}] + K_D} \quad (37)$$

où R_{max} est la réponse maximale de l'analyte (RU), $R_{\text{éq}}$ est la réponse mesurée à l'équilibre par SPR à la concentration utilisée en CTP et K_D la constante de dissociation.

La détermination des K_D est donc réalisée en mesurant les réponses $R_{\text{éq}}$ obtenues en SPR à différentes concentrations en CTP pour les enzymes Ba-IspD et Ec-IspD, puis en traçant la courbe de $R_{\text{éq}}$ en fonction de la concentration en CTP.

Des solutions contenant 4,69 ; 9,38 ; 18,75 ; 37,5 ; 75 ; 150 et 300 μM de CTP ont été injectées six fois sur les 4 surfaces en simultanée au cours d'une expérience (Figure 58).

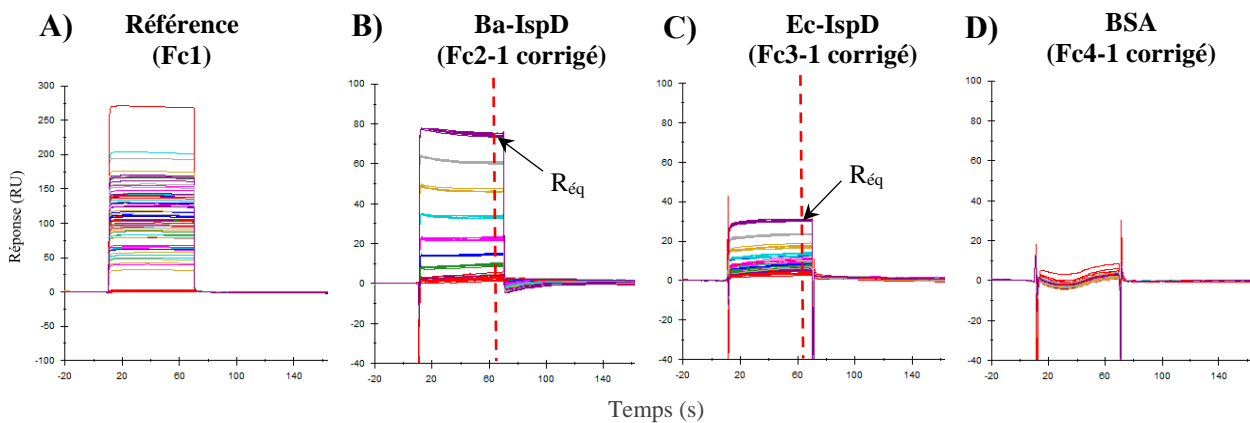


Figure 58 : Réponses de la gamme de concentration en CTP sur les 4 surfaces de la puce CM5 avec un temps d'injection de 60 s. A) Réponses mesurées sur la surface de référence. B) Réponses mesurées sur la surface contenant l'enzyme Ba-IspD. C) Réponses mesurées sur la surface contenant l'enzyme EC-IspD. D) Réponses mesurées sur la surface contenant la BSA. Les réponses sont corrigées par rapport à la référence et à la courbe de calibration. La valeur du $R_{\text{éq}}$ est mesurée 4 secondes avant la fin de l'injection.

Pour cette expérience le CTP a été solubilisé dans un tampon avec 5% de DMSO pour rendre compte des conditions du criblage des fragments. Une correction par la surface de référence (Fc1) a été faite (Figure 58A). Les sensorgrammes B et C de la Figure 58 correspondent aux réponses mesurées sur les surfaces greffées avec l'enzyme Ba-IspD (Fc2) et l'enzyme Ec-IspD (Fc3) respectivement, avec correction par la surface de référence. La dernière surface greffée

avec la BSA (Fc4) permet d’avoir un contrôle de la sélectivité du CTP par rapport aux enzymes. Le sensorgramme de la BSA ne montrent aucune réponse quelle que soit la concentration en CTP (Figure 58D), ce qui confirme que les réponses mesurées sur Fc2 et Fc3 sont spécifiques à une interaction entre les enzymes IspD et le CTP.

Le K_D pour les deux enzymes IspD, est déterminé en traçant les réponses à l’équilibre ($R_{\text{éq}}$) en fonction de la concentration en analyte A (ici le CTP) (Figure 59). La courbe est représentée par l’équation :

$$R_{\text{éq}} = \frac{R_{\text{max}}[A]}{K_D + [A]} + y \quad (38)$$

où R_{max} est la réponse maximale de l’analyte (RU), $R_{\text{éq}}$ est la réponse mesurée par SPR à la concentration définie et y est la valeur de l’ordonnée à l’origine de la courbe expérimentale ne passant par zéro. L’ajustement de la courbe selon l’équation (38) en utilisant le logiciel Biaevaluation de l’appareil Biacore permet de déterminer le K_D et le R_{max} (Figure 59).

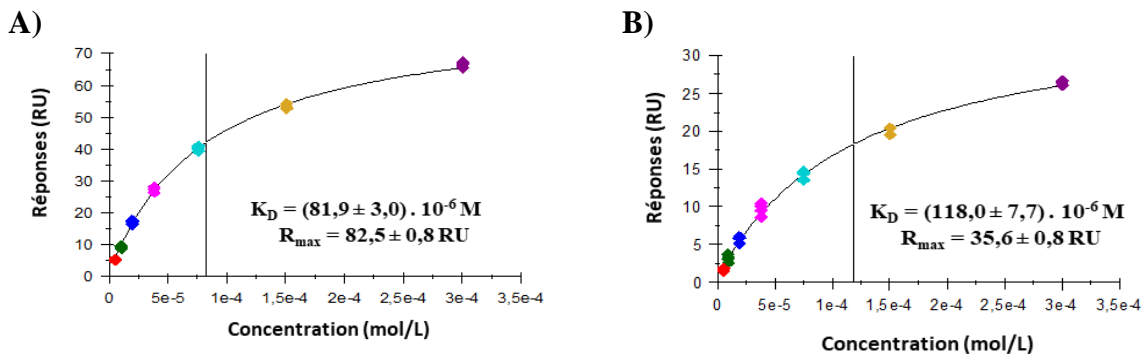


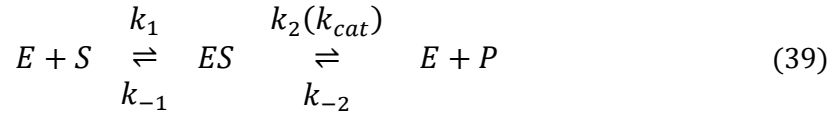
Figure 59 : Tracés des réponses du CTP en (A) de Ba-IspD et en (B) de Ec-IspD, en fonction des concentrations 4,69 (rouge), 9,38 (vert), 18,8 (bleu), 37,5 (rose), 75 (cyan), 150 (jaune), 300 μM (violet).

Des cinétiques enzymatiques réalisées précédemment au laboratoire par le Dr. Zoljargal Baatarkhuu ont permis de déterminer les constantes de Michaelis-Menten entre le CTP et les deux enzymes Ec-IspD¹⁰⁶ et Ba-IspD (résultats non publiés).

Constantes des enzymes	Ba-IspD	Ec-IspD
K_M	$22 \pm 2 \mu\text{M}$	$84 \pm 9 \mu\text{M}$
K_D	$82 \pm 3 \mu\text{M}$	$118 \pm 8 \mu\text{M}$

Tableau 8 : Constantes cinétiques K_M et K_D des deux enzymes Ba-IspD et Ec-IspD.

La relation entre le K_D et le K_M peut être établie à partir des équilibres suivants²⁰⁴ :



avec S le substrat, E l'enzyme, P le produit et k_{-2} négligeable :

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \text{et} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

Ainsi, lorsque que $k_{-1} \gg k_{cat}$ c'est-à-dire quand la formation du produit est lente par rapport à la dissociation complexe enzyme-substrat, on obtient :

$$K_M \approx \frac{k_{-1}}{k_1} = K_D \quad (40)$$

Dans ces conditions le K_M est équivalent au K_D . Les valeurs de K_D déterminées pour les deux enzymes Ba-IspD et Ec-IspD sont respectivement de 82 μM et 118 μM et sont du même ordre de grandeur que le K_M de Ba-IspD et d'Ec-IspD déterminés au laboratoire par des cinétiques enzymatiques qui sont respectivement de 22 μM et 84 μM . Ainsi, la méthode développée par SPR a pu être validée et utilisée pour le criblage des fragments.

Le tracé des $R_{\text{éq}}$ ci-dessus (Figure 59) montrent des réponses maximales (R_{max}) relativement différentes entre les deux enzymes Ba-IspD et Ec-IspD : 82,5 RU et 35,6 RU respectivement. Ces valeurs sont fonction du nombre d'enzymes immobilisées sur les surfaces et l'accessibilité de leur site actif après fixation (cf. 2.2.3.1, Tableau 7, p. 80).

Un R_{max} a pu être déterminé pour chaque enzyme avec le tracé des $R_{\text{éq}}$ obtenus avec l'injection de CTP (Figure 59). Les R_{max} théoriques des enzymes Ba-IspD et Ec-IspD ont été calculés (équation 35) avec une masse molaire du CTP égale à 530 Da et une stœchiométrie de 1 (Tableau 9).

Ligands	Ba-IspD	Ec-IspD
Masse molaire (Da)	25944	26560
Taux d'immobilisation moyen (RU)	12894	9053
R_{max} théorique (RU)	263	180
R_{max} (RU)	82	35
R_{act} (%)	31	19

Tableau 9 : Détermination du pourcentage de site actif accessible.

D'après les valeurs calculées à partir des équations (35) et (36), 31 % des sites actifs de l'enzyme Ba-IspD immobilisées sont accessibles alors que pour l'enzyme Ec-IspD ce chiffre n'est que de 19 % (Tableau 9). Ces différences d'accessibilité et de taux d'immobilisation expliquent que les R_{\max} expérimentaux obtenus pour Ba-IspD sont plus importantes que pour Ec-IspD.

2.2.5 Criblage par SPR de la librairie de fragments

La librairie de 500 fragments utilisée dans ce projet a été achetée auprès de la société Edelris. Les composés sont vendus conditionnés à 100 mM en solution dans le DMSO, répartis en 5 boîtes de 96 fragments et 1 boîte de 20 fragments. Les fragments ont été nommés selon le code alphanumérique de la boîte : par exemple un fragment contenu dans la boîte numéro 3 placé en position D04 sera nommé B3D04.

Ces fragments ont été criblés en utilisant ces plaques 96 puits et les deux enzymes Ba-IspD et Ec-IspD. Seuls les résultats obtenus relatifs à Ba-IspD sont présentés. En effet, les résultats du criblage des 500 fragments obtenus avec Ec-IspD étaient difficilement interprétables dû à la plus faible immobilisation de l'enzyme sur la surface. Ces problèmes peuvent s'expliquer soit par un site actif moins accessible, 19 % pour Ec-IspD contre 31 % pour Ba-IspD soit par un taux d'immobilisation plus faible, 8000 RU en moyenne pour Ec-IspD contre 12 000 RU en moyenne pour Ba-IspD. Une optimisation de la méthode sera nécessaire à l'avenir en utilisant une méthode de fixation différente pour l'enzyme Ec-IspD sur la surface.

Les fragments ont été testés à une concentration de 100 μ M sur les 4 surfaces. Les sensorgrammes obtenus pour les 500 molécules sur la surface contenant Ba-IspD sont représentés dans la Figure 60 avec la correction de l'effet de surface et de la courbe de calibration du DMSO (Fc2-1 corrigé).

Sur les 500 fragments, certains donnent des sensorgrammes avec des valeurs de RU négatives (Figure 60). Les sensorgrammes obtenus sur les surfaces sur lesquelles sont fixées Ba-IspD, Ec-IspD et la BSA sont corrigés par rapport à la surface Fc1 afin d'éliminer notamment des effets de solvant. Si un fragment fournit une réponse supérieure sur la surface Fc1 par rapport à une autre surface, le sensorgramme montre des valeurs négatives. Ces fragments ont été éliminés immédiatement du criblage car ils se lient à Fc1 et sont donc non spécifiques à IspD.

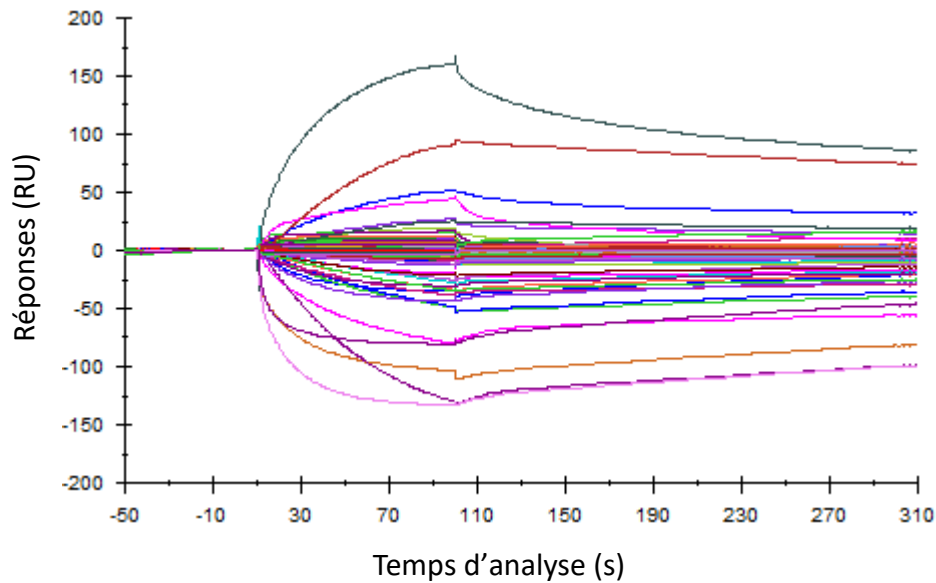


Figure 60 : Sensorgrammes des 500 fragments sur la surface greffée avec l'enzyme Ba-IspD. Un temps d'association de 60 s et de dissociation de 200 s a été utilisé.

Les sensorgrammes des autres fragments qui se lient potentiellement à l'enzyme Ba-IspD sont traités selon plusieurs paramètres. Pour plus de clarté, seul le traitement d'une plaque 96 puits (Boîte 3) est représenté comme exemple et cette méthode a été appliquée à tous fragments.

Dans un premier temps, les sensorgrammes générés par les injections des fragments de la boîte 3 à une concentration de 100 μM dans le tampon d'analyse (Tableau 5) en utilisant l'enzyme Ba-IspD ont été corrigés avec la surface de référence (Fc1) et avec la courbe de correction du DMSO (Figure 61A). Un second graphique a été tracé en reportant les réponses à l'équilibre ($R_{\text{éq}}$) de chaque fragment en fonction de leur cycle de passage (Figure 61B). Par exemple, les cycles 25 à 32 et 156 à 163 correspondent à la gamme CTP et les cycles 35 et 152 correspondent à l'injection des fragments (Figure 61B).

Plusieurs contrôles ont été effectués lors du criblage des fragments afin de s'assurer de la stabilité de la protéine greffée sur la surface après un certain nombre de cycle. Des solutions de CTP à différentes concentrations (les mêmes concentrations que celles utilisées précédemment pour déterminer le K_D) ont été injectées en début et fin de criblage (losange bleu de la Figure 61B). Une solution de glucose à 150 μM est injectée en début et fin d'expérience de criblage (cycle 22 et 166, triangle noir de la Figure 61B) afin d'avoir un contrôle négatif sur le criblage. Après 18 injections, la solution tampon est injectée (carré rouge de la Figure 61B, cycle 12, 30, ..., 138, 156) et toutes les 10 injections, une solution de CTP à 100 μM est injectée (carré vert de la Figure 61B, cycle 5, 15, ..., 155, 165).

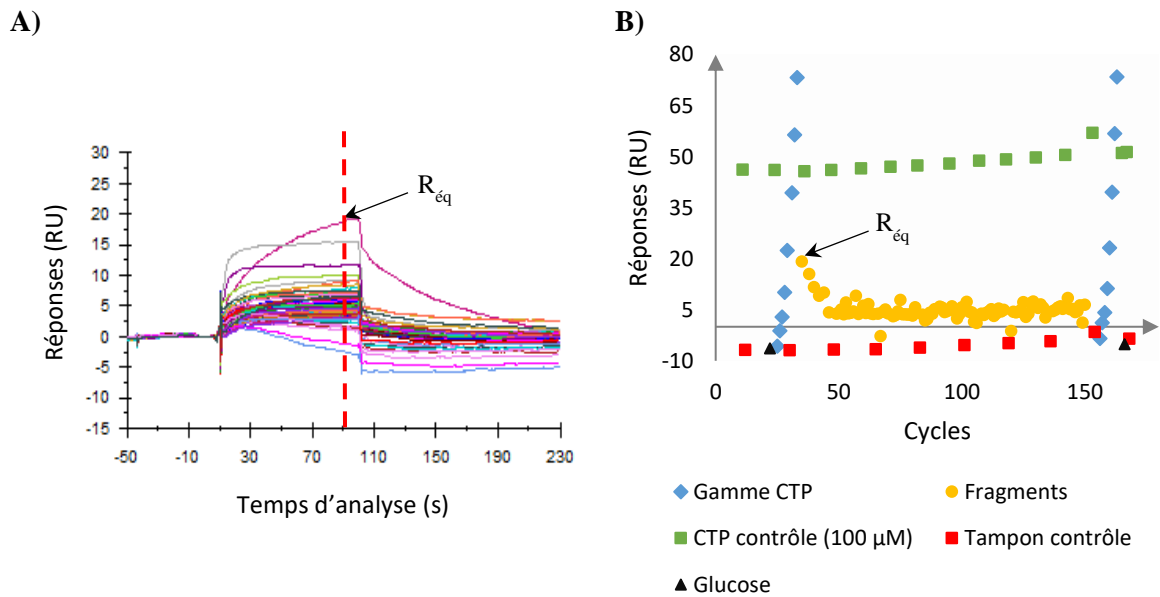


Figure 61 : Expérience de criblage et tracé des $R_{éq}$ en fonction du cycle d'analyse. A) Sensorgramme des fragments de la Boîte 3 sans les sensorgrammes des différents contrôles. B) Graphique des valeurs des $R_{éq}$ (4 secondes avant fin de l'injection) en fonction du cycle.

Les réponses sont corrigées et ajustées en utilisant les différents contrôles. En effet, après correction du sensorgramme Fc2 (Figure 62A) par la réponse de la surface de référence (Fc2-1, Figure 62B) et la courbe de correction du DMSO (Fc2-1corr, Figure 62C), deux autres ajustements sont effectués (Figure 62D) : (i) à la réponse corrigée (Fc2-1 corrigé) est soustraite la réponse du tampon contrôle le plus proche afin d'éliminer les erreurs systématiques dues à l'effet de solvant et du système d'injection ($R_{éq}$) ; (ii) la réponse soustraite ($R_{éq}$) est ensuite divisée par la masse molaire de l'analyte (MM_A) afin d'obtenir une réponse ajustée R_2 , d'après l'équation suivante :

$$R_2 = \frac{100 * R_{éq}}{MM_A} \quad (41)$$

La réponse mesurée en SPR (RU) est proportionnelle à la concentration massique des molécules qui se lient aux protéines, et donc à la masse molaire des analytes. C'est pourquoi cette correction est importante pour comparer les réponses des fragments.

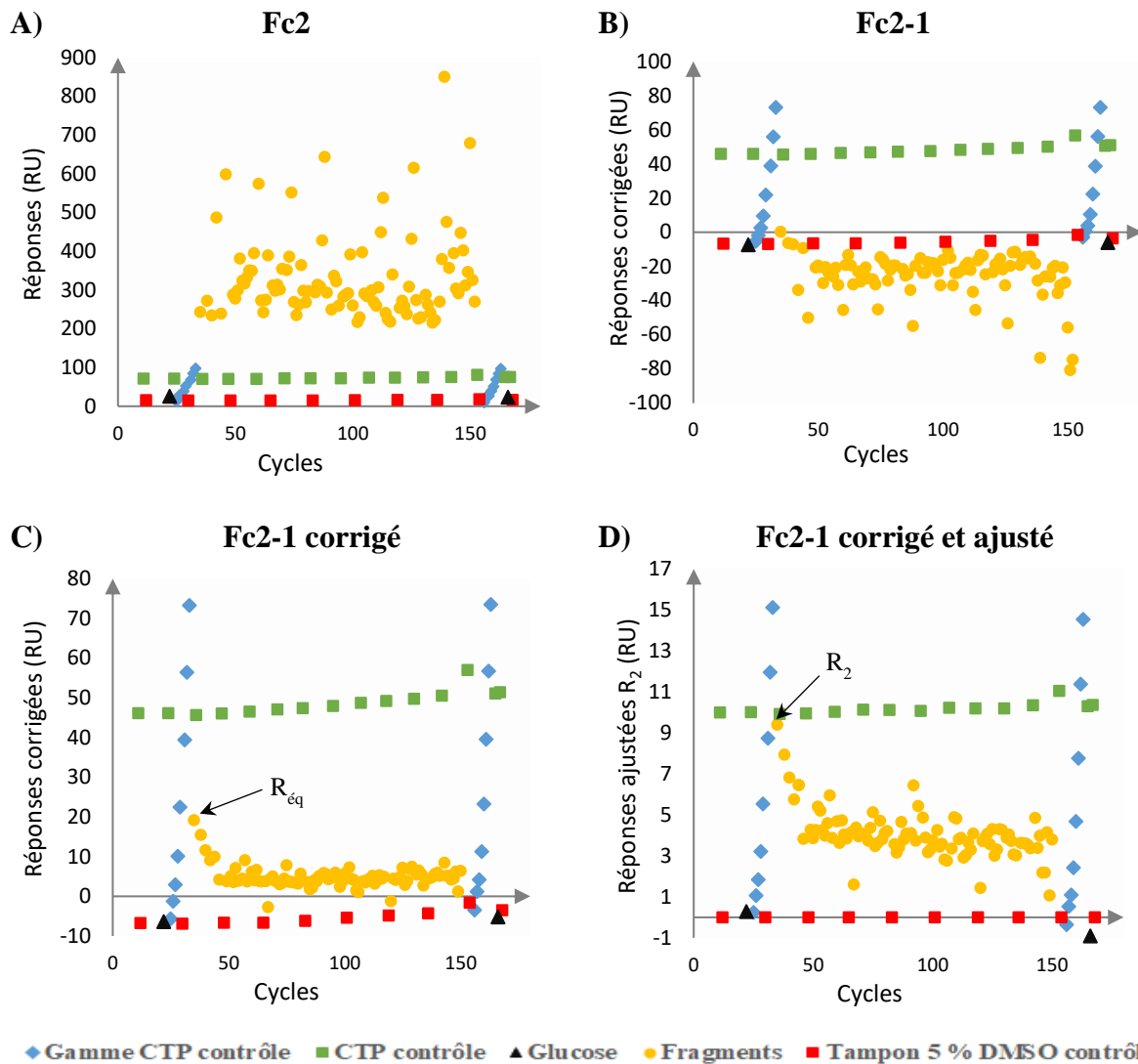


Figure 62 : Les différentes corrections apportées pour traiter les données. A) Réponses sur la surface Fc2. B) Réponses sur la surface Fc2 moins les réponses de la surface Fc1 (Fc2-1). C) Réponses R_{eq} , Fc2-1 corrigées par la courbe de calibration de DMSO (Fc2-1 corrigé). D) Réponses R_2 , Fc2-1 corrigées et ajustées par rapport à la masse molaire de l'analyte (Fc2-1 corrigé et ajusté).

Dans ce criblage, la plupart des fragments n'ont pas d'affinité pour l'enzyme et forment ainsi un seuil fictif de fragments non liants. Les fragments qui sont au-dessus de ce seuil de fragments non liants (Figure 63– trait rouge) devraient correspondre aux fragments qui ont une affinité pour l'enzyme. Nous avons fixé le seuil à 5 RU pour la boîte 3 et avons sélectionné les fragments au-dessus du seuil afin d'étudier davantage cette affinité.

Après ce traitement des données, les réponses obtenues par injection des fragments sur la surface avec la protéine BSA (Fc4) ont également été corrigées, puis comparées aux réponses sur Fc2. Les fragments testés sur Fc4 montrant des réponses supérieures ou égales à celles sur Fc2 ont été considérés comme des fragments non spécifiques à Ba-IspD et supprimés du criblage. Pour la Boîte 3, la comparaison des réponses des fragments sur les surfaces fixées

avec Ba-IspD et la BSA a permis d'identifier des fragments avec une affinité non spécifique (Figure 63).

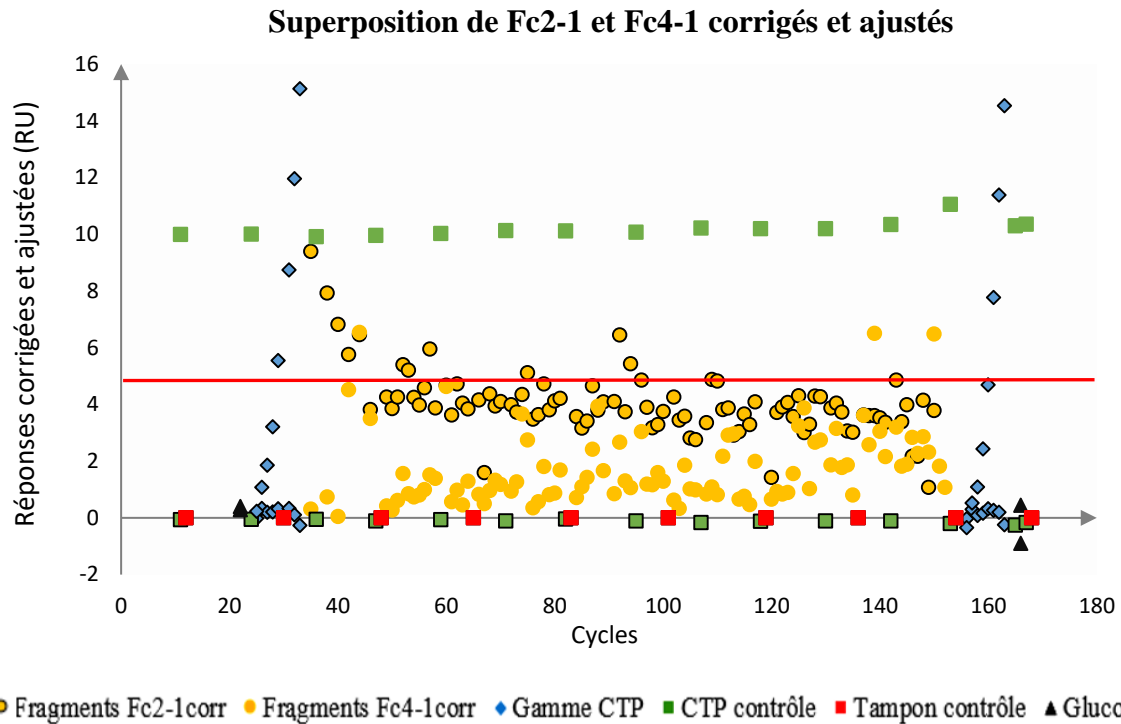


Figure 63 : Superposition des réponses à l'équilibre corrigées et ajustées en fonction du cycle d'analyse des surfaces Ba-IspD (Fc2) et BSA (Fc4). Les points entourés en noir correspondent à la surface Fc2-1 et les non entourés à Fc4-1. Les fragments au-dessus de la coupure (ligne rouge) et spécifiques à Ba-IspD sont sélectionnés.

Ce traitement des données a été réalisé pour tous les sensorgrammes issus de l'injection des 500 fragments. Cependant, ces 500 fragments ont été testés sur différentes puces avec différents taux d'immobilisation (TI) d'enzymes.

Expériences	Boîtes 1 et 6	Boîtes 2 et 4	Boîtes 3 et 5
Taux d'immobilisation (RU)	14229	13533	15094

Tableau 10 : Valeurs des taux d'immobilisation selon les expériences réalisées.

Afin de comparer les réponses des fragments entre les différentes expériences, une normalisation des réponses corrigées et ajustées (R_{NORM}) a été effectuée selon l'équation suivante :

$$R_{NORM} = \frac{R_{\text{éq}}}{R_{\text{max théorique}}} = \frac{R_2 * MM_{\text{enzyme}}}{TI * 100} \quad (42)$$

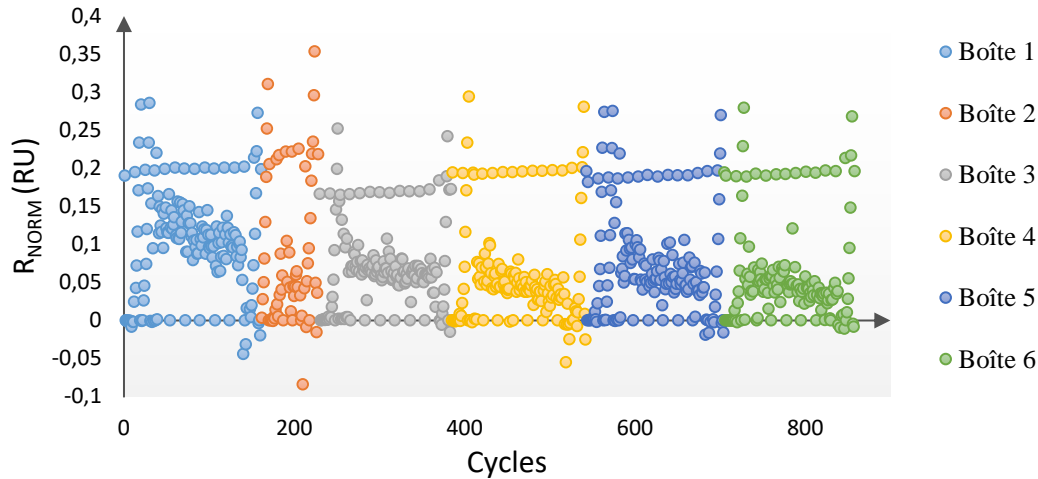
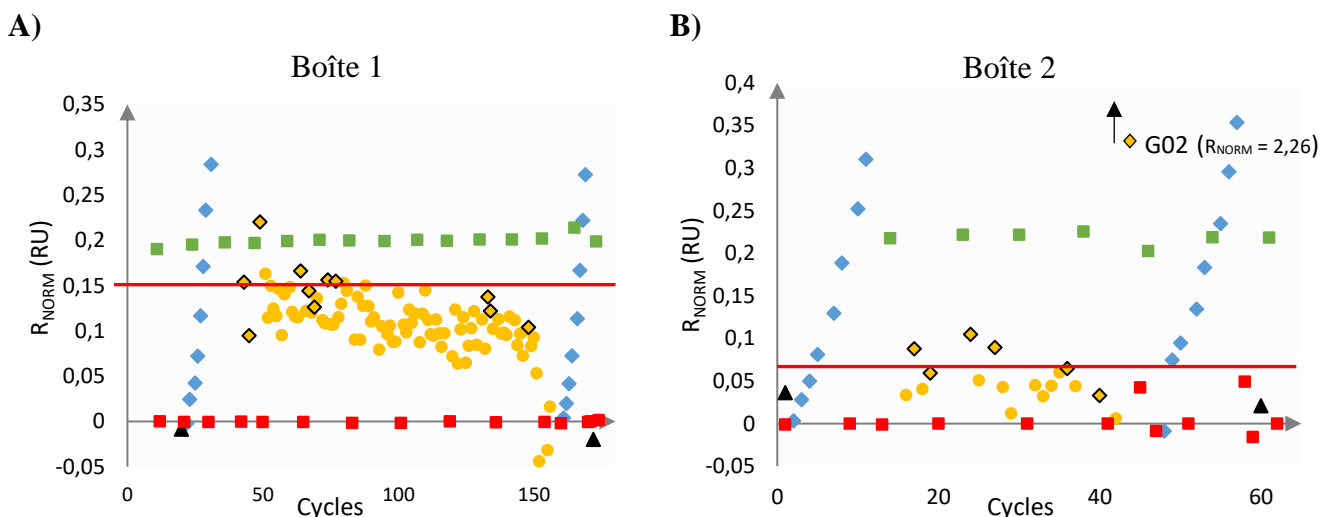


Figure 64 : Normalisation des réponses corrigées et ajustées des 500 fragments.

Cependant, malgré la normalisation par rapport aux taux d'immobilisation (Figure 64) les réponses des fragments sont trop différentes entre chaque boîte. Il est impossible de sélectionner les fragments d'après une seule valeur seuil.

Ainsi, les réponses des fragments ont été traitées séparément et les critères de sélection précédents ont été appliqués afin de déterminer quels fragments se lient à l'enzyme.

Le criblage des 500 fragments a été effectué en duplicata. Sur ces deux répliques, les fragments avec des valeurs au-dessus du seuil et avec un signal sur Fc2 supérieur au signal sur Fc4, ont été sélectionnés.



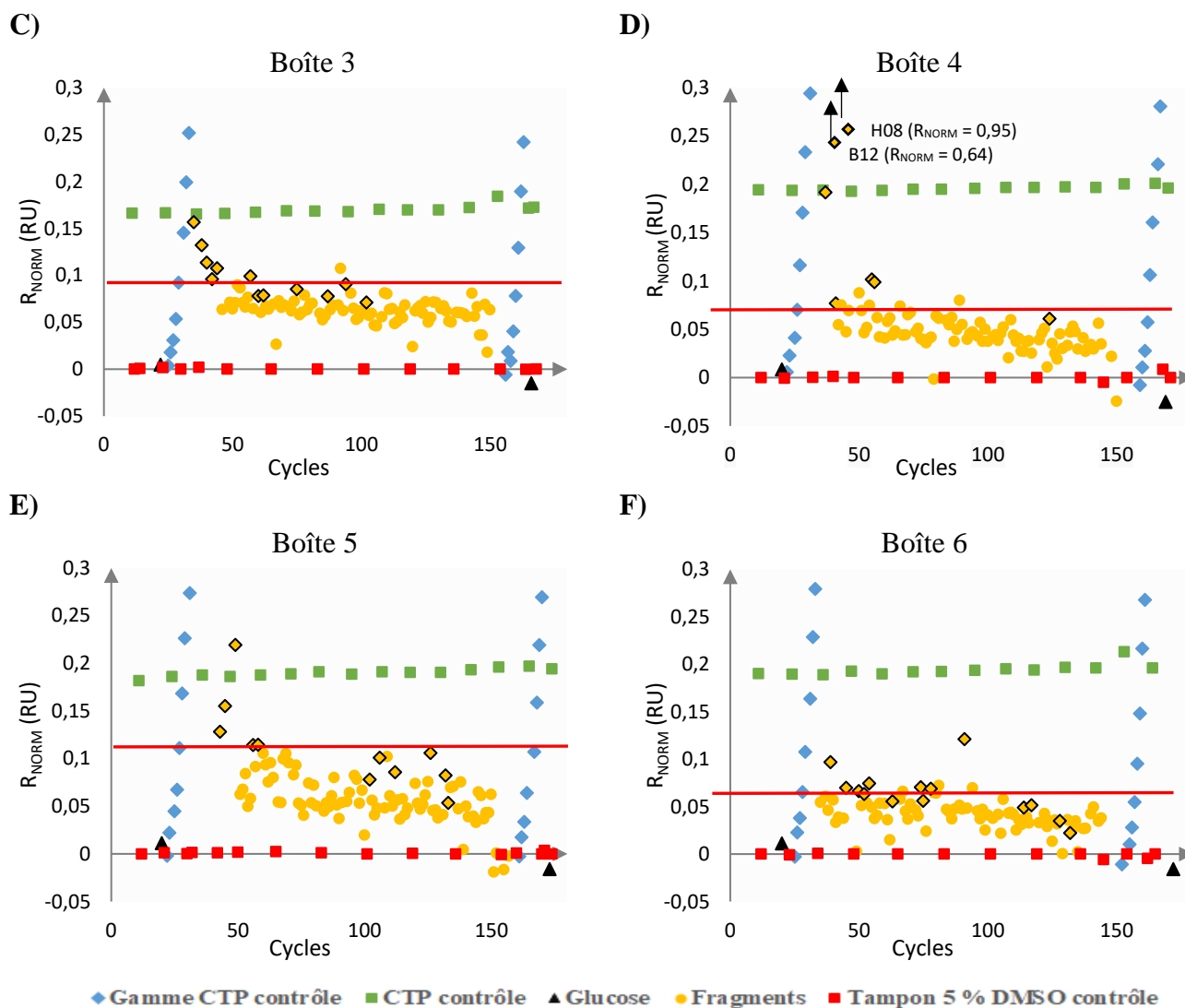


Figure 65 : Second criblage des 500 fragments avec les réponses normalisées en fonction du cycle. Les flèches noires indiquent des fragments avec des valeurs importantes, leurs valeurs de R_{NORM} sont indiquées entre parenthèse. Les losanges entourés en noir correspondent aux fragments sélectionnés.

Les résultats présentés dans la Figure 65 correspondent au second criblage des 500 fragments et les points encadrés en noir (losanges) correspondent aux 63 fragments sélectionnés (Tableau 11). Lors du premier réplica, certains fragments présentaient une réponse au-dessus du seuil mais plus pour le second, et inversement. Afin de ne pas commettre d'erreur de faux positifs/négatifs, les fragments avec une réponse au-dessus du seuil pour l'un ou les deux réplicas ont été sélectionnés pour le criblage à différentes concentrations en fragment. Cela explique la présence de fragments sélectionnés qui sont sous le seuil lors du second criblage (Figure 65). Dans la Figure 65, certains fragments (points ronds jaunes) sont au-dessus du seuil

mais n'ont pas été sélectionnés. Ces derniers ont une réponse plus importante sur Fc4 que sur Fc2 et montrent ainsi une réponse avec la BSA (Fc4). Ils ont donc une affinité non spécifique.

Boîtes	Fragments sélectionnés spécifique à Ba-IspD													
1	F11	B10	E08	H10	D02	B02	B04	B06	C02	G09	G08	E07	/	/
2	F01	A02	H01	D03	B02	F02	G02	/	/	/	/	/	/	/
3	D04	F10	H05	E01	C02	E03	B01	A11	B03	D08	G10	C12	/	/
4	H08	G01	B12	D12	B01	B02	A01	/	/	/	/	/	/	/
5	G02	E06	E01	C01	E12	E07	F12	G05	G07	A06	A09	/	/	/
6	G02	D12	G12	B05	C01	F11	C10	C11	A09	A04	B04	D01	B01	H02

Tableau 11 : Noms des fragments sélectionnés à 100 μ M par boîtes.

Afin de confirmer que ces molécules se lient à Ba-IspD et afin de déterminer leur K_D , ces fragments ont été injectés dans le système à différentes concentrations.

2.2.6 Sélection des fragments à retenir et détermination des K_D

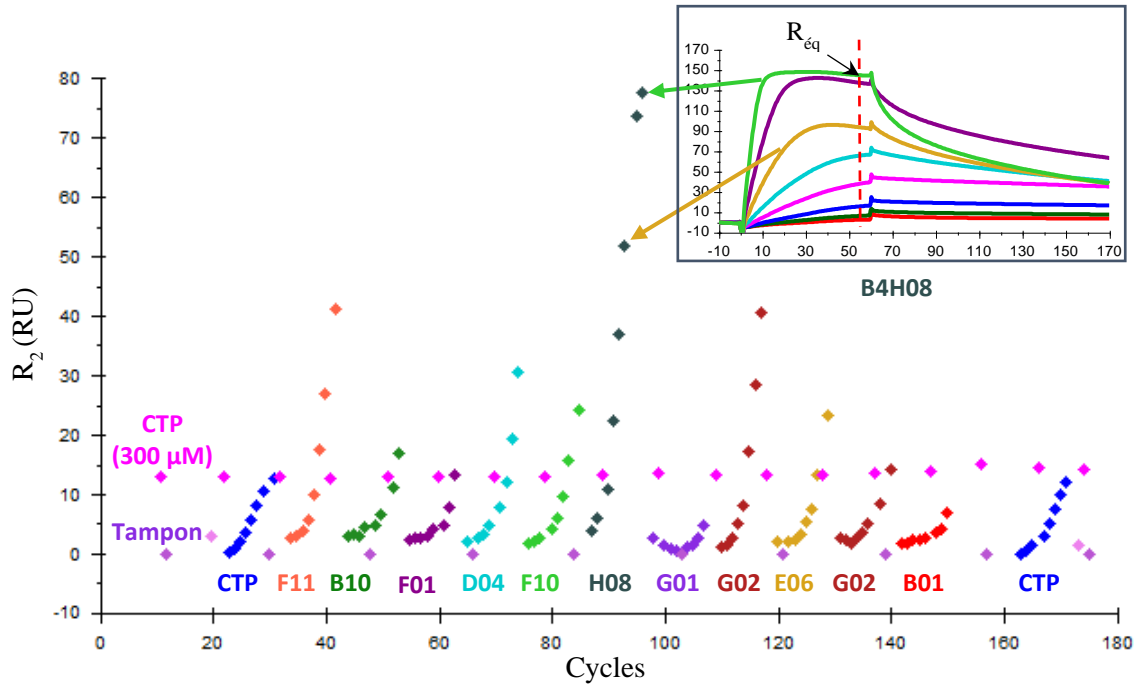
2.2.6.1 Détermination des meilleurs fragments

Des solutions des 63 fragments sélectionnés précédemment ont été préparées à sept concentrations différentes (3,91 ; 7,81 ; 15,62 ; 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 μ M) afin de vérifier que les fragments se lient à l'enzyme IspD de *Bacillus anthracis* et de déterminer la constante de dissociation à l'équilibre.

Pour chacune des expériences, les mêmes contrôles que précédemment ont été utilisés. Chaque fragment est testé de la concentration la plus diluée à la plus concentrée. Une injection de tampon est effectuée entre chaque changement de fragment. Lors du criblage précédent, les fragments avec les réponses les plus importantes ont été testés en priorité. Des boîtes nommées de A à J contenant les différents fragments ont été préparées. Les fragments ayant donné les réponses les plus importantes lors du criblage à 100 μ M sont contenus dans les boîtes A et B afin d'être testés prioritairement. Les résultats obtenus, illustrés dans la Figure 66, confirment que les meilleurs fragments sont contenus dans ces deux boîtes. Les autres boîtes contiennent de nombreux fragments ayant des réponses non dépendantes de la concentration ou ont des R_2 trop faibles, comme représentés dans la Figure 66C.

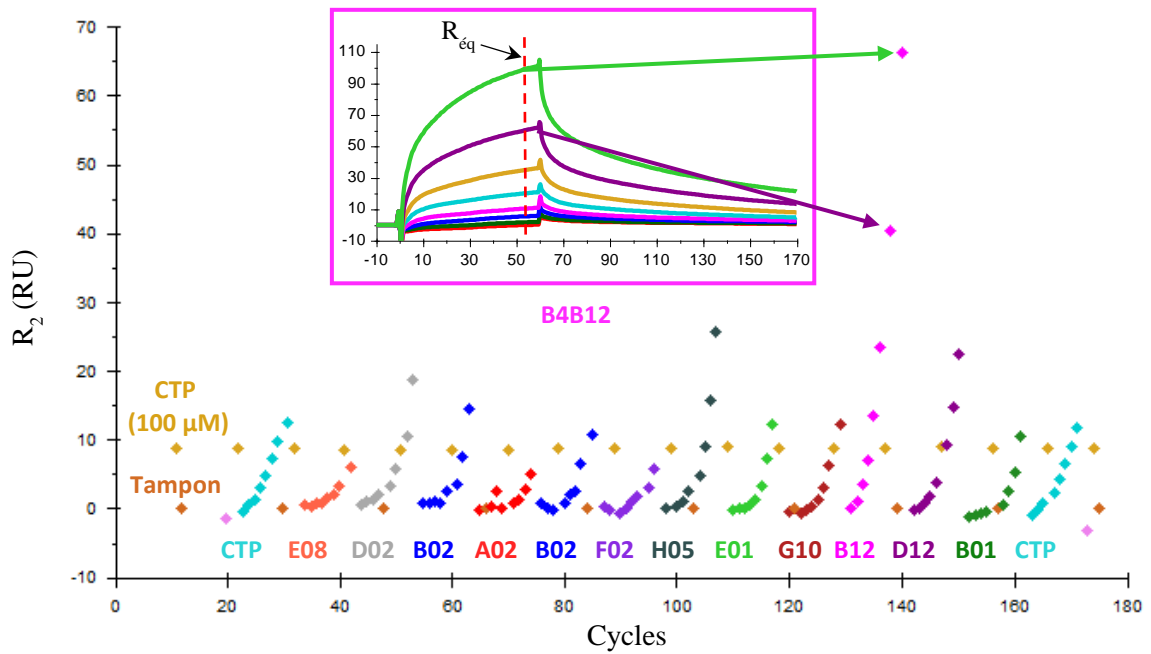
A)

Boîtes A



B)

Boîtes B



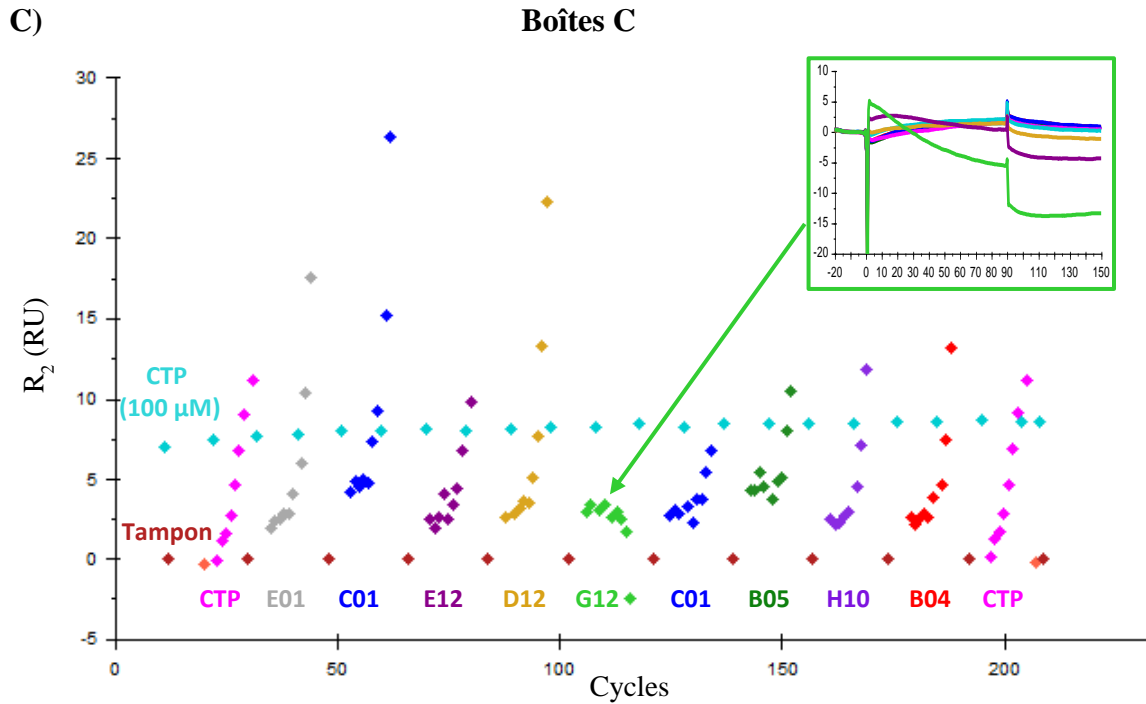


Figure 66 : Réponses de différents fragments à des concentrations comprises entre 3,91 et 500 μM en fonction de leurs cycles de passage lors de l'expérience. A) Réponses des fragments de la boîte A. B) Réponses des fragments de la boîte B. C) Réponses des fragments de la boîte C.

La sélection des fragments s'est faite dans un premier temps en considérant l'allure des sensorgrammes et des graphiques représentant les R_2 en fonction du cycle de mesure (Figure 66). Les fragments avec des réponses et des sensorgrammes similaires à ceux illustrés dans la Figure 66A ont été sélectionnés. Les fragments avec des sensorgrammes ressemblant à celui de G12 de la boîte C (Figure 66C) n'ont pas été retenus. Pour les fragments sélectionnés, les R_{eq} ont été tracés en fonction de la concentration des fragments et une première valeur de K_D a été déterminée après ajustement de la courbe selon l'équation (38). Le K_D déterminé à partir d'une seule expérience a permis une première sélection des 63 fragments, mais la valeur obtenue est approximative.

Les sensorgrammes des fragments tels que le fragment B4H08 (Figure 66A) et B4B12 (Figure 66B), permettent d'obtenir un tracé optimal pour la détermination d'un K_D approximatif. Seuls les fragments avec des K_D inférieurs à 10^{-2} M ont été sélectionnés et lorsque le K_D est supérieur ou égale à cette valeur, les fragments ont été écartés du criblage. Vingt-trois fragments ont ainsi été sélectionnés (Figure 67).

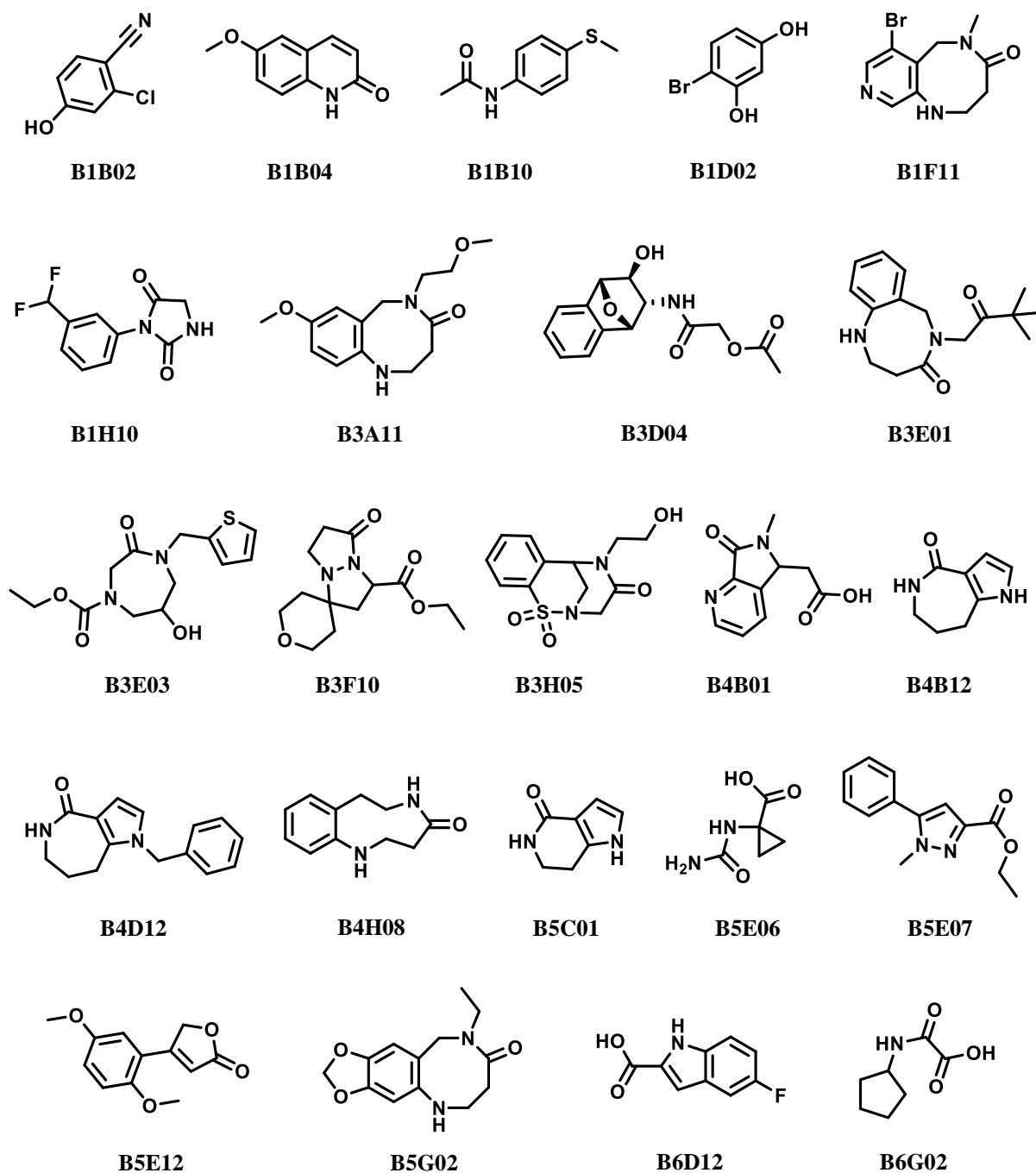


Figure 67 : Représentation des structures chimiques des 23 fragments sélectionnés.

Afin de classer ces vingt-trois fragments entre eux, une nouvelle expérience en utilisant des solutions à 100 μ M a été réalisée (Figure 68) sur une même puce, avec le même taux de fixation d'enzyme.

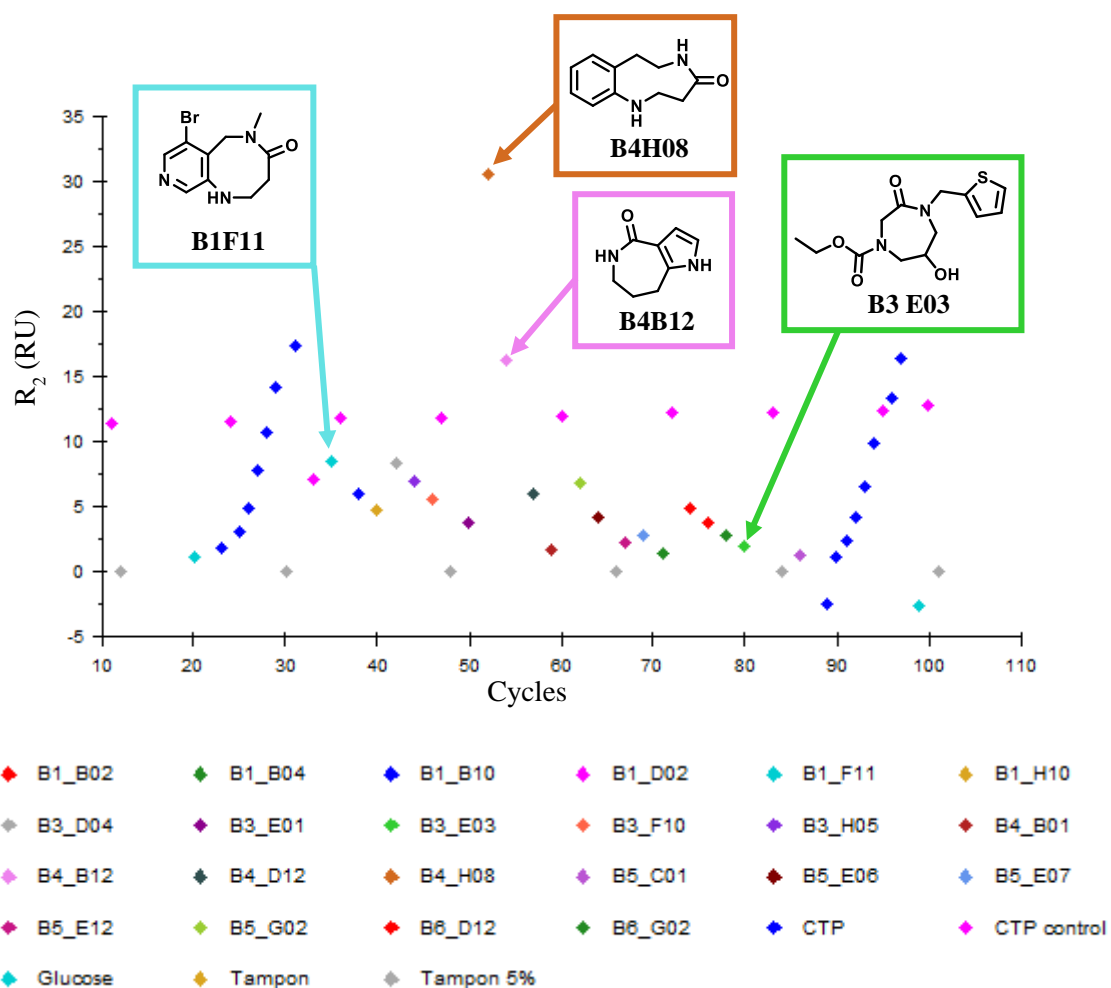


Figure 68 : Représentation des réponses d'une expérience des 23 fragments sélectionnés à une concentration de 100 μ M.

Deux fragments B4H08 et B4B12 montrent des réponses supérieures à celle du CTP pour une même concentration (Figure 68). Cela peut indiquer que ces fragments se fixent plusieurs fois sur l'enzyme. La réponse étant dépendante de la masse ajoutée sur la surface, si deux molécules se fixent sur l'enzyme au lieu d'une, la réponse est doublée.

Ainsi, les fragments sont classés par affinité pour l'enzyme Ba-IspD de la plus, à la moins importante : B4H08, B4B12, B1F11, B3D04, B1D02, B3H05, B5G02, B4D12, B1B10, B3F10, B6D12, B1H10, B5E06, B3E01, B1B02, B1B04, B5E07, B5E12, B3E03, B4B01, B6G02, B5C01.

Cette expérience a été réalisée deux fois et le classement des fragments par rapport aux valeurs de R_2 est cohérent. Dans l'expérience présentée Figure 68, le fragment B3A11 est manquant mais lors de la deuxième expérience il se positionne entre B1H10 et B1B04.

2.2.6.2 La détermination des K_D

Afin de confirmer que les 23 fragments sélectionnés ont une affinité pour Ba-IspD et pour déterminer la valeur du K_D de façon plus précise, les sensorgrammes pour chaque fragment ont été enregistrés à différentes concentrations. L'expérience a été réalisée au minimum trois fois pour vérifier la reproductibilité de la mesure du K_D . Les résultats n'étaient pas reproductibles pour cinq fragments B1B04, B4B01, B6G02, B3A11, B5C01 et ils ont donc été écartés du criblage.

Le K_D a été estimé en traçant les réponses à l'équilibre ($R_{\text{éq}}$) en fonction de la concentration. Les deux ou trois meilleures expériences sont représentées ci-dessous (Figure 69-Figure 86) et les réponses à l'équilibre ont été tracées selon un modèle d'interaction 1 : 1 en fonction de la concentration en fragment. La constante de dissociation K_D de chaque expérience a été déterminée à l'aide du logiciel Biaevaluation (Figure 69-Figure 86). Ce logiciel a permis d'ajuster chaque courbe en utilisant l'équation (38).

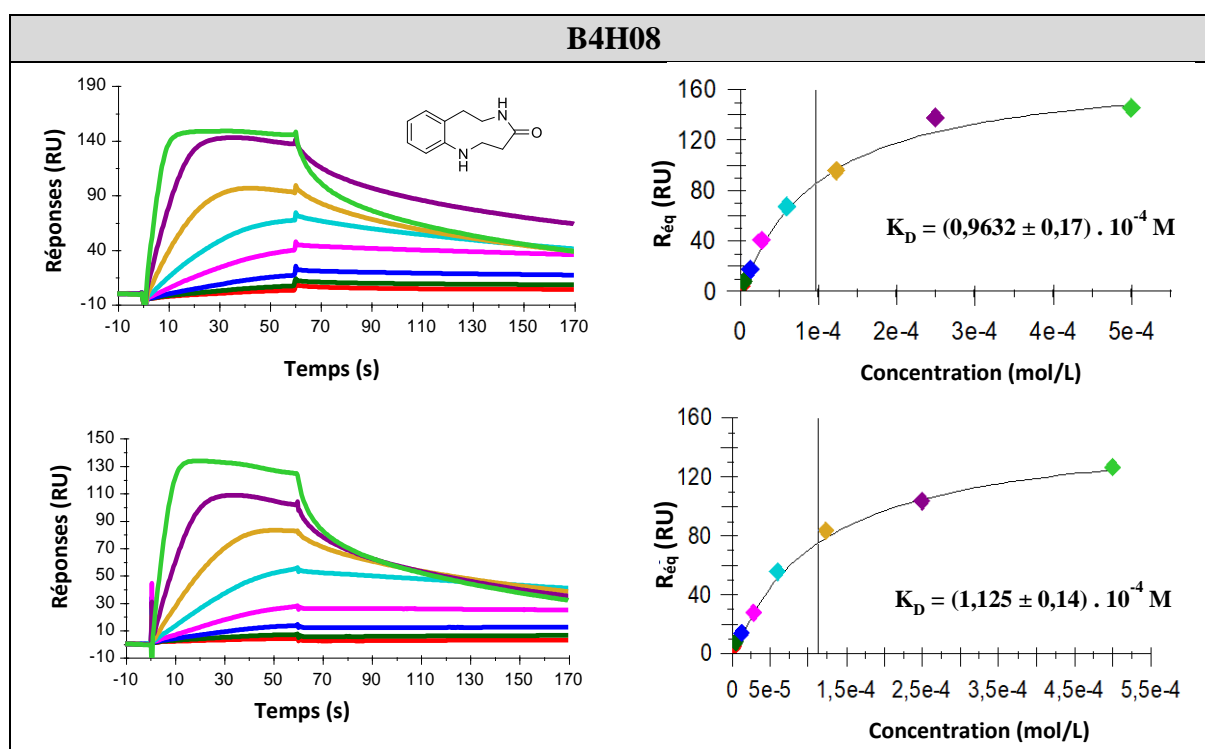


Figure 69 : Sensorgramme du fragment B4H08 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

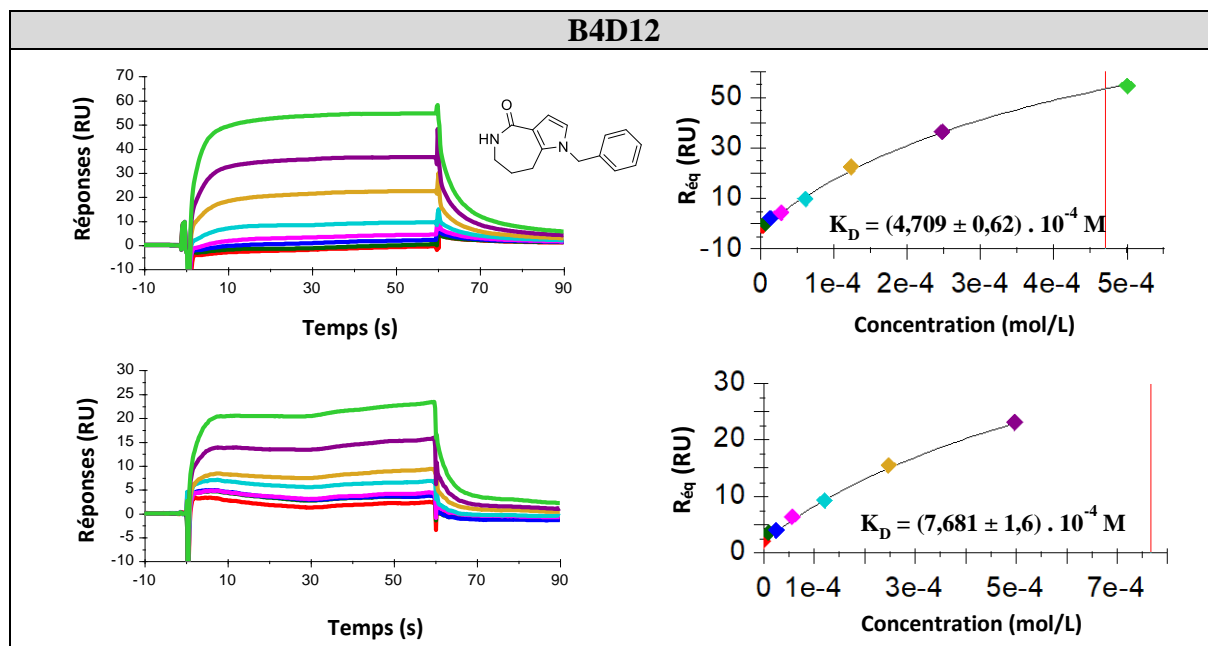


Figure 70 : Sensorgramme du fragment B4D12 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

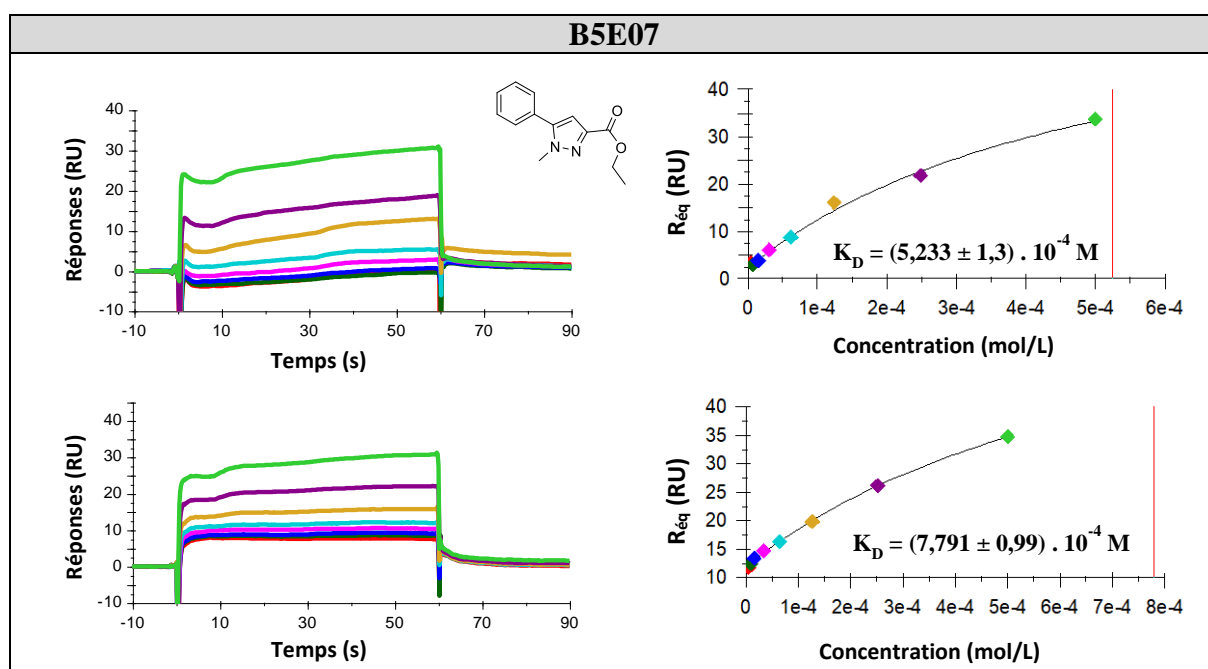


Figure 71 : Sensorgramme du fragment B5E07 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

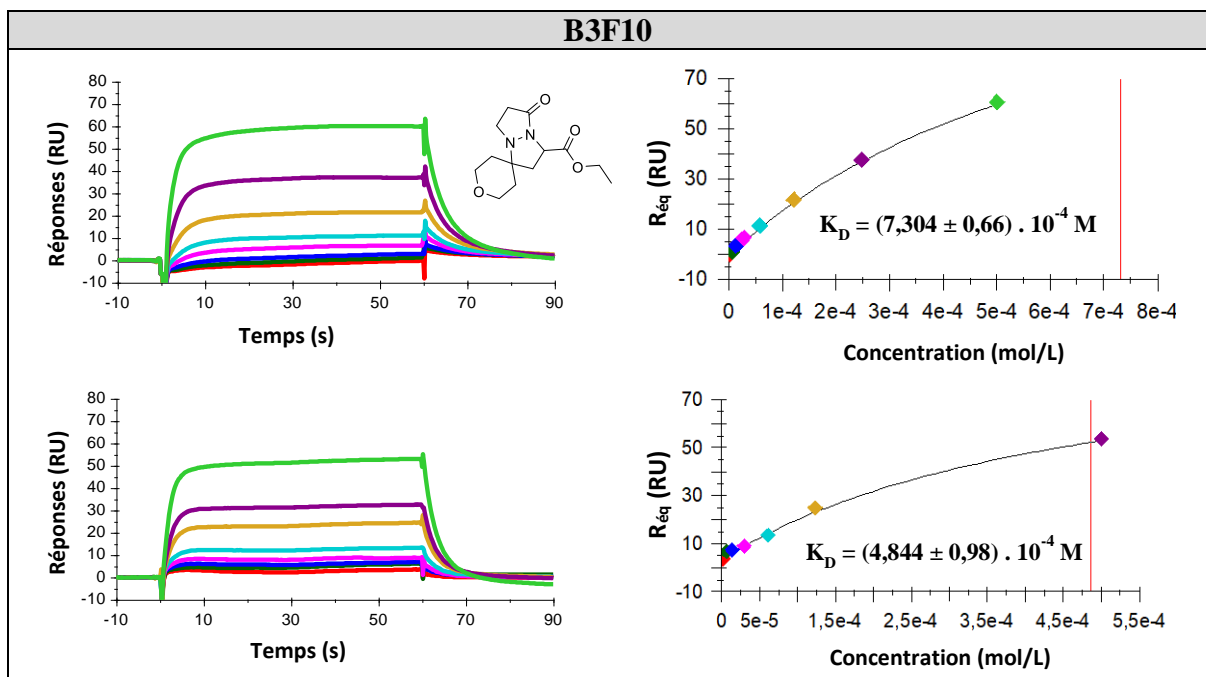


Figure 72 : Sensorgramme du fragment B3F10 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

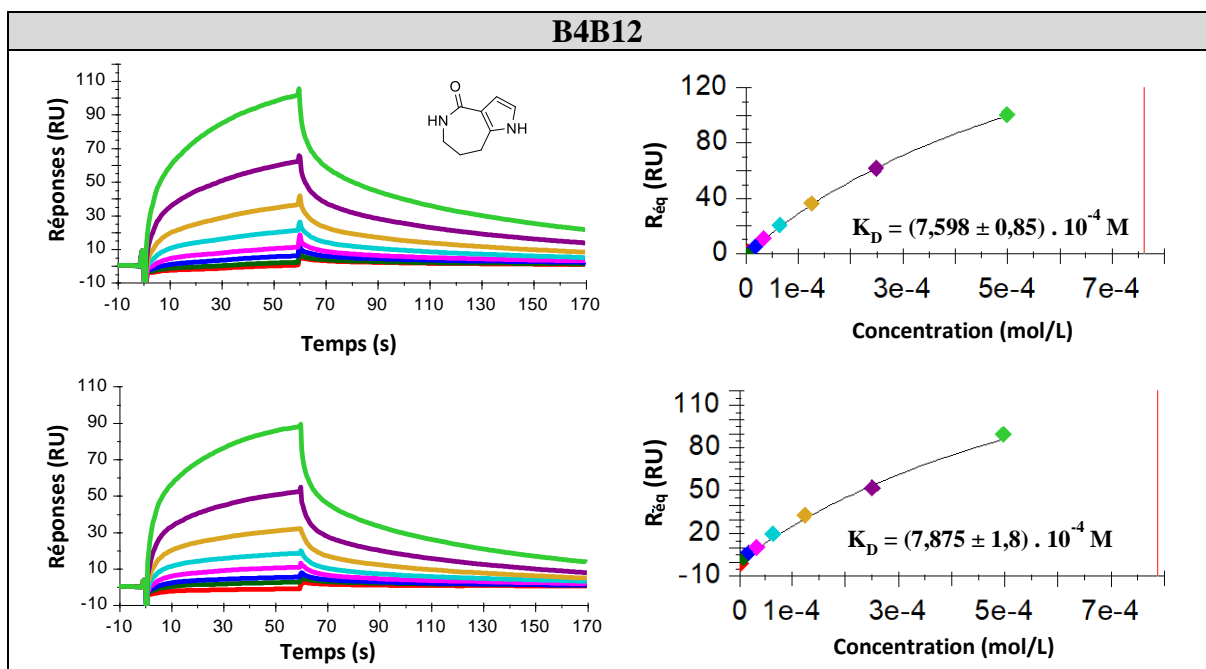


Figure 73 : Sensorgramme du fragment B4B12 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

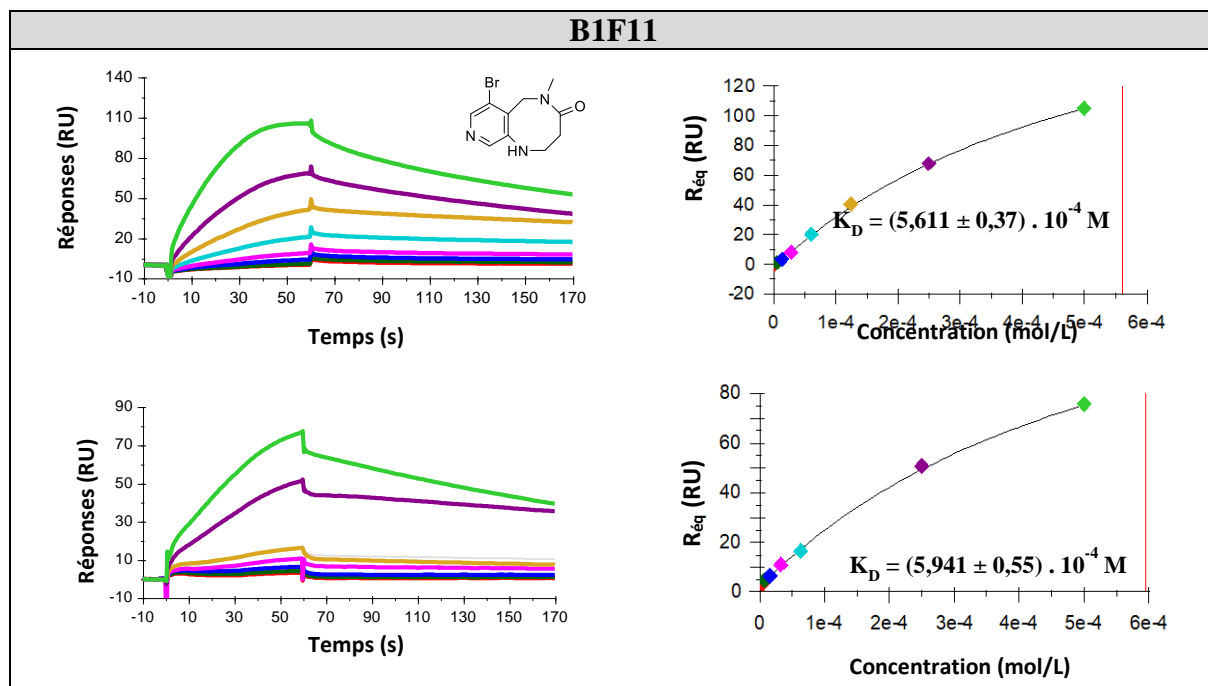


Figure 74 : Sensorgramme du fragment B1F11 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

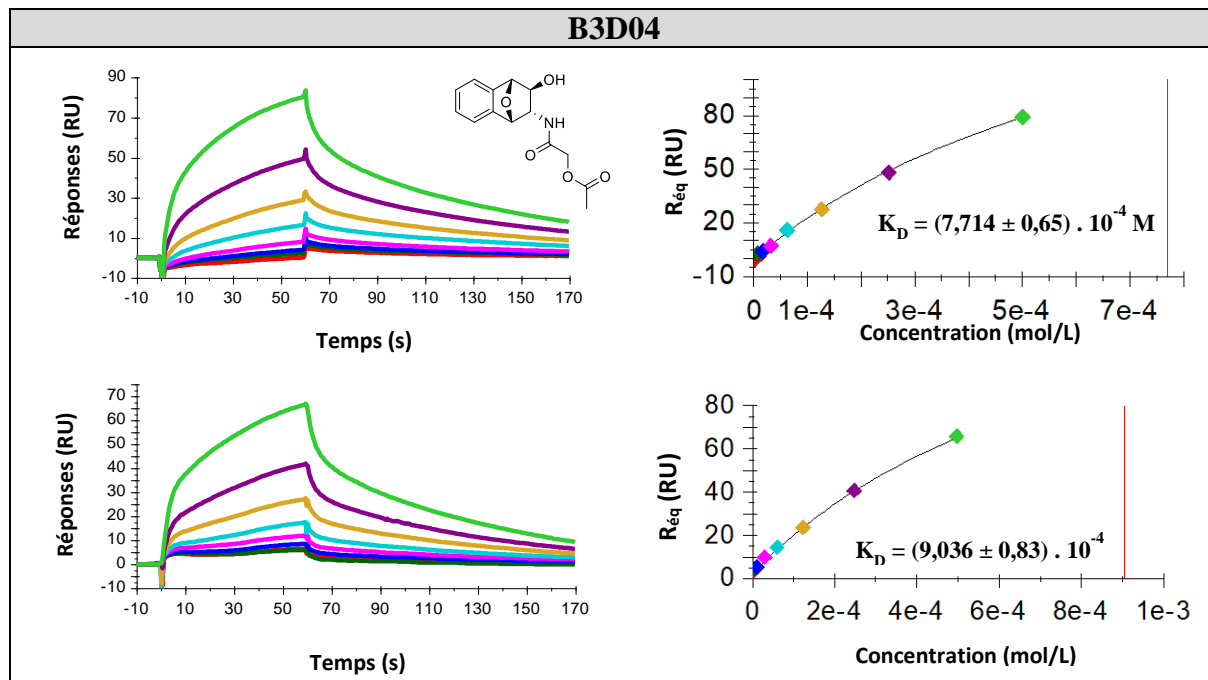


Figure 75 : Sensorgramme du fragment B3D04 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

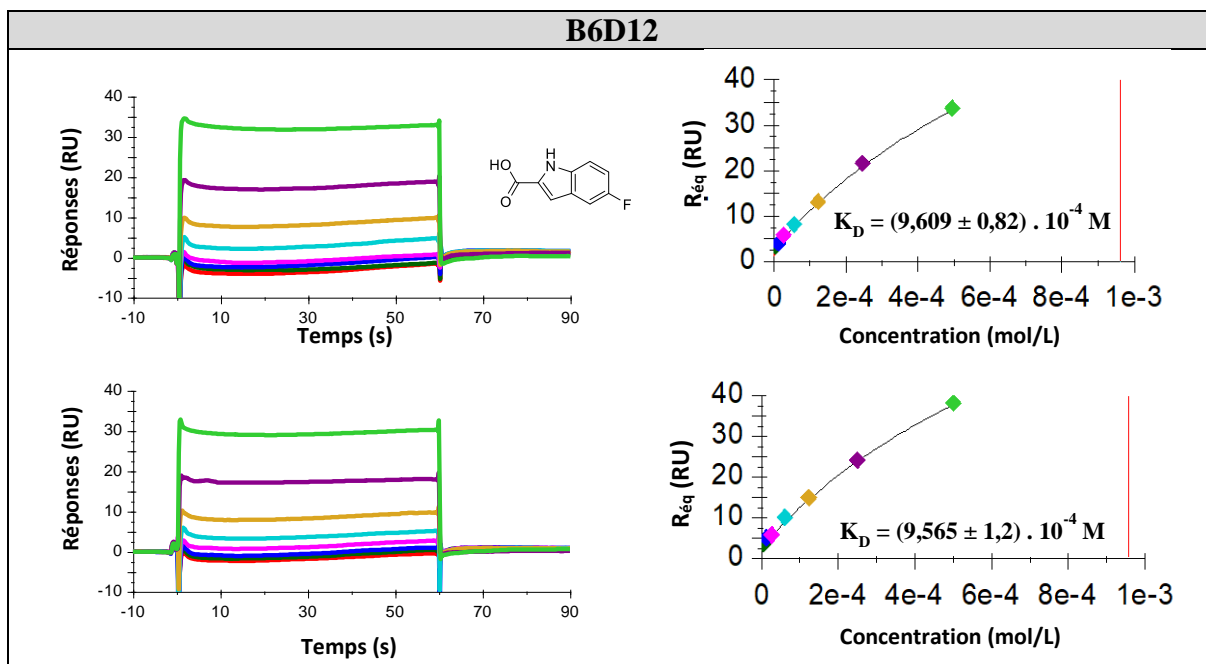


Figure 76 : Sensorgramme du fragment B6D12 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

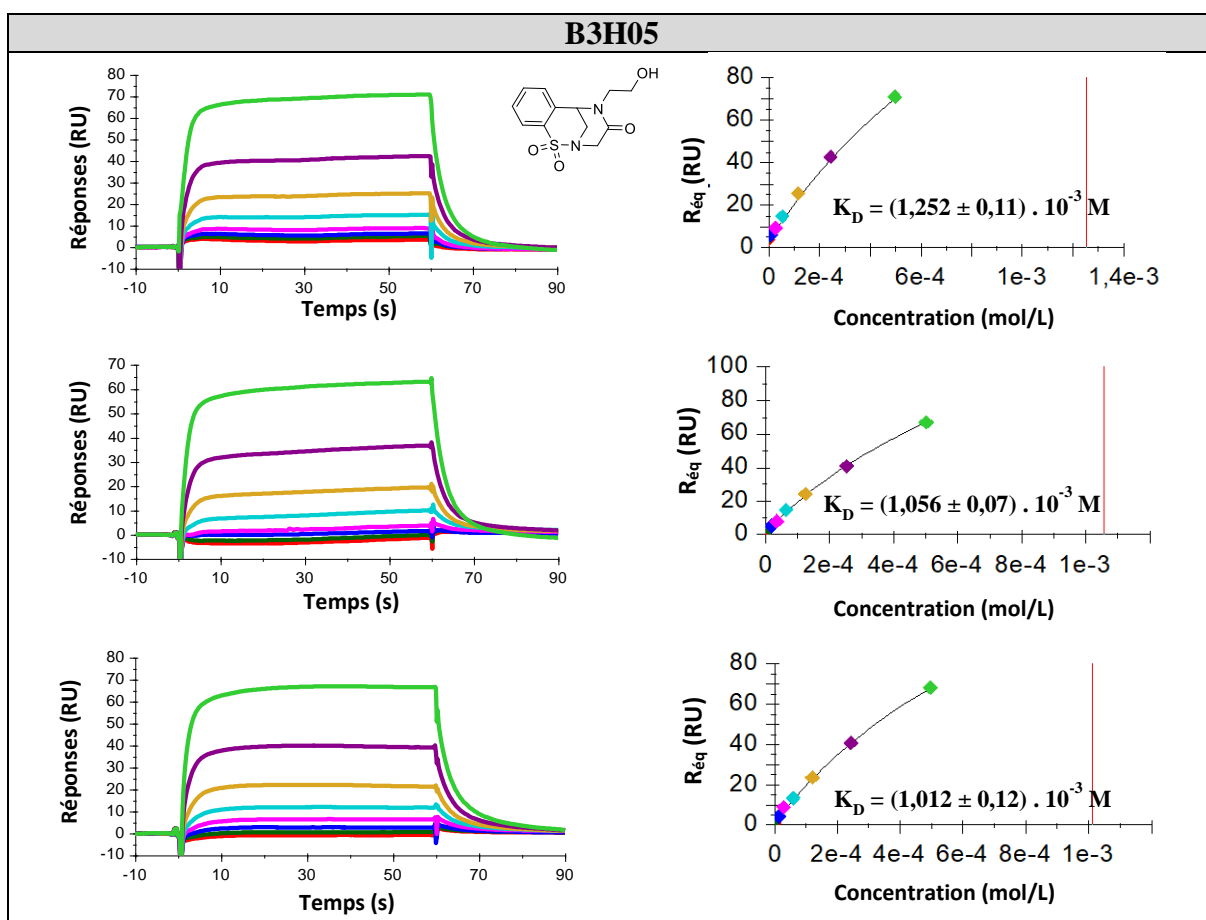


Figure 77 : Sensorgramme du fragment B3H05 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

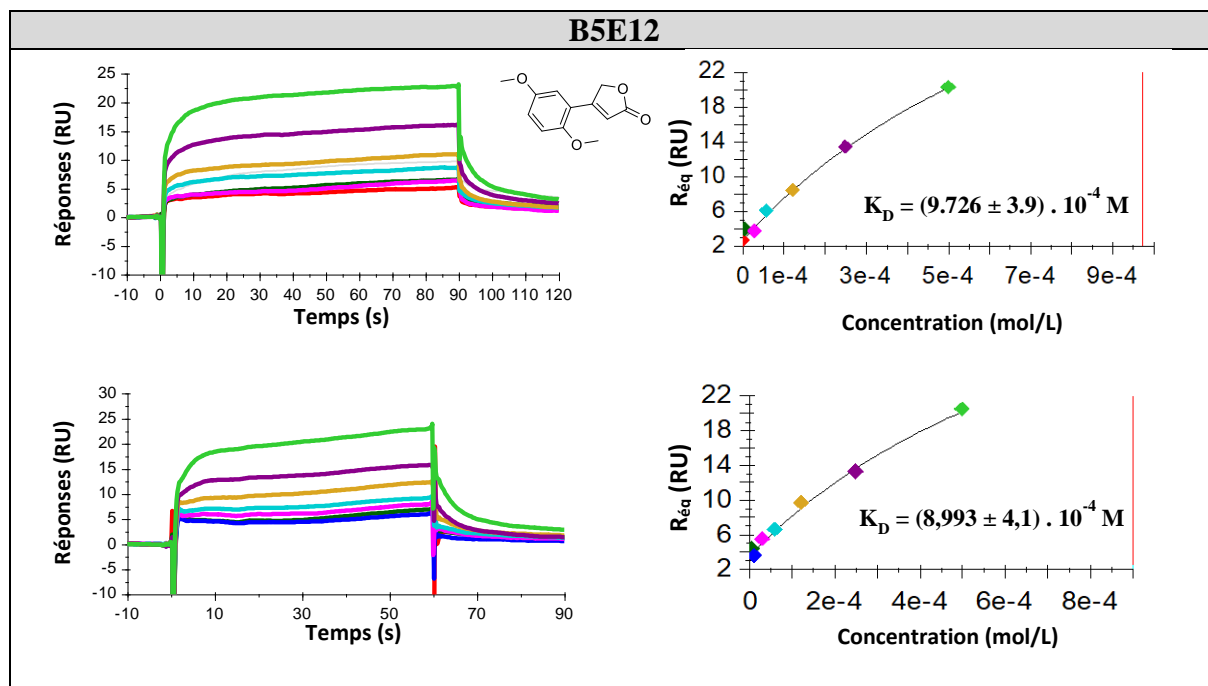


Figure 78 : Sensorgramme du fragment B5E12 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

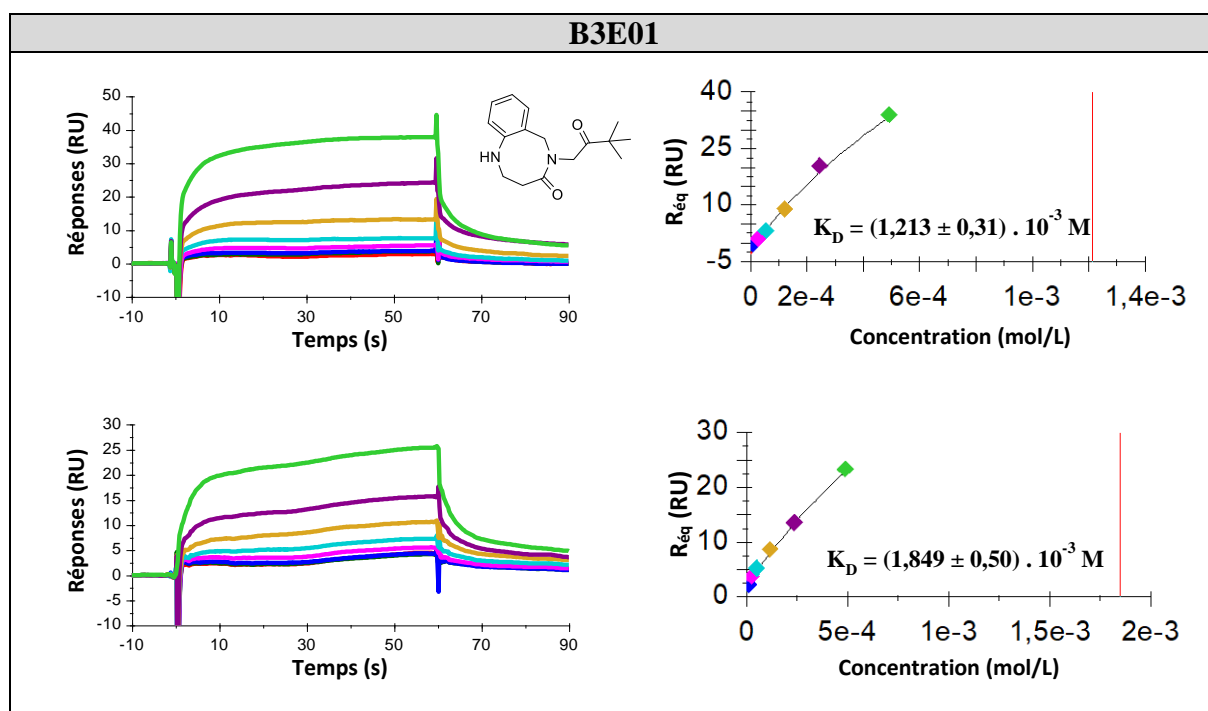


Figure 79 : Sensorgramme du fragment B3E01 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

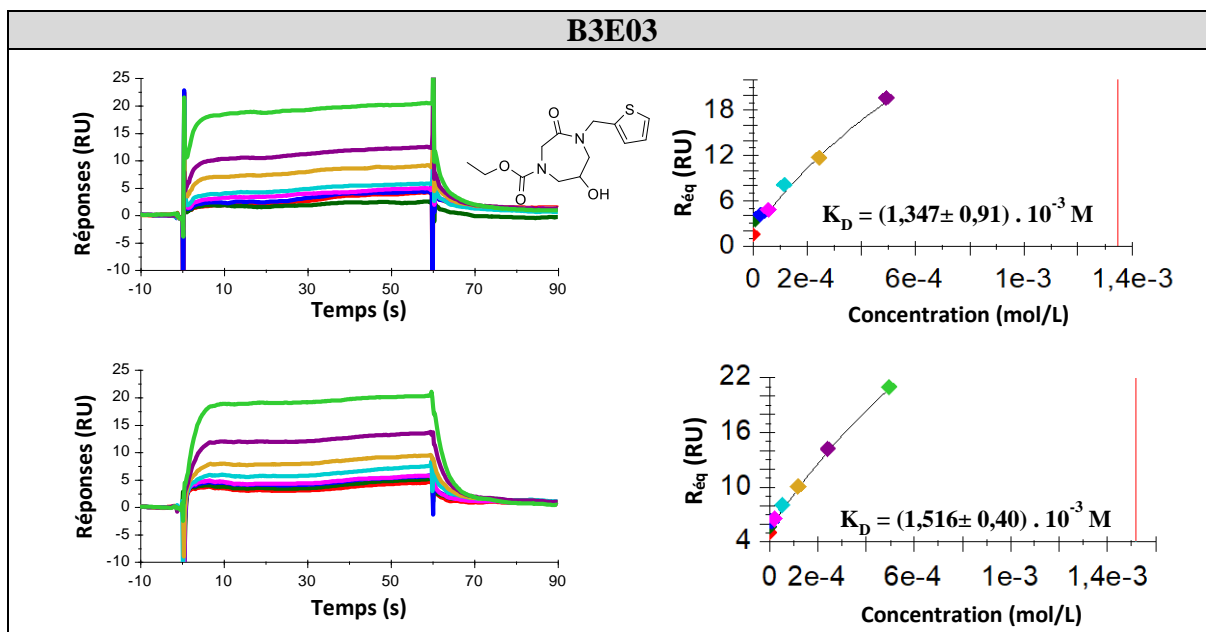


Figure 80 : Sensorgramme du fragment B3E03 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

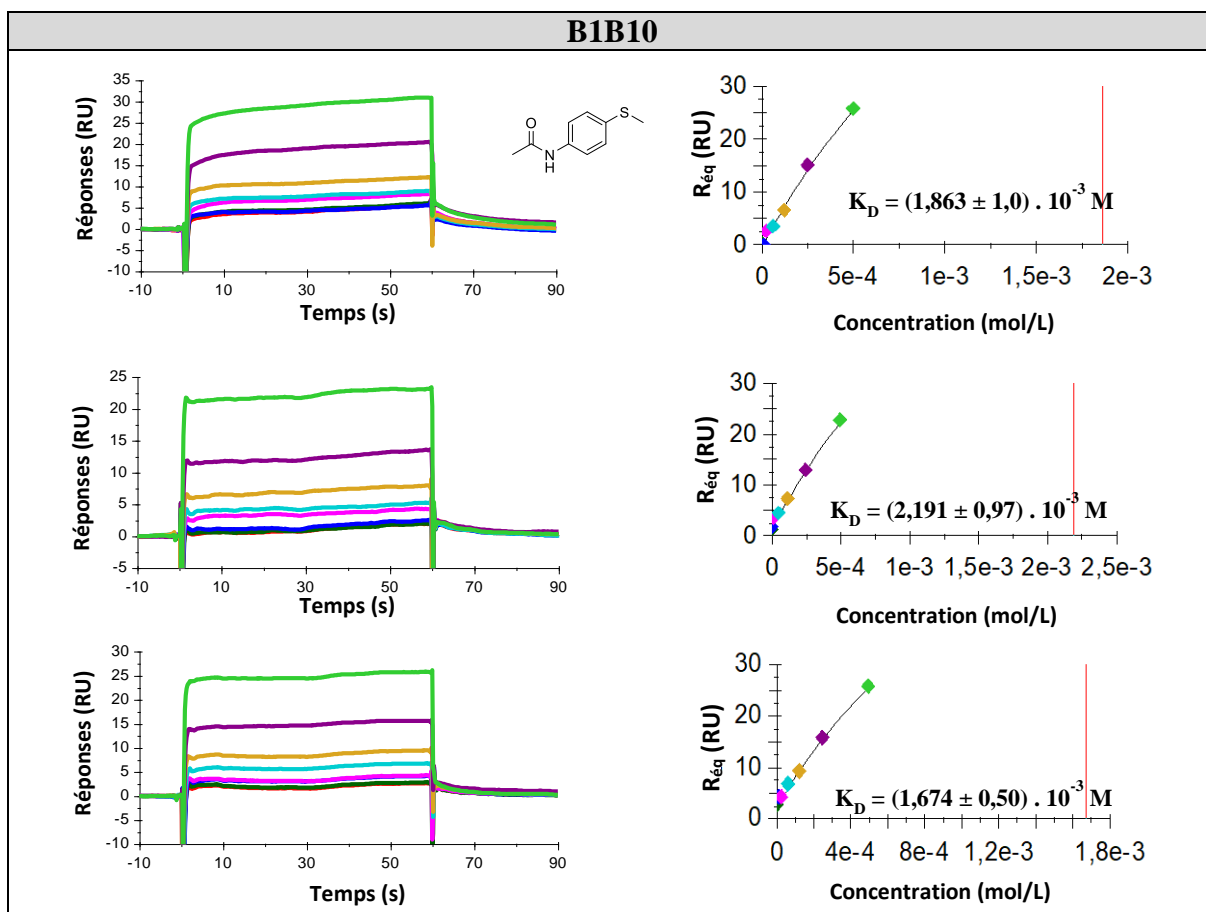


Figure 81 : Sensorgramme du fragment B1B10 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

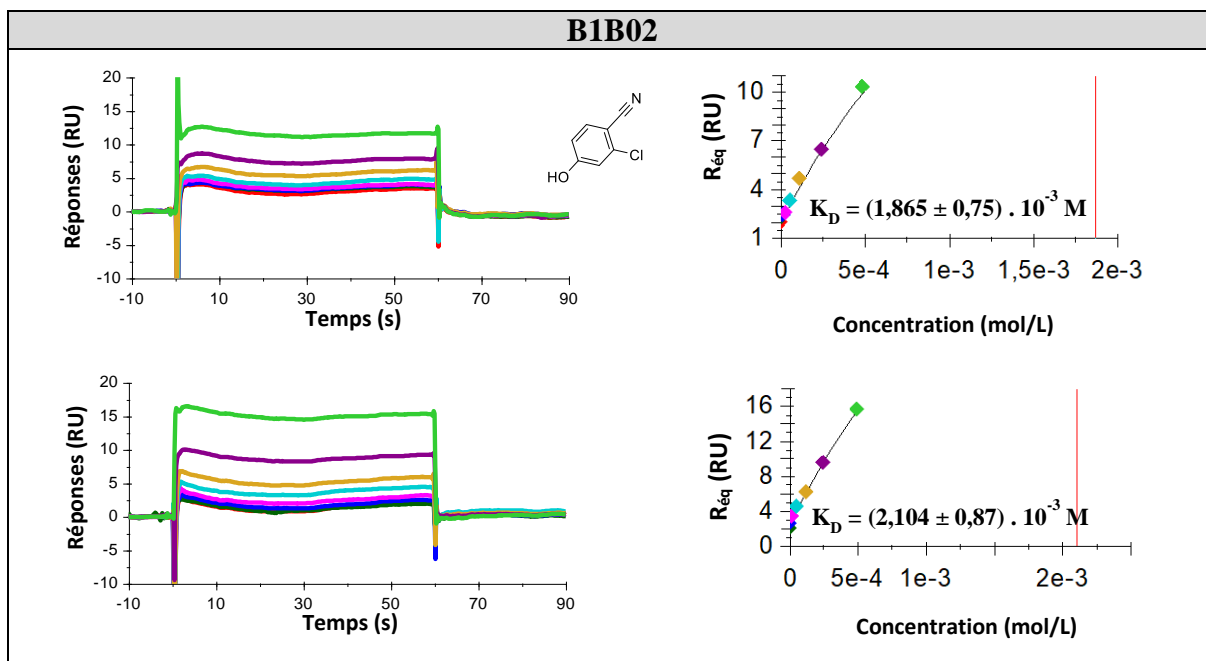


Figure 82 : Sensorgramme du fragment B1B02 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

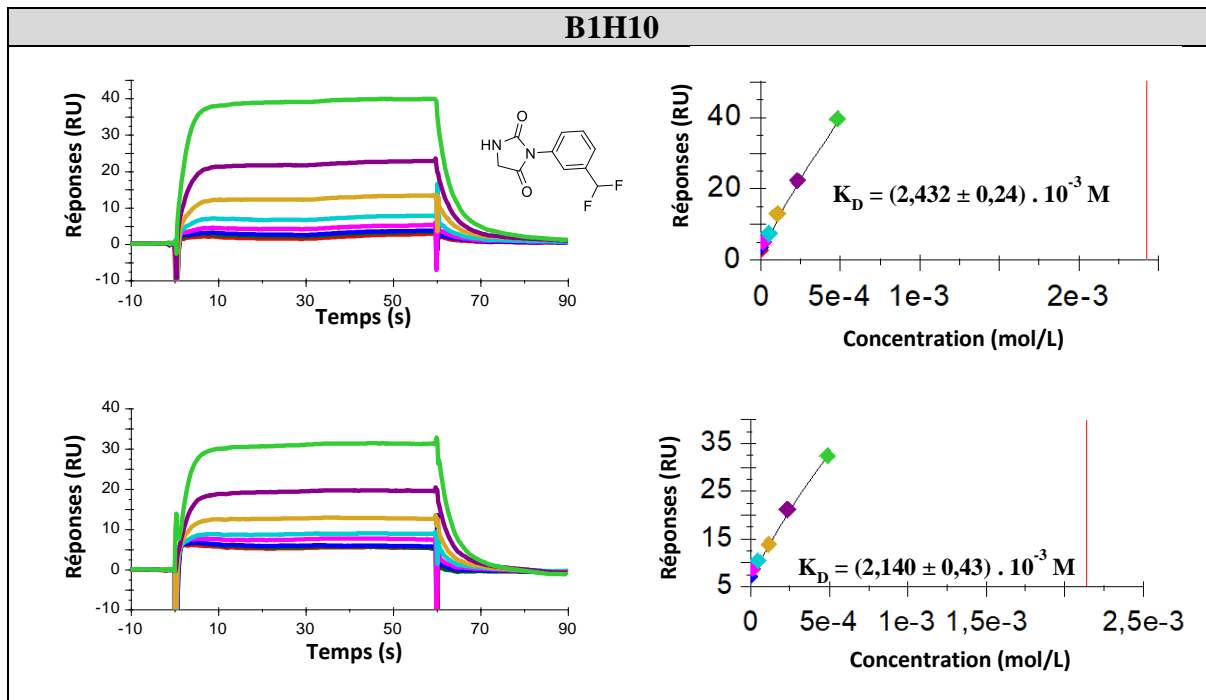


Figure 83 : Sensorgramme du fragment B1H10 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

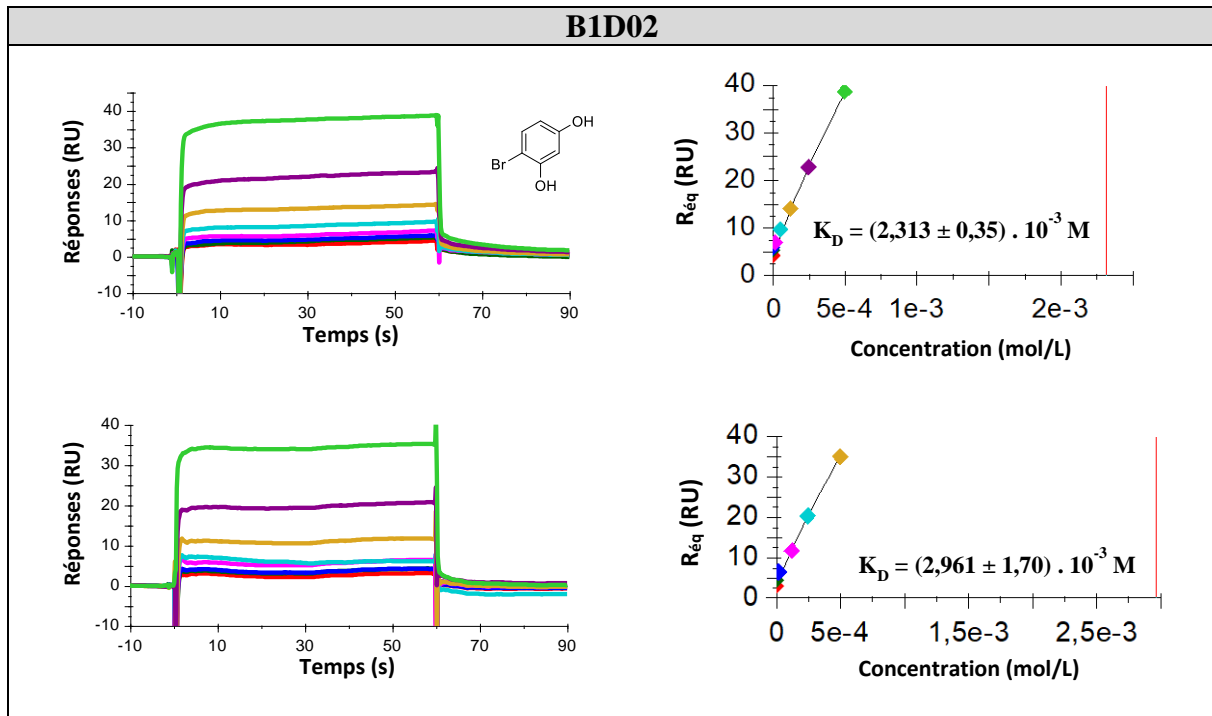


Figure 84 : Sensorgramme du fragment B1D02 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

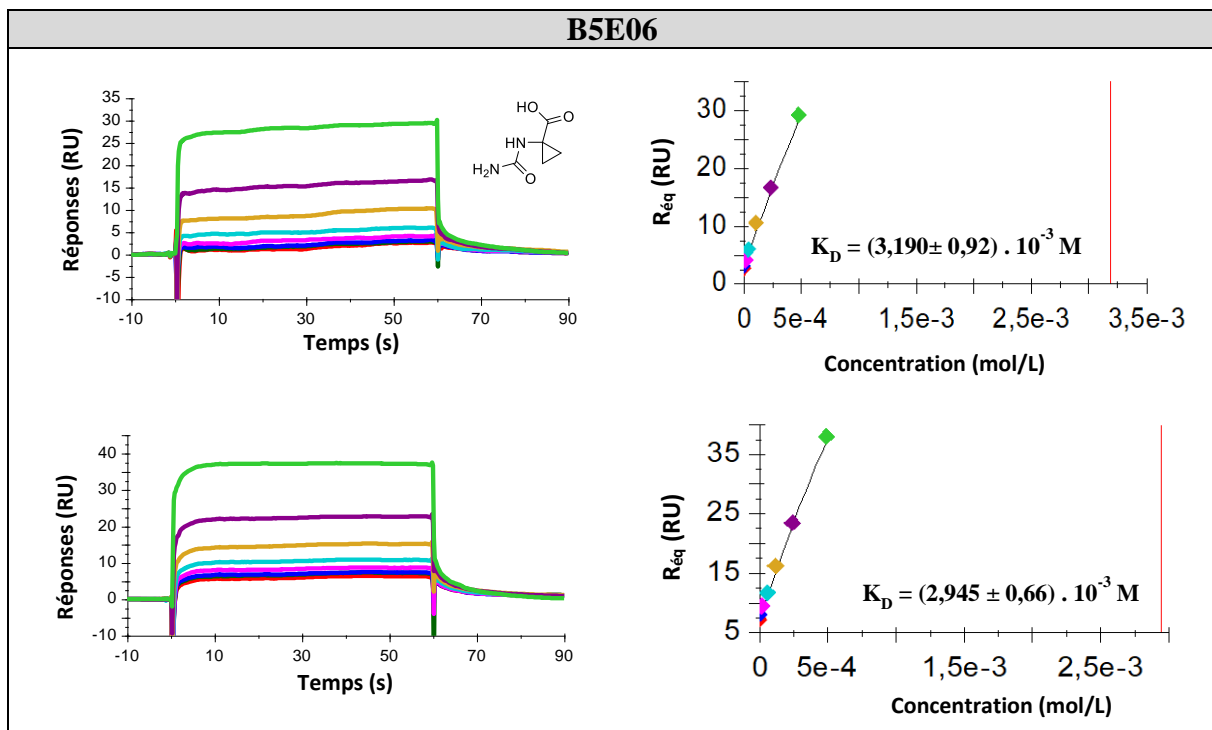


Figure 85 : Sensorgramme du fragment B5E06 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

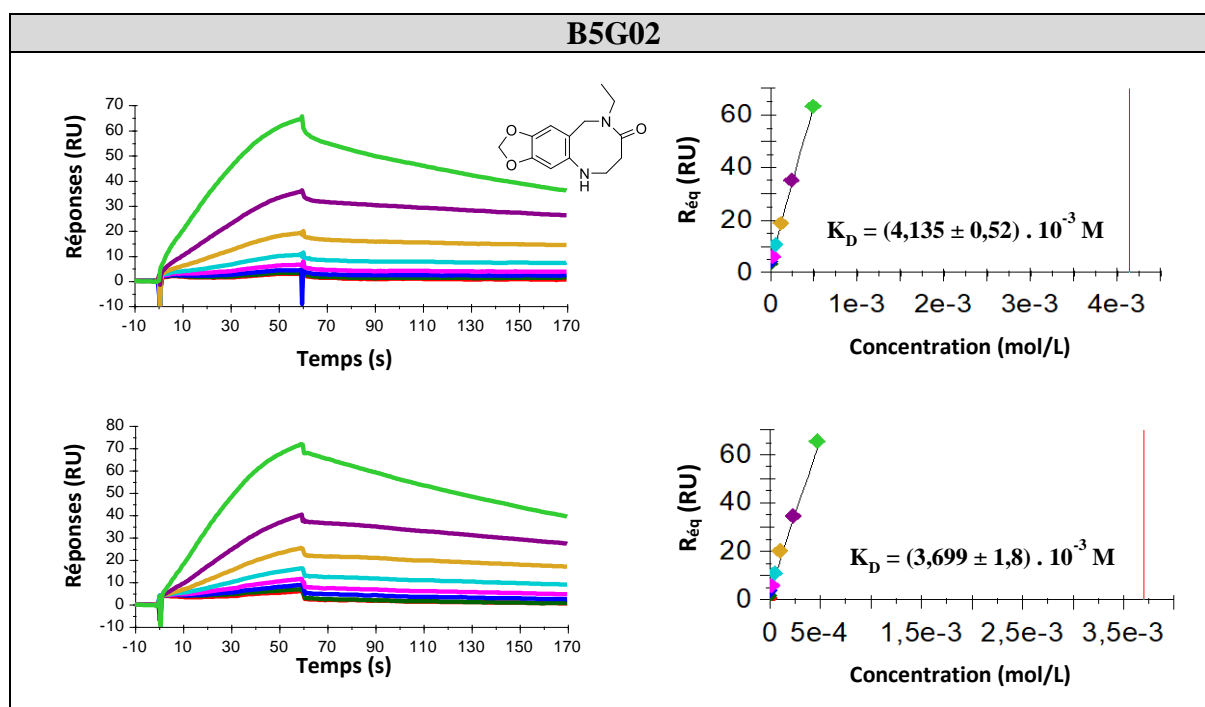


Figure 86 : Sensorgramme du fragment B5G02 (à gauche) et le tracé des réponses à l'équilibre du fragment en fonction de sa concentration (à droite). Le K_D est déterminé selon un modèle d'interaction 1 :1.

On notera que les constantes de vitesse k_a et k_d n'ont pas pu être déterminées. En effet, le logiciel Biaevaluation de l'appareil n'a pas produit de résultats cohérents pour ces données.

Néanmoins, d'après l'allure des sensorgrammes, les phases d'association et de dissociation peuvent être estimées :

- Phases d'association et de dissociation rapides : CTP (Figure 58) et les fragments B5E07 (Figure 71), B6D12 (Figure 76), B1B10 (Figure 81), B1B02 (Figure 82), B5E06 (Figure 85), B1D02 (Figure 84).
- Phases d'association rapide et de dissociation lentes : B4H08 (Figure 69), B4D12 (Figure 70), B3H05 (Figure 77).
- Phases d'association et de dissociation lente : B1F11 (Figure 74), B5G02 (Figure 86).

Afin de classer ces fragments, il est nécessaire de déterminer un K_D qui tient compte des 2-3 expériences réalisées par fragments. Comme les taux d'immobilisations n'étaient pas identiques pour toutes les expériences, nous n'avons pas fait la moyenne des K_D issus de chaque expérience. Des réponses normalisées R_{NORM} ont donc été calculées afin d'harmoniser les résultats en divisant chaque R_{eq} par le R_{max} théorique correspondant à l'expérience qui est fonction du TI.

Pour rappel, les équations (35) et (42) utilisées respectivement pour les calculs du R_{max} théorique et du R_{NORM} :

$$R_{max\text{théorique}} = \frac{MM_A}{MM_L} * TI$$

avec
$$R_{NORM} = \frac{R_{\text{éq}}}{R_{max\text{théorique}}}$$

et les masses molaires, MM_A pour le fragment et MM_L pour l'enzyme Ba-IspD.

Pour un même fragment, un R_{NORM} moyen (R_{NORM}) est calculé à chaque concentration en faisant la moyenne des R_{NORM} obtenus à cette même concentration (Tableau 12).

Fragment B4H08		$R_{\text{éq}}$ (RU)		R_{NORM} (RU)		R_{NORM} (RU)
Concentration (μM)	Essai 1	Essai 2	Essai 1	Essai 2	Moyenne	
0	0	0	0,00	0,00	0,00	
3,91	2,7	3,7	0,03	0,04	0,04	
7,81	6,6	6,5	0,07	0,08	0,07	
15,62	15,9	12,9	0,17	0,15	0,16	
31,25	38,1	26,3	0,42	0,31	0,36	
62,5	65,8	53,3	0,72	0,62	0,67	
125	93,7	82,6	1,03	0,96	1,00	
250	136,1	102,5	1,50	1,19	1,34	
500	143,4	125,2	1,58	1,46	1,52	
R_{max} expérimentale (logiciel)	185	158	Exemple : $R_{NORM} = \frac{1}{2} * \left(\frac{143,4}{91} + \frac{125,2}{86} \right)$ $R_{NORM} = \frac{1}{2} * (1,58 + 1,46) = 1,52$			
Taux Immobilisation	11961	11297				
R_{max} théorique	91	86				

Tableau 12 : Résultats des réponses $R_{\text{éq}}$ et calcul des R_{NORM} du fragment B4H08.

Les R_{NORM} sont ensuite tracées en fonction de la concentration du fragment. Le nuage de point obtenu est ajusté selon l'équation de régression non linéaire :

$$R_{NORM} = \frac{R_{NORM\text{max}} * [\text{Fragment}]}{K_D + [\text{Fragment}]} + y \quad (43)$$

Le logiciel Kaleidagraph a été utilisé pour ajuster les courbes.

La Figure 87 montre la courbe de saturation pour le fragment B4H08. On obtient un $R_{NORM\text{max}}$ de 1,9406 et un K_D de 104,47 μM . Les courbes et leurs ajustements sont donnés pour chaque fragment dans l'Annexe 3.

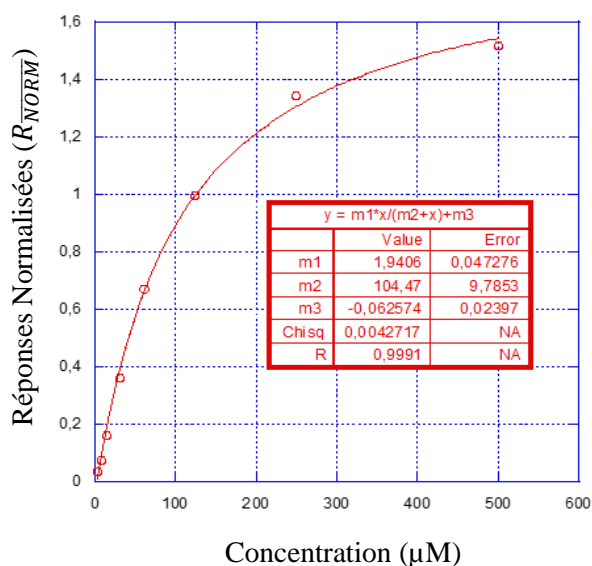


Figure 87 : Courbe de saturation du fragment B4H08. m_1 : $R_{NORM\ max}$, m_2 : K_D (en μM) et m_3 : y .

Pour calculer un K_D , il est préconisé que le tracé des réponses ($R_{\acute{e}q}$ ou R_{NORM}) en fonction de la concentration en fragment montre un plateau aux concentrations élevées en fragment ou que la concentration la plus élevée soit au moins égale au double de la valeur du K_D calculée²⁰⁵. En effet, pour une interaction 1 : 1, le K_D est égale à la concentration d'analyte qui sature 50 % des sites de liaison, de sorte que $R_{NORM} = 0,5 * R_{NORM\ max}$ (ou $R_{\acute{e}q} = 0,5 * R_{max}$). Cependant, dans notre étude la concentration du fragment a été limitée à 500 μM . Des concentrations en fragment 2 à 3 fois supérieures pourraient provoquer des problèmes de solubilité et consommer une trop grande quantité de fragment.

Le seul fragment qui atteint un plateau est B4H08 (Figure 69 et Annexe 3) avec un K_D de 104 μM (Tableau 13, entrée 1). Pour les neuf fragments suivants (Tableau 13, entrée 2 à 10), le tracé des réponses en fonction de la concentration en fragment montrent un infléchissement de la courbe laissant imaginer un plateau (Figure 70-Figure 78 et Annexe 3). Ces fragments ont un K_D plus grand que la plus haute concentration testée (500 μM) mais le K_D estimé peut néanmoins être considéré comme acceptable.

Cependant, pour les huit fragments restants (Tableau 13, Entrée 11 à 18), le tracé semble linéaire (Figure 79-Figure 86 et Annexe 3). Les moyennes des K_D estimées ne sont donc pas fiables. Il est préférable de considérer uniquement leur ordre de grandeur qui est de 10^{-3} M.

La constante de dissociation à l'équilibre ne peut être déterminée précisément par SPR lorsque les concentrations en fragments sont trop faibles par rapport aux valeurs des K_D , la saturation étant dans ce cas de moins de 50 %. La concentration en fragment devrait être augmentée pour

arriver à la saturation mais des problèmes de solubilité des fragments auraient pu survenir et dégrader le système microfluidique de l'appareil Biacore.

Les valeurs des K_D obtenues pour chaque fragment sont répertoriées par ordre croissant dans le Tableau 13 :

N°	Fragment	Structure	K_D moyen (10^{-6} mol/L)	N°	Fragment	Structure	K_D moyen (10^{-6} mol/L)
1	B4H08		104,47 ± 9,7853	10	B5E12		1122,3 ± 291,8
2	B4D12		529,55 ± 52,359	11	B3E01		1395,0 ± 22,24
3	B5E07		619,83 ± 92,737	12	B3E03		1608,5 ± 580,62
4	B3F10		706,79 ± 122,17	13	B1B10		1869,3 ± 466,01
5	B4B12		775,8 ± 123,68	14	B1B02		2058,6 ± 639,23
6	B1F11		825,8 ± 192,31	15	B1H10		2326,5 ± 247,03
7	B3D04		831,8 ± 63,485	16	B1D02		3063,2 ± 1193,0
8	B6D12		957,23 ± 64,817	17	B5E06		3084,7 ± 724,76
9	B3H05		1100,2 ± 82,883	18	B5G02		4214,4 ± 936,81

Tableau 13 : Classement des fragments en fonction de la valeur de leur K_D (ordre croissant).

2.2.7 L'efficacité du ligand (LE)

L'efficacité du ligand (LE) est une donnée qui peut être utilisée pour estimer si un fragment est viable pour devenir un candidat médicament (cf. Chapitre 1.6.2.2, p. 45). Le LE est calculé pour les fragments avec les valeurs de K_D acceptables, c'est-à-dire pour les neuf premiers fragments du Tableau 13 (Entrée 1 à 9), d'après l'équation (2, p. 51) :

$$LE = \frac{-RT \ln K_D}{HA}$$

Exemple de calcul pour le fragment B4H08 :

$$LE = \frac{-0,00831 * 298,15 * \ln 0,000105}{14} = 1,6913 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{HA}^{-1}$$

Le LE est exprimé généralement en $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{HA}^{-1}$, une conversion de kJ en kcal est donc nécessaire (1 kJ = 0,239006 kcal) :

$$LE = 1,6913 * 0,239006 = 0,39 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{HA}^{-1}$$

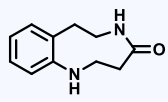
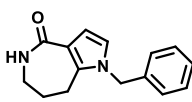
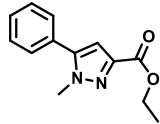
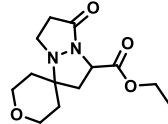
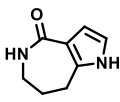
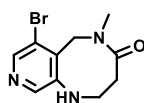
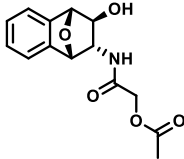
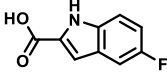
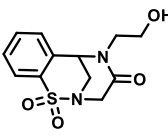
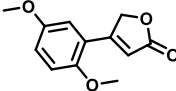
<p>B4H08</p>  <p>14 HA $K_D = 104 \mu\text{M}$ LE = 0,39</p>	<p>B4D12</p>  <p>18 HA $K_D = 230 \mu\text{M}$ LE = 0,28</p>	<p>B5E07</p>  <p>17 HA $K_D = 620 \mu\text{M}$ LE = 0,26</p>	<p>B3F10</p>  <p>19 HA $K_D = 706 \mu\text{M}$ LE = 0,23</p>	<p>B4B12</p>  <p>11 HA $K_D = 776 \mu\text{M}$ LE = 0,39</p>
<p>B1F11</p>  <p>15 HA $K_D = 826 \mu\text{M}$ LE = 0,28</p>	<p>B3D04</p>  <p>20 HA $K_D = 832 \mu\text{M}$ LE = 0,21</p>	<p>B6D12</p>  <p>13 HA $K_D = 957 \mu\text{M}$ LE = 0,32</p>	<p>B3H05</p>  <p>19 HA $K_D = 1100 \mu\text{M}$ LE = 0,21</p>	<p>B5E12</p>  <p>16 HA $K_D = 1122 \mu\text{M}$ LE = 0,25</p>

Figure 88 : Calcul du LE pour les dix fragments montrant les meilleurs K_D .

Le LE est exprimé en $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{HA}^{-1}$.

Ces dix fragments ont un LE compris entre de 0,21-0,39 kcal.mol⁻¹.HA⁻¹. L'optimisation de ces fragments vers à un candidat-médicament devrait comprendre une augmentation du nombre d'atomes lourds tout en augmentant l'affinité afin d'atteindre une valeur de LE acceptable supérieure à 0,3 kcal.mol⁻¹.HA⁻¹ pour des propriétés pharmacocinétiques optimales (Tableau 4).

Le fragment B4H08 conduit à un LE de 0,39 pour 14 HA ce qui représente un point de départ très intéressant pour l'optimisation vers un candidat médicament. Le faible nombre d'atomes lourds permet de nombreuses possibilités d'optimisation pour améliorer l'affinité de ce fragment. C'est également le cas pour les fragments B4B12 avec 11 HA et un LE de 0,39 et B6D12 avec 13 HA et un LE de 0,32.

2.2.8 L'efficacité de liaison (BE)

Comme discuté précédemment (cf. 2.2.6.2, p. 99), certaines courbes de la réponse $R_{\text{éq}}$ ou R_{NORM} en fonction de la concentration en fragment sont loin d'atteindre un plateau, montrant ainsi une faible affinité de ces fragments avec Ba-IspD. L'impossibilité d'obtenir une courbe de saturation correcte peut provenir d'une trop faible concentration en fragment mais aussi de multiples interactions du fragment avec différents sites de fixation de l'enzyme, les fragments pouvant se lier à différents sites avec des affinités différentes.

Au vu des résultats et de l'impossibilité de déterminer un K_D correct pour certains fragments, le concept d'efficacité de liaison (BE) a été introduit²⁰⁶ afin de mieux évaluer l'interaction du fragment avec l'enzyme Ba-IspD et de les classer.

Ce paramètre correspond à la pente de la courbe de saturation aux faibles concentrations en fragment. Ainsi, il représente la quantité d'analyte (CTP ou fragment) lié en fonction de la concentration sans prendre en compte le mécanisme de liaison et le nombre de sites de fixation. L'équation de la réponse à l'équilibre $R_{\text{éq}}$ pour un fragment de concentration C est décrite selon l'équation B de la Figure 49. Cette équation peut être réorganisée comme suit :

$$R_{\text{éq}} = \frac{R_{\text{max}} * C}{K_D + C} = \frac{\frac{R_{\text{max}}}{K_D} * C}{\frac{C}{K_D} + 1} \quad \text{ou} \quad R_{\text{éq}} = \frac{BE * C}{\frac{C}{K_D} + 1} \quad (44)$$

$$\text{avec} \quad BE = \frac{R_{\text{max}}}{K_D} \quad (45)$$

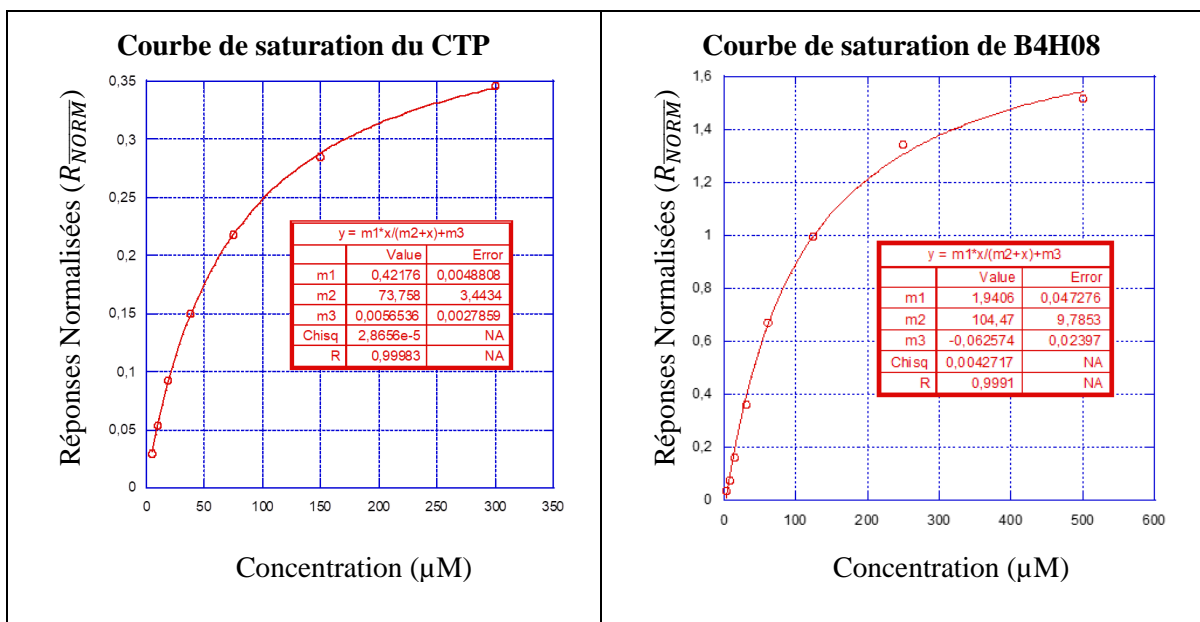
La valeur de BE peut être obtenue par régression non linéaire d'après l'équation (44) en traçant la courbe de $R_{\text{éq}}$ en fonction de la concentration en fragment pour les 10 meilleurs fragments. Or précédemment, pour déterminer les K_D et les $R_{NORMmax}$, nous n'avons pas utilisé les $R_{\text{éq}}$ mais des R_{NORM} car les $R_{\text{éq}}$ ont été obtenus à partir d'expériences qui ne mettaient pas en jeu les mêmes taux d'immobilisation (TI) d'enzyme. En effet, ces R_{NORM} permettaient de tenir compte de la disparité de ces taux d'immobilisation.

Pour déterminer le BE, nous avons besoin des valeurs des $R_{\text{éq}}$. Mais si nous utilisons des valeurs issues d'expériences réalisées avec des TI différents, la valeur du BE sera faussée. C'est pourquoi un $R_{max}théorique\ moyen$ ($R_{max}théorique$) correspondant à la moyenne des $R_{max}théorique$ est introduit afin de calculer les $R_{\text{éq} moyen}$ ($R_{\text{éq}}$) à partir des R_{NORM} :

$$R_{\text{éq}} = R_{NORM} * R_{max}théorique \quad (46)$$

$$\text{d'où} \quad BE_1 = \frac{R_{NORMmax}}{K_D} * R_{max}théorique \quad (47)$$

Le calcul de BE_1 est correct lorsque le plateau est atteint ou presque et donc qu'une régression non linéaire est réalisable (Tableau 14). Les 10 premiers fragments du Tableau 13 et le CTP correspondent à ces critères et leurs valeurs de BE_1 sont répertoriées dans le Tableau 14.



Fragments	K_D (μM)	$R_{\overline{max}}$ théorique (RU)	$R_{\overline{NORM} max}$ (RU)	BE_1 ($RU^2.mM^{-1}$)
CTP	73,758	252,0	0,42176	1440,87
B4H08	104,47	88,5	1,9406	1643,95
B4D12	529,55	121,0	0,67703	154,70
B5E07	619,83	126,0	0,47842	97,25
B3F10	706,79	135,0	0,98114	187,40
B4B12	775,80	76,5	3,1086	306,53
B1F11	825,80	136,5	1,7799	294,21
B3D04	831,80	138,5	1,3648	227,25
B6D12	957,23	95,0	1,0083	100,07
B3H05	1100,20	150,7	1,4112	193,26
B5E12	1122,30	98,0	0,56004	48,90

Tableau 14 : Valeurs de BE_1 pour les fragments avec une courbe de saturation correcte. Exemples de courbes de saturation pour le CTP et le fragment B4H08. Avec le $R_{\overline{NORM} max} = m_1$, le $K_D = m_2$ et l'ordonnée à l'origine = m_3 (car la courbe ne passe pas par zéro).

Le fragment B4H08 a le meilleur BE_1 avec une valeur de 1643 mM^{-1} . B4H08 à pratiquement la même efficacité de liaison que le contrôle (CTP) qui a une valeur de 1440 mM^{-1} . Ensuite, les fragments B4B12, B1F11 ont des BE_1 d'environ 300 mM^{-1} , suivi des fragments B3D04, B3H05, B3F10 qui ont des BE_1 aux alentours de 200 mM^{-1} . Pour finir, les fragments B4D12, B6D12, B5E07 et B5E12 ont des BE_1 inférieur à 150 mM^{-1} .

Des valeurs de BE ont également été calculées par régression linéaire pour les fragments dont les courbes de saturation n'atteignent pas le plateau et qui sont des courbes quasi linéaires. Lorsque $C \ll K_D$, l'équation (44) se simplifie :

$$R_{\acute{e}q} = BE * C \quad (48)$$

Ainsi, la valeur de BE représente la pente de la partie linéaire initiale de la courbe de saturation décrite par l'équation (38). Comme les résultats des $R_{\overline{NORM}}$ et des K_D ont été obtenus à partir d'une moyenne de plusieurs expériences réalisées avec des taux d'immobilisation différents, la pente de la droite est également multipliée par le $R_{\overline{max}théorique}$ et le BE_2 est déterminé d'après l'équation suivante :

$$BE_2 = pente * R_{\overline{max}théorique} \quad (49)$$

En SPR, la réponse du fragment dépend de sa masse molaire et le R_{max} qui en résulte est aussi influencé par ce facteur. Le BE étant relié au R_{max} , la normalisation du BE_2 par la masse molaire

permet de comparer l'efficacité de liaison en considérant la masse du fragment. Ainsi, le BE_3 peut se calculer selon l'équation suivante :

$$BE_3 = \frac{\text{pente} * R_{\text{max}} \text{ théorique}}{MM_{\text{fragment}}} = \frac{BE_2}{MM_{\text{fragment}}} \quad (50)$$

Les valeurs de BE_2 et BE_3 ont été calculées pour les huit derniers fragments du Tableau 13 des courbes de saturation (Figure 79-Figure 86) quasi linéaires. Les cinq plus faibles concentrations en fragments ont servi à tracer les courbes (Annexe 3) et déterminer les BE. Les résultats sont répertoriés dans le Tableau 15.

Fragments	K_D moyen (μM)	R_{max} théorique (RU)	BE_2 ($\text{RU}^2.\text{mM}^{-1}$)	BE_3 ($\text{RU}^2.\text{mM}^{-1}.\text{Da}^{-1}$)
B3E01	1395	133,5	65,37	0,24
B3E03	1608,5	158,5	43,23	0,14
B1B10	1869,3	91,3	63,34	0,35
B1B02	2058,6	81,0	30,6	0,19
B1H10	2326,5	118,5	74,23	0,33
B1D02	3063,2	94,5	67,26	0,36
B5E06	3084,7	78,5	65,07	0,45
B5G02	4214,40	128,0	145,32	0,59

Exemple d'ajustement de la courbe de saturation en utilisant une régression linéaire	
<p>B5G02</p>	<p>Exemple :</p> $BE_2 = 0,011477 * 128$ $BE_2 = 1,4532 \mu\text{M}^{-1}$ $BE_2 = 145,32 \text{mM}^{-1}$ <p>Masse molaire de B5G02 : 248,2 Da</p> $BE_3 = \frac{145,32}{248,2}$ $BE_3 = 0,59 \text{mM}^{-1}.\text{Da}^{-1}$

Tableau 15 : Valeurs de BE_2 et BE_3 pour les fragments avec la droite correspondant aux cinq premières concentrations.

Le fragment B5G02 a le plus grand K_D (environ 4 mM) et le meilleur BE_3 de $0,59 \text{mM}^{-1}$. Les fragments B1H10, B1D02, B5E06 et B1B10 ont des BE_3 similaires d'environ $0,4 \text{mM}^{-1}$ alors que leurs K_D sont bien différents. Quant aux fragments B3E03, B1B02 et B3E01, ils ont les BE

les plus faibles alors que leurs K_D n'étaient pas les plus grands. Ces résultats démontrent que les K_D calculés pour ces huit fragments ne reflètent pas leurs véritables affinités. Ainsi, le BE_3 est utilisé pour comparer ces huit fragments entre eux et permet de les classer selon un ordre différent.

Afin de comparer les efficacités de liaison, les BE_1 , BE_2 et BE_3 ont été calculés pour tous les fragments. Les valeurs BE_2 et BE_3 des 10 premiers fragments (Tableau 14) ont été calculées en prenant les cinq plus faibles concentrations. Pour le CTP, les quatre plus faibles concentrations ont servi au calcul.

Les valeurs BE_1 , pour les huit derniers fragments ont été calculées en utilisant la régression non linéaire (Annexe 3) malgré l'absence de plateau sur les courbes de saturation.

Les valeurs de K_D , BE_1 , BE_2 et BE_3 sont résumées dans le Tableau 16.

Fragments	K_D moyen (μM)	BE_1 ($\text{RU}^2.\text{mM}^{-1}$)	BE_2 ($\text{RU}^2.\text{mM}^{-1}$)	BE_3 ($\text{RU}^2.\text{mM}^{-1}.\text{Da}^{-1}$)
CTP	61,46	1729,08	910,25	1,71
B4H08	104,47	1643,95	970,61	5,10
B4D12	529,55	154,7	120,64	0,50
B5E07	619,83	97,25	86,13	0,37
B3F10	706,79	187,4	172,18	0,64
B4B12	775,8	306,53	328	2,18
B1F11	825,8	294,21	288,02	1,07
B3D04	831,8	227,25	226,95	0,82
B6D12	957,23	100,07	98,36	0,54
B3H05	1100,2	193,26	206,96	0,73
B5E12	1122,3	48,9	38,5	0,17
B3E01	1395	77,91	65,37	0,24
B3E03	1608,5	42,57	43,23	0,14
B1B10	1869,3	59,73	63,34	0,35
B1B02	2058,6	26,51	30,6	0,19
B1H10	2326,5	77,86	74,23	0,33
B1D02	3063,2	77,62	67,26	0,36
B5E06	3084,7	67,09	65,07	0,45
B5G02	4214,4	139,36	145,32	0,59

Tableau 16 : Résultats des différents paramètres définissant l'affinité de liaison des 18 fragments pour l'enzyme Ba-IspD.

En se basant sur les résultats de BE_3 , le fragment B4H08, qui avait précédemment le meilleur K_D , a aussi la meilleure efficacité de liaison de $5,10 \text{ mM}^{-1}$. Cette valeur est supérieure à l'analyte contrôle, le CTP qui a une valeur de BE_3 de $1,71 \text{ mM}^{-1}$. Le BE_3 est un paramètre qui est utilisé pour les faibles affinités et n'est donc pas pertinent pour ce fragment.

Ainsi, le Tableau 16 permet de catégoriser les dix-huit fragments en deux parties. Les fragments ayant un $K_D \leq 1 \text{ mM}$ sont considérés comme ayant une affinité correcte (de B4H08 à B3H05) pour Ba-IspD. Ceux montrant un $K_D \geq 1 \text{ mM}$ (de B5E12 à B5G02) et une efficacité de liaison BE_3 faible (excepté pour B5G02) sont considérés comme ayant une affinité faible pour Ba-IspD.

Les meilleurs fragments, qui seront davantage étudiés, sont ceux pour lesquelles un $K_D \leq 1,1 \text{ mM}$ a pu être déterminé (Tableau 17, B4H08, B4D12, B5E07, B3F10, B4B12, B1F11, B3D04, B6D12, B3H05).

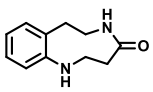
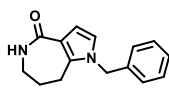
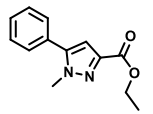
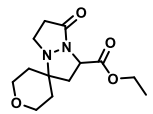
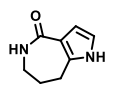
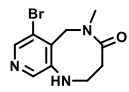
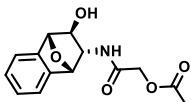
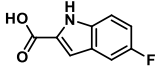
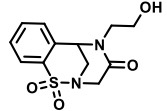
B4H08	B4D12	B5E07	B3F10	B4B12	B1F11
					
B3D04		B6D12		B3H05	
					

Tableau 17 : Les fragments avec un K_D intéressant.

Les fragments B1D02, B5E06, B5G02 (Tableau 18) ne doivent pas être complètement écartés du criblage car ils montrent des efficacités de liaison (BE_3) relativement élevés.

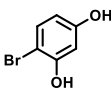
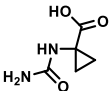
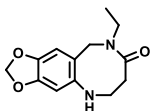
B1D02	B5E06	B5G02
		

Tableau 18 : Les fragments avec un BE_3 intéressant.

2.3 Conclusion

Dans ce chapitre, une méthodologie pour la mesure de l'affinité d'un fragment par SPR a été mise en place pour les enzymes Ba-IspD et Ec-IspD.

Dans un premier temps, les conditions d'immobilisation des deux enzymes Ba-IspD et Ec-IspD ont été mises au point et ont permis de les fixer sur une surface d'or avec succès. Il a ensuite été démontré qu'une partie des sites actifs des deux enzymes restent accessibles malgré leur immobilisation par la détermination des K_D des complexes Ba-IspD-CTP et Ec-IspD-CTP.

Dans un second temps, la mise au point de la méthode de criblage des fragments solubilisés dans du DMSO a nécessité une correction par rapport à ce solvant qui engendre un important signal en SPR. C'est pourquoi une gamme de correction a été faite. Une fois au point, la méthode a été employée pour le criblage d'une librairie de 500 fragments. Vingt-trois molécules ont ainsi été sélectionnées, et des K_D compris entre 10^{-3} et 10^{-4} ont pu être déterminées pour dix-huit d'entre elles.

Le fragment B4H08 semble être le meilleur fragment sélectionné avec un K_D de 104 μM et une efficacité de ligand (LE) de 0,39 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{HA}^{-1}$ qui est une valeur encourageante pour son optimisation. Les huit fragments B4D12, B5E07, B3F10, B4B12, B1F11, B3D04, B6D12 et B3H05 ont montré des résultats intéressants avec des K_D compris entre 0,5 et 1,1 mM, et des valeurs de LE comprises entre 0,21 et 0,39 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{HA}^{-1}$.

Les résultats obtenus en SPR auraient pu être optimisés. En effet, la comparaison des valeurs de K_D ou de BE à partir de valeurs obtenues avec des taux d'immobilisation différents a nécessité des traitements mathématiques. Des expériences en triplicatas sur une surface avec le même taux d'immobilisation permettraient d'obtenir des K_D plus simplement avec des résultats plus reproductifs et réalistes. D'autre part, neuf fragments ont été testés à des concentrations trop faibles pour déterminer précisément un K_D et n'ont pu être classés que selon leur efficacité de liaison. Une détermination plus précise des K_D de ces neuf fragments pourrait être faite avec des expériences réalisées avec des concentrations plus importantes en fragment. Cependant, des problèmes d'agrégation et de solubilité des fragments pourraient survenir et ces expériences sont coûteuses car elles consomment une quantité importante de fragment.

Afin de confirmer ces premiers résultats, et d'éliminer des fragments qui pourraient se révéler être des faux-positifs, d'autres expériences ont été réalisées et sont présentées dans le chapitre suivant.

2.4 Partie expérimentale

2.4.1 Production de l'enzyme Ba-IspD

Le gène codant pour l'enzyme IspD de *Bacillus anthracis* (Ba-IspD) a été synthétisé, après optimisation des codons, par la société Genscript, puis cloné dans un vecteur pET-28a. Ce vecteur a ensuite été introduit dans des cellules compétentes d'*Escherichia coli* BL21(DE3). Une pré-culture d'*E. coli* BL21[pet28a-Ba-IspD] est incubée à 37°C sous agitation (200 rpm) pour 8h dans du milieu LB (5 ml) contenant de la Kanamycine (25 µg/ml). Une seconde culture de 50 mlensemencée avec 1 ml de la première pré-culture est cultivée dans les mêmes conditions que précédemment durant la nuit. Enfin, 5 ml de la culture précédente sont ajoutés à 500 ml de LB contenant de la Kanamycine (25 µg/ml) puis la culture est agitée à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 0,6 et 0,8. L'expression de la protéine est induite par l'addition d'IPTG (100 µM) puis le milieu est ensuite agité (200 rpm) pendant 4h à 37 °C. Les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation (7000 x g, 10 min, 4°C). Pour une fiole de 1L, 4,09 g de cellules ont été récupérées puis stockées à -80°C jusqu'à la purification de Ba-IspD. La masse de Ba-IspD recombinante est de 27,29 kDa.

2.4.2 Purification de Ba-IspD sur une colonne Ni-NTA

Le culot bactérien (4,09 g) a été resuspendu dans du tampon de lyse (20 ml, Tris HCl 50 mM, pH 8,0) puis les cellules sont lysées par sonication (8 x 30 s, avec 1 min de refroidissement entre chaque cycle). Après centrifugation (25 min, 16000 g, 4°C), le surnageant est filtré avec un filtre seringue Whatman GD/X™ de 0,45 µM (Cytiva anciennement GE Healthcare, référence : 6880-2504), puis chargé sur une colonne Ni²⁺-NTA (Qiagen, référence : 30210) de 10 ml avec un débit de 1 ml/min en utilisant un appareil ÄKTA™ Start (Cytiva). La colonne a été préalablement conditionnée avec sept volumes de colonne de tampon de lyse. Des paliers d'élution à différentes concentrations en imidazole (20, 40, 60, 150 et 200 mM) sont effectués dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Les fractions contenant IspD sont identifiées par gel SDS-PAGE (10 %) et seules les fractions les plus pures sont rassemblées. Après concentration sur Amicon Ultra 15 YM-30 (Millipore, référence : UFC903008), l'imidazole est éliminé à l'aide d'une colonne d'exclusion PD10 (Cytiva, référence : 17-0851-01) éluée à 4°C avec un tampon Tris HCl 50 mM, pH 8,0. Après détermination de la concentration en protéine en utilisant le test de Bradford avec la BSA comme standard²⁰⁷, la solution de Ba-IspD résultante (5 ml, 6,03 mg/ml) est aliquotée, congelée avec de l'azote liquide et conservée à -80°C.

2.4.3 Criblage

Les analyses d'interaction enzyme/fragments ont été effectuées en utilisant un appareil de SPR Biacore T200 (Cytiva, Biacore). La puce CM5 (Réf : 29149603), le surfactant P20 (Réf : BR-1000-54), le N-hydroxysuccinimide (NHS), le N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), l'éthanolamine/HCl et les tampons acétate de sodium à 10 mM ont été achetés auprès de Cytiva par l'équipe du Dr Gilles Travé de l'IGBMC. Les enzymes IspD de *Bacillus anthracis* et *Escherichia coli* sont produites et purifiées au laboratoire. La Bovine Sérum Albumine a été achetée chez Aldrich (CAS 9048-46-8) et la librairie de fragment (500 fragments) chez Edlris.

2.4.3.1 Les différents tampons

Lors du criblage par SPR différents tampons phosphates ont été utilisés et ils sont répertoriés dans le Tableau 19 :

Tampon	Phosphate (mmol/L)	NaCl (mmol/L)	MgCl ₂ (mmol/L)	Surfactant P20 (v/v)	DMSO (v/v)	pH
Stock	100	300	5	0 %	0 %	7,4
Immobilisation	50	150	2,5	0,005 %	0 %	7,4
Dilution 1	50	150	2,5	0	4,04 %	7,4
Dilution 2	50	150	2,5	0	5 %	7,4
Analyse	50	150	2,5	0,005 %	5 %	7,4

Tableau 19 : Les différents tampons utilisés lors du criblage par SPR.

Le tampon stock est utilisé pour préparer tous les autres tampons. Le tampon de course nécessaire à l'immobilisation de Ba-IspD, Ec-IspD et la BSA est préparé à partir du tampon stock et le surfactant P20 est ajouté avant l'injection dans l'appareil SPR. Des tampons d'acétate de sodium de 10 mM sont utilisés pour diluer les différentes protéines (Tableau 20) et permettent leurs immobilisations sur la puce CM5.

Les tampons dilution 1 et 2 permettent de solubiliser les fragments. Le tampon dilution 1 permet de diluer les fragments conditionnés à 100 mM dans le DMSO. Pour cela, 5 µl de fragment

(100 % DMSO) sont ajoutés à 495 µl de tampon dilution 1 (4,04 % DMSO) conduisant à une concentration de 1 mM avec un pourcentage en DMSO de 5 % final.

Le tampon dilution 2 permet d'effectuer les dilutions nécessaire à la préparation des solutions à 3,91 ; 7,81 ; 15,62 ; 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 µM. Le tampon d'analyse est préparé à partir du tampon stock et le surfactant est ajouté avant l'injection dans le système Biacore. C'est le tampon utilisé pour le conditionnement de l'appareil et pendant une analyse.

Protéines	Ba-IspD	Ec-IspD	BSA
Tampon	Acétate de sodium 10 mM pH = 5,0	Acétate de sodium 10 mM pH = 5,0	Acétate de sodium 10mM pH = 4,0

Tableau 20 : Composition des tampons acétate utilisés pour solubiliser les protéines.

2.4.3.2 Immobilisation

Une puce CM5 (Biacore-GE Healthcare) est utilisée afin de fixer les protéines sur la surface d'or. Sur cette puce, trois protéines ont été injectées avec un débit de 10 µl/min et à une concentration de 100 µg/ml

Les stocks d'enzymes Ba-IspD (3,20 mg/ml) et Ec-IspD (2,87 mg/ml) purifiées au laboratoire sont conservés sous la forme d'aliquots et stockés à -80°C. Un aliquot est utilisé par expérience. La BSA est commercial et une solution est préparée à chaque expérience.

Les protéines Ba-IspD et Ec-IspD sont préalablement diluées dans un tampon acétate de sodium (10 mM, pH 5,0) et la BSA solubilisé dans un tampon acétate de sodium (10 mM, pH 4,0), puis sont immobilisées en utilisant une réaction de couplage peptidique à 25°C. Un tampon phosphate (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0,005% Surfactant P20, 2,5 mM MgCl₂, pH 7,4) est utilisé comme tampon de course pour l'immobilisation. La surface de dextrane carboxyméthylé est activée pendant 10 min par une solution à 0,05 M de NHS et à 0,2 M d'EDC. Les enzymes Ba-IspD, Ec-IspD et la BSA sont injectées sur la surface d'or pendant respectivement 30 s, 45 s, et 180 s. Les groupes carboxyméthylés activés restants sont neutralisés par une injection de 120 s d'éthanolamine à 1 M (pH 8,5 ; 10 µl/min). Ba-IspD (Monomère : 25944 Da), Ec-IspD (Monomère : 26560 Da) et la BSA (66430 Da) sont immobilisées et engendrent respectivement des réponses moyennes de 12894 RU, 9053 RU et 5831 RU.

2.4.3.3 Expérience avec le CTP

Une fois les enzymes immobilisées un conditionnement « Prime » de la puce est effectué avant de réaliser les mesures. Le tampon phosphate (Tableau 19 : Analyse) utilisé pour effectuer le « Prime » est injecté pendant 6 min avec un débit de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Une solution stock de CTP à 300 μM est préparée à chaque expérience SPR dans un tampon phosphate (Tableau 19 : Analyse). Des gammes de concentration variables en CTP et les contrôles positifs sont préparées à partir de cette solution stock.

Une gamme de concentration en CTP a été préparée à huit concentrations différentes : 4,69 ; 9,38 ; 18,75 ; 37,5 ; 75 ; 150 ; 300 μM et elle a été répartie dans six colonnes de la plaque 96 puits. Les dilutions ont été préparées dans le même tampon phosphate que précédemment (Tableau 19 : Analyse). La gamme de concentration répartie dans les 6 colonnes est injectée successivement. Pour une gamme de concentration, les dilutions ont été injectées de la moins à la plus concentrée pendant 60 s à un débit de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ sur toutes les surfaces simultanément. Après 25 h d'analyse, les données ont été traitées par le logiciel Biaevaluation.

2.4.3.4 Solutions de DMSO

Le tampon phosphate à 52,5 mM (1,05x) a été préparée en ajoutant 10,5 ml de tampon phosphate stock à 100 mM à une solution de 9,5 ml de H₂O milliQ®.

À partir de ce tampon phosphate 52,5 mM, des solutions à 4,5 % et à 5,8 % en DMSO ont été préparées (Tableau 21) :

% DMSO	4,5	5,8
Tampon (1,05x)	9,5 ml	9,5 ml
Volume de DMSO	450 μl	580 μl

Tableau 21 : Préparation des solutions de DMSO à 4,5% et 5,8%.

À partir de ces deux solutions mères, huit solutions ont été préparées avec des concentrations comprises entre 4,5 et 5,8 % en DMSO, en mélangeant ces deux solutions comme décrit dans le Tableau 22 :

Nombre de solutions	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration en DMSO (%)	4,50	4,69	4,87	5,05	5,24	5,42	5,61	5,80
4,5 % de DMSO (μ l)	0	200	400	600	800	1000	1200	1400
5,8 % de DMSO (μ l)	1400	1200	1000	800	600	400	200	0

Tableau 22 : Préparation des huit solutions de DMSO utilisées pour établir la courbe de correction DMSO.

Ces solutions de calibration ont été injectées en début, milieu et fin d'expérience sur les surfaces Fc2, Fc3 et Fc4 afin de tracer une courbe de correction par rapport au DMSO.

2.4.3.5 Criblage des fragments

Les fragments ont été achetés à 100 mM en solution dans le DMSO. La première dilution à 1 mM en fragment est réalisée en diluant 5 μ l de fragment à 100 mM dans 495 μ l de tampon phosphate (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 4,04 % DMSO, pH 7,4), pour une concentration finale en DMSO de 5 %. La seconde solution à 100 μ M en fragment est préparée en diluant 100 μ l de la dilution précédente dans le tampon phosphate (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 5 % DMSO, pH 7,4). Les fragments sont répartis dans des plaques 96 puits (Greiner Bio-One, réf : 650201, Polypropylène). Toutes les expériences ont été réalisées à 25°C, chaque solution de fragment, contrôle et tampon a été injectée pendant 60 s, avec un temps de dissociation de 200 s. La gamme de concentration en CTP est injectée en début et fin d'expérience. La solution contrôle CTP (contrôle positif) à 100 μ M est injectée toutes les 10 mesures et la solution de glucose (contrôle négatif) à 150 μ M est injectée en début et fin d'expérience. Les différents analytes sont injectés sur les quatre surfaces en simultané à 40 μ l/min.

2.4.3.6 Mesure des réponses en variant la concentration des fragments

Des solutions de fragments à des concentrations de : 3,91 ; 7,81 ; 15,62 ; 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 μ M ont été préparées dans un tampon phosphate (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 5 % DMSO, pH 7,4), à partir de la solution commerciale à 100 mM. Les contrôles positifs (CTP : 100 μ M) et le tampon sont injectés toutes les 15 mesures entre chaque fragment. Une gamme de concentration en CTP et le contrôle négatif (glucose) sont injectés en début et fin d'expérience. Une courbe de calibration du DMSO est effectuée en début, milieu et fin d'expérience

Chapitre 3

Études complémentaires :
STD, docking et cinétique

3. Études complémentaires de l'interaction des fragments avec Ba-IspD et détermination de leur pouvoir d'inhibition.

Ce chapitre décrit les études complémentaires réalisées après la sélection des fragments par SPR. Afin de confirmer que les 23 fragments sélectionnés précédemment se lient à Ba-IspD, des expériences de RMN ont été réalisées. Dans le cadre d'une approche par fragment, avoir des informations structurales sur le site de liaison du fragment est un atout supplémentaire pour faire évoluer ce fragment. C'est pourquoi des expériences de cristallographie et des calculs de docking ont été entrepris. Enfin, un test d'activité enzymatique a été développé afin d'évaluer le pouvoir inhibiteur des fragments.

3.1 Spectroscopie de différence de transfert de saturation (STD)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil intéressant pour l'étude des interactions moléculaires en solution. C'est une technique essentielle pour détecter les interactions entre des petits ligands et des protéines²⁰⁸. Depuis quelques années, l'expérience de RMN STD (Saturation Transfert Difference) est utilisée pour effectuer des criblages de molécules et caractériser les complexes protéines ligands^{134,209}. Deux phénomènes RMN majeurs sont impliqués dans l'expérience STD conçue pour détecter une interaction entre un ligand sur une protéine : l'effet de saturation du spin nucléaire et la diffusion du spin du proton.

3.1.1 Principe

Les expériences de RMN STD sont basées sur l'effet Overhauser nucléaire (NOE) définie par une interaction entre deux spins à travers l'espace (diffusion de spin) et non pas à travers les liaisons chimiques comme le couplage scalaire. Cette interaction est limitée à environ 5-6 Å. De plus, la méthode STD repose sur l'observation des signaux de résonance du ligand et ne nécessite donc pas de marquage isotopique de la protéine étudiée. Cette technique est utilisée pour détecter des liaisons de faibles affinités¹³⁴ ($K_D \approx 10^{-3}$ à 10^{-8} M) *via* un transfert de magnétisation non scalaire (*via* diffusion de spin) d'une protéine (>20 000 Da) vers des ligands plus petits²⁰⁸ (<1000 Da). La saturation est obtenue en appliquant un signal radiofréquence sélectif dans une région spectrale qui contient uniquement des signaux de la protéine comme par exemple, entre 0 et -1 ppm pour la région correspondant aux signaux **des** méthyles ou aux alentours de 7 ppm pour la région correspondant aux signaux des aromatiques.

Les signaux des groupements méthyles des petites molécules sont rarement compris entre 0 et -1 ppm. Ainsi, cette région spectrale comprise entre 0 à -1 ppm permet de saturer la protéine sans affecter les molécules plus petites présentes dans la solution étudiée. Cette saturation sélective est transférée à la protéine entière *via* la diffusion de spin par l'effet NOE intramoléculaire ^1H - ^1H . La saturation est ensuite transférée au ligand lié *via* l'effet NOE intermoléculaire¹³³ jusqu'aux sites de liaison du ligand potentiel. Pour que le transfert de saturation se produise, la distance entre la macromolécule et le ligand doit être au maximum de 5 Å et plus le ligand est proche plus les signaux sont importants. La saturation transférée de la protéine au ligand lié permet de saturer les signaux RMN du ligand. Lors de la dissociation, une diminution de l'intensité du signal RMN des ligands libres en solution est observée (Figure 89 : On-résonance). Successivement à cette expérience, la même saturation sélective est utilisée pour saturer une autre région spectrale ne contenant aucun signal proton (Figure 89 : Off-résonance), par exemple à -3 ppm (1500 Hz).

Le spectre de RMN-STD d'un ligand qui a subi le transfert de saturation est obtenu par soustraction du spectre enregistré sans saturation protéique (Off-résonance) au spectre de la protéine sélectivement saturée (On-résonance) et ne contient que les signaux du proton du ligand. D'autres composés (Non ligand), qui sont présents en solution mais qui ne se lient pas à la protéine, ne reçoivent pas le transfert de saturation et leurs signaux s'annulent après soustraction (Figure 89).

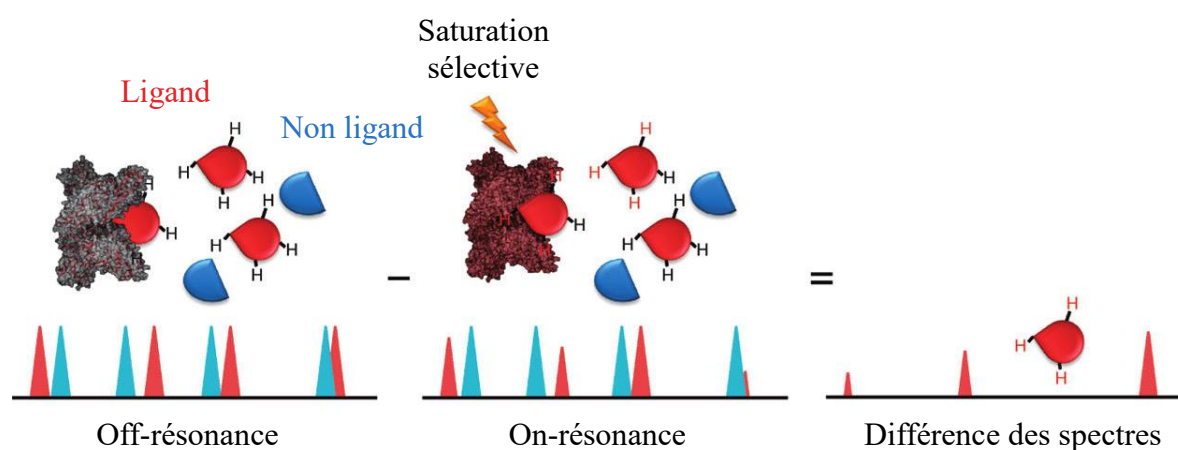


Figure 89 : Représentation schématique d'une expérience RMN STD. Les échanges entre le ligand libre et lié permettent le transfert intermoléculaire de la magnétisation de la protéine vers la solution. Image issue de la publication de Viegas¹³³. Les triangles rouges et bleu correspondent respectivement aux signaux du ligand et du non ligand.

L'intensité des signaux STD dépend du temps d'irradiation, du temps de saturation et de l'excès de molécules de ligand utilisées¹³⁴. Les spectres RMN-STD sont obtenus avec une très faible

quantité d'enzyme (μM) et une quantité 20 à 100 fois supérieure de ligand. Cette excès est nécessaire afin d'obtenir un grand nombre de ligands saturés entraînant une plus grande diminution de ces signaux et donc un meilleur signal après soustraction des spectres Off-On. En effet, avec l'excès de ligand, il est très peu probable qu'un ligand saturé se fixe de nouveau dans le site de liaison.

La limitation de cette méthode RMN est liée au temps de résidence du ligand dans le site de liaison de la protéine et donc aux constantes cinétiques d'association k_a et de dissociation k_d . L'association d'un ligand L à une protéine P conduit à la formation d'un complexe PL, selon un équilibre décrit par l'équation (51) :



avec k_a , la constante d'association ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et k_d , la constante de dissociation (s^{-1}).

Lorsque la dissociation du complexe PL est lente (k_d petit), le ligand reste complexé à la protéine et l'expérience STD est moins efficace. Ainsi, aucun signal STD ne peut être observé pour des ligands de forte affinité¹³⁴.

Il est à noter que lorsqu'un tampon D_2O est utilisé, les protons échangeables de la protéine et des ligands sont échangés par un atome de deutérium (D). Le signal RMN n'est donc plus observable pour ces protons²¹⁰.

3.1.2 Détermination de l'interaction entre l'enzyme Ba-IspD et le CTP.

Des expériences de RMN STD ont été réalisées uniquement sur les 18 fragments sélectionnés par SPR (cf. Chapitre 2, Tableau 13, p. 111) pour lesquelles un K_D a été déterminé. L'analyse par RMN STD des 5 fragments, dont le K_D n'a pas pu être déterminé, n'a pas été réalisé par manque de temps.

Dans un premier temps, afin de valider la méthode d'analyse et de mettre au point les conditions expérimentales, une expérience de RMN STD avec Ba-IspD et le CTP a été faite. Celle-ci a été réalisée avec un excès de ligand (20 :1) par rapport à la quantité d'enzyme. Ainsi, l'interaction du CTP ($250 \mu\text{M}$) et de l'enzyme Ba-IspD ($12,5 \mu\text{M}$) a été mesurée par RMN STD en présence de glucose ($250 \mu\text{M}$) qui est le contrôle négatif. En effet, le glucose est utilisé car il a été montré par SPR qu'il ne se lie pas à Ba-IspD et il est donc considéré comme un non ligand.

Un premier spectre a été enregistré sur le mélange contenant l'enzyme Ba-IspD, le CTP et le glucose (Figure 90A) afin de déterminer la fréquence sélective à utiliser. Ainsi, un spectre On-résonance, de cette même solution, avec cette fois-ci l'enzyme Ba-IspD saturée par la fréquence sélective choisie à 400 Hz (0,8 ppm) correspondant aux signaux des méthyles (Figure 90B) a été enregistré. Un spectre Off-résonance est ensuite enregistré avec une saturation sélective à -1500 Hz (-3 ppm).

Sur le spectre de RMN-STD, correspondant à la soustraction du spectre B au spectre A (Figure 90C), les signaux des protons non échangeables du CTP sont observables ce qui confirme l'interaction entre le CTP et Ba-IspD. L'absence de signal pour le glucose est en adéquation avec le fait que ce composé n'interagit pas avec l'enzyme.

Cette première expérience valide donc les conditions expérimentales utilisées et confirme que le CTP se lie à l'enzyme. Cette méthodologie a été appliquée aux fragments sélectionnés par SPR.

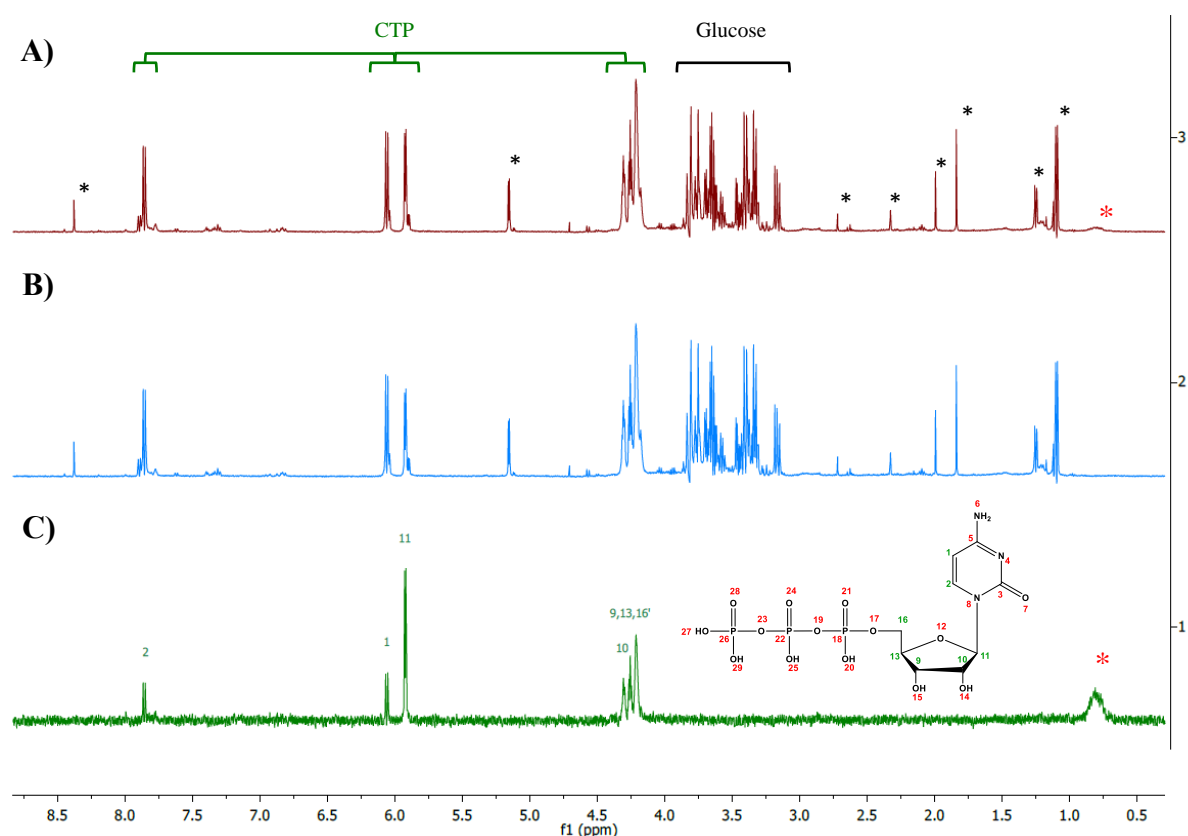


Figure 90 : Expérience de RMN STD entre le ligand CTP et l'enzyme Ba-IspD. (A) Spectre de référence (Off-résonance) et (B) le spectre de référence (On-résonance) avec les signaux du CTP, du glucose et de l'enzyme Ba-IspD. (C) Soustraction des spectres Off-On pour conduire au spectre RMN STD du CTP. Les astérisques en noir indiquent les impuretés présentes dans l'échantillon. À noter que les signaux des impuretés ne sont pas non plus présents dans le spectre RMN STD. L'astérisque rouge représente les signaux des méthyles de l'enzyme.

3.1.3 Détermination de l'interaction entre Ba-IspD et les fragments.

Afin de confirmer que les dix-huit fragments se lient à l'enzyme Ba-IspD, des analyses par RMN STD ont été effectuées avec ces fragments.

Les constantes d'association et de dissociation sont des paramètres importants dans les expériences de RMN STD. Lorsque le k_d est petit, la liaison P-L est forte, ainsi peu de ligands saturés sont libérés en solution. Lorsque le k_d est grand, la liaison P-L est faible ainsi le temps d'interaction du ligand avec l'enzyme est trop faible pour que le ligand soit saturé. Lorsque le k_a est grand, la formation du complexe P-L est faible ainsi le nombre de ligand saturé en solution peut être insuffisant pour détecter un signal. Ces paramètres sont donc importants pour l'observation d'un signal en RMN STD.

Dans le cas du CTP, le sensorgramme obtenu par SPR indique une association avec l'enzyme rapide et une dissociation rapide du complexe. Dans un premier temps, les fragments avec le même type de sensorgramme (association et dissociation rapide) ont été testés par RMN STD (Figure 91).

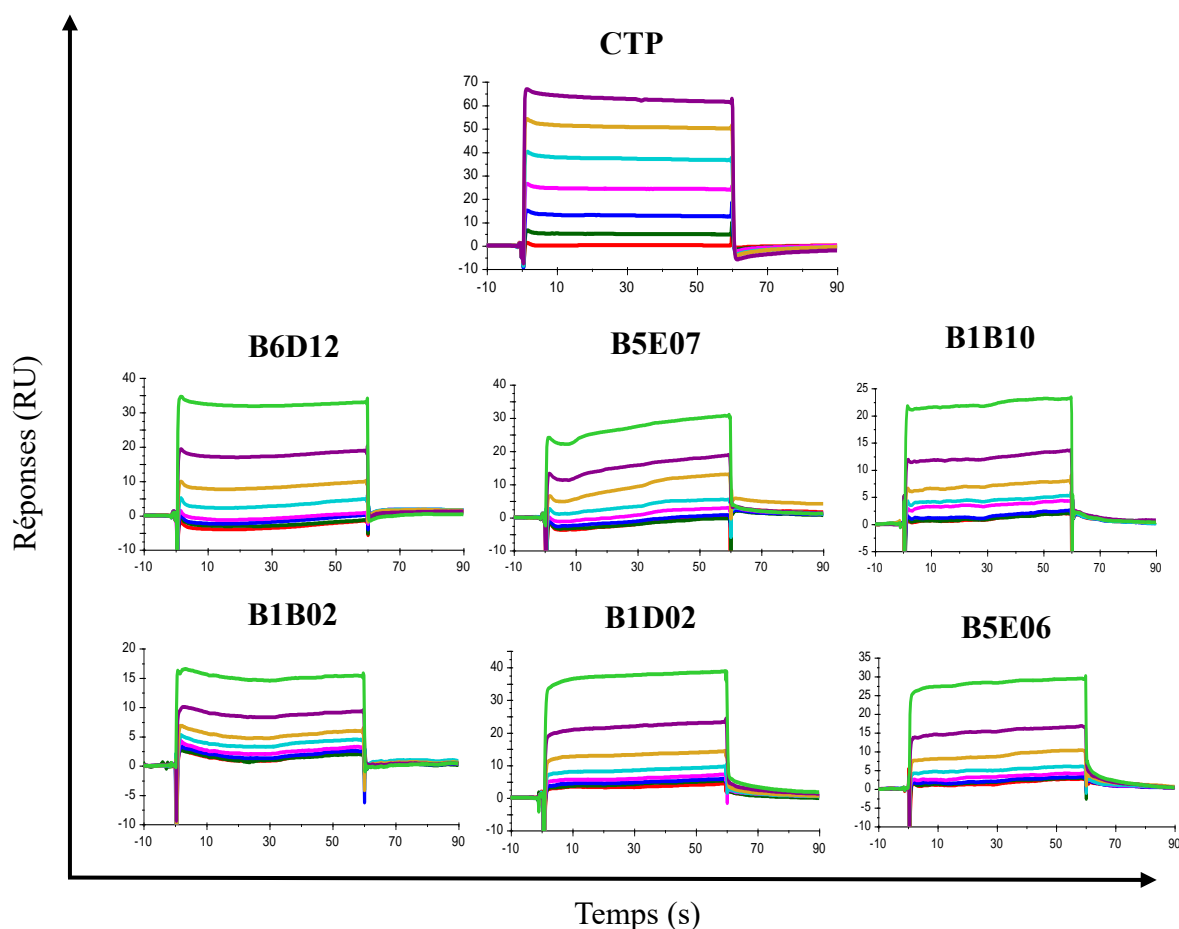


Figure 91 : Représentation des sensorgrammes du CTP et des fragments avec des phases d'association et de dissociation rapides.

Pour les cinq premiers fragments : B6D12, B5E07, B1B10, B1B02, B1D02 des signaux de RMN STD ont été obtenus. Un exemple du traitement des spectres, On et Off-résonance est représenté pour le fragment B6D12 (Figure 92). Pour les quatre autres fragments, seuls les spectres RMN-STD ont été présentés (Figure 92).

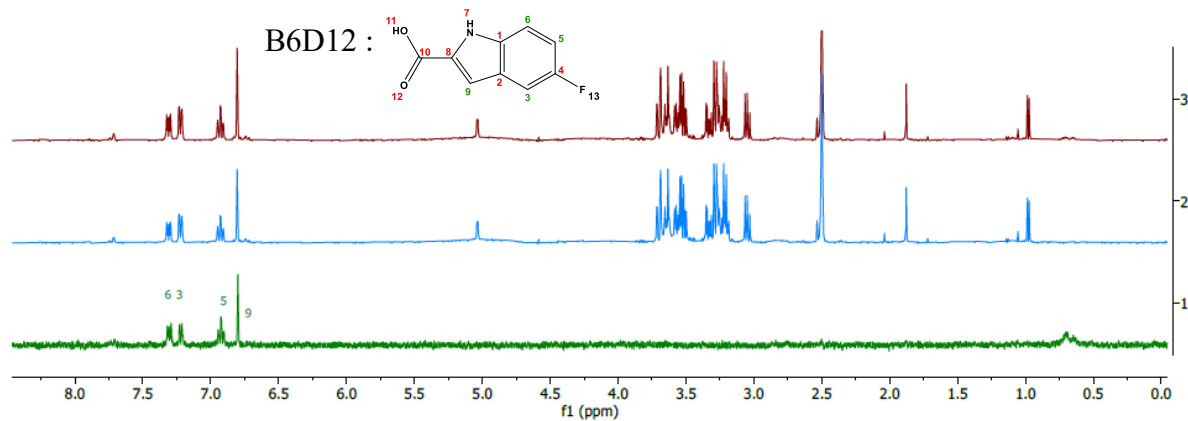
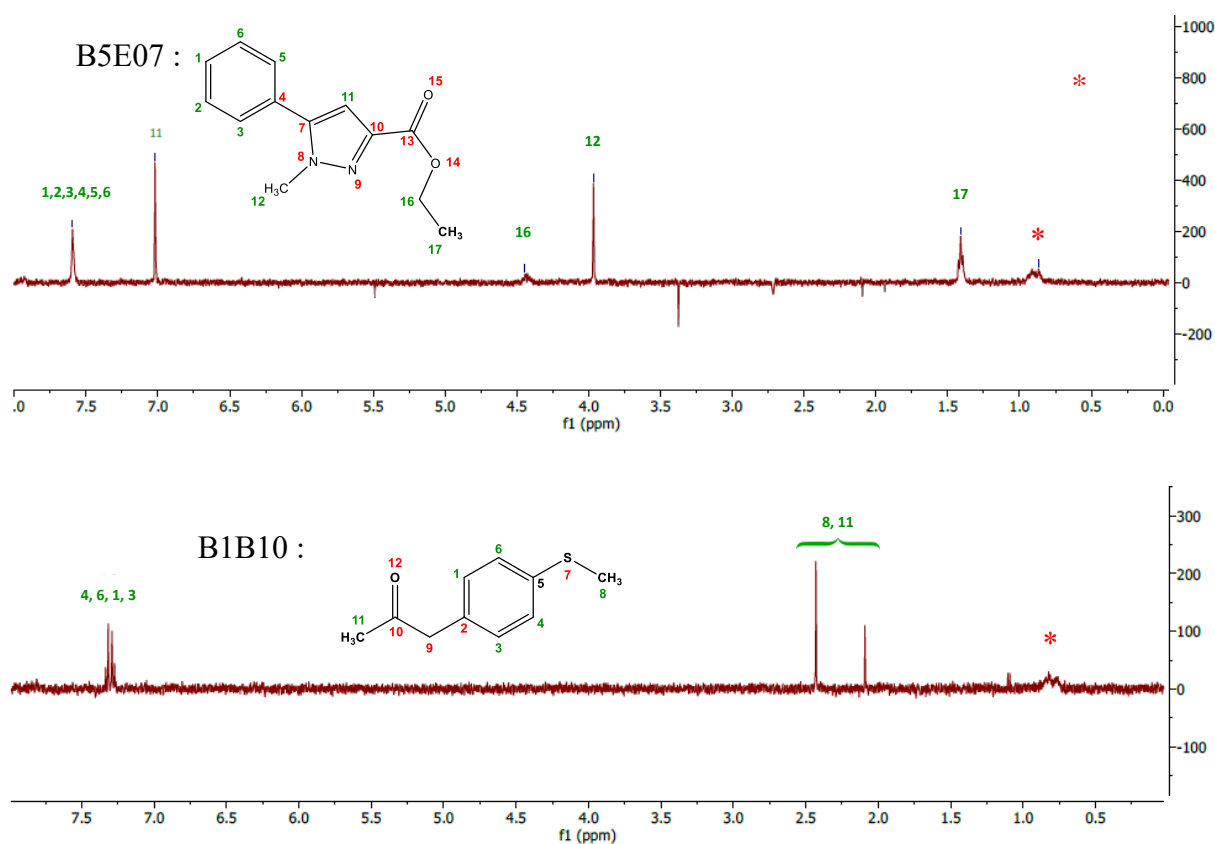


Figure 92 : Résultats de la RMN STD pour le fragment B6D12. Représentation du spectre Off résonance (rouge), On-résonance (bleu) et RMN STD (vert). L'astérisque rouge représente les signaux des méthyles de l'enzyme.



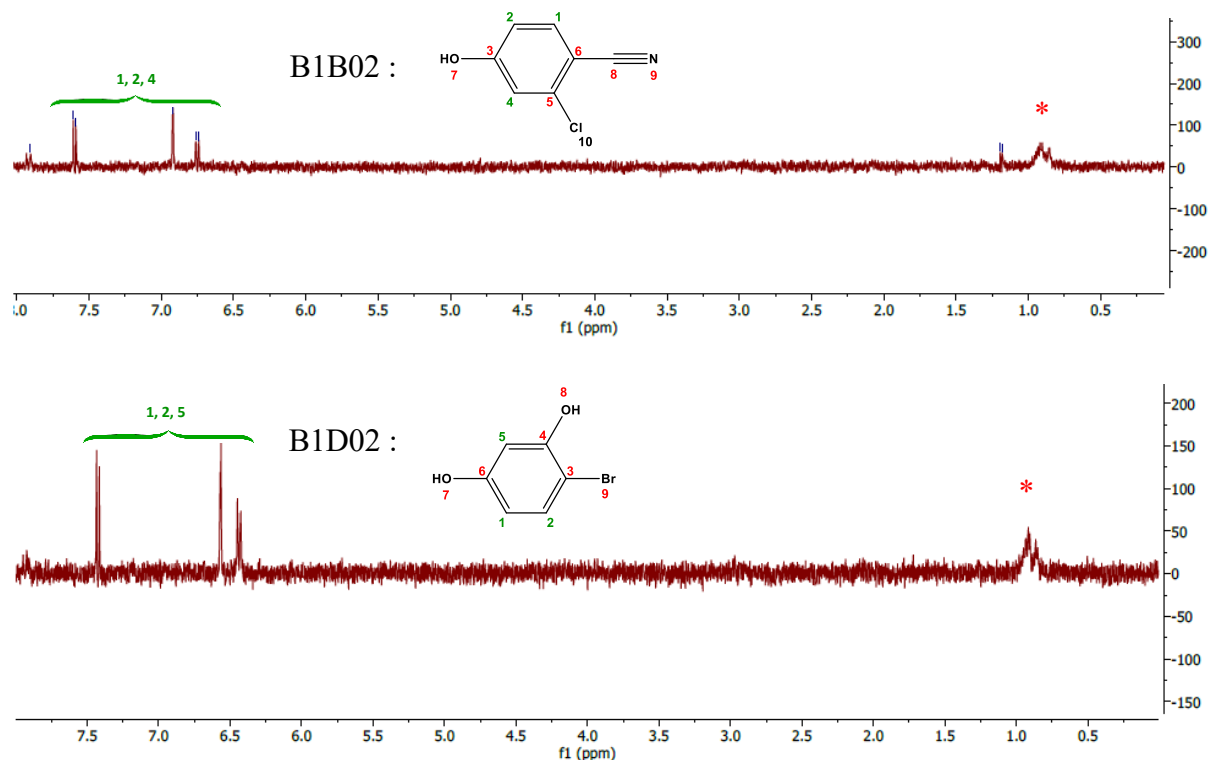


Figure 93 : Spectres RMN-STD des fragments B5E07, B1B10, B1B02, B1D02 (de haut en bas).
L'astérisque rouge représente les signaux de l'enzyme.

Les spectres on-résonance ont été réalisés en accumulant 512 scans.

Pour le dernier fragment B5E06 (Figure 94), une première expérience avec 512 scans n'a pas permis d'observer un signal sur le spectre de RMN STD. Et malgré, l'accumulation de 3840 scans aucun signal du fragment n'a pu être détecté. Les expériences de SPR réalisées avec B5E06 avaient montré une interaction avec Ba-IspD conduisant à la détermination d'un K_D (3084,7 μM) et à la mesure d'un BE_3 (0,45 mM^{-1}).

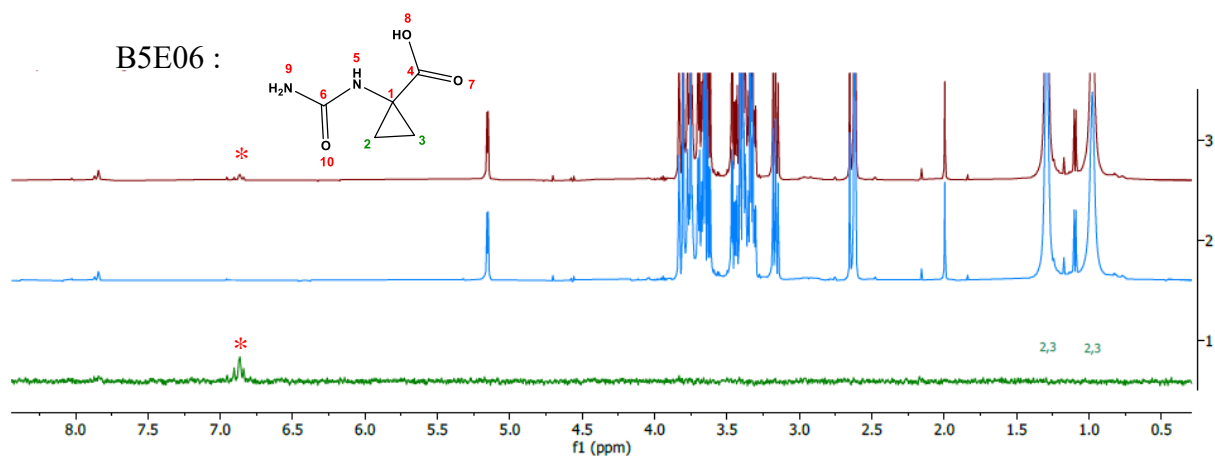


Figure 94 : Spectres de l'expérience de RMN STD pour le fragment B5E06. Spectre off-résonance (haut), spectre on-résonance (milieu) et spectre RMN STD (bas). L'astérisque rouge représente les signaux de l'enzyme.

Les seuls signaux qui ont été détectés en ^1H RMN sont les protons H_2 et H_3 correspondants au CH_2 du cyclopropane. En effet, les autres protons étant échangeables avec ^2H , les signaux sont indétectables en RMN.

Cette absence de signal RMN STD peut s'expliquer de plusieurs façons, soit ce sont les protons échangeables de B5E06 qui interagissent avec Ba-IspD et il n'est alors pas possible de détecter ces interactions par RMN STD. Soit le fragment a des phases d'association et de dissociation trop lentes malgré l'allure du sensorgramme et ne peut donc pas être détecté par RMN STD. Il est aussi possible que le fragment ne se lie pas à Ba-IspD malgré les résultats obtenus par SPR.

Après les mesures de RMN STD de ces 6 fragments, d'autres ont été testés avec cette fois-ci des sensorgrammes d'allures différentes (Figure 95). La vitesse de dissociation de chaque complexe formé avec le ligand et Ba-IspD semble plus lente.

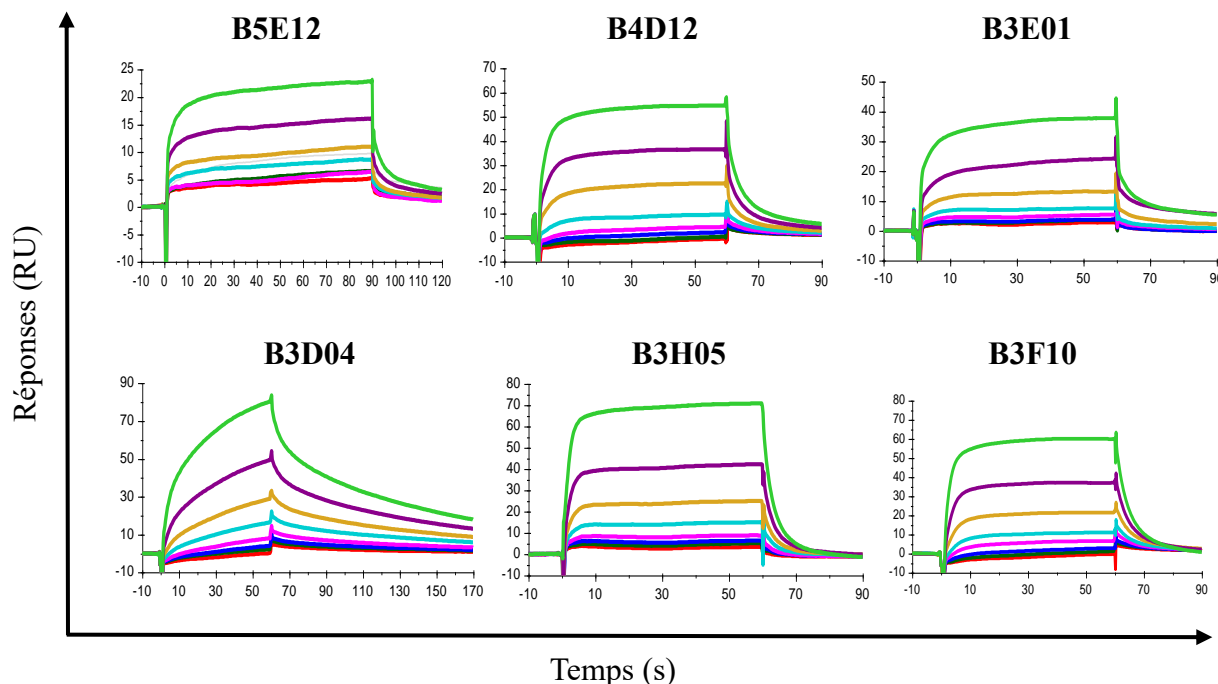


Figure 95 : Sensorgrammes de fragments présentant une phase de dissociation lente.

Pour le fragment B5E12, le spectre RMN STD (Figure 96) a été obtenu avec une acquisition de 512 scans malgré une phase de dissociation lente mis en évidence sur le sensorgramme (Figure 95). Une dissociation lente minimise le nombre de ligands saturés libres en solution et diminue donc le signal STD. Plus la dissociation est lente plus le nombre de scans à réaliser pour obtenir un signal STD est grand.

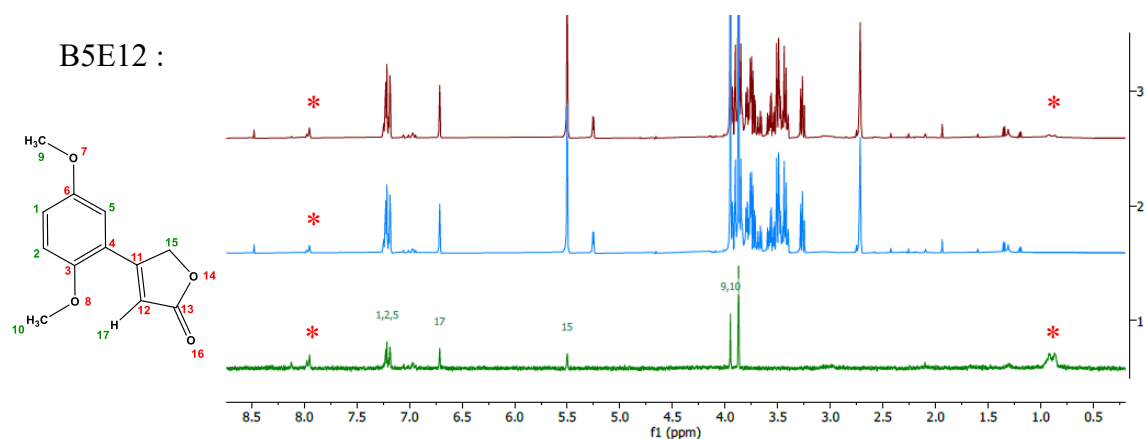


Figure 96 : Spectres de l'expérience de RMN STD pour le fragments B5E12. Spectre off-résonance (haut), spectre on-résonance (milieu) et spetre RMN-STD (bas).

Pour les fragments B4D12, B3E01 et B3H05 des acquisitions de 512 scans n'ont pas été suffisantes. Des expériences d'environ 4000 scans ont permis d'obtenir des signaux mais de faibles intensités (Figure 97).

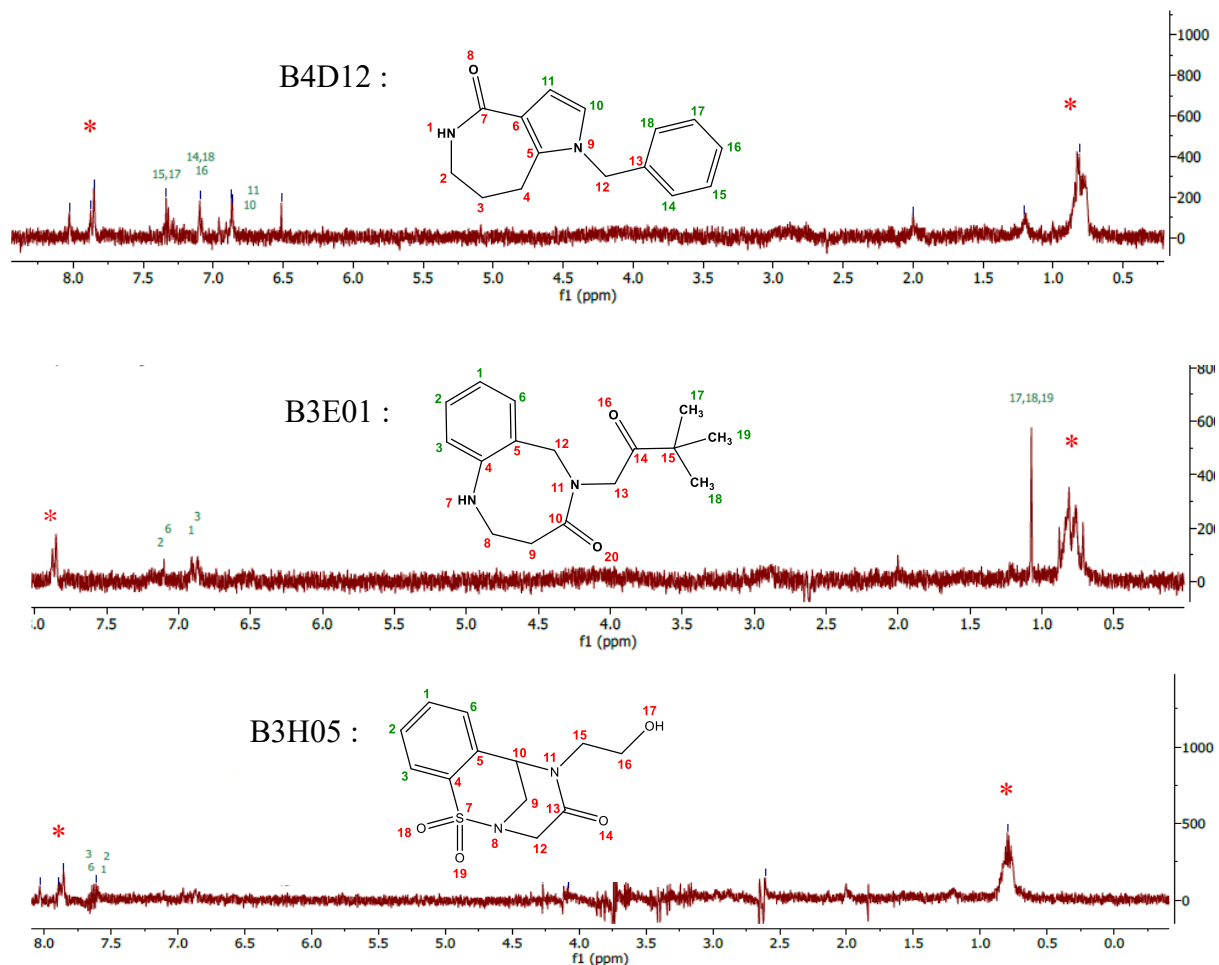


Figure 97 : Spectres RMN STD des fragments B4D12, B3E01 et B3H05 (de haut en bas). Accumulation : 4000 scans. L'astérisque rouge représente les signaux de l'enzyme.

Pour ces trois fragments, on peut supposer que les phases de dissociation sont trop lentes et que très peu de fragments soient saturés, ce qui explique le faible signal.

Les 7 fragments restants, B3D04, B4H08, B3F10, B3E03, B1H10, B1F11, B4B12, ne présentent aucun signal RMN STD malgré un grand nombre de scans (env. 4000 scans). Les phases de dissociation doivent être bien trop lentes. Des exemples de spectres RMN-STD de deux fragments B3D04 et B4H08 qui ne montrent pas de signal STD ont été représentés en Figure 98.

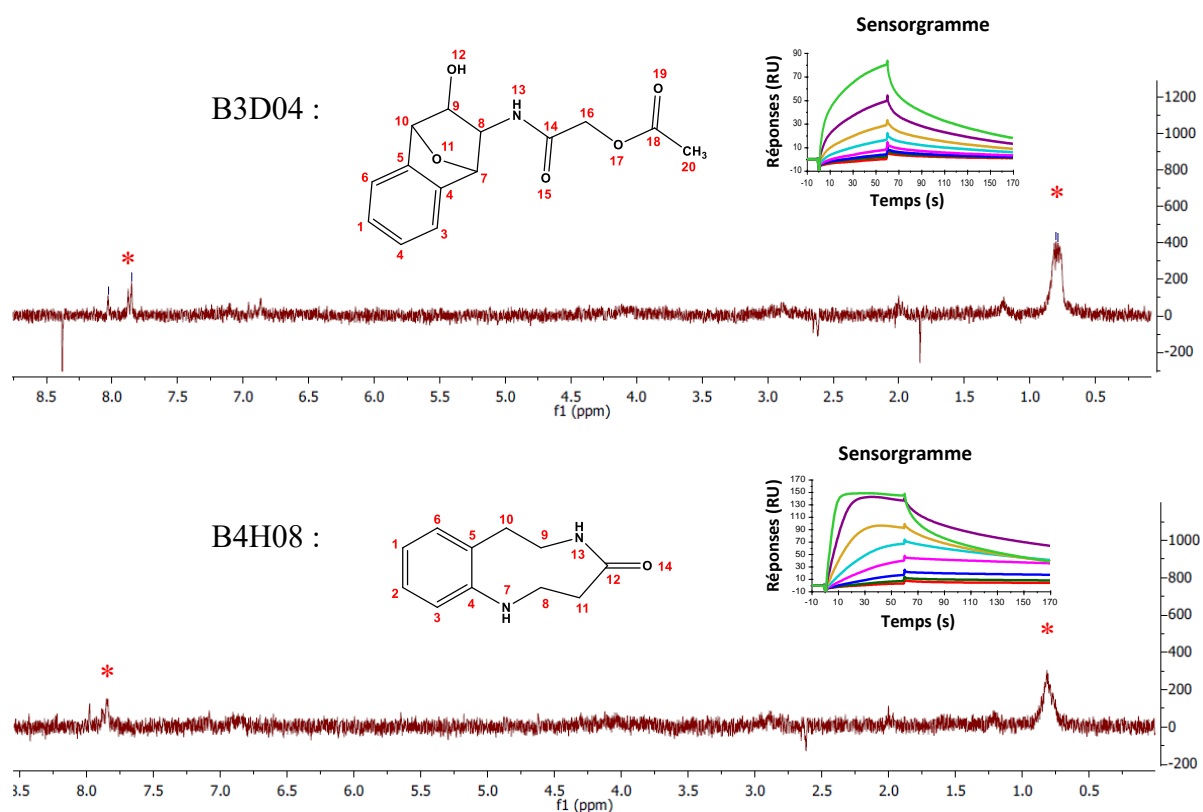


Figure 98 : Spectres RMN STD des fragments B3D04 et B4H08 (de haut en bas), enregistrés sur 4000 scans. L'astérisque rouge représente les signaux de l'enzyme.

Le fragment B5G02 est un fragment à association et dissociation lente (Figure 99) avec un sensorgramme similaire au fragment B3D04 (Figure 95). Cependant à la différence du fragment B3D04, un signal STD est observé. La présence de ces signaux peut s'expliquer par la fréquence sélective utilisée à 350 Hz (0,76 ppm) qui est proche de la fréquence du méthyle du fragment B5G02 à 506 Hz (1,01 ppm), conduisant à une différence de 156 Hz. Ainsi, le signal observé peut être un artéfact car il résulte de la saturation directe du fragment (Figure 99).

Il n'a pas été possible d'utiliser une autre fréquence de saturation, comme celle des aromatiques vers 3400 Hz (6,8 ppm), car des signaux du fragment sont également présents dans cette zone de fréquence.

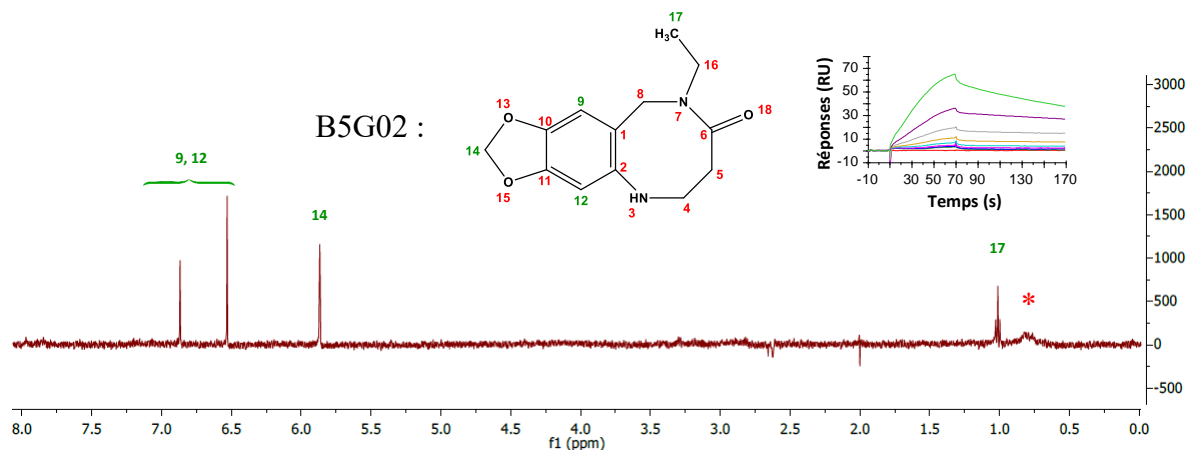


Figure 99 : Spectres RMN STD du fragment B5G02 enregistré sur 4096 scans. L'astérisque rouge représente les signaux de l'enzyme.

Une expérience de RMN STD a été réalisée pour démontrer cette hypothèse. Une expérience en présence de glucose, connu comme non ligand, et de l'enzyme Ba-IspD a été mise en place afin de déterminer si une saturation sélective de l'enzyme à proximité d'un signal d'un ligand le sature même en l'absence d'interaction. Ainsi, une saturation sélective à 156 Hz de distance d'un signal de glucose, a été enregistré afin d'observer ou non l'apparition d'un signal STD pour le glucose. Le résultat a montré qu'aucun signal STD n'est présent et infirme l'hypothèse posée.

Une autre explication de la réponse STD positive est que ce fragment forme des agrégats ou des liaisons non spécifiques sur l'enzyme Ba-IspD est conduit à un faux positif (Tableau 3) mais on ne peut pas exclure que ce fragment se lie à Ba-IspD.

Sur les 18 fragments sélectionnés, la confirmation d'interaction avec Ba-IspD par RMN STD a été validée pour dix fragments, B6D12, B5E07, B1B10, B1B02, B1D02, B5E12, B4D12, B3E01, B3H05, B5G02 (Tableau 23). Les fragments B1F11, B1H10, B3D04, B3E03, B3F10, B4B12, B4H08, B5E06 n'ont pas montré de signal STD ce qui est peut être dû à une trop faible quantité de ligands saturés en solution suite à une association ou une dissociation trop lente. Cependant, le fragment B5G02 est l'exception à cette règle car malgré une association est une dissociation lente, un signal de STD est observé.

Des expériences de RMN DOSY de diffusion¹³⁴ pourraient être réalisées afin de confirmer les interactions entre l'enzyme Ba-IspD et les 8 fragments avec des dissociations lentes qui n'ont pas donnés de signal en RMN STD. En effet, cette technique de RMN repose sur la variation du coefficient de diffusion (D) des espèces en solution. Les signaux de petites molécules (D élevé) diminuent plus rapidement que ceux des grosses molécules (D faible) et permettent de

différencier un ligand libre en solution d'un ligand lié à une protéine. Ainsi, plus le ligand a une vitesse de dissociation lente plus il reste lié à la protéine et meilleurs sont les signaux RMN. La mise en place de ces expériences n'a pas pu être réalisée par manque de temps.

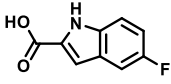
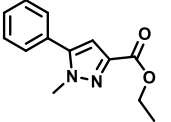
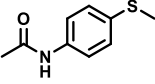
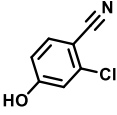
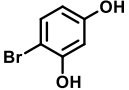
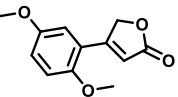
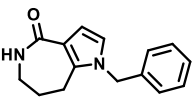
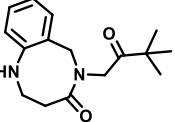
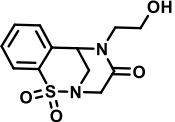
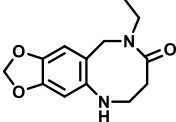
B6D12	B5E07	B1B10	B1B02	B1D02
				
B5E12	B4D12	B3E01	B3H05	B5G02
				

Tableau 23 : Structure des dix fragments confirmés par STD.

3.2 La cristallographie et le « Docking »

3.2.1 La cristallographie

Plusieurs structures de l'enzyme IspD issues de différents organismes sont disponibles dans la Protein Data Bank (PDB). Une liste non exhaustive est présentée dans le Tableau 24. Parmi ces structures, IspD de *Bacillus subtilis* présente la plus grande homologie (73 %) avec IspD de *Bacillus anthracis* mais seulement 53 % d'identité.

Organismes	Homologie (%)	Identité (%)	PDB
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168</i>	73	53	5HS2
<i>Escherichia coli</i>	51	34	1VGU
<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	53	34	2XWN
<i>Arabidopsis thaliana</i>	55	36	4NAI
<i>Campylobacter jejuni</i>	52	32	1W55
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	52	32	1VGW

Tableau 24 : Enzymes IspD présentes dans la PDB et leurs pourcentages d'homologie et d'identité avec Ba-IspD.

Nous avons estimé que ces différentes enzymes IspD n'étaient pas assez proches structurellement de Ba-IspD pour développer des inhibiteurs sélectifs de Ba-IspD. Ainsi, Ba-IspD purifiée a été envoyée dans le groupe du Dr Jean-Luc Ferrer (Groupe Synchrotron, Institut

de Biologie Structurale de Grenoble) dans le but de résoudre la structure de Ba-IspD. En collaboration avec le Dr Franck Borel et le Dr Jean-Luc Ferrer, deux structures de l'enzyme ont été résolues à 2,35 Å pour l'apoenzyme et à 1,71 Å (Figure 100) pour l'enzyme en complexe avec le CTP. Dans cette structure, les deux phosphates terminaux du CTP n'ont pas pu être observés.

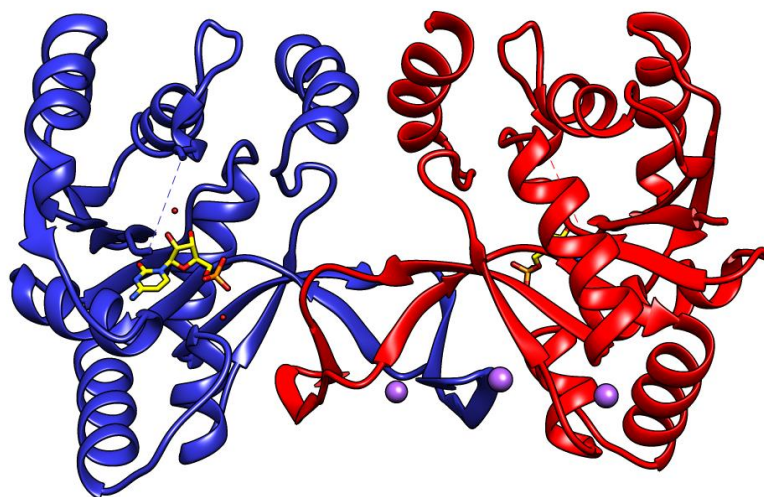


Figure 100 : Représentation de la structure tridimensionnelle de l'homodimère de l'enzyme Ba-IspD en présence du ligand CTP (jaune) et de Mg²⁺ (violet).

L'enzyme Ba-IspD a un poids moléculaire de 25944 Da (avec l'étiquette contenant six résidus histidines) et comme les autres structures cristallographiques de l'enzyme IspD déjà publiées, forme un homodimère. Différentes expériences de co-cristallisation entre Ba-IspD et les 23 fragments sélectionnées ont été entreprises dans le laboratoire de Grenoble. Néanmoins, malgré les différentes conditions de co-cristallisation testées aucun co-cristal contenant un fragment n'a pu être obtenu.

En parallèle de ces essais, des expériences de « docking » ont été réalisées par le Dr Franck Borel à partir de la structure résolue à 2,35 Å, dans le but d'obtenir des informations structurales sur les interactions entre l'enzyme Ba-IspD et ces fragments.

3.2.2 Expériences de docking des fragments sélectionnés en utilisant la structure de Ba-IspD comme cible.

3.2.1.1 Les spécifications du docking

L'amarrage moléculaire appelée plus couramment docking est une méthode qui prédit l'orientation d'une molécule par rapport à une autre lorsqu'elles sont liées pour former le

complexe le plus stable.

Les approches bio-informatiques de docking sont très répandues dans la recherche de nouveaux médicaments pour l'identification de touches et l'optimisation de molécules²¹¹⁻²¹³. Le docking peut être utilisé pour modéliser l'interaction entre une petite molécule et une protéine au niveau atomistique. Cette approche permet de caractériser le comportement de petites molécules dans les sites de liaison et d'élucider des processus biologiques²¹⁴.

Le docking permet la prédiction de la conformation et de l'orientation du ligand dans un site de liaison localisé. L'identification du site de liaison préalablement aux expériences de docking augmente considérablement l'efficacité du docking. Les informations sur les sites de liaisons peuvent être obtenues par comparaison de la protéine cible avec une famille de protéines similaires déjà décrites dans la littérature. Lorsque le site de liaison est inconnu, des programmes de détection de cavité sont employés comme par exemples GRID²¹⁵, POCKET²¹⁶ et PASS²¹⁷.

Le premier modèle de docking²¹⁸ utilisé est basé sur la théorie « clé et serrure » de Fisher²¹⁹ avec le ligand (clé) et le récepteur (serrure) qui sont traités comme des corps rigides. Koshland introduit « l'ajustement induit » (Induced fit) qui permet d'améliorer le modèle précédent, en indiquant que le site actif de la protéine est continuellement remodelé par les interactions avec le ligand²²⁰. Cette théorie implique que le ligand et le récepteur soient flexibles pendant le docking. Afin de diminuer les ressources informatiques nécessaires pour modéliser un ligand sur un récepteur flexible, seule une partie de la protéine est rendue flexible²²¹ et les dimensions de la zone d'étude dans l'espace sont classiquement de 10x10x10 Å. Des programmes tels que Glide permettent de tenir compte de la flexibilité du ligand et le module de raffinement du programme Prime permet de tenir compte de la flexibilité des récepteurs.

3.2.1.2 *Le criblage des fragments par docking en utilisant Ba-IspD comme cible*

À partir de la structure cristallographique de Ba-IspD résolue à 2,35 Å, des études de docking ont été réalisées avec les 23 fragments sélectionnés par criblage SPR.

Le Dr Franck Borel (IBS, Grenoble) a modélisé les interactions entre l'enzyme et les fragments en utilisant un modèle « Induced fit ». D'après ces calculs de modélisation, il existe 3 sites de fixation pour les fragments. Le premier site correspond au site de fixation du CTP, il sera appelé site CTP. Pour le second site de liaison, une phénylalanine (F108) est responsable en grande partie de l'interaction avec le fragment et au niveau du troisième site une tyrosine (Y203) est présente. Ces deux sites seront appelés respectivement site F et site Y.

Les résultats sont donnés en score de docking (DS, « Docking Score ») (Tableau 25) qui reflète approximativement l'énergie de liaison entre le fragment et l'enzyme. Plus la valeur du DS est petite (négative) meilleures sont les interactions entre le fragment et l'enzyme.

Fragments	Conformations	Site F	Site Y	Site CTP
B4H08		-9.933	-5.636	-5.947
B3D04	7S 8S 9S 10R	-10.227	-8.672	-6.829
Isomères de B3D04	7S 8S 9R 10R	-10.761	-6.020	-5.900
	7S 8R 9S 10R	-11.254	-8.295	-9.479
	7S 8R 9R 10R	-11.661	-8.110	-6.130
	7R 8S 9S 10S	-9.600	-9.828	-9.166
	7R 8S 9R 10S	-11.450	-8.822	-6.456
	7R 8R 9S 10S	-11.413	-7.493	-6.227
	7R 8R 9R 10S	-12.163	-7.060	-7.152
B4D12		-9.306	-5.628	-7.051
B1H10		-9.526	-8.683	-5.116
B6G02		-7.059	-6.825	-10.881
B5E12		-4.880	-5.416	-7.395
B1B10		-8.076	-6.448	-6.113
B5G02		-8.042	-6.131	-5.979
B3E03	4S	-8.006	-7.774	-6.306
Isomères de B3E03	4R	-7.691	-8.150	-7.255
B3H05	10S	-8.142	-6.041	-6.265
Isomère de B3H05	10R	-7.223	-5.921	-6.597
B3E01		-8.368	-6.599	-5.952
B3F10	8S	-8.022	-7.762	-6.735
Isomères de B3F10	8R	-7.389	-7.725	-6.573
B6D12		-7.532	-5.667	-6.815
B5E07		-7.378	-6.298	-5.127
B4B12		-6.688	-7.321	-5.959
B1B02		-6.666	-5.636	-5.213
B1D02		-6.651	-5.628	-5,2
B1F11		-6.618	-7.643	-5.200
B5E06		-5.697	-4.529	-5.213
B3A11		-10.262	-6.345	-5.752
B5C01		-8.204	-6.601	-6.020
B1B04		-8.385	-6.155	-5.165
B4B01	7S	-5.915	-7.284	-7.579
Isomères de B4B01	7R	-7.514	-7.097	-7.982

Tableau 25 : Résultats du docking réalisé sur les vingt-trois fragments sélectionnés par SPR. Les cinq fragments encadrés en noir sont ceux pour lesquels le K_D n'a pas pu être déterminé de façon reproductible.

Certains fragments possèdent des isomères de conformation auxquels des scores de docking ont

été attribués individuellement. L'isomère du fragment B3D04 qui a été criblé en SPR correspond à l'isomère 7S, 8S, 9S, 10R (Tableau 25, en gras). Pour les fragments B3E03, B3H05, B3F10, B4B01 la stéréochimie n'a pas été indiquée par l'entreprise (Edelris) qui nous a vendu les fragments.

Dans le Tableau 25, les DS des 23 fragments (cf. Chapitre 2-Figure 67) pour chaque site (CTP, F et Y) ont été calculés. Ainsi, certains fragments ont des scores de docking intéressants selon le site de liaison.

Si l'on considère le site F et les fragments qui ont un DS inférieur à -10, cinq fragments sont intéressants à étudier.

Le fragment B4H08 semble interagir fortement avec ce site avec un DS de -9,933 et faiblement avec les deux autres sites.

Les isomères du fragment B3D04 semblent interagir de la même manière que B4H08 avec le site F, mais certains interagissent aussi sur le site de liaison Y. Par contre B4H08 et B3D04 ne semblent pas avoir beaucoup d'affinité pour le site CTP, ce qui pourrait être intéressant pour relier ce fragment à un fragment spécifique du site CTP.

Les deux fragments B4D12 et B1H10 ont tous deux un DS semblable pour le site F (-9,306 et -9,526 respectivement). Cependant le fragment B1H10 est moins sélectif car il interagit également avec le site Y avec un DS de -8,683 et B4D12 interagit faiblement avec le site CTP. Le dernier DS remarquable est celui du fragment B3A11. Cependant ce fragment avait été écarté du criblage par SPR car son K_D n'a pas pu être mesuré de manière reproductible. Du fait de son DS important, sa structure chimique pourrait être considérée pour l'aide à l'optimisation des fragments si des expériences complémentaires valident son intérêt.

Si l'on considère le site Y et les fragments qui ont un DS inférieur à -8, trois fragments sont intéressants à étudier.

Les fragments B3D04 et B1H10 ont tous deux des DS de -8,672 et -8,683 respectivement et comme cité précédemment ne sont pas sélectifs de ce site.

Les isomères de B3E03 interagissent sur ce site avec des DS de -7,774 (4S) et -8,150 (4R) mais interagissent aussi avec les autres sites de liaison avec quasiment les mêmes DS.

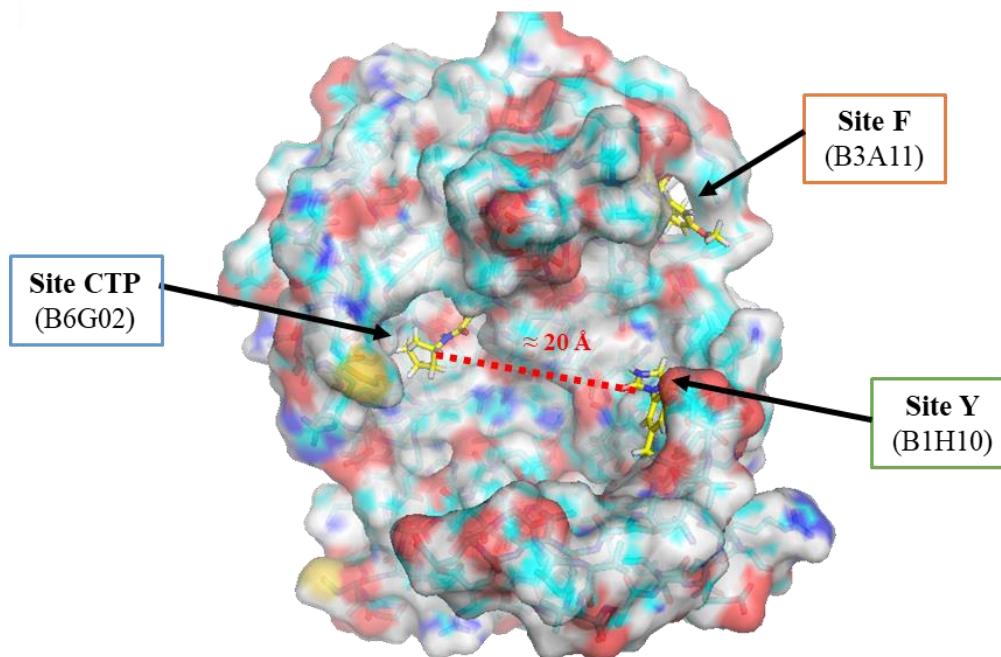
Nous considérons donc que le docking n'a révélé aucun fragment qui pourrait être spécifique au site Y.

Si l'on considère le site CTP, trois fragments sont intéressants à étudier.

Les fragments B4D12 et B5E12 ont des scores de docking similaires avec respectivement -7,051 et -7,395. Cependant, B5E12 semble être sélectif du site CTP contrairement au fragment B4D12 qui interagit fortement avec le site F.

Le fragment B6G02 se démarque avec son score de docking de -10,881, qui est le meilleur DS pour le site CTP. Ce fragment a été éliminé du criblage car son K_D n'a pas pu être obtenu. Comme son docking score est grand, il pourrait être considéré pour l'optimisation si des expériences complémentaires valident son intérêt.

A)



B)

Fragment	Structure	K_D	STD	Site F	Site Y	Site CTP
B1H10	<chem>Fc1ccc(N2C(=O)NC(=O)N2)cc1</chem>	2 mM	Pas de signal	-9,526	-8,683	-5,116
B6G02	<chem>OC(=O)N1CCCC1</chem>	Non déterminé	Non analysé	-7,059	-6,825	-10,881
B3A11	<chem>COc1ccc2c(c1)nc3c2cnc3</chem>	Non déterminé	Non analysé	-10,262	-6,345	-5,752
B4H08	<chem>O=C1NCCc2ccccc2N1</chem>	104 μ M	Pas de signal	-9,933	-5,636	-5,947
B3D04	<chem>CC(=O)OC(=O)N[C@@H]1C=CC=C1O</chem>	832 μ M	Pas de signal	-10,227	-8,672	-6,829

Figure 101 : Les fragments retenus par docking. A) Représentation tridimensionnelle de docking des fragments B1H10, B6G02 et B3A11 dans trois sites de fixation. B) Résumé des fragments les plus intéressants déterminés par le docking.

Des fragments avec des DS corrects ont été représentés dans leurs poches respectives des sites CTP, F et Y dans la Figure 101.

La Figure 101 illustre un monomère de Ba-IspD et le positionnement des fragments dans les différents sites suite aux expériences de docking. La position des fragments semblent indiquer qu'ils pourraient être reliés entre eux. La structure cristallographique de Ba-IspD est dimérique et lorsque l'autre monomère est présent le site F est complètement isolé des deux autres sites mais toujours accessible en tant que site de liaison. Le site Y devient inaccessible dû à l'emboîtement des deux monomères (Figure 100) dans cette forme cristallisée. Cependant, en solution la structure n'est pas connue et ces deux sites pourraient être accessibles pour relier deux fragments du site CTP au site Y. La distance entre les fragments B6G02 et B1H10 mesurée avec Pymol est d'environ 20 Å (Figure 101). En considérant, qu'une liaison carbone-carbone est en moyenne de 1,54 Å, on pourrait envisager de concevoir un bras espaceur d'environ 13 atomes de carbone pour relier ces fragments.

3.3 La cinétique enzymatique de Ba-IspD

L'objectif de ma thèse est la conception de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme Ba-IspD *via* une approche par fragment. Maintenant qu'une vingtaine de fragments a été sélectionnée, il est nécessaire d'évaluer leurs activités inhibitrices sur Ba-IspD. Pour cela, il est nécessaire de disposer d'un test d'activité de l'enzyme Ba-IspD qui catalyse la transformation de CTP et de MEP en CDP-ME et PPi (Figure 102).

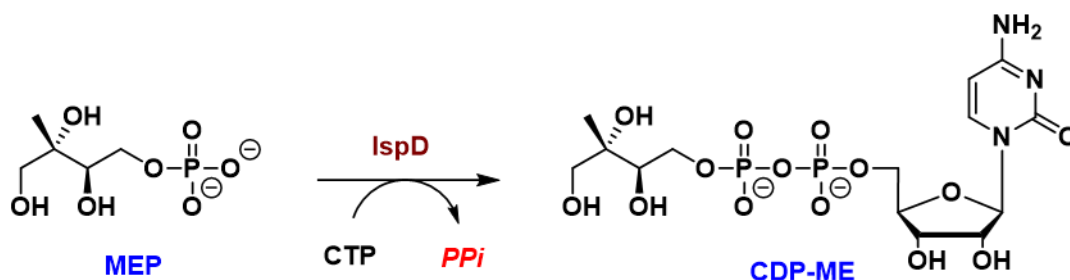


Figure 102 : Réaction catalysée par IspD et libération du diphosphate (PPi).

3.3.1 Introduction à la cinétique enzymatique

Les enzymes catalysent des réactions biochimiques dont le mécanisme et la vitesse de réaction sont étudiés par la cinétique enzymatique. Une réaction enzymatique simple avec une enzyme (E) qui convertit un substrat (S) en un produit (P) est décrite comme suit :



L'enzyme (E) se lie au substrat (S) en formant un complexe enzyme substrat (ES) avec une constante de vitesse k_1 et se dissocie selon une constante de vitesse k_{-1} . Une fois le complexe ES formé, l'enzyme peut catalyser la formation du produit (P) avec une constante de vitesse k_2 . La formation d'un complexe ES lors d'une réaction enzymatique a été décrite pour la première fois par Leonor Michaelis et Maud Menten en 1913^{222,223}. De ces travaux est issu l'équation de Michaelis-Menten qui relie la vitesse de réaction et la concentration en substrat :

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (52)$$

avec v la vitesse initiale, K_M la constante de Michaelis-Menten et V_{max} la vitesse maximale.

Dans les conditions initiales, la formation du produit est minimale et le k_{-2} est négligeable. De plus, la constante de vitesse de formation du produit, désignée par k_2 (k_{cat} dans ce cas), représente le nombre maximum de réactions catalysées par l'enzyme par unité de temps. V_{max} est le produit de k_{cat} par la concentration totale en enzyme $[E]_{total} = [ES]$, c'est-à-dire lorsque toutes les enzymes sont sous la forme d'un complexe ES.

Le tracé de l'équation de Michaelis-Menten pour une concentration faible en substrat croît de façon linéaire avec l'augmentation de $[S]$. À des concentrations plus élevées, la courbe s'infléchit jusqu'à atteindre un plateau qui correspond à V_{max} (Figure 103). La constante de Michaelis-Menten K_M représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale est égale à la moitié de la vitesse maximale. Les réactions enzymatiques à un seul substrat ont tendance à obéir à la cinétique décrite par Michaelis-Menten.

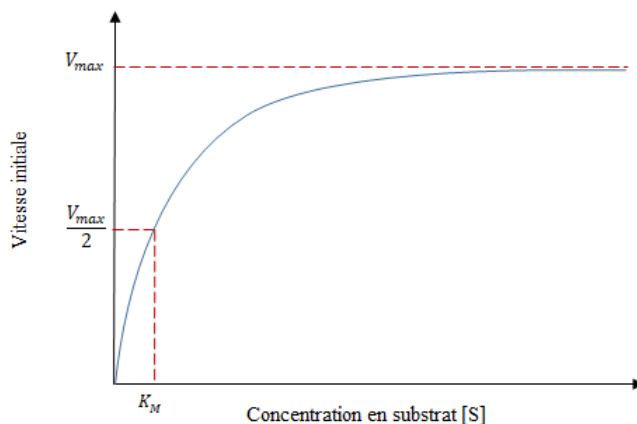


Figure 103 : Courbe cinétique de Michaelis-Menten.

Au laboratoire des tests enzymatiques ont été réalisés par Zoljargal Baatarkhuu sur l'enzyme IspD d'*E. coli* afin de déterminer les constantes cinétique V_{max} et K_M en utilisant l'équation (52) de Michaelis-Menten. Pour cela, le test enzymatique doit être réalisé en faisant varier la concentration d'un substrat (MEP par exemple) et en gardant la concentration de l'autre substrat fixe et en excès (CTP par exemple) afin que sa concentration ne limite pas la vitesse.

Un K_M apparent de $41 \pm 6 \mu\text{M}$ pour le MEP et un K_M apparent de $90 \pm 10 \mu\text{M}$ pour le CTP ont été déterminés par cette méthode. Les résultats obtenus sont similaires aux valeurs décrites par Imperial et collaborateur²²⁴ qui ont déterminé des K_M de $61 \pm 14 \mu\text{M}$ pour le MEP et de $58 \pm 6 \mu\text{M}$ pour le CTP pour l'enzyme IspD d'*E. coli* selon la même méthode.

Par la suite, des études cinétiques sur IspD de *Bacillus anthracis* ont été entreprises de la même façon et il a été possible de déterminer les K_M de $8,5 \pm 1,6 \mu\text{M}$ pour le MEP et de $22,7 \pm 1,7 \mu\text{M}$ pour le CTP.

3.3.2 L'inhibition enzymatique

L'inhibition d'une enzyme correspond à une diminution de son activité par une molécule appelée inhibiteur. Il existe plusieurs types d'inhibiteurs. Les inhibiteurs irréversibles se lient covalamment alors que les autres inhibiteurs se lient de façon réversible à l'enzyme. Dans le cadre de notre étude, les fragments sont considérés comme des inhibiteurs réversibles.

D'après la nomenclature de Cleland, il y a trois types de mécanisme d'inhibition réversible : l'inhibition compétitive, incompétitive et non compétitive qui dépendent chacun du mode d'interaction de l'inhibiteur avec l'enzyme²²⁵ (Figure 104). La constante d'inhibition K_i permet de caractériser la formation des différents complexes enzyme-inhibiteur.

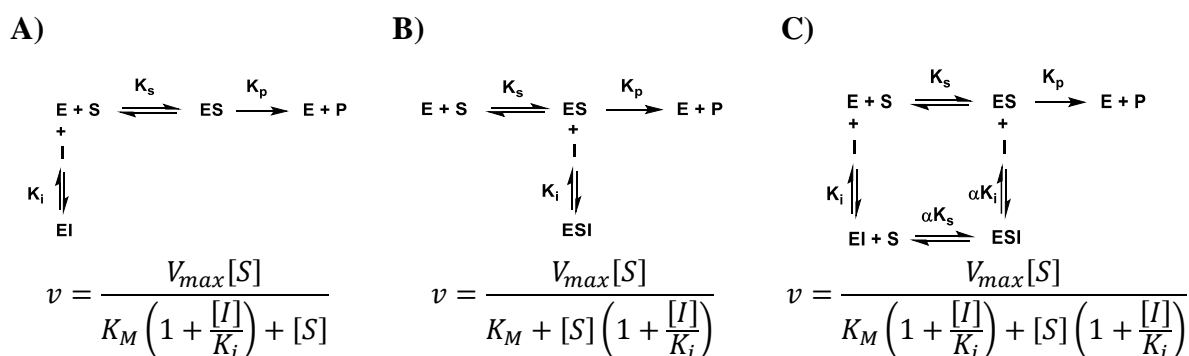


Figure 104 : Les différents modes d'inhibition et les équations de vitesses associées. A) Inhibition compétitive. B) Inhibition incompétitive. C) Inhibition non compétitive. I-Inhibiteur, K_i constante d'inhibition, EI complexe enzyme-inhibiteur.

Dans le cas d'un mécanisme d'inhibition compétitive, le substrat (S) et l'inhibiteur (I) sont en compétition pour le même site actif de l'enzyme (Figure 104A).

L'inhibition incompétitive résulte de l'interaction entre l'inhibiteur (I) et le complexe enzyme-substrat (ES) qui conduit à la formation du complexe ternaire ESI inactif (Figure 104B).

Pour une inhibition non compétitive (Figure 104C), l'inhibiteur (I) peut se lier soit à l'enzyme libre (E) soit au complexe enzyme-substrat (ES). Lorsque K_i est égale à αK_i , le mécanisme est identifié comme une inhibition non compétitive pure. Lorsque le K_i est différent de αK_i alors on parle d'inhibition mixte.

La détermination d'un K_i et du mode d'inhibition est fastidieuse.

Un autre paramètre, plus simple à déterminer, peut être utilisé pour caractériser l'inhibition d'une enzyme. Il s'agit de la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) représentant la concentration en inhibiteur pour laquelle 50% l'activité enzymatique est inhibée. La détermination de ce paramètre dépend des concentrations de l'enzyme, de l'inhibiteur et du substrat. Des expériences simples permettent d'obtenir une valeur d' IC_{50} , mais la valeur est fonction des paramètres de l'expérience. L'analyse de la perte d'activité est réalisée en faisant varier la concentration en inhibiteur pour une concentration en enzyme et en substrats constants. La donnée obtenue représente l'activité en fonction de la concentration en inhibiteur. Ces résultats peuvent être ajustés selon la fraction d'inhibition en fonction de la concentration en inhibiteur. La courbe est tracée par un ajustement en utilisant l'équation 53.

$$y = \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{pente}} \quad (53)$$

avec y la fraction d'inhibition et x la concentration en inhibiteur. Le K_i peut être estimé à partir de l' IC_{50} selon le type de mécanisme d'inhibition. En effet, en 1973 Yung-chi Cheng et William H. Prusoff décrivent des équations permettant d'approximer l' IC_{50} et le K_i sous certaines conditions en fonction du mode d'inhibition et du nombre de substrat de l'enzyme²²⁶.

3.3.3 IspD, une enzyme bi-substrat

La conversion du MEP et du CTP en CDP-ME catalysée par IspD est une réaction bi-substrat (Figure 102). La détermination du mécanisme bi-substrat de l'enzyme IspD d'*E. coli* a été réalisée par D. Cane et ses collaborateurs en utilisant une analyse « pulse chase » qui consiste à marquer le MEP ou le CTP dans une première solution contenant IspD suivi de

l'addition d'un mélange de MEP et de CTP non marqués pour conduire à la formation du produit CDP-ME marqué ($[^{14}\text{C}]\text{CDP-ME}$). La quantification du $[^{14}\text{C}]\text{CDP-ME}$ produit en fonction du temps et l'allure de la courbe du taux de conversion du substrat marqué a permis de déterminer que le CTP se lie en premier à IspD suivi de la fixation du MEP⁶⁷. Ces travaux ont montré que le mécanisme de l'enzyme IspD est séquentiel et que les substrats se lient dans un ordre précis.

En utilisant pour la première fois un modèle bi-substrat pour l'étude cinétique d'IspD, Z. Baatarkhuu a confirmé que la réaction catalysée par IspD d'*E. coli* est une réaction séquentielle et a montré que les K_M du CTP et du MEP sont respectivement de 149 μM ($K_{i\text{CTP}}$) et de 46 μM ($K_{i\text{MEP}}$) dans un modèle bi-substrat qui est décrit par l'équation (54) et la Figure 105.

$$v = \frac{V_{max} * AB}{K_{ia}K_b + K_aB + K_bA + AB} \quad (54)$$

avec K_{ia} la constante de Michaelis-Menten de l'enzyme E pour le substrat A (CTP), K_b la constante de dissociation de B (MEP) du complexe EA (E-CTP), K_a la constante de dissociation de A (CTP) du complexe EB (E-MEP).

La constante de dissociation du complexe IspD-CTP et du MEP (K_{MEP}) de 20 μM s'est révélée très inférieure à la constante de dissociation du complexe E-MEP et du CTP (K_{CTP}) de 265 μM confirmant que le CTP se lie en premier dans le site de liaison¹⁰⁶ (Figure 105). Si le MEP se lie en premier, le complexe E-MEP a très peu d'affinité pour le CTP et se dissocie.

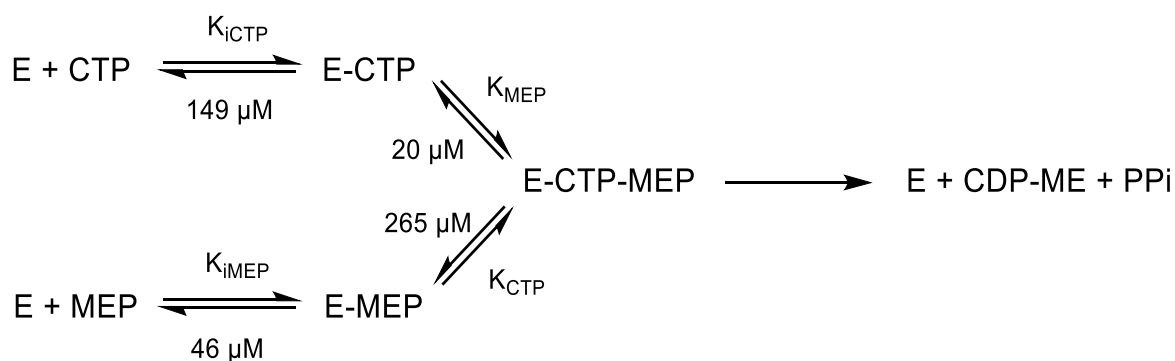


Figure 105 : Détermination du mécanisme séquentiel de l'enzyme IspD chez *E. coli*. K_i correspond à la constante de Michaelis-Menten et K la constante de dissociation. Image reproduite de la thèse de Z. Baatarkhuu²²⁷.

La détermination d'un K_i d'un inhibiteur de l'enzyme bi-substrat IspD est particulièrement complexe. Ainsi, nous avons décidé de déterminer le pouvoir d'inhibition des 18 fragments par la mesure d' IC_{50} .

3.3.4 Les tests enzymatiques de IspD

Dans le but de déterminer l'activité de l'enzyme et le pouvoir d'inhibition des 18 fragments, un test enzymatique pour l'enzyme IspD est nécessaire. Plusieurs tests enzymatiques ont été publiés pour cette enzyme.

Une première étude a été réalisée par A. Bacher et ses collaborateurs en utilisant du [2-¹⁴C]2-C-méthylérythritol 4-phosphate ([¹⁴C]-MEP) comme substrat lors de la réaction enzymatique. L'activité a été suivie par chromatographie sur couche mince afin de séparer le [¹⁴C]-MEP du [¹⁴C]-CDPME formé. La radioactivité a été détectée et quantifiée en utilisant un PhosphorImager⁶⁶.

Par la suite, une méthode a été développée pour séparer et quantifier les produits de la réaction enzymatique d'IspD par HPLC en utilisant un détecteur UV à 270 nm^{70,228} et ainsi évaluer l'activité d'IspD.

Ces deux techniques nécessitent des instruments de mesure spécifiques et requièrent une certaine expertise. D'autres méthodes plus simples ont été mises en place pour déterminer l'activité de l'enzyme IspD.

Plusieurs tests enzymatiques sont basés sur la quantification des phosphates (Pi). L'enzyme IspD produit du 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol (CDP-ME) et du diphosphate inorganique (PPi). Les PPi peuvent être hydrolysés en phosphates (Pi) par une pyrophosphatase et les Pi peuvent alors être quantifiés en utilisant des dosages spectrophotométriques.

Un test commercial EnzChek® basé sur les travaux de Webb²²⁹ permet la quantification du phosphate inorganique (Pi). Le principe est illustré en Figure 106.

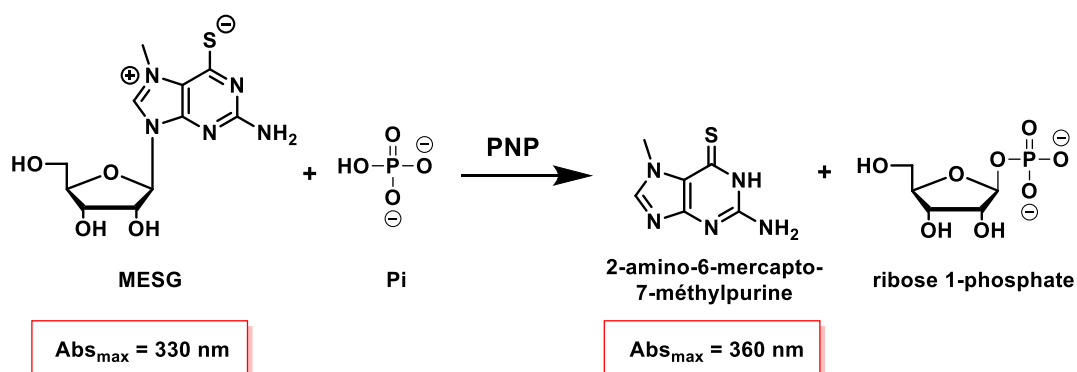


Figure 106 : Conversion enzymatique du 2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine riboside (MESG) en ribose 1-phosphate et 2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine par la purine nucléoside phosphorylase (PNP). La croissance de l'absorbance à 360 nm permet de suivre l'activité.

L'enzyme purine nucléoside phosphorylase (PNP) qui permet la transformation des phosphates (Pi) et du 2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine riboside (MESG) en ribose 1-phosphate et en 2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine est utilisée (Figure 106). Le suivi du changement d'absorbance du 2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine par spectrophotométrie à 360 nm permet une quantification du phosphate inorganique (Pi).

Des tests basés sur la formation de complexes colorés sont aussi utilisés. Les phosphates forment des complexes avec le molybdate et différents colorants comme le vert de malachite²²⁴, le cristal violet²³⁰ et le rouge de quinaldine²³¹. Les complexes phosphomolybdates peuvent également être réduits par de l'acide ascorbique²³² ou de l'ascorbate en présence d'antimoine²³³ pour conduire à la formation de bleu de molybdène. Le Tableau 26 résume les différents tests utilisés et les paramètres de mesure pour la quantification des phosphates.

Type de colorant	Sources de Molybdate	Absorbance	Temps d'analyse	Gamme de linéarité
Vert de malachite	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	610 nm	20 min	0 à 20 μM
Cristal violet	Na_2MoO_4	560 nm	40 min	0 à 8,75 μM
Rouge de quinaldine	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	525 nm	15 min	0 à 12,5 μM
Acide ascorbique	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	820 nm	1,5 h	0 à 15 μM
Ascorbate/antimoine	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ + $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2$	880 nm	15 min	0 à 15 μM

Tableau 26 : Les différentes méthodes de quantification des phosphates²³⁴ par spectrophotométrie.

Avec $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$: Heptamolybdate d'ammonium, Na_2MoO_4 : Molybdate de sodium et $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2$: tartrate d'antimoine et de potassium.

Le test le plus sensible et le plus utilisé est celui avec le complexe molybdate, le vert de malachite²³⁴ et le Pi. C'est le test qui a été utilisé dans le cadre de ma thèse.

Ce test est simple, rapide à mettre en place et les conditions expérimentales ont été établies précédemment au laboratoire par Zoljargal Baatarkhuu au cours de sa thèse¹⁰⁶.

Ce test enzymatique sera utilisé pour déterminer si les fragments sélectionnés précédemment par SPR inhibent Ba-IspD et permettra également de tester les produits développés à partir des

fragments. La mesure de l'activité enzymatique de Ba-IspD en présence de ces fragments, à différentes concentrations, permet de déterminer leur IC_{50} .

3.3.5 Principe du test enzymatique utilisé pour déterminer l'activité de Ba-IspD.

Afin de mesurer l'activité de l'enzyme et le pouvoir inhibiteur des fragments, une méthode spectroscopique issue des travaux de Bernal²²⁴ a été employée. La réaction catalysée par IspD forme du CDP-ME et du diphosphate (PPi) par le transfert d'un groupement cytidine monophosphate du CTP vers le MEP (Figure 102).

Le test enzymatique est basé sur le dosage des phosphates (Pi) issus de la transformation du PPi via l'ajout d'une seconde enzyme, la pyrophosphatase inorganique. Le phosphate produit forme un complexe avec un réactif coloré composé de molybdate et de vert de Malachite qui absorbe à 630 nm et qui peut être dosé par spectrophotométrie (Figure 107).

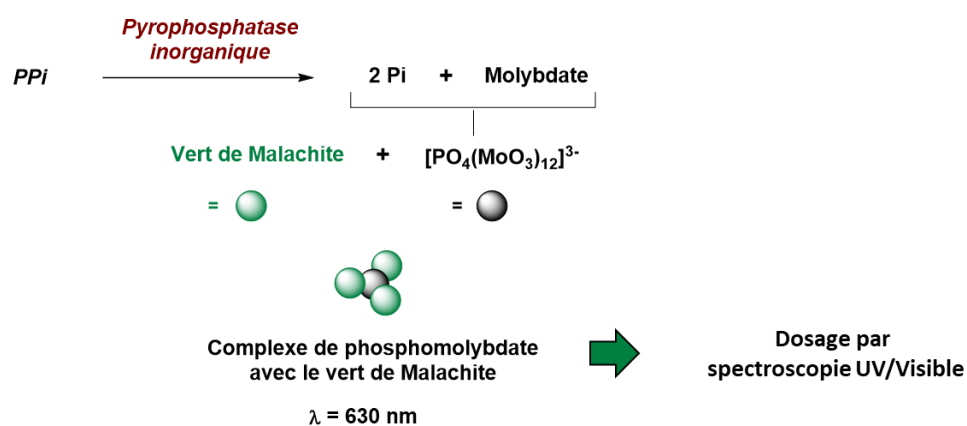


Figure 107 : Principe du test pour la détection du PPi formé dans le test enzymatique.

3.3.6 Détermination de l'activité de l'enzyme Ba-IspD

3.3.6.1 La courbe d'étalonnage : $[Pi] = f(DO)$

Le dosage des phosphates (Pi) par spectroscopie UV/visible nécessite de préparer préalablement une courbe d'étalonnage. Pour cela, différentes solutions de Pi de concentration variant de 0 à 18 μM dans un tampon Tris HCl (50 mM, 5 mM MgCl_2 , pH 8,0) ont été mises en présence de molybdate d'ammonium et de vert de malachite. L'absorbance a été mesurée après 10 min d'incubation à 30°C. La courbe d'étalonnage a été réalisée à partir des concentrations suivantes : 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 μM (Figure 108). La concentration en Pi est ensuite tracée en fonction de l'absorbance à 630 nm. La courbe obtenue est ajustée en utilisant une régression linéaire. La courbe de calibration est linéaire entre 1 et 20 μM de

phosphate avec une absorbance variant entre 0,1 et 1,6 ce qui est conforme à la publication de Bernal²²⁴.

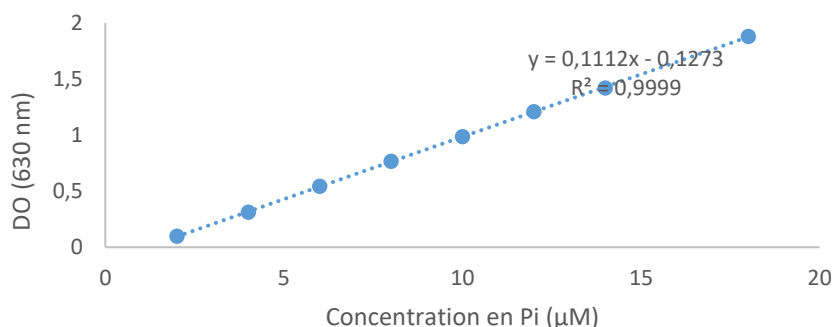


Figure 108 : Droite d'étalonnage pour quantifier la concentration de Pi en fonction de l'absorbance à 630 nm. Équation : $Pi = a \cdot DO + b$.

3.3.6.2 Conditions du test enzymatique pour déterminer l'activité de Ba-IspD

Les conditions du test enzymatique ont été adaptées des tests cinétiques réalisés précédemment au laboratoire par Zoljargal Baatarkhuu sur Ba-IspD (Travaux non publiés). Les concentrations des deux substrats de l'enzyme Ba-IspD ont été choisies en considérant la valeur de leur K_M : $22,73 \pm 1,704 \mu\text{M}$ pour le CTP et $8,503 \pm 1,607 \mu\text{M}$ pour le MEP. Ainsi, une concentration en CTP de $210 \mu\text{M}$ ($\approx 10x$ le K_M) et de MEP de $50 \mu\text{M}$ ($\approx 5x$ le K_M) ont été utilisées pour les tests enzymatiques. La concentration en enzyme et le temps d'incubation ont été déterminés afin que moins de 10 % du substrat soit converti en PPI. Finalement, une quantité d'enzyme de $0,004 \mu\text{g}$ pour Ba-IspD et de 133 mU/ml pour la pyrophosphatase ont été retenues dans un volume final de $400 \mu\text{l}$ et un temps de réaction de 8 minutes à 30°C .

Les fragments étant solubilisés dans du DMSO, il était important de confirmer que la présence de DMSO dans le test ne modifie pas excessivement l'activité de l'enzyme. Les tests enzymatiques ont été réalisés afin de déterminer l'activité de l'enzyme à 0 % et 1 % en DMSO, qui sont respectivement de $61,29$ et $52,35 \mu\text{mol/min/mg}$ (Tableau 27). La perte d'activité de Ba-IspD est inférieure à 15 % en présence de 1% en DMSO.

Activité	
0% DMSO ($\mu\text{mol/min/mg}$, n = 3)	$61,29 \pm 0,25$
1% DMSO ($\mu\text{mol/min/mg}$, n = 3)	$52,35 \pm 0,48$

Tableau 27 : Activités de Ba-IspD à 0 % et 1 % de DMSO. Conditions : Ba-IspD- $0,004 \mu\text{g}$, Pyrophosphate inorganique ($133,5 \text{ mU/ml}$), CTP ($210 \mu\text{M}$), MEP ($50 \mu\text{M}$), MgCl_2 (1 mM), DTT (1 mM) dans du Tris HCl (50 mM , pH 8,0, $400 \mu\text{l}$).

3.3.7 Test d'inhibition sur les fragments criblés

Les 18 fragments sélectionnés par SPR ont été testés comme potentiel inhibiteur de l'enzyme Ba-IspD ainsi que les 5 fragments (B1B04, B3A11, B4B01, B5C01, B6G02) qui ont été écartés du criblage car leurs K_D n'ont pas pu être déterminés.

3.3.7.1 Test de l'activité de l'enzyme Ba-IspD en présence des fragments.

Dans les conditions précédemment décrites, l'activité de l'enzyme a été mesurée sans et avec le fragment à une concentration de 200 μM (Figure 109).

On observe une fluctuation de l'activité d'IspD entre 45 et 90 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ en fonction du jour et des groupes de fragments testés. Cependant, l'activité était stable pour une même expérience d'environ 4 fragments (testés le même jour). Par exemple, le groupe de fragments B4B01, B3A11, B5C02 et B1B04 ont été testés dans une même expérience avec une activité pour IspD sans fragment de 90 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ alors que le groupe de fragments B6D12, B3D04, B4B12 et B5E12 ont été testés dans une autre expérience avec une activité d'IspD sans fragment de 60 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Figure 109).

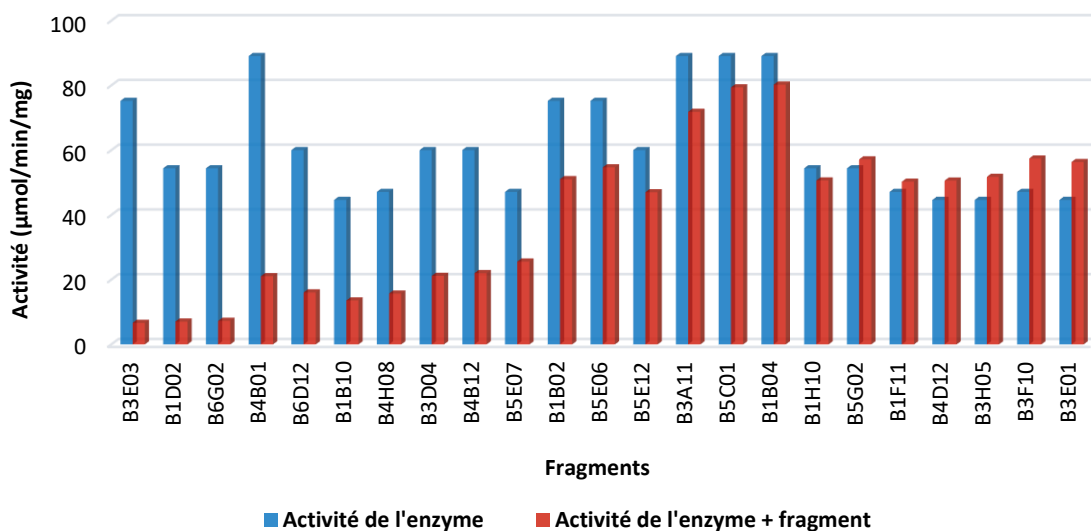


Figure 109 : Activités de l'enzyme Ba-IspD sans (bleu) et avec (rouge) les fragments à 200 μM . Conditions : Ba-IspD-0,004 μg , Pyrophosphate inorganique (133,5 mU/ml), CTP (210 μM), MEP (50 μM), MgCl_2 (1mM), DTT (1 mM), fragment (200 μM) dans du Tris HCl (50 mM, pH 8,0, 400 μl).

Cette variation d'activité entre les groupes de fragment n'influence pas la comparaison des résultats d'inhibition car un rapport des activités avec le fragment présent à une concentration

de 200 μM et sans le fragment a été calculé pour chaque fragment. Ainsi, un taux d'inhibition a pu être déterminé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Taux d'inhibition} = 100 - \frac{\text{Activité de l'enzyme+fragment}}{\text{Activité de l'enzyme}} * 100 \quad (56)$$

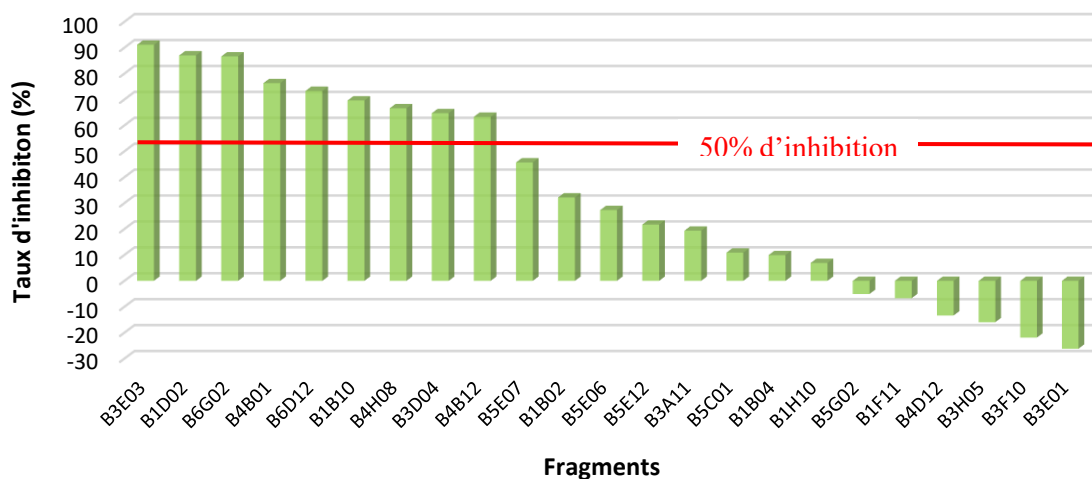


Figure 110 : Taux d'inhibition des fragments à 200 μM sur l'enzyme Ba-IspD.

Sur les 23 fragments testés, neuf montrent un taux d'inhibition au-dessus de 50% pour une concentration de 200 μM (Figure 110). La structure de ces fragments est donnée dans la Figure 111.

<p>B3E03</p>	<p>B1D02</p>	<p>B6G02</p>	<p>B4B01</p>	<p>B6D12</p>
<p>B1B10</p>	<p>B4H08</p>	<p>B3D04</p>	<p>B4B12</p>	

Figure 111 : Structures des neuf fragments montrant un taux d'inhibition supérieur à 50 % à 200 μM .

3.3.7.2 Test de l'activité de la pyrophosphatase en présence des fragments

Lors des tests cinétiques, deux enzymes sont mis en jeu : Ba-IspD et la pyrophosphatase. Afin de vérifier que les fragments inhibent sélectivement l'enzyme Ba-IspD, des tests d'inhibition des fragments avec la pyrophosphatase seule ont été effectués. Seuls les fragments qui présentent un taux d'inhibition positif dans les tests enzymatiques de Ba-IspD ont été testés. Les conditions de réaction ont été mis en place afin d'avoir un taux de conversion des PPI en Pi inférieur à 15% et ainsi être dans les conditions de vitesse initiale.

D'après la Figure 112, le taux de conversion du PPI en Pi est similaire avec (orange) ou sans (bleu) fragments. Ainsi, aucun des fragments montrant une inhibition dans le test de l'enzyme Ba-IspD est un inhibiteur de la pyrophosphatase. Les fragments identifiés dans la Figure 111 inhibent bien Ba-IspD.

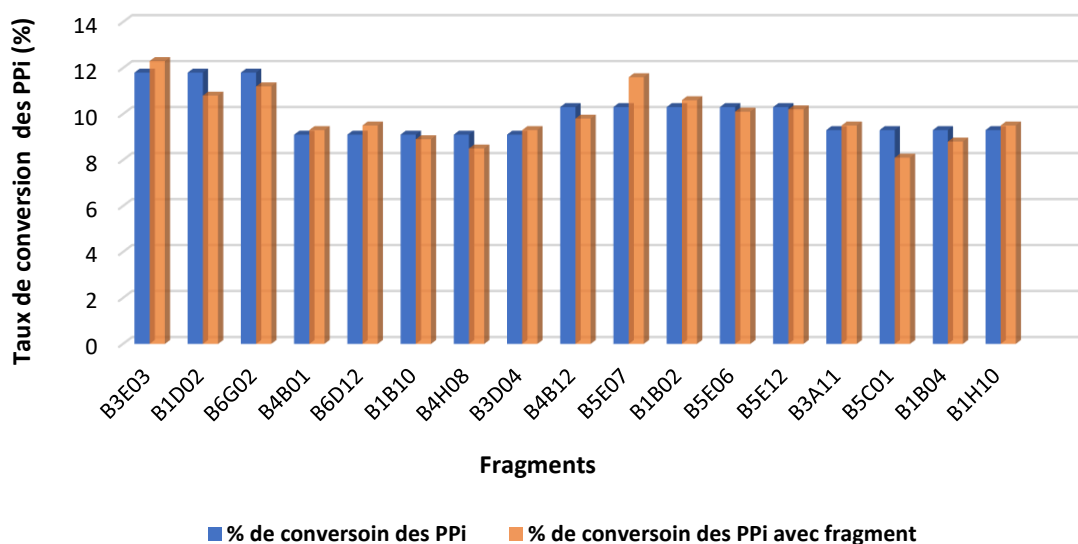


Figure 112 : Taux de conversion du PPI en Pi par la pyrophosphatase avec (orange) et sans (bleu) fragment (n=1). Conditions : PPI (0,2 mM), MgCl₂ (1 mM) et la pyrophosphatase inorganique (19,925 mU/ml) fragment (200 μM) dans du Tris HCl (50 mM, pH 8,0, 400 μl).

3.3.7.3 Test d'activité en association lente

Les fragments qui ont des sensorgrammes avec une allure d'association lente en SPR (Figure 113) et qui conduisent à une très faible variation de l'activité de Ba-IspD ont été testés en mode d'association lente (slow binding).

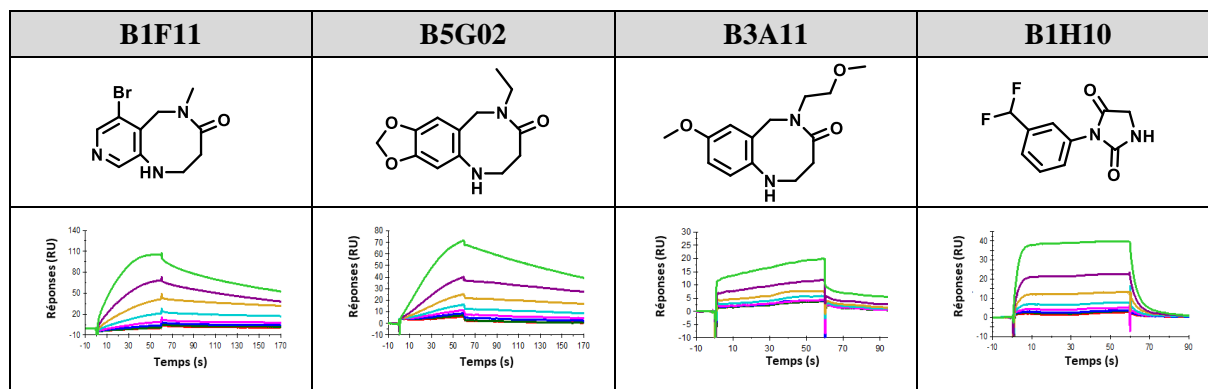


Figure 113 : Sensorgrammes des fragments testés en slow binding.

Pour cela, le test enzymatique est réalisé en pré-incubant l'enzyme Ba-IspD avec le fragment pendant 10 min ce qui permet de favoriser sa fixation sur l'enzyme. La réaction catalytique débute par l'ajout des deux substrats (CTP + MEP).

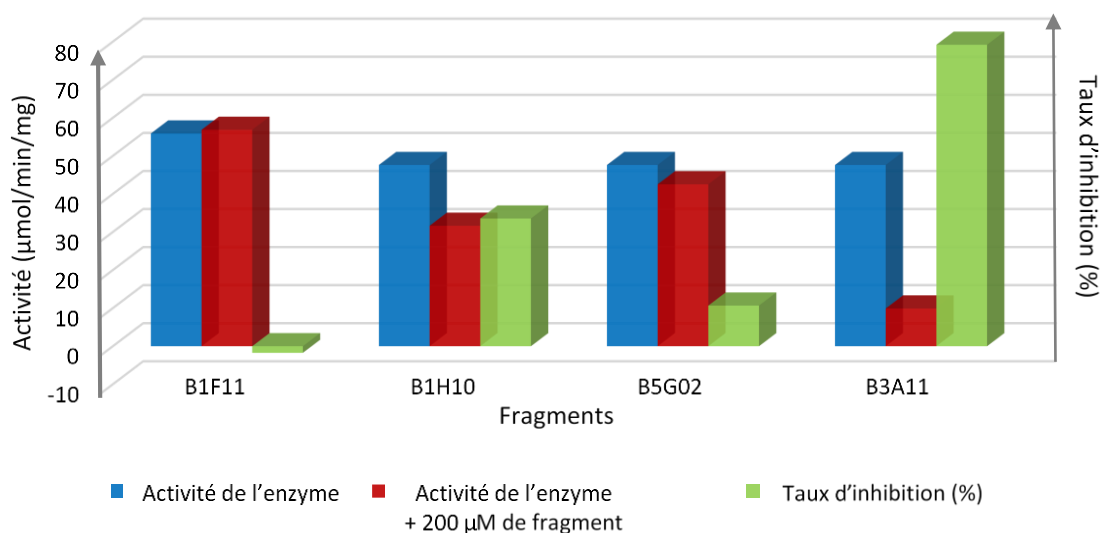


Figure 114 : Activités de l'enzyme Ba-IspD en mode d'association lente avec (rouge) et sans (bleu) fragment à 200 µM et le taux d'inhibition associé (vert). Conditions : Ba-IspD (0,004 µg), pyrophosphate inorganique (133,5 mU/ml), CTP (210 µM), MEP (50 µM), MgCl₂ (1mM), DTT (1 mM), fragment (200 µM) dans du Tris HCl (50 mM, pH 8,0, 400 µl).

Comme précédemment, une activité a été déterminée avec et sans le fragment étudié. Dans la Figure 114, le fragment B3A11 conduit à une importante perte d'activité de l'enzyme Ba-IspD avec un taux d'inhibition de 79 %, suivi par le fragment B1H10 qui montre un taux d'inhibition de 33%. Dans les conditions classiques, B3A11 et B1H10 ont respectivement des taux d'inhibition de 19 % et 6 %. Ainsi, ces deux fragments, et plus particulièrement B3A11 semblent être des inhibiteurs « slow binding ».

Le fragment B3A11 avait été éliminé du criblage par SPR car la valeur de son K_D était comprise entre 10^{-3} et 10^{-2} M avec des résultats difficilement reproductibles. Cependant, ces résultats de SPR peuvent être liés à une association beaucoup trop lente qui ne permet pas d'atteindre l'équilibre dans un temps trop court (60 s d'association) et induit ainsi des valeurs de R_{eq} incohérentes. D'après les données de SPR, de docking (DS = -10.262) et de cinétique enzymatique, B3A11 semble être un ligand et un inhibiteur de l'enzyme Ba-IspD mais avec une association lente. B1H10 n'a pas été retenu pour plusieurs raisons. Bien que son taux d'inhibition soit de 33 %, proche des 50 % ayant servi à la sélection, son K_D déterminé par SPR est de l'ordre de 2 mM et d'après le docking il semblerait se fixer dans plusieurs sites.

3.3.7.4 Détermination des IC_{50}

En reprenant la Figure 110, les neuf fragments ayant des taux d'inhibition supérieurs à 50% (Figure 111) ont été testés à deux concentrations différentes, 50 μ M et 200 μ M, permettant à la fois de confirmer l'inhibition du fragment et de déterminer la gamme de concentration à utiliser pour déterminer l' IC_{50} . Différents tests ont été réalisés en faisant varier uniquement la concentration du fragment. Pour déterminer l' IC_{50} , la fraction d'inhibition a été tracée en fonction de la concentration en fragment. Les courbes obtenues ont été ajustées en utilisant le logiciel Kaleidagraph et l'équation :

$$Fraction\ d'inhibition = \frac{1}{1 + \left(\frac{[Fragment]}{IC_{50}}\right)^{pente}} \quad (56)$$

Ainsi, des courbes correctes ont été obtenues et la détermination de l' IC_{50} a été possible pour trois fragments : B4H08 (Figure 115), B1D02 (Figure 116), B3D04 (Figure 117) dans une gamme de concentrations comprises entre 0 et 300 μ M. Ces fragments ont des K_D respectivement de 104 μ M, 3 mM et 832 μ M.

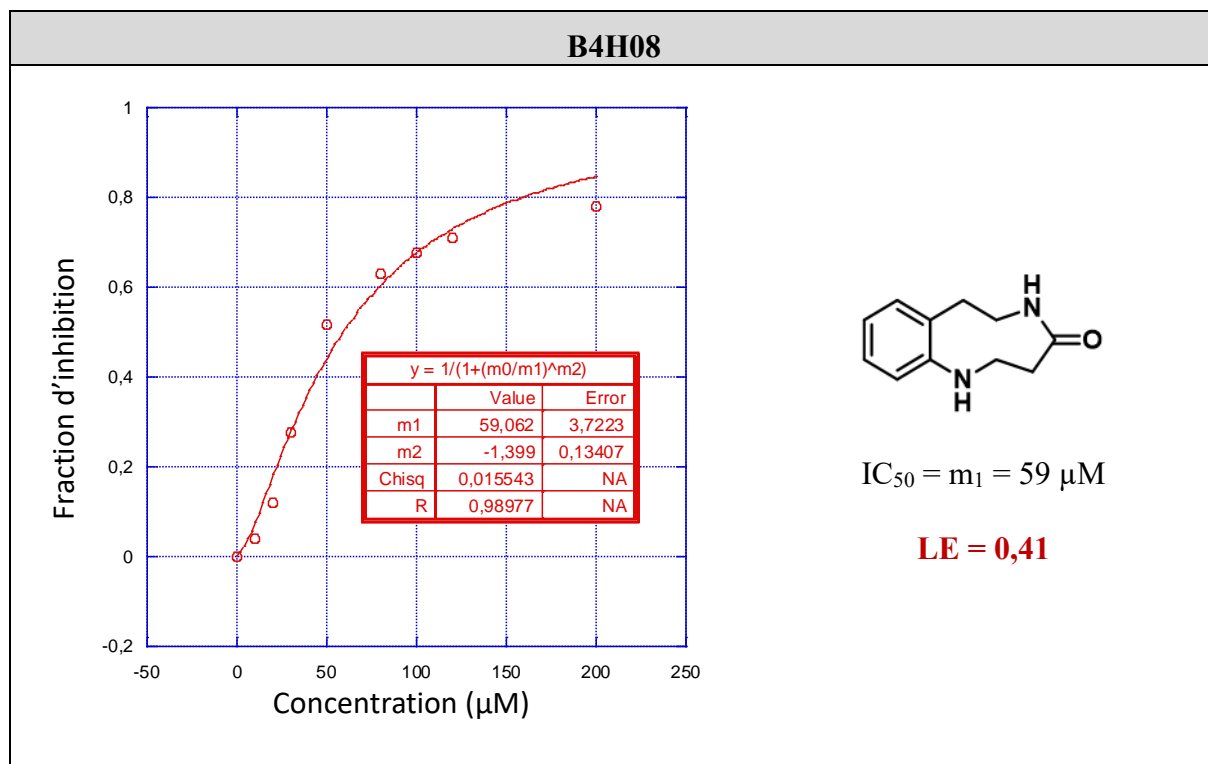


Figure 115 : Détermination de l' IC_{50} et structure chimique du fragment B4H08.

Paramètres : $m_1 = IC_{50}$, $m_2 =$ pente, $LE = -RT \ln(IC_{50})/HA$.

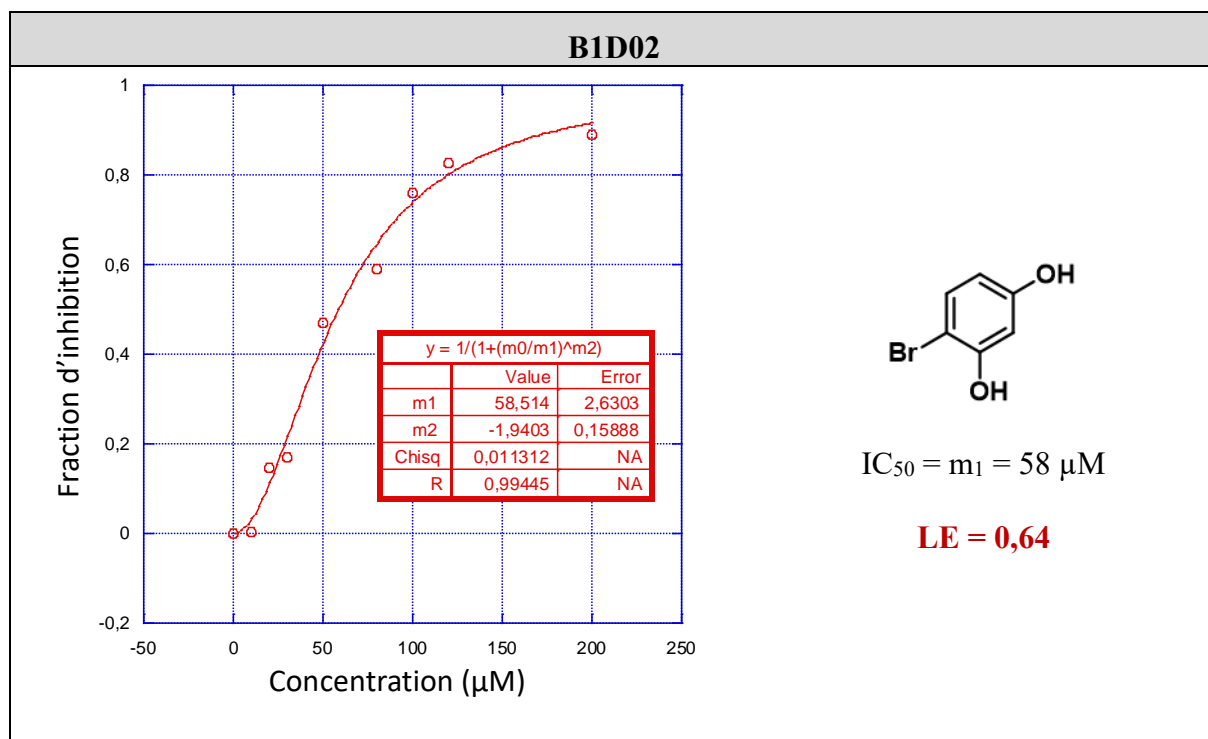


Figure 116 : Détermination de l' IC_{50} et structure chimique du fragment B1D02.

Paramètres : $m_1 = IC_{50}$, $m_2 =$ pente, $LE = -RT \ln(IC_{50})/HA$.

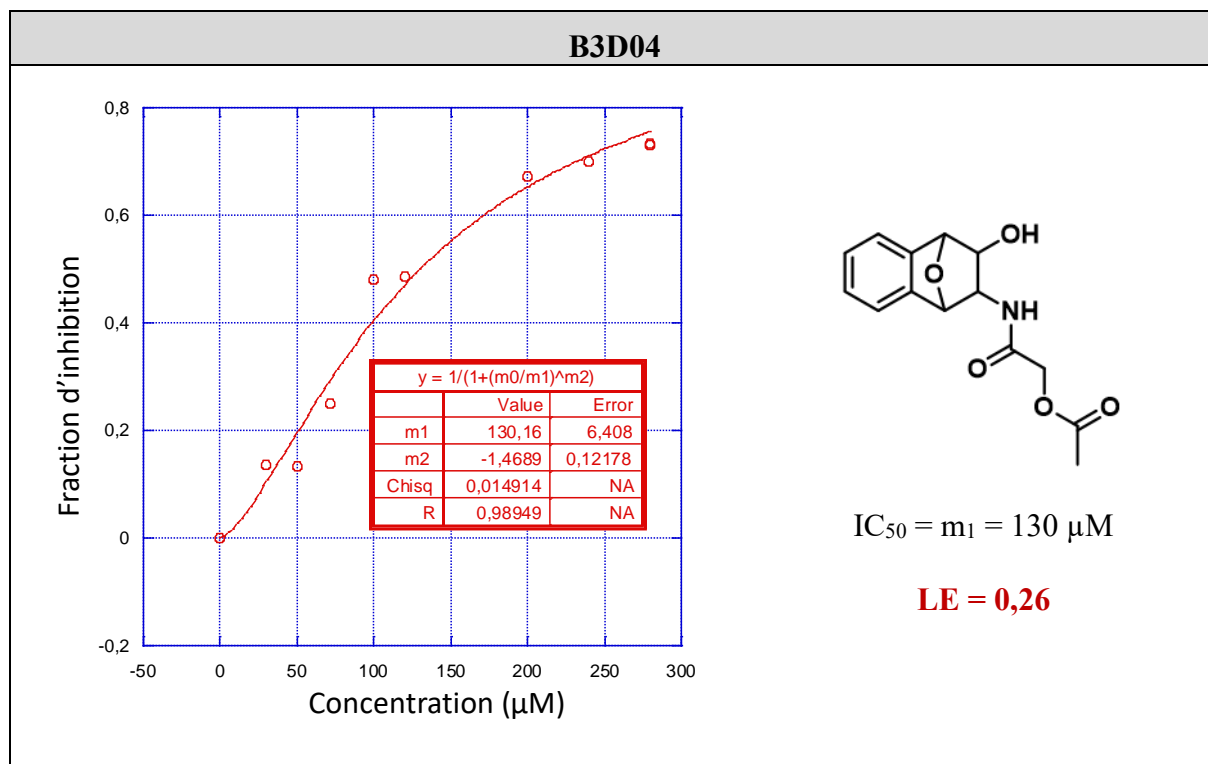


Figure 117 : Détermination de l' IC_{50} et structure chimique du fragment B3D04.

Paramètres : $m_1 = IC_{50}$, $m_2 =$ pente, $LE = -RT \ln(IC_{50})/HA$.

La détermination des IC_{50} pour les 6 autres fragments B3E03, B6G02, B4B01, B6D12, B4D12, B1B10 n'a pas été possible. En effet, l'inhibition n'était pas dépendante de la concentration et les résultats n'étaient pas reproductibles.

Après ces premières expériences, le lot d'enzyme était épuisé ainsi que le stock de CTP utilisé et certains fragments. Pour reproduire certaines de ces expériences, une nouvelle production et purification de l'enzyme Ba-IspD ont été réalisées. L'activité obtenue était de 60 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Un nouveau lot de CTP a aussi été acheté.

Les fragments disponibles et qui montrent une inhibition supérieure à 40 % (Figure 110) ont été retestés à 200 μM et aussi à 1 mM pour favoriser l'interaction des fragments qui ont un K_D important. Cependant, les tests réalisés avec ces nouveaux lots, enzymes et substrats, ne nous ont pas permis de reproduire exactement les résultats obtenus auparavant avec 200 μM de fragments. Les taux d'inhibition obtenus sont plus faibles (Figure 118). Les taux d'inhibition du fragment B3E03 à 200 et 1000 μM n'ont pas pu être déterminés car le stock de fragment était épuisé. De plus, l'expérience à 200 μM du fragment B4H08 a été ratée et le taux d'inhibition n'a pas pu être déterminé.

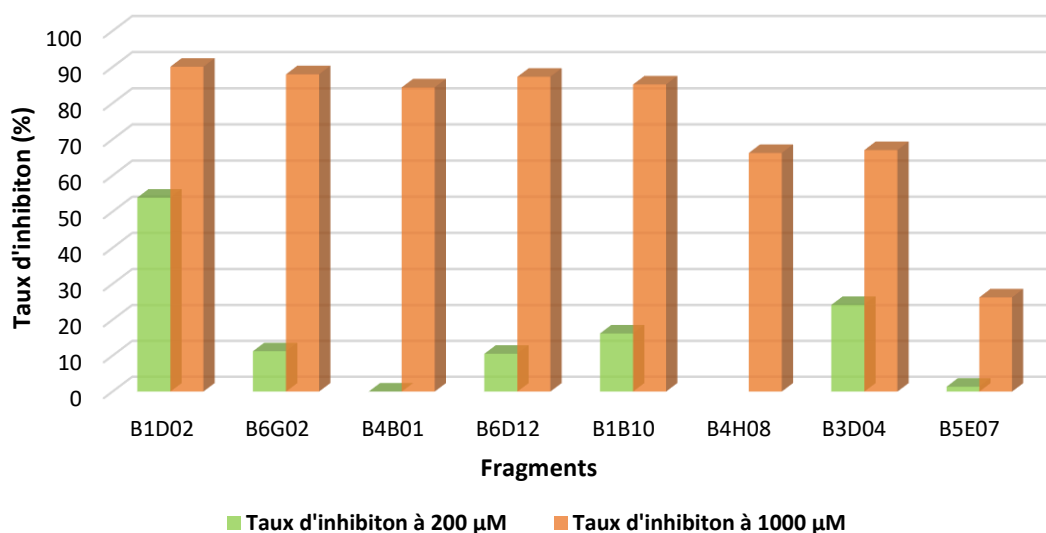


Figure 118 : Taux d'inhibition des fragments à 200 µM (vert) et 1000 µM (orange) sur Ba-IspD (n=1).

La différence des taux d'inhibitions à 200 µM entre ces résultats (Figure 118) et les résultats précédents (Figure 110) peuvent s'expliquer par le changement de lot d'enzyme et des lots de CTP et MEP. En effet, la concentration stock de ces deux substrats peut être supérieure à la valeur estimée et donc une concentration supérieure en inhibiteur est nécessaire pour inhiber l'enzyme. Malgré cette différence de résultats, les valeurs à 1000 µM permettent de confirmer que ces 8 fragments : B1D02, B6G02, B4B01, B6D12, B1B10, B4H08, B3D04 et B5E07 sont des inhibiteurs de l'enzyme Ba-IspD (Tableau 28). Le fragment B4B12 qui avait une inhibition supérieure à 50 % dans les premières expériences (Figure 110) n'a pas pu être retesté en inhibition car le stock du fournisseur Edelris était épuisé. Cependant, étant donné son fort potentiel d'inhibition lors de la première expérience, il sera nécessaire de confirmer ce résultat dans le futur.

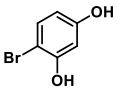
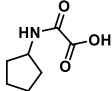
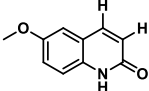
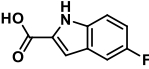
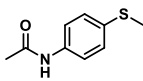
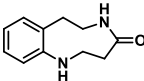
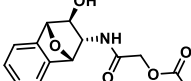
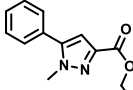
B1D02	B6G02	B4B01	B6D12
			
B1B10	B4H08	B3D04	B5E07
			

Tableau 28 : Structures des huit fragments dont l'inhibition a été confirmée.

Afin d'augmenter la sensibilité du test et donc de libérer plus de phosphate en utilisant le 2^{ème} stock d'enzyme, la quantité d'enzyme Ba-IspD a été multipliée par deux pour déterminer les

IC₅₀ de B4H08 et un nouveau stock de B1D02 a été acheté. Pour ces fragments, des gammes de concentrations comprises entre 0 et 400 µM pour B1D02 et 0 et 500 µM pour B4H08 ont été utilisées. Les résultats ont été concluants uniquement pour B1D02 avec la détermination d'une IC₅₀ de 158 µM (Figure 119).

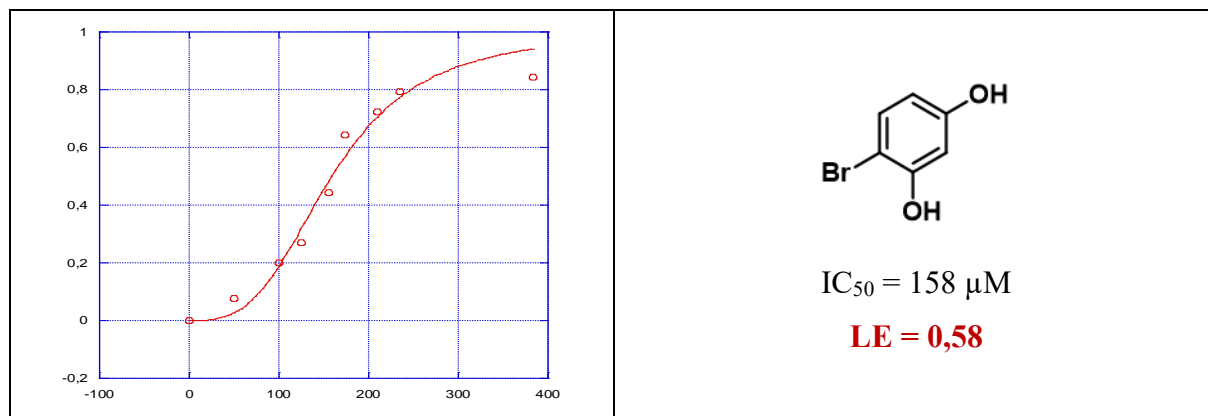


Figure 119 : Détermination de l'IC₅₀ et structure chimique du fragment B1D02.

Paramètres : $m_1 = IC_{50}$, $m_2 = \text{pente}$, $LE = (-RT \ln(IC_{50}))/HA$.

La différence de résultat entre les expériences réalisées avec le lot 1 (IC₅₀ = 58 µM) et le lot 2 (IC₅₀ = 158 µM) n'est pas surprenante. En effet, l'IC₅₀ n'est pas une valeur constante et dépend des conditions de l'expérience. Ici, la quantité d'enzyme a été doublée et le stock CTP n'est pas le même que pour la première expérience.

3.4 Conclusion

Après avoir sélectionné une vingtaine de fragment par SPR, des expériences de RMN-STD ont permis de confirmer l'interaction entre Ba-IspD et certains de ces fragments : B1B02, B1B10, B1D02, B3E01, B3H05, B4D12, B5E07, B5E12, B6D12. D'après les sensorgrammes obtenus en SPR, ces fragments ont des vitesses d'association et de dissociation rapides. La confirmation de l'interaction par RMN STD pour les autres fragments n'a pas été possible. Cela est dû soit à l'absence d'interaction, soit aux phases d'association et de dissociation des fragments qui sont trop lentes, soit que l'interaction a lieu au niveau de protons échangeables et cela empêche l'acquisition correcte des signaux STD.

En parallèle, la collaboration avec le Dr. Franck Borel de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble, a permis de résoudre la structure cristallographique de l'enzyme Ba-IspD avec et sans le CTP. Des co-cristallisations avec les fragments sélectionnées par SPR n'ayant pu aboutir, des expériences de Docking ont mis en évidence trois sites de fixation sur Ba-IspD. De plus, les fragments B4H08, B3D04, B6G02, B3A11, B5E12, B1H10 montrent des DS importants sur les différents sites identifiés.

Enfin, l'inhibition de 8 fragments B4H08, B3D04, B6G02, B1D02, B4B01, B6D12, B1B10 et B5E07 sur l'enzyme Ba-IspD a été démontrée à deux concentrations (200 μM et 1000 μM). Une première expérience de mesure de l' IC_{50} a été réalisée pour les fragments B4H08, B1D02 et B3D04 conduisant à des résultats encourageants de 59 μM , 58 μM et 130 μM et des valeurs de LE respectives de 0,41, 0,64 et 0,26 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{HA}^{-1}$. Pour les fragments B4H08 et B3D04, des valeurs de LE de 0,39 et 0,21 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{HA}^{-1}$ avaient été précédemment calculée à partir des K_D et sont en adéquation avec les résultats obtenus en remplaçant les K_D par les IC_{50} . Pour le fragment B1D02 montrant un K_D approximatif de 3,08 mM, une valeur de LE de 0,38 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{HA}^{-1}$ a été calculée à partir de ce K_D . Cette valeur est beaucoup plus faible que la valeur de 0,64 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{HA}^{-1}$ déterminée à partir de la valeur de l' IC_{50} .

Par la suite, des tests d'inhibitions avec deux fois plus de quantité d'enzymes ont été effectués afin d'améliorer la limite de détection et de pouvoir déterminer une IC_{50} de façon plus reproductible. Par cette méthode, une IC_{50} de 158 μM a été mesurée de façon reproductible ($n = 3$) pour le fragment B1D02 avec un LE de 0,58 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{HA}^{-1}$ qui est proche de la valeur précédemment déterminée en utilisant l' IC_{50} de la première expérience ($\text{IC}_{50} = 58 \mu\text{M}$). Cette valeur de LE élevée peut être un avantage pour son optimisation vers un candidat médicament.

En effet, l'inhibition de ce fragment est déjà importante pour un fragment avec si peu d'atomes lourds. L'ajout de nombreux atomes lourds pour tenter d'améliorer son affinité va probablement diminuer son LE vers une valeur minimale de $0,3 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$ qui est idéale pour un composé avec de bonnes propriétés ADME¹⁴³.

Les fragments B4B12 (stock épuisé) et B3A11 (slow binding) ont montré des inhibitions intéressantes mais ils n'ont pas été sélectionnés. Des études supplémentaires d'inhibition pourront être réalisées afin de déterminer leur potentiel d'inhibition et de confirmer leur intérêt pour le développement vers un candidat médicament.

En se basant sur ces différents résultats (SPR, RMN, Docking et cinétique), les fragments B1D02, B3D04, B6D12, B6G02 ont été sélectionnés. Ces fragments clés servent de modèle de départ pour concevoir des molécules plus grandes afin d'augmenter leur pouvoir d'inhibition. Ce travail est décrit dans le chapitre suivant.

3.5 Partie expérimentale

3.5.1 Spectroscopie RMN STD

3.5.1.1 Enregistrement des spectres

Les spectres ont été enregistrés à 25°C avec un spectromètre Bruker 500 MHz. Le programme STD utilisé est le `stddiffesgp.3` fourni par Bruker (Figure 120).

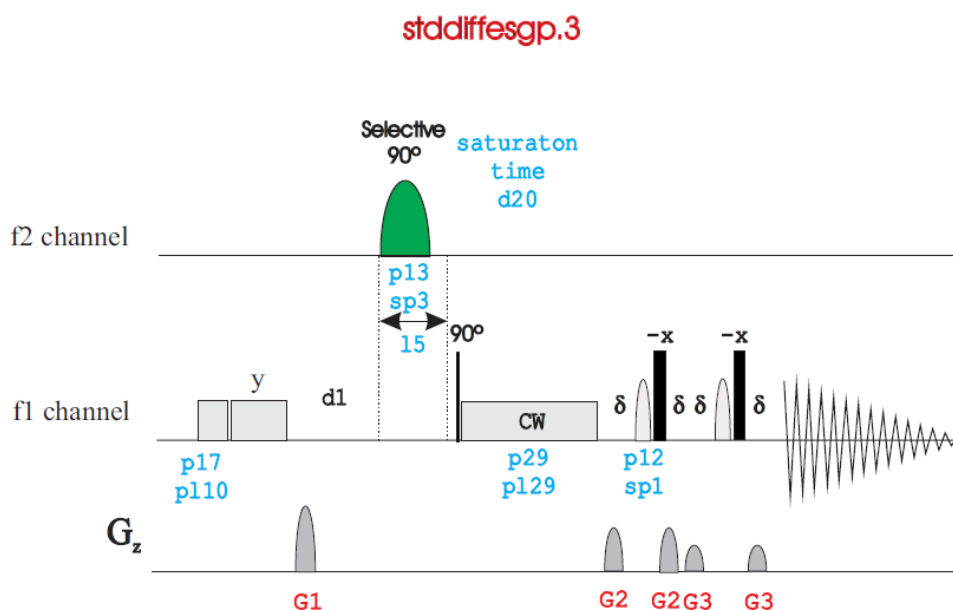


Figure 120 : Séquence de l'analyse RMN STD `stddiffesgp` fourni par Bruker²³⁵.

La saturation sélective de l'enzyme Ba-IspD est réalisée par une succession d'impulsions de forme Gaussienne de 40 ms, pour un temps de saturation de 2 sec.

Le programme d'impulsion pour supprimer le signal de l'eau est « excitation sculpting ».

Les fréquences sélectives de l'enzyme ont été choisies entre 377-415 Hz et 3400-3435 Hz avec 256 à 4736 scans accumulés pour chaque expérience de STD (dépend de l'intensité du signal de chaque analyte) (Tableau 29). Pour une expérience de 256 scans, 52 minutes sont nécessaires.

L'irradiation du spectre Off résonance est effectué à -1500 Hz (-3 ppm). Les spectres de saturation On et Off résonance sont collectés successivement à chaque scans.

Un délai de 3s entre chaque FID permet de s'assurer d'une relaxation totale de l'analyte.

La diminution du signal (spectre RMN-STD), résultant du transfert de saturation de l'enzyme à l'analyte, est évaluée par la soustraction entre le spectre Off-résonance et le spectre On-résonance avec le logiciel MestReNova.

Analytes	Saturation de la protéine : On (Hz)	Saturation de la protéine : Off (Hz)	Nombre de scans	Temps d'acquisition (min)
CTP	402	-1500	1600	320
B3F10	402	-1500	1536	307
	3400		1152	230
B1B10	409	-1500	256	50
	3386			50
B1B04	400	-1500	512	102
B1B02	410	-1500	512	102
B1D02	410	-1500	512	102
B5E06	3435	-1500	512	102
			3840	768
B6D12	415	-1500	512	102
B5E07	383	-1500	512	102
B3H05	377	-1500	1600	380
			4096	818
B4D12	411	-1500	512	102
			4736	948
B5E12	383	-1500	512	102
			4096	818
B3D04	386	-1500	4096	818
B3E01	382	-1500	3968	794
B4H08	390	-1500	512	102
			4096	818
B4B12	390	-1500	512	102
			4096	818
B1H10	390	-1500	512	102
			4096	818
B5G02	350	-1500	512	102
			4096	818
B3E03	409	-1500	512	102
			4096	818

Tableau 29 : Récapitulatif des paramètres d'analyses.

3.5.1.2 Préparation des échantillons

L'enzyme IspD de *Bacillus anthracis* (Ba-IspD) a été produite et purifiée au laboratoire (cf. Chapitre II). Le CTP (CAS : 36051-68-0) a été achetée chez Jena Bioscience. Le Glucose (CAS : 50-99-7), le D₂O 99,8 % (CAS : 7789-20-0) et le DMSO-*d*₆ 99,8 % en ampoule de 0,75 ml (CAS : 2206-27-1) proviennent de Sigma.

Préparation du tampon phosphate D₂O :

Une solution tampon phosphate (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, pH 7,4) dans le D₂O a été préparée selon la publication de Krężel et Bal²³⁶ qui décrit les conditions pour avoir un pH à 7,4 dans du D₂O.

Préparation de l'enzyme Ba-IspD dans le tampon phosphate D₂O :

L'enzyme Ba-IspD est stockée dans un tampon Tris HCl 50mM à pH 8,0. Un lot d'enzyme à 12 mg/ml (V= 1 ml) stocké à -80°C a été utilisé. Le tampon a été changé à l'aide d'une membrane de filtration ayant un seuil de coupure de 10 kDa (Amicon Ultra 10K, Merck). Six centrifugations ont été réalisées successivement (10 000 g pour 10 min) permettant d'enlever 300 µl de tampon et de le remplacer par 300 µl de D₂O à chaque cycle.

Préparation de l'échantillon pour la RMN STD :

- **Test avec le CTP :** Le test a été réalisé dans un tube RMN de 5 mm pour un volume total de 600 µl dans le tampon phosphate D₂O précédemment préparé (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, pH 7,4). Le tube contient du DMSO-*d*₆ (2,5 %), du CTP (250 µM) et du glucose (250 µM). L'enzyme Ba-IspD (12,5 µM) a été ajoutée après l'acquisition d'un premier spectre ¹H.
- **Test avec les fragments :** Le test a été réalisé dans un tube RMN de 5 mm pour un volume total de 600 µl dans le tampon phosphate D₂O précédemment préparer (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, pH 7,4). Le tube contient du DMSO-*d*₆ (2,5 %), le fragment (250 µM) et du glucose (250 µM). L'enzyme Ba-IspD (12,5 µM) a été ajoutée après l'acquisition d'un premier spectre ¹H.

3.5.2 Expériences de docking.

Le docking *in silico* a été réalisé par le Dr. Franck Borel (IBS Grenoble) en utilisant la suite de Schrödinger (Schrödinger LLC, New York, NY, USA). La structure RX de l'apoenzyme Ba-IspD à 2,35 Å de résolution a été utilisée pour ces expériences. La structure de la protéine a été préparée à l'aide du « Protein preparation wizard tool ». Les structures 3D des ligands et les différents tautomères ont été produits avec LigPrep. Le site de liaison du CTP a été utilisé pour générer les grilles de docking, avec trois zones de docking différentes de 10 Å x 10 Å x 10 Å, 25 Å x 25 Å x 25 Å et 35 Å x 35 Å x 35 Å centrées sur le site du substrat CTP. Aucune contrainte comme les liaisons hydrogènes ou la position des atomes n'a été appliquée pour guider le docking. Tous les composés ont été dockés en utilisant Glide en mode extra précision (XP).

3.5.3 Cinétique

L'enzyme Ba-IspD est stockée dans un tampon Tris HCl 50 mM à pH 8,0. Des lots d'enzymes à 6 mg/ml et 1,48 mg/ml, stockée à -80°C, ont été utilisés. Le MEP a été synthétisé au laboratoire par le Dr. Philippe Chaignon^{237,238}. Le CTP (CAS : 36051-68-0) a été acheté chez Jena Bioscience ou chez Sigma. Le DTT (CAS : 3483-12-3), la pyrophosphatase de levure (CAS : 9024-82-2 ; I1643-100UN), le standard phosphate (CAS : 7558-79-4), le vert de Malachite (CAS : 123333-61-9), le molybdate d'ammonium (CAS : 12054-85-2) et le DMSO sec $\leq 0,02\%$ d'eau (CAS : 67-68-5) proviennent de Sigma.

3.5.3.1 Préparation du réactif colorant.

Une solution de vert de malachite est préparée en ajoutant de l'acide sulfurique concentré (60 ml) à de l'eau (300 ml) suivi de l'addition d'une poudre de vert de malachite (440 mg).

Du molybdate d'ammonium (67,5 mg) solubilisé dans de l'eau milliQ® (1 ml) est ajouté à la solution de vert de malachite (4 ml). Une solution de Tween 20 à 11 % (50 μ l) est ajoutée au mélange.

3.5.3.2 Réalisation de la droite d'étalonnage du phosphate.

À partir d'une solution standard commerciale de phosphate (7,04 mM), une solution stock de phosphate à 40 μ M a été préparée. À partir de cette dernière, des solutions à 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 μ M ont été préparées dans un volume total de 400 μ l de tampon Tris HCl (50 mM, pH 8,0 ; 5 mM de MgCl₂). La préparation des solutions diluées est décrite dans le Tableau 30.

Concentration Pi (μ M)	0	4	6	8	10	12	14	18
Volume solution mère (μ l)	0	40	60	80	100	120	140	180
Volume de tampon (μ l)	400	360	340	320	300	280	260	220

Tableau 30 : Préparation des solutions de phosphate pour la courbe d'étalonnage.

3.5.3.3 Test d'activité de la pyrophosphatase

Une solution A contenant du MgCl₂ (1 mM), du pyrophosphate (50 μ M) et de la pyrophosphatase inorganique (133,5 mU/ml) a été préparée dans un volume final de 1500 μ l de tampon Tris HCl (50 mM, pH 8,0).

La solution est incubée à 30°C puis 40 μ l de réaction sont prélevés au bout de 2 min, 5 min et 10 min d'incubation. Ces 40 μ l sont ajoutés à 360 μ l de tampon Tris HCl (50 mM, pH 8,0) auxquels sont ajoutés 100 μ l de réactif colorant. Après 10 min d'incubation à 30°C, la densité

optique (DO) à 630 nm est lue sur un spectrophotomètre UV-visible Genesys 150 (Thermoscientific). La concentration en phosphate est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

3.5.3.4 Les tests cinétiques classiques

➤ Procédure générale :

Les réactions sont réalisées dans un tampon Tris HCl (50mM, MgCl₂ 5mM, pH 8,0, volume total de 400 µl). La solution contenant tous les composés sauf l'enzyme Ba-IspD est pré-incubée à 30°C pendant 2 min avant l'ajout de cette enzyme. La réaction est incubée à 30°C pendant 8 min avant l'ajout de 100 µl de réactif coloré. Après une incubation de 10 min, la DO₆₃₀ est lue. Un contrôle est préparé en parallèle avec tous les constituants sauf l'enzyme Ba-IspD et sert de blanc de réaction. La DO₆₃₀ mesurée du blanc est soustraite aux DO₆₃₀ du test cinétique. La concentration en phosphate est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

➤ Détermination de l'activité de Ba-IspD et l'influence du DMSO :

Afin de déterminer l'influence du DMSO sur l'activité de Ba-IspD, deux réactions sont réalisées en présence de 0 % et 1 % en DMSO. Chaque réaction contient : CTP (0,2 mM), MEP (0,05 mM), DTT (1 mM), pyrophosphatase inorganique (133,5 mU/ml). Ba-IspD (20 µl - 0,004 µg) a été ajoutée pour initier la réaction.

➤ Tests d'inhibition des fragments sur Ba-IspD :

Afin de déterminer l'inhibition des fragments, deux réactions ont été réalisées avec des concentrations de 200 µM et 1000 µM en fragment. Chaque réaction contient : CTP (0,21 mM), MEP (0,05 mM), DTT (1 mM), pyrophosphatase inorganique (133,5 mU/ml). Ba-IspD (20 µl - 0,004 µg ou 0,008 µg) a été ajoutée pour initier la réaction.

➤ Détermination de l'IC₅₀ :

Afin de déterminer la valeur de l'IC₅₀ de chaque fragment, l'expérience est réalisée comme précédemment, avec différentes concentrations de fragment comprises entre 10 µM et 1000 µM pour couvrir la gamme dans laquelle se trouve l'IC₅₀.

3.5.3.5 Test de l'inhibition des fragments sur la pyrophosphatase

➤ Procédure générale :

Les réactions sont réalisées dans un tampon Tris HCl (50 mM, pH 8,0) dans un volume total de 400 μ l. La réaction est incubée à 30°C pendant 8 min avant l'ajout de 100 μ l de réactif coloré. Une incubation de 10 min est effectuée avant de lire la DO₆₃₀. Un contrôle est préparé en parallèle avec tous les constituants sauf la pyrophosphatase et sert de blanc de réaction. La valeur de la DO₆₃₀ mesurée du blanc est soustraite aux valeurs des DO₆₃₀ de chaque test. La concentration en phosphate est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

➤ Tests d'inhibition des fragments sur la pyrophosphatase :

Afin de déterminer si les fragments inhibent la pyrophosphatase, deux réactions sont effectuées avec 0 μ M de fragment et à 200 μ M en fragment en présence de 1 % en DMSO. Chaque réaction contient : PPI (0,2 mM), MgCl₂ (1 mM) et la pyrophosphatase inorganique (31,9 μ l - 19,925 mU/ml) a été ajoutée pour initier la réaction.

3.5.3.6 Les tests d'activité en association lente (Slow binding)

Les réactions sont réalisées dans un tampon Tris HCl (50mM, MgCl₂ 5mM, pH 8,0, volume total de 400 μ l). La réaction contenant du DTT (1 mM), de la pyrophosphatase inorganique (133,5 mU/ml) et Ba-IspD (20 μ l - 0,004 μ g) est pré-incubée 10 min en présence du fragment (200 μ M) à tester, avant l'ajout de l'initiateur composé d'une solution de CTP (0,21 mM) et de MEP (0,05 mM). La réaction est incubée à 30°C pendant 8 min avant l'ajout de 100 μ l de réactif coloré. Une incubation de 10 min est effectuée avant de lire la DO₆₃₀. Un contrôle est réalisé avec tous les constituants excepté Ba-IspD et sert de blanc de réaction. La DO₆₃₀ mesurée du blanc est soustraite aux DO₆₃₀ du test cinétique. La concentration en phosphate est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

Chapitre 4

Développement de nouvelles
molécules à partir de
fragments clés

4. Développement de nouvelles molécules à partir de fragments clés

L'approche par fragment débute par le criblage d'une librairie de fragments sur une cible donnée et se termine par l'évolution des fragments sélectionnés afin d'augmenter leurs affinités pour la cible. Cette dernière étape consiste à faire évoluer par synthèse des fragments clés, à les agrandir afin d'augmenter le nombre d'interaction et ainsi améliorer leur affinité avec l'enzyme. Une approche d'évolution de fragment a été mise en place en ajoutant des groupements hydrophobes aux quatre fragments sélectionnés dans les chapitres précédents. Cette stratégie de synthèse permet de déterminer s'il existe des sites hydrophobes autour du site de liaison du fragment sélectionné à l'enzyme Ba-IspD et d'utiliser cette propriété pour augmenter l'affinité.

4.1 Pourquoi choisir ces fragments clés ?

Le meilleur fragment B4H08 montrant un K_D de 104 μM , une inhibition de l'enzyme ($\text{IC}_{50} = 58 \mu\text{M}$, $n = 1$) et un bon résultat de docking de -9,9 dans le site F, n'a pas été sélectionné au regard de la complexité de sa synthèse et de l'avancée de ma thèse. En effet, une voie de synthèse de la molécule 1,2,3,5,6,7-Hexahydro-4H-1,5-benzodiazonin-4-one correspondant au fragment B4H08 a été décrite par Klapars *et al*²³⁹ (Schéma 11). Cette synthèse implique une réaction de couplage C-N par une catalyse au cuivre suivie d'une étape d'expansion de cycle passant par une réaction de transamidation intramoléculaire à partir du 2-(2-bromophényl)éthanamine et du 2-azétidinone (β -lactame).

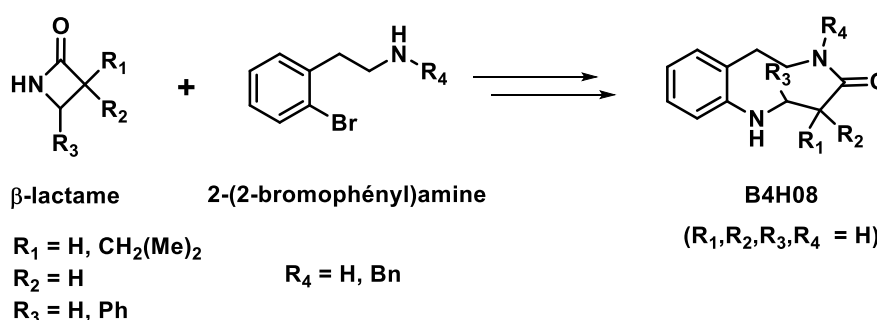
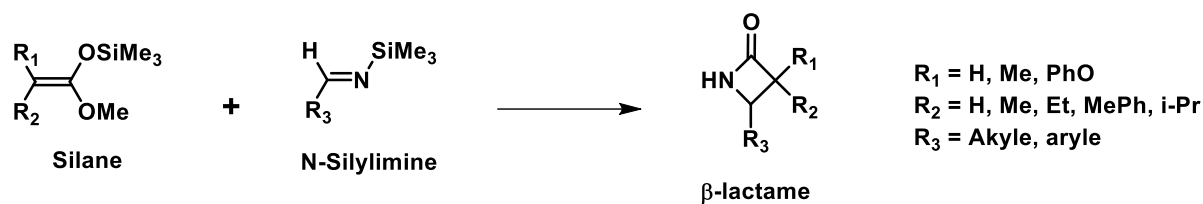


Schéma 11 : Synthèse du fragment B4H08 décrit par Klapars *et al*²⁰⁹.

Afin d'optimiser le fragment, des dérivés doivent être rapidement accessible mais cette méthode de synthèse nous contraint à repartir des réactifs β -lactame et 2-(2-bromophényl)amine. Or, la synthèse de ce β -lactame nécessite deux réactifs, une N-silylimine²⁴⁰ (Base de Schiff) et un silane qui sont relativement long et coûteux à produire²⁴¹ et dont les substituants possibles (R₁, R₂ et R₃) décrits dans la littérature sont limités (Schéma 12).


 Schéma 12 : Synthèse du composé β-lactame décrit par Colvin et al²⁴¹.

Ainsi, d'autres fragments plus accessibles, B3D04, B6D12, B1D02 et B6G02 (Tableau 31) ont été sélectionnés en examinant les différents résultats obtenus par SPR, STD, docking et cinétique enzymatique. Ces différents résultats ont été résumés dans le Tableau 31. De plus, la sélection des fragments a tenu compte des groupements fonctionnels présents sur le fragment afin de les optimiser facilement.

Analyses Composés	SPR	STD	Docking	Cinétique
CTP 	$K_D = 10^{-5} \text{ M}$ $BE_3 = 1,71 \text{ mM}^{-1}$	✓	$DS_F = -6$ $DS_Y = -10$ $DS_{CTP} = -11$	/
B3D04 	$K_D = 10^{-4} \text{ M}$ $BE_3 = 0,82 \text{ mM}^{-1}$	✗	$\overline{DS}_F = -11$ $\overline{DS}_Y = -8$ $\overline{DS}_{CTP} = -7$	$IC_{50} = 130 \mu\text{M}$ (Exp. 1)
B6D12 	$K_D = 10^{-3} \text{ M}$ $BE_3 = 0,54 \text{ mM}^{-1}$	✓	$DS_F = -7$ $DS_Y = -5$ $DS_{CTP} = -7$	% Inhibition : 73 % à 200 μM (Exp. 1) 87 % à 1000 μM (Exp. 2)
B1D02 	$K_D = 10^{-3} \text{ M}$ $BE_3 = 0,36 \text{ mM}^{-1}$	✓	$DS_F = -6$ $DS_Y = -5$ $DS_{CTP} = -5$	$IC_{50} = 58 \mu\text{M}$ (Exp. 1) $IC_{50} = 158 \mu\text{M}$ (Exp. 2)
B6G02 	$K_D \approx 10^{-2} \text{ M}$ $BE_3 \approx 0,24 \text{ mM}^{-1}$	Non Analysé	$DS_F = -7$ $DS_Y = -7$ $DS_{CTP} = -11$	% Inhibition : 86 % à 200 μM (Exp. 1) 88 % à 1000 μM (Exp. 2)

Tableau 31 : Résumé des résultats obtenus sur Ba-IspD pour le CTP et les quatre fragments, B3D04, B6D12, B1D02, B6G02 par : SPR, STD, docking et cinétique. Le Docking a été effectué en Induced fit pour les fragments et en XP (enzyme fixe) pour le CTP, les données ne sont pas comparables entre-elles car différents logiciels ont été utilisés. Exp.1 : lot d'enzyme 1, Exp.2 : lot d'enzyme 2.

Les résultats du fragment B3D04 ont montré une affinité de l'ordre de 10^{-4} M en SPR et une IC_{50} de 130 μ M (un seul réplica). De plus, les résultats du docking indiquent différentes orientations possibles de ce fragment et de ses isomères dans les trois sites de liaison. Malgré l'absence de signal STD due à une association et une dissociation lente, ce fragment a été sélectionné comme fragment de départ pour l'évolution de fragment. La fonction alcool et l'azote permettent plusieurs possibilités d'évolution de ce fragment.

Le fragment B6D12 a un K_D de 10^{-3} M et présente des pourcentages d'inhibition supérieurs à 70 % à des concentrations de 200 μ M et 1000 μ M (1 seul réplica). Une confirmation de l'interaction entre Ba-IspD et ce fragment a été possible par STD et le docking a révélé un DS de -7 sur les deux sites F et CTP. La fonction acide carboxylique peut permettre d'obtenir différents dérivés.

Le fragment B1D02 est le seul fragment pour lequel une IC_{50} a pu être déterminée en triplicata avec une valeur de 158 μ M. De plus, les résultats de SPR démontrent une affinité de l'ordre du millimolaire avec une efficacité de liaison (BE) de $0,36 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{Da}^{-1}$ et l'interaction avec Ba-IspD a été confirmée par STD. C'est une molécule avec deux fonctions phénols qui peuvent être facilement fonctionnalisées par estérification.

Pour le fragment B6G02, un DS de -11 pour le site CTP a été obtenu. De plus, des premières expériences ont démontré une potentielle inhibition de la réaction enzymatique catalysée par Ba-IspD avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 80 % à des concentrations de 200 μ M et 1000 μ M. L'atome d'azote permet plusieurs possibilités d'évolution de ce fragment.

4.2 Stratégie d'évolution des fragments clés

4.2.1 Précurseurs pour optimiser les fragments clés par synthèse

Dans le but de synthétiser un maximum de molécules en peu de temps et à moindre coût, des molécules de départ similaires aux fragments ont été achetées (Figure 121).

La stratégie d'optimisation des fragments que nous avons retenue est basée sur la formation d'une liaison amide entre les précurseurs qui possèdent une fonction amine et des molécules commerciales portant une fonction acide carboxylique. Les synthons (1) et (4) des fragments B6G02 et B1D02 ont été achetés mais pour les fragments B3D04 et B6D12 des étapes de synthèses ont été nécessaires pour accéder aux synthons (5) et (6) (Figure 121).

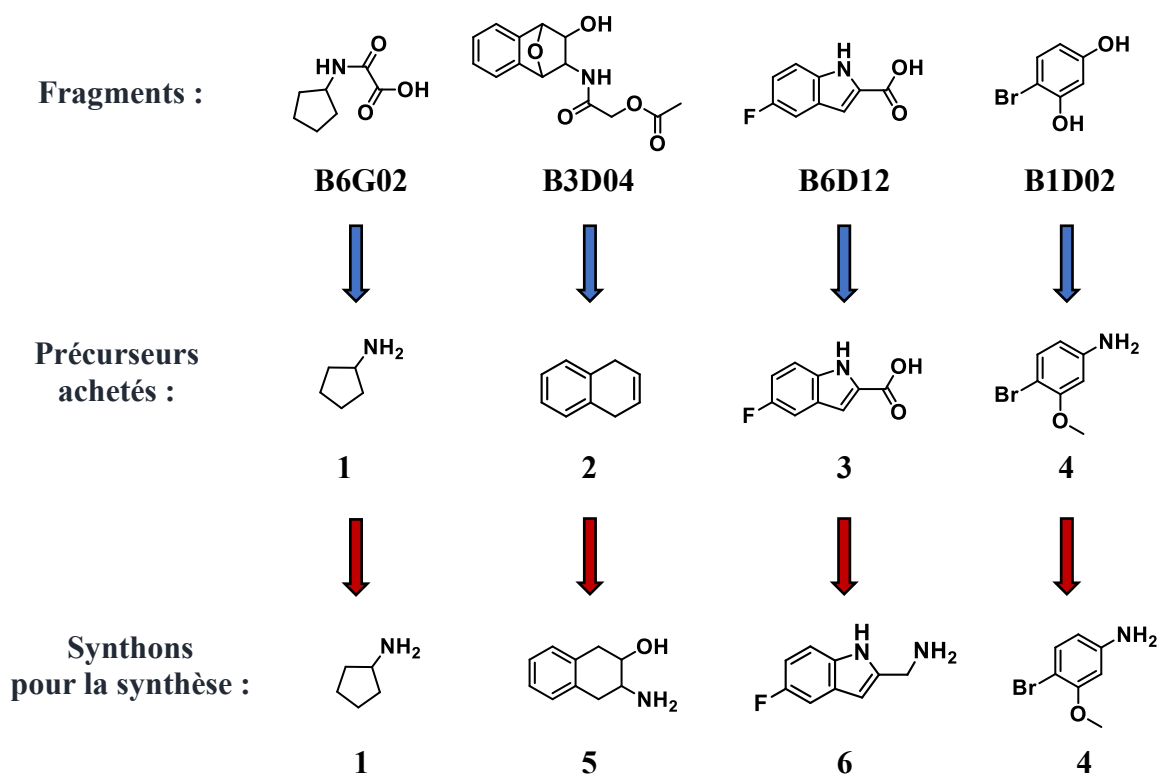


Figure 121 : Précurseurs pour l'évolution des fragments choisis.

4.2.1.1 Synthèse des précurseurs non commerciaux

a) Analogue du fragment B3D04 :

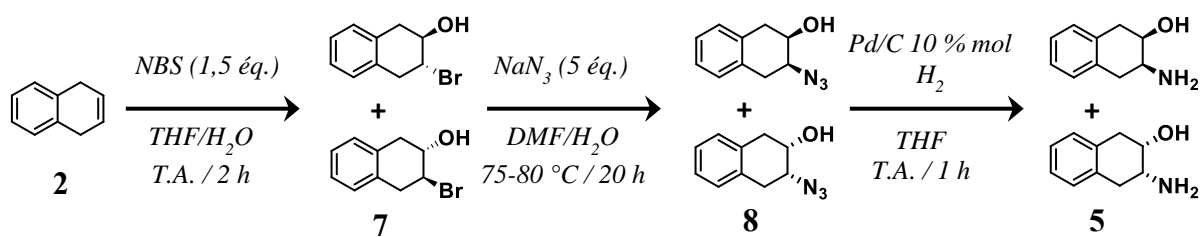


Schéma 13 : Stratégie de synthèse du précurseur pour la synthèse des analogues du fragment B3D04.

Cette stratégie de synthèse a permis d'obtenir le composé (**5**) en trois étapes à partir de l'alcène correspondant (**2**). En effet, le 1,4-dihydronaphtalène (**2**) réagit avec le NBS pour former un pont bromonium qui après addition d'eau conduit à deux isomères de la molécule (**7**) avec une stéréochimie *anti*²⁴². Le brome est ensuite substitué *via* une substitution nucléophile d'ordre deux afin d'obtenir l'azoture²⁴³ correspondant (**8**) qui est ensuite réduit par hydrogénation en

présence de palladium sur charbon pour conduire à l'amine (**5**). La succession de ces trois réactions a permis d'obtenir le couple d'énantiomère (**5**) avec un rendement global de 41 %.

b) Analogue du fragment B6D12 :

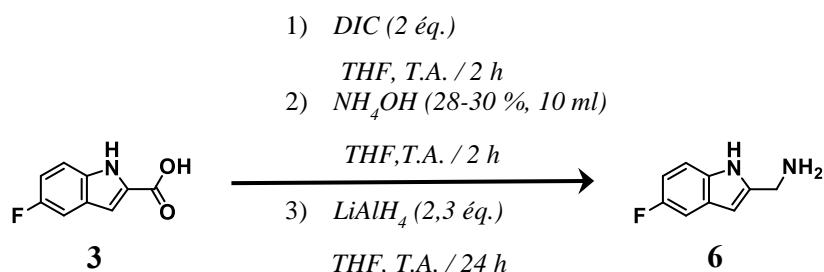


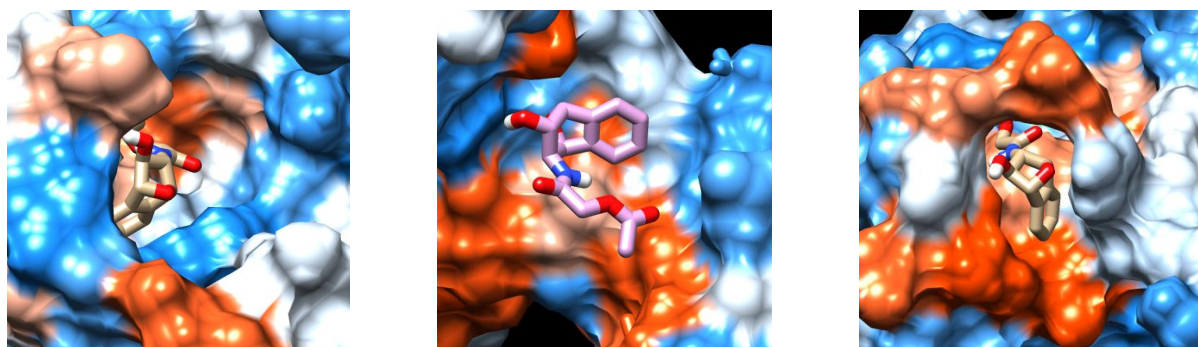
Schéma 14 : Stratégie de synthèse du précurseur pour la synthèse des analogues du fragment B6D12.

La synthèse du précurseur amine (**6**) a été réalisée en un seul pot (one-pot) à partir de l'acide carboxylique correspondant (**3**)²⁴⁴. L'acide (**3**) s'est additionné au diisopropylcarbodiimide (DIC) pour activer l'acide. Puis, l'addition d'une solution d'ammoniaque permet la formation de la fonction amide. Le précipité est ensuite solubilisé dans du THF puis l'amide est réduit en amine (**6**) par l'hydrure d'aluminium avec un rendement après purification de 75 %.

4.2.1.2 *Des acides carboxyliques choisis et leurs caractéristiques*

La synthèse des nouvelles molécules, issues des fragments sélectionnés, est réalisée à l'aide de différents acides carboxyliques *via* la formation d'une liaison amide avec les précurseurs amines précédemment décrits.

Le choix des acides carboxyliques a été orienté vers des composés hydrophobes après avoir analysé la surface des trois sites de fixation des fragments sur Ba-IspD avec le logiciel Chimera (version 1.10.2). Un exemple est illustré en Figure 122 avec le fragment B3D04, qui présente les meilleurs DS pour les trois sites (Tableau 31), en montrant sa position dans les trois sites de fixation : CTP, Y203 et F108. Le caractère hydrophobe de la surface est représenté par la couleur rouge et a été calculé à partir du logiciel Chimera et du programme « hydrophobicity surface ». Pour chacun de ces trois sites, la présence de surface hydrophobe (rouge, Figure 122) est observée aux alentours du fragment B3D04. Ainsi, l'ajout de groupements hydrophobes sur ce fragment et les autres fragments pourrait améliorer leurs affinités. Le site CTP possède également des surfaces hydrophobes proches de la poche du CTP ainsi, l'ajout de chaînes hydrophobes suffisamment longues pourrait améliorer l'affinité des fragments pour ce site.



Site CTP

Site Y203

Site F108

Figure 122 : Les différents sites de fixation du fragment B3D04 révélés par docking. La couleur va du bleu pour la surface la plus hydrophile, à blanc, à orange-rouge pour les surfaces les plus hydrophobes. Images réalisées avec le logiciel Chimera à partir du docking.

La disponibilité et le prix d'achat a également guidé le choix des différentes molécules hydrophobes. Dans la Figure 123 sont illustrés les acides carboxyliques aliphatiques (composés de 4 à 8 atomes de carbones) et aromatiques sélectionnés (Figure 123).

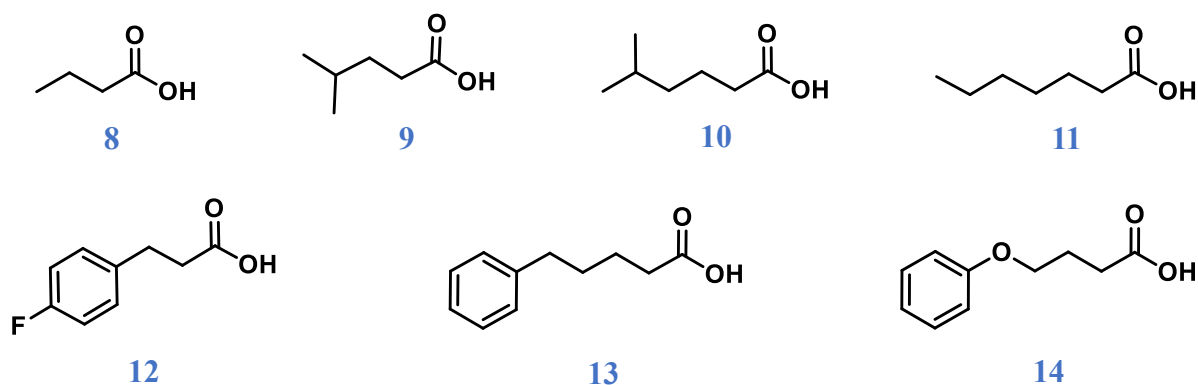


Figure 123 : Représentation des sept acides carboxyliques mis en jeu lors des couplages.

Les molécules possédant un groupement aromatique (**12**) à (**14**) permettent également de sonder des sites hydrophobes et peuvent potentiellement créer des interactions π - π avec les groupements aromatiques des acides aminés Tyrosine (Y), Phénylalanine (F) et Tryptophane (W) de l'enzyme Ba-IspD. D'après les résultats du docking et les DS associés (cf. 3.2.2.2, Tableau 25, p. 139) les fragments interagissent avec les résidus Y203 et F108 de l'enzyme Ba-IspD. De plus, dans la Figure 122, des zones hydrophobes (surface rouge) sont présentes dans les trois sites de fixation. Ainsi, l'ajout d'un groupement hydrophobe pourrait augmenter l'affinité de la nouvelle molécule pour sa cible au niveau des trois sites de liaison et de ce fait augmenter son potentiel d'inhibition par rapport au fragment de départ.

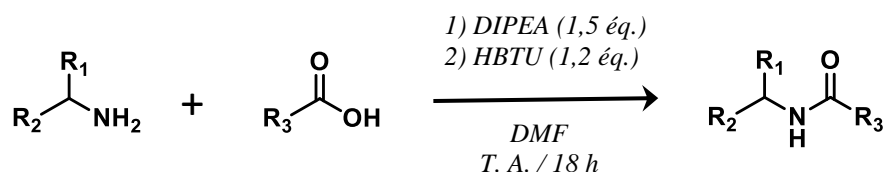
La molécule (**12**) a la particularité d'avoir un atome de Fluor présent sur le cycle aromatique. L'ajout de cet atome peut modifier les propriétés physiques et biologiques (solubilité, miscibilité, lipophilie) et augmenter la stabilité métabolique de la molécule²⁴⁵.

4.2.2 Méthodologie de synthèse

Les nouvelles molécules ont été synthétisées par couplage peptidique. Une liaison amide permet de relier les fragments ou leurs analogues aux différents acides à chaînes hydrophobes. Deux types de couplage ont été utilisés, un pour les amines primaires (**1**), (**5**), (**6**) et un autre pour le dérivé de l'aniline (**4**). En effet, la stratégie de couplage des amines (**1**), (**5**), (**6**) testée sur le dérivé aniline (**4**) n'ayant pas fonctionné, une nouvelle stratégie de synthèse a donc été choisie²⁴⁶. Par manque de temps, toutes les combinaisons amines/acides carboxyliques n'ont pas pu être testées.

4.2.2.1 Stratégie de couplage des amines (**1**), (**5**), (**6**)

Le couplage entre l'amine et l'acide carboxylique a été réalisé avec le *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-Tétraméthyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU) en présence de la base *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) (Schéma 15).



*Schéma 15 : Synthèse générale du couplage des amines (**1**), (**5**), (**6**) en présence de l'activateur HBTU.*

La base DIPEA permet d'obtenir la base conjuguée de l'acide carboxylique qui réagit sur l'HBTU pour conduire à la formation de l'ester activé 1 avec libération de la base conjuguée de d'HOBt. Cette dernière s'additionne sur le carbonyle de l'ester activé 1 pour former l'ester activé 2 plus stable que le précédent (Schéma 16). L'amine va s'additionner préférentiellement sur cet ester et conduire à l'amide désiré.

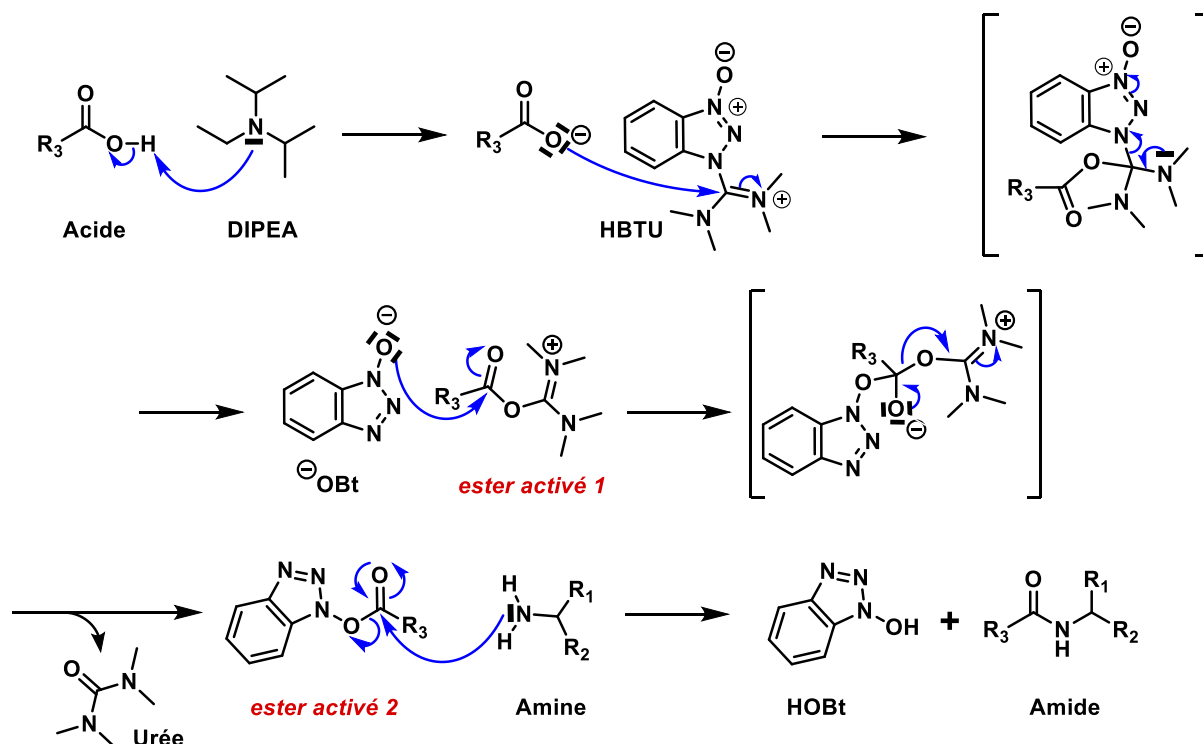


Schéma 16 : Mécanisme réactionnel du couplage entre l'amine et l'acide carboxylique en utilisant l'activateur $HBTU$ et la base $DIPEA$.

4.2.2.2 Stratégie de couplage de l'amine (4)

Le couplage entre l'amine et l'acide carboxylique a été réalisé à l'aide du 1-Hydroxybenzotriazole ($HOBT$) en présence du chlorhydrate carbodiimide 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC/HCl) (Schéma 17).

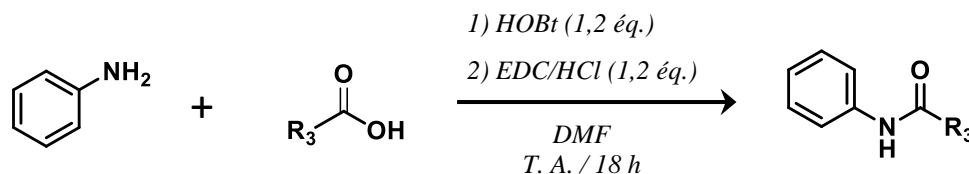


Schéma 17 : Synthèse générale du couplage des amines aromatiques (4) avec l'activateur $HOBT$.

Dans cette réaction, le carbodiimide (EDC) joue le rôle de base en déprotonant la fonction acide carboxylique mais aussi un rôle d'activateur qui permet d'obtenir l'intermédiaire réactionnel sur lequel $HOBT$ va s'ajouter pour former l'ester activé. L'addition de l'amine sur l'ester activé conduit à la formation de l'amide désiré (Schéma 18).

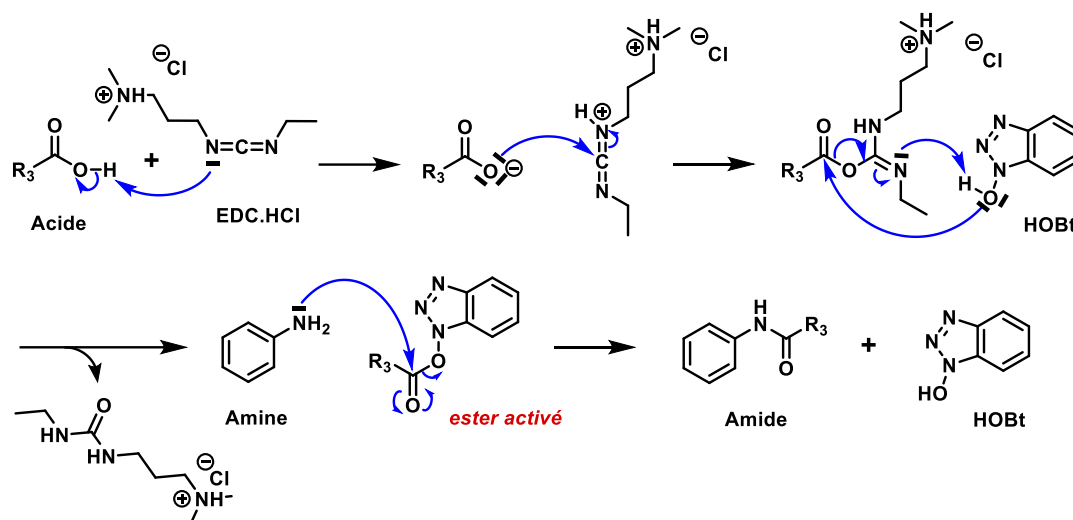


Schéma 18 : Mécanisme réactionnel du couplage entre une amine et un acide carboxylique en utilisant les activateurs EDC/HCl et HOBT.

4.3 Synthèses des nouvelles molécules dérivées des fragments clés

L'évolution des fragments B6G02, B1D02, B3D04 et B6D12 a été réalisée à partir d'analogues contenant une fonction amine (Figure 121) et différentes molécules hydrophobes contenant une fonction acide carboxylique (Figure 123). Les Figure 124 à 127 résument les différents couplages effectués pour chaque analogue de fragment et les acides carboxyliques choisis.

4.3.1 Analogues du fragment B6D12

Les couplages entre l'amine (**6**) et les acides carboxyliques (**8**, **10**, **12**, **13**, **14**) ont permis de synthétiser cinq molécules avec des rendements supérieurs à 85 % dont trois avec un cycle aromatique (**15**, **16**, **17**) et deux avec des chaînes aliphatiques (**18**, **19**) (Figure 124).

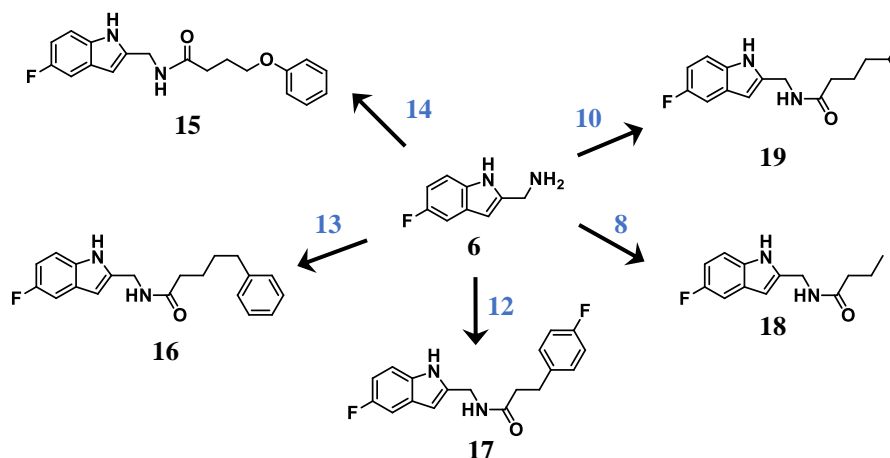


Figure 124 : Représentation des cinq molécules synthétisées à partir de l'amine (**6**).

4.3.2 Analogues du fragment B6G02

Les couplages à partir de l'amine (**1**) et les acides carboxyliques (**9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14**) ont permis de synthétiser six molécules avec des rendements supérieurs à 87 % dont trois avec un cycle aromatique (**20**, **21**, **22**) et trois avec des chaînes aliphatiques (**23**, **24**, **25**) (Figure 125).

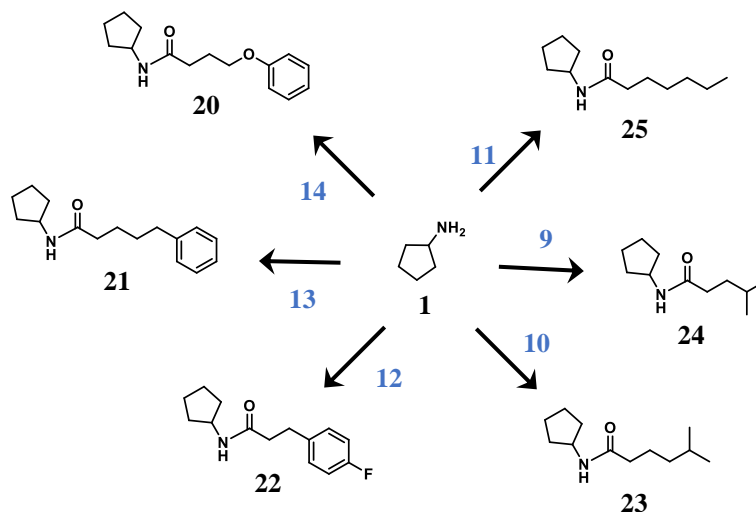


Figure 125 : Représentation des six molécules synthétisées à partir de l'amine (1).

4.3.3 Analogues du fragment B3D04

Les couplages entre l'amine (**5**) et les acides carboxyliques (**10**, **11**, **12**, **14**) ont permis de synthétiser quatre molécules avec des rendements supérieurs à 82 %, dont deux avec un cycle aromatique (**26**, **27**) et deux avec des chaînes aliphatiques (**28**, **29**) (Figure 126).

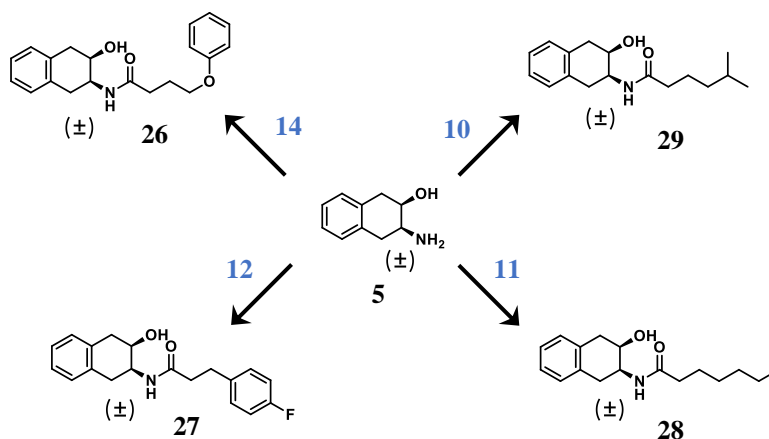


Figure 126 : Représentation des quatre molécules synthétisées à partir de l'amine (5).

4.3.4 Analogues du fragment B1D02

Les couplages à partir de l'amine (**4**) et les acides carboxyliques (**3**, **12**, **14**) ont permis de synthétiser trois molécules avec des rendements supérieurs à 77 %, dont deux avec un cycle aromatiques (**30**, **32**) et un avec un indole (**31**) ce dernier peut être considéré comme une fusion entre l'analogue du fragment B1D02 (**4**) et le fragment B6D12 (**3**) (Figure 127).

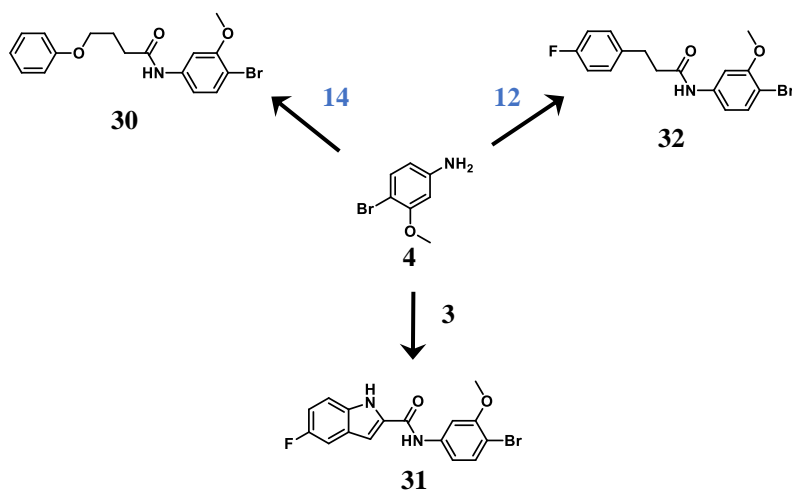


Figure 127 : Représentation des trois molécules synthétisées à partir de l'amine (**4**).

4.4 Conclusion

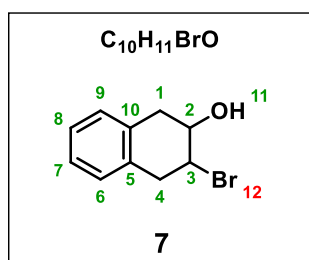
Les différents couplages peptidiques mis en œuvre permettent d'obtenir les molécules visées en 1 à 4 étapes avec de bons rendements. Ces nouvelles molécules avec des substituants hydrophobes plus ou moins encombrés et des groupements aromatiques vont être engagées dans des tests enzymatiques afin de déterminer leurs pouvoirs inhibiteurs sur Ba-IspD. Des analyses de docking pourront être entreprises pour déterminer le meilleur site de liaison potentiel pour chaque molécule sur Ba-IspD. Les résultats obtenus permettront d'orienter l'évolution de ces molécules, soit en gardant ces groupements hydrophobes soit en ajoutant des groupements plus hydrophiles. D'autres types d'acides carboxyliques pourraient être utilisés tels que des acides plus hydrophiles avec des groupements amine, alcool ou thiol.

Il serait également intéressant de synthétiser des analogues du meilleur fragment B4H08 qui a été écarté lors de l'évolution des fragments malgré son K_D de 104 μM . La synthèse du fragment B4H08 pourra être réalisée comme décrit par Klapars *et al*²³⁹. Des réactions de couplage entre ce fragment, qui possède une fonction amine et les différents acides carboxyliques pourraient être envisagées afin de faire évoluer ce fragment qui a montré les meilleurs résultats préliminaires.

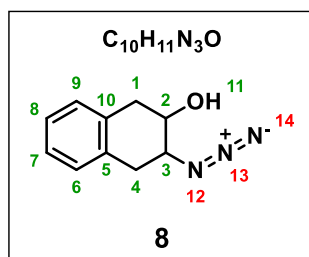
4.5 Partie expérimentale

Les solvants et les réactifs ont été achetés chez Sigma-Aldrich et TCI et utilisés sans purification préalable. Les réactions ont été suivies sur plaques de silice 60 F254 Merck (CCM) et les produits ont été révélés avec une lumière UV/visible à 254 nm et/ou avec une solution de ninhydrine dans l'éthanol. La silice de grade technique de 60 Å avec une taille de particule de 40-63 µm a été utilisée (Sigma, CAS : 112926-00-8) pour purifier les produits. Les spectres RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (126 MHz) ont été enregistrés sur un spectromètre Ascend™ 500 Bruker et analysés avec le logiciel MestReNova. Les déplacements chimiques ont été calibrés en fonction des solvants, CDCl_3 (^1H : 7,26 ppm ; ^{13}C : 77,16 ppm) et MeOD (^1H : 3,31 ppm ; ^{13}C : 49,00 ppm). La multiplicité des signaux est décrite avec s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) et m (multiplet). Les constantes de couplages sont données en Hertz (Hz) et ont été déterminées à l'aide du logiciel NMRnotebook.

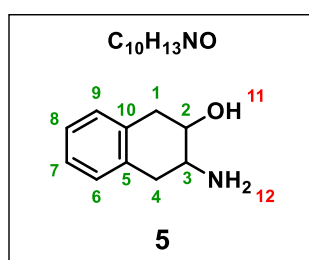
3-bromo-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène-2-ol (7)



Le 1,4-dihydronaphtalène (**2**) (1 éq, 200 mg, 1,54 mmol) est mis en solution dans du THF (10 ml). Le NBS (1,5 éq, 410 mg, 2,3 mmol) solubilisé dans H_2O (5 ml) est ensuite ajouté à 0°C à la solution précédente et le milieu réactionnel est agité pendant 2 h à température ambiante. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (3 x 10 ml). Les phases organiques sont combinées et séchées sur Na_2SO_4 puis concentrées sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié sur chromatographie sur colonne de silice avec l'éluant AcOEt/EP (10/90). Le produit (**7**) est obtenu sous la forme d'un solide blanc (318 mg, 91 %). R_F = 0,30 (10/90 ; AcOEt/EP). **RMN ^1H** (500 MHz, CDCl_3) : δ = 7.20 – 7.14 (m, 2H, H-7, H-8), 7.12 (m, 1H, H-6 ou H-9), 7.06 (m, 1H, H-6 ou H-9), 4.31 (td, J = 10.2, 5.6 Hz, 1H, H-3), 4.10 (td, J = 9.6, 5.8 Hz, 1H, H-2), 3.53 (dd, J = 16.7, 5.6 Hz, 1H, H-4), 3.39 (dd, J = 16.5, 10.7 Hz, 1H, H-4'), 3.34 (dd, J = 16.5, 5.7 Hz, 1H, H-1), 2.89 (dd, J = 16.6, 9.8 Hz, 1H, H-1'), 2.66 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-11). **RMN ^{13}C** (126 MHz, CDCl_3) : δ = 133.63 (C-5 ou C-10), 133.40 (C-5 ou C-10), 129.12 (C-6 ou C-9), 127.92 (C-6 ou C-9), 126.78 (C-7 ou C-8), 126.53 (C-7 ou C-8), 71.60 (C-2), 56.94 (C-3), 39.19 (C-4), 36.31 (C-1).

3-azido-1,2,3,4-tétrahydronaphthalèn-2-ol (8)

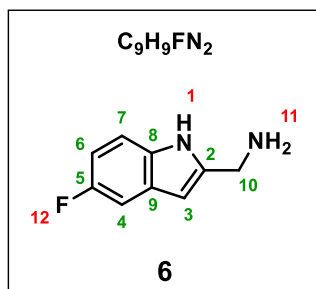
Une solution de NaN_3 (5 \u00e9q , 429 mg, 6,6 mmol) dans l'eau (3 ml) est ajout\u00e9e \u00e0 une solution de 3-bromo-1,2,3,4-t\u00e9trahydronaphthal\u00e8n-2-ol (**7**) (1 \u00e9q, 300 mg, 1,32 mmol) r\u00e9actionnel dans du DMF (15 ml). La solution est chauff\u00e9e \u00e0 75-80\u00b0C pendant 20 h. Le milieu est lav\u00e9 avec de l'eau (200 ml) et extrait avec du CH_2Cl_2 (3 x 20 ml). Les phases organiques sont s\u00e9ch\u00e9es sur Na_2SO_4 , filtr\u00e9es puis co-\u00e9vapor\u00e9es avec du tolu\u00e8ne. Le produit (**8**) est purifi\u00e9 sur chromatographie sur colonne de silice \u00e9lu\u00e9e avec AcOEt/EP (10/90). Le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc (117 mg, 47 %). $R_F = 0,63$ (30/70 ; AcOEt/EP). **RMN ^1H** (500 MHz, CDCl_3) : $\delta = 7.22$ -7.05 (m, 4H, H-6, H-7, H-8, H-9), 3.92 (tdd, $J = 9.3, 5.7, 3.2$ Hz, 1H, H-2), 3.74 (td, $J = 10.0, 5.7$ Hz, 1H, H-3), 3.25 (dd, $J = 8.5, 5.7$ Hz, 1H, H-4), 3.22 (dd, $J = 8.7, 5.8$ Hz, 2H, H-1), 2.89 (t, $J = 11.4$ Hz, 1H, H-4'), 2.86 (t, $J = 11.2$ Hz, 1H, H-1'), 2.43 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-11). **RMN ^{13}C** (126 MHz, CDCl_3) : $\delta = 133.44$ (C-5 ou C-10), 132.65 (C-5 ou C-10), 129.12 (C-6 ou C-9), 128.71 (C-6 ou C-9), 126.81 (C-7 ou C-8), 126.63 (C-7 ou C-8), 70.62 (C-2), 63.82 (C-3), 36.59 (C-4), 33.78 (C-1).

3-amino-1,2,3,4-t\u00e9trahydronaphthal\u00e8n-2-ol (5)

Le 3-azido-1,2,3,4-t\u00e9trahydronaphthal\u00e8n-2-ol (**8**) (568 mg, 3,0 mmol) est solubilis\u00e9 dans du THF (30 ml) \u00e0 temp\u00e9rature ambiante puis du Pd/C (10 % mol, 42 mg, 0,3 mmol) est ajout\u00e9 et le milieu r\u00e9actionnel est plac\u00e9 sous atmosph\u00e8re d'hydrog\u00e8ne. Apr\u00e8s 1h, le milieu est filtr\u00e9 sur c\u00e9lite puis la c\u00e9lite est lav\u00e9e avec du m\u00e9thanol. Le filtrat est concentr\u00e9 sous vide et le produit (**5**) est obtenu sous la forme d'un solide avec un rendement de 97%. $R_F = 0,27$ (10/90 ; MeOH/ CH_2Cl_2). **RMN ^1H** (500 MHz, MeOD) : $\delta = 7.13$ - 7.02 (m, 4H, H-6, H-7, H-8, H-9), 3.66 (ddd, $J = 10.0, 10.0, 5.5$ Hz, 1H, H-2), 3.12 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-1), 3.09 (t, $J = 6.2$ Hz,

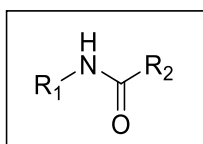
1H, H-4), 2.96 (ddd, $J = 10.6, 9.4, 5.6$ Hz, 1H, H-3), 2.74 (dd, $J = 16.0, 10.0$ Hz, 1H, H-1'), 2.66 (dd, $J = 16.4, 10.6$ Hz, 1H, H-4'). **RMN** ^{13}C (126 MHz, MeOD) : $\delta = 135.47$ (C-5 ou C-10), 135.16 (C-5 ou C-10), 129.81 (C-6 ou C-9), 129.50 (C-6 ou C-9), 127.18 (C-7, C-8), 72.84 (C-2), 54.33 (C-3), 38.49 (C-1), 37.03 (C-4).

(5-fluoro-1H-indol-2-yl)méthanamine (6)



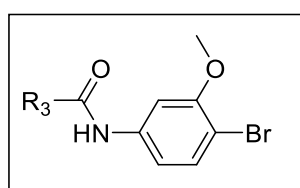
L'acide 5-fluoro-1H-indole-2-carboxylique (**3**, 1 éq, 1 g, 5,6 mmol) est solubilisé dans du THF (31 ml) et du DIC (2 éq, 1,81 g, 11,1 mmol) est ajouté à la solution. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h puis une solution de NH_4OH (28-30% dans l'eau, 10 ml) est additionnée. Après 2h, la réaction est arrêtée par l'ajout d'eau (10 ml) et la phase aqueuse est extraite avec l'AcOEt (2 x 20 ml). Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution de saumure, séchées avec Na_2SO_4 et évaporées sous vide. Le brut réactionnel est précipité dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Après filtration, le solide est solubilisé dans du THF (31 ml) puis du LiAlH_4 (2,3 éq, 489 mg, 12,9 mmol) est doucement ajouté à 0°C . Le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et agité pendant 24 h. Le milieu est neutralisé par l'ajout d'eau (20 ml). Le solide obtenu après filtration est purifié sur chromatographie sur colonne de silice éluée avec un mélange de $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5/95 puis 10/90). Le produit (**6**) est obtenu sous la forme d'un solide orange (688 mg, 75 %). $R_F = 0,20$ (10/90 ; $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$). **RMN** ^1H (500 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) : $\delta = 7.24$ (dd, $J = 8.5, 4.6$ Hz, 1H, H-7), 7.11 (dd, $J = 9.8, 2.6$ Hz, 1H, H-4), 6.80 (ddd, $J = 9.8, 8.5, 2.6$ Hz, 1H, H-6), 6.30 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H, H-3), 3.91 (s, 2H, H-10). **RMN** ^{13}C (126 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) : $\delta = 159.07$ (d, $J = 231.5$ Hz, C-5), 143.17 (C-2), 134.56 (C-8), 130.26 (d, $J = 10.2$ Hz, C-9), 112.34 (d, $J = 9.8$ Hz, C-7), 109.87 (d, $J = 26.3$ Hz, C-6), 105.32 (d, $J = 23.4$ Hz, C-4), 99.94 (d, $J = 4.5$ Hz, C-3), 39.82 (C-10).

Procédure de synthèse 1 : Formation d'une liaison amide



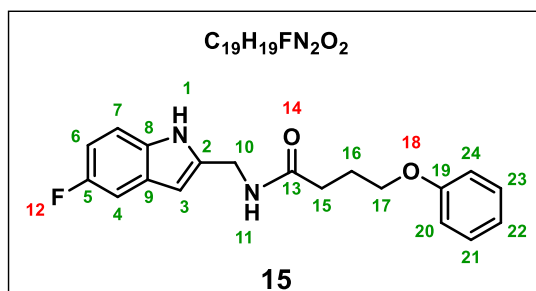
L'acide carboxylique (1 éq) est solubilisé dans du DMF (5 ml) et du DIPEA (1,5 éq) est ajouté. La solution est ensuite agitée pendant 5 min à température ambiante. L'HBTU (1,3 éq) est alors additionné au milieu réactionnel pendant 5 min à température ambiante. L'amine (1,2 éq) solubilisée dans du DMF est ajoutée au milieu, la réaction est agitée pendant 18 h. De l'H₂O (200 ml) est ajoutée puis le milieu réactionnel est extrait avec du CH₂Cl₂ (3 x 20 ml). Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution de saumure, séchées avec Na₂SO₄ et co-évaporées avec du toluène (3 x 5 ml). Le solide obtenu est purifié sur chromatographie sur colonne avec un éluant MeOH/CH₂Cl₂ (1/99).

Procédure de synthèse 2 : Formation d'une liaison amide à partir d'un dérivé aniline



L'acide carboxylique (1 éq) est solubilisé dans du DMF (5 ml) et le dérivé aniline (1 éq) est ajouté à température ambiante et sous agitation. L'EDC/HCl (1.2 éq) et l'HOBt (1,2 éq) sont additionnées successivement. Après 24h, une solution saturée en NaHCO₃ (200 ml) est ajoutée au milieu réactionnel pour atteindre un pH > 10. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt (3 x 20 ml) et les phases organiques combinées sont lavées avec une solution de NaCl saturée puis séchées avec Na₂SO₄. Après évaporation sous vide, le brut réactionnel est purifié sur chromatographie sur colonne éluee avec un mélange AcOEt/EP (10/90).

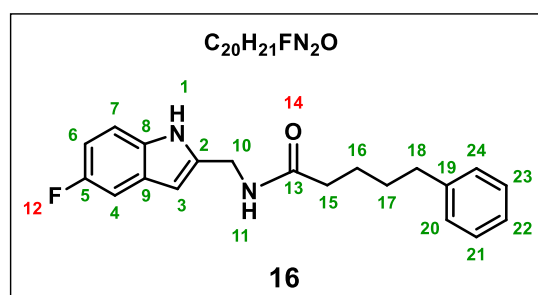
N-((5-fluoro-1*H*-indole-2-yl)méthyl)-4-phénoxybutanamide (**15**)



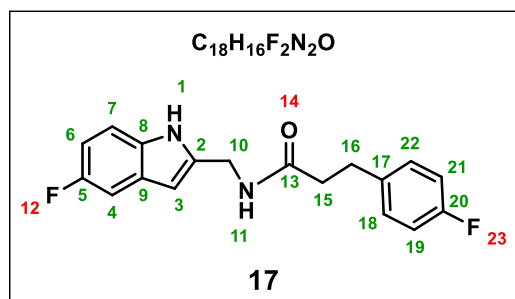
L'acide 4-phénoxybutanoïque (**14**, 107 mg, 0,59 mmol) a été couplé avec le (5-fluoro-1*H*-indole-2-yl)méthanamine (**6**, 116 mg, 0,71 mmol) selon la procédure **1** pour obtenir 171 mg de produit (**15**) sous la forme d'un solide jaune pâle avec un rendement de 90 %. $R_F = 0,38$ (3/97 ; MeOH/CH₂Cl₂). **RMN** ¹**H** (500 MHz, CDCl₃) : $\delta = 9.06$ (s, 1H, H-1), 7.29 – 7.20 (m, 2H, H-21, H-23), 7.19 – 7.17 (m, 1H, H-7), 7.17 – 7.15 (m, 1H, H-4), 6.93 (tt, $J = 7.5$ Hz, 1.0 Hz, 1H,

H-22), 6.89 (ddd, $J = 9.0, 8.9, 2.5$ Hz, 1H, H-6), 6.79 (dd, $J = 7.8$ Hz, 1.0 Hz, 2H, H-20, H-24), 6.27 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-11), 6.24 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-3), 4.45 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, H-10), 3.96 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, H-17), 2.43 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-15), 2.13 (tt, $J = 7.3$ Hz, 5.7 Hz, 2H, H-16). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) : $\delta = 174.35$ (C-13), 158.70 (C-19), 157.97 (d, $J = 233.8$ Hz, C-5), 138.23 (C-2), 132.95 (C-8), 129.62 (C-21, C-23), 128.06 (d, $J = 10.2$ Hz, C-9), 121.02 (C-22), 114.48 (C-20, C-24), 111.80 (d, $J = 9.7$ Hz, C-7), 110.45 (d, $J = 26.3$ Hz, C-6), 105.18 (d, $J = 23.4$ Hz, C-4), 100.88 (d, $J = 4.5$ Hz, C-3), 66.70 (C-17), 37.50 (C-10), 33.04 (C-15), 25.21 (C-16).

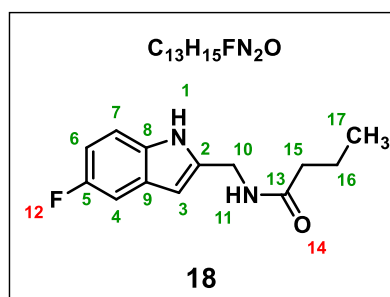
***N*-((5-fluoro-1*H*-indol-2-yl)méthyl)-5-phénylpentanamide (16)**



L'acide 5-phénylpentanoïque (**13**, 105 mg, 0,59 mmol) a été couplé avec le (5-fluoro-1*H*-indole-2-yl)méthanamine (**6**, 116 mg, 0,71 mmol) selon la procédure **1** pour obtenir 96 mg de produit (**16**) sous la forme d'un solide marron avec un rendement de 92 %. $R_F = 0,59$ (5/95 ; $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$). **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) : $\delta = 9.04$ (s, 1H, H-1), 7.24 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-21, H-23), 7.23 – 7.21 (m, 1H, H-4), 7.19 – 7.14 (m, 2H, H-7, H-22), 7.12 (dd, $J = 7.4, 1.6$ Hz, 2H, H-20, H-24), 6.90 (ddd, $J = 9.1, 9.0, 2.7$ Hz, 1H, H-6), 6.26 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-3), 5.99 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-11), 4.44 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, H-10), 2.62 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-18), 2.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-15), 1.74 – 1.67 (m, 2H, H-16), 1.69 – 1.59 (m, 2H, H-17). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) : $\delta = 174.90$ (C-13), 158.01 (d, $J = 233.8$ Hz, C-5), 142.09 (C-19), 138.50 (C-2), 132.96 (C-8), 128.49 (C-20, C-21, C-23, C-24), 128.00 (d, $J = 10.3$ Hz, C-9), 125.99 (C-22), 111.80 (d, $J = 9.7$ Hz, C-4), 110.51 (d, $J = 26.3$ Hz, C-6), 105.22 (d, $J = 23.4$ Hz, C-7), 100.77 (d, $J = 4.6$ Hz, C-3), 37.54 (C-10), 36.44 (C-15), 35.73 (C-18), 31.07 (C-17), 25.27 (C-16).

N-((5-fluoro-1H-indol-2-yl)méthyl)-3-(4-fluorophényl)propanamide (**17**)

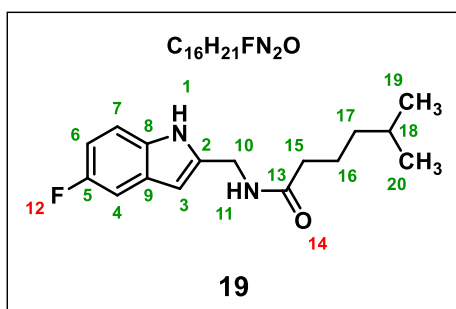
L'acide 3-(4-fluorophényl)propanoïque (**12**, 50 mg, 0,30 mmol) a été couplé avec le (5-fluoro-1H-indole-2-yl)méthanamine (**6**, 59 mg, 0,36 mmol) selon la procédure **1** pour obtenir 82 mg du produit (**17**) sous la forme d'un solide marron avec un rendement de 88%. $R_F = 0,39$ (60/40 ; AcOEt/EP). **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 8.89$ (s, 1H, H-1), 7.22 (dd, $J = 8.8, 4.4$ Hz, 1H, H-7), 7.17 (dd, $J = 9.6, 2.5$ Hz, 1H, H-4), 7.13 – 7.05 (m, 2H, H-18, H-22), 6.92 (ddd, $J = 9.1, 9.1, 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.91 – 6.83 (m, 2H, H-19, H-21), 6.21 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-3), 5.98 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-11), 4.42 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, H-10), 2.95 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-16), 2.49 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-15). **RMN ^{13}C** (126 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 173.75$ (C-13), 161.59 (d, $J = 244.5$ Hz, C-20), 158.02 (d, $J = 234.0$ Hz, C-5), 138.17 (C-2), 136.11 (d, $J = 3.3$ Hz, C-17), 132.91 (C-8), 129.84 (d, $J = 7.8$ Hz, C-18, C-22), 128.03 (d, $J = 10.3$ Hz, C-3), 115.47 (d, $J = 21.2$ Hz, C-19, C-21), 111.72 (d, $J = 9.7$ Hz, C-7), 110.57 (d, $J = 26.2$ Hz, C-6), 105.24 (d, $J = 23.5$ Hz, C-4), 100.85 (d, $J = 4.6$ Hz, C-3), 38.43 (C-15), 37.47 (C-10), 30.90 (C-16).

N-((5-fluoro-1H-indol-2-yl)méthyl)butyramide (**18**)

L'acide butyrique (**8**, 73 μ l, 0,80 mmol) a été couplé avec le (5-fluoro-1H-indole-2-yl)méthanamine (**6**, 157 mg, 0,96 mmol) selon la procédure **1** pour obtenir 181 mg du produit (**18**) sous la forme d'un solide rouge avec un rendement de 96 %. $R_F = 0,47$ (5/95 ; MeOH/ CH_2Cl_2). **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 9.14$ (s, 1H, H-1), 7.21 (dd, $J = 8.8, 4.3$ Hz, 1H, H-7), 7.17 (dd, $J = 9.6, 2.6$ Hz, 1H, H-4), 6.90 (ddd, $J = 8.8, 9.2, 2.6$ Hz, 1H, H-6), 6.26 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, H-3), 6.18 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-11), 4.46 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H-10), 2.19 (t, $J =$

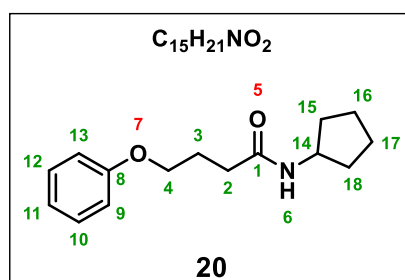
7.5 Hz, 2H, H-15), 1.68 (h, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-16), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H-17). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) : $\delta = 174.99$ (C-13), 157.96 (d, $J = 233.8$ Hz, C-5), 138.54 (C-2), 132.96 (C-8), 128.02 (d, $J = 10.2$ Hz, C-9), 111.78 (d, $J = 9.7$ Hz, C-7), 110.40 (d, $J = 26.3$ Hz, C-6), 105.15 (d, $J = 23.5$ Hz, C-4), 100.68 (d, $J = 4.6$ Hz, C-3), 38.44 (C-15), 37.46 (C-10), 19.11 (C-16), 13.84 (C-17).

***N*-((5-fluoro-1*H*-indol-2-yl)méthyl)-5-méthylhexanamide (19)**



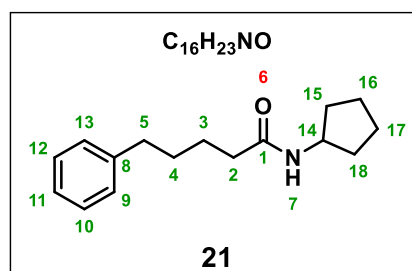
L'acide 5-méthylhexanoïque (**10**, 84 μl , 0,59 mmol) a été couplé avec le (5-fluoro-1*H*-indole-2-yl)méthanamine (**6**, 116 mg, 0,71 mmol) selon la procédure **1** pour obtenir 140 mg du produit (**19**) sous la forme d'un solide beige avec un rendement de 85 %. $R_F = 0,42$ (4/96 ; $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$). **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) : $\delta = 9.12$ (s, 1H, H-1), 7.22 (dd, $J = 9.0, 4.2$ Hz, 1H, H-7), 7.18 (dd, $J = 9.5, 2.5$ Hz, 1H, H-4), 6.90 (ddd, $J = 9.1, 9.1, 2.5$ Hz, 1H, H-6), 6.26 (s, 1H, H-3), 6.13 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-11), 4.46 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, H-10), 2.19 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-15), 1.70 – 1.59 (m, 2H, H-16), 1.53 (hept, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-18), 1.22 – 1.12 (m, 2H, H-17), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 5H, H-19, H-20). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) : $\delta = 175.18$ (C-13), 157.97 (d, $J = 233.8$ Hz, C-5), 138.54 (C-2), 132.96 (C-8), 128.01 (d, $J = 10.2$ Hz, C-9), 111.78 (d, $J = 9.6$ Hz, C-7), 110.43 (d, $J = 26.2$ Hz, C-6), 105.16 (d, $J = 23.2$ Hz, C-4), 100.69 (d, $J = 4.6$ Hz, C-3), 38.55 (C-17), 37.49 (C-10), 36.82 (C-15), 27.91 (C-18), 23.56 (C-16), 22.57 (C-19, C-20).

***N*-cyclopentyle-4-phenoxybutanamide (20)**

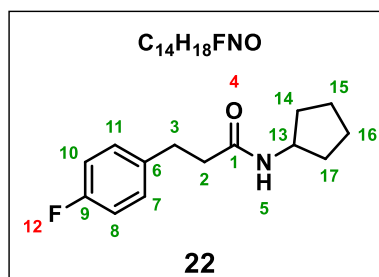


L'acide 4-phénoxybutanoïque (**14**, 107 mg, 0,59 mmol) a été couplé avec la cyclopentamine (**1**, 70 μ l, 0,71 mmol) en utilisant la procédure de synthèse **1** pour obtenir 142 mg du produit (**20**) sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 97 %. $R_F = 0,63$ (5/95 ; MeOH/CH₂Cl₂). **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) : $\delta = 7.28$ (dd, $J = 8.5, 7.3$ Hz, 2H, H-10, H-12), 6.94 (tt, $J = 7.3$ Hz, 1 Hz, 1H, H-11), 6.89 (dd, $J = 8.5$ Hz, 1.0 Hz, 2H, H-9, H-13), 5.48 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-6), 4.20 (dtt, $J = 7.7$ Hz, 6.5 Hz, 1H, H-14), 4.00 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, H-4), 2.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2), 2.19 (tt, $J = 7.2$ Hz, 5.9 Hz, 2H, H-3), 2.03 – 1.88 (m, 2H, H-15, H-18), 1.67 – 1.51 (m, 4H, H-16, H-17), 1.42 – 1.22 (m, 2H, H-15, H-18). **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : $\delta = 171.95$ (C-1), 158.94 (C-8), 129.62 (C-10, C-12), 120.89 (C-11), 114.55 (C-9, C-13), 66.87 (C-4), 51.25 (C-14), 33.31 (C-2), 33.27 (C-15, C-18), 25.44 (C-3), 23.80 (C-16, C-17).

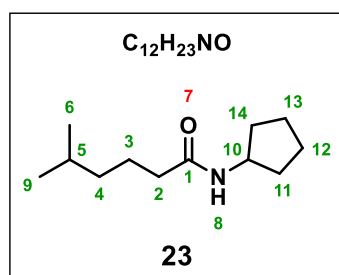
N-cyclopentyl-5-phénylpentanamide



L'acide 5-phénylpentanoïque (**13**, 105 mg, 0,59 mmol) a été couplé avec la cyclopentamine (**1**, 70 μ l, 0,71 mmol) en utilisant la procédure de synthèse **1** pour obtenir 137 mg du produit (**21**) sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 94 %. $R_F = 0,54$ (5/95 ; MeOH/CH₂Cl₂). **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) : $\delta = 7.30 - 7.24$ (m, 2H, H-9, H-13), 7.21 – 7.14 (m, 3H, H-10, H-11, H-12), 5.34 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-7), 4.19 (dtt, $J = 7.0, 7.0, 7.0$ Hz, 1H, H-14), 2.62 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-5), 2.14 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-2), 2.03 – 1.91 (m, 2H, H-15, H-18), 1.71 – 1.62 (m, 4H, H-3, H-4), 1.62 – 1.52 (m, 4H, H-16, H-17), 1.39 – 1.27 (m, 2H, H-15, H-18). **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : $\delta = 172.48$ (C-1), 142.39 (C-8), 128.53 (C-10, C-12), 128.44 (C-9, C-13), 125.88 (C-11), 51.18 (C-14), 36.92 (C-2), 35.83 (C-5), 33.30 (C-15, C-18), 31.21 (C-4), 25.58 (C-3), 23.83 (C-16, C-17).

***N*-cyclopentyl-3-(4-fluorophényl)propanamide (22)**

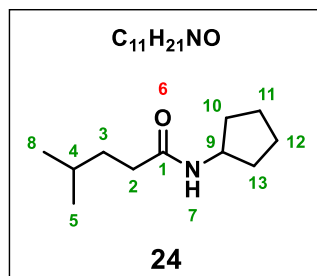
L'acide 3-(4-fluorophényl)propanoïque (**12**, 130 mg, 0,77 mmol) a été couplé avec la cyclopentamine (**1**, 91 μ l, 0,924 mmol) en utilisant la procédure de synthèse **1** pour obtenir 176 mg du produit (**22**) sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 97 %. $R_F = 0,67$ (5/95 ; MeOH/CH₂Cl₂). **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) : $\delta = 7.13$ (dd, $J = 8.5, 5.5$ Hz, 2H, H-7, H-11), 6.94 (ddd, $J = 8.7, 6.7, 2.0$ Hz, 2H, H-8, H-10), 5.39 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-5), 4.15 (dt, $J = 7.0, 7.0, 7.0$ Hz, 1H, H-13), 2.91 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-3), 2.38 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-2), 1.96 – 1.85 (m, 2H, H-14, H-17), 1.64 – 1.48 (m, 4H, H-15, H-16), 1.31 – 1.18 (m, 2H, H-14, H-17). **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : $\delta = 171.45$ (C-1), 161.52 (d, $J = 243.9$ Hz, C-9), 136.70 (d, $J = 3.2$ Hz, C-6), 129.89 (d, $J = 7.9$ Hz, C-7, C-11), 115.29 (d, $J = 21.1$ Hz, C-8, C-10), 51.19 (C-13), 38.81 (C-2), 33.13 (C-14, C-17), 31.09 (C-3), 23.72 (C-15, C-16).

***N*-cyclopentyl-5-méthylhexanamide (23)**

L'acide 5-méthylhexanoïque (**10**, 109 μ l, 0,77 mmol) a été couplé avec la cyclopentamine (**1**, 91 μ l, 0,924 mmol) en utilisant la procédure de synthèse **1** pour obtenir 132 mg du produit (**23**) sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 88 %. $R_F = 0,54$ (5/95 ; MeOH/CH₂Cl₂) **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) : $\delta = 5.40$ (s, 1H, H-8), 4.20 (dt, $J = 6.9, 6.9, 6.9$ Hz, 1H, H-10), 2.10 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-2), 2.04 – 1.89 (m, 2H, H-11, H-14), 1.71 – 1.57 (m, 6H, H-3, H-12, H-13), 1.53 (hept, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-5), 1.40 – 1.28 (m, 2H, H-11, H-14), 1.23 – 1.13 (m, 2H, H-4), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-6, H-9). **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : $\delta = 172.80$ (C-1),

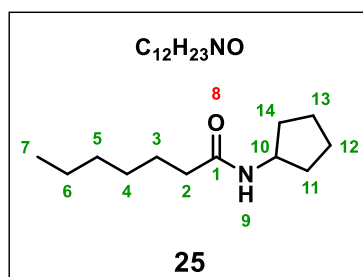
51.16 (C-10), 38.66 (C-4), 37.34 (C-2), 33.31 (C-11, C-14), 27.97 (C-5), 23.84 (C-3), 23.83 (C-12, C-13), 22.65 (C-6, C-9).

***N*-cyclopentyl-4-methylpentanamide (24)**



L'acide 4-méthylpentanoïque (**9**, 74 μ l, 0,59 mmol) a été couplé avec la cyclopentamine (**1**, 70 μ l, 0,71 mmol) en utilisant la procédure de synthèse **1** pour obtenir 101 mg du produit (**24**) sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 94 %. $R_F = 0,61$ (5/95 ; MeOH/CH₂Cl₂). **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) : $\delta = 5.42$ (s, 1H, H-7), 4.19 (dtt, $J = 7.0, 7.0, 7.0$ Hz, 1H, H-9), 2.16 – 2.09 (m, 2H, H-2), 2.02 – 1.92 (m, 2H, H-10, H-13), 1.73 – 1.59 (m, 4H, H-11, H-12), 1.62 – 1.54 (m, 1H, H-4), 1.52 – 1.42 (m, 2H, H-3), 1.39 – 1.28 (m, 2H, H-10, H-13), 0.89 (d, $J = 6.4$ Hz, 10H, H-5, H-8). **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : $\delta = 172.96$ (C-1), 51.16 (C-9), 35.11 (C-2), 34.79 (C-3), 33.29 (C-10, C-13), 27.99 (C-4), 23.83 (C-11, C-12), 22.46 (C-5, C-8).

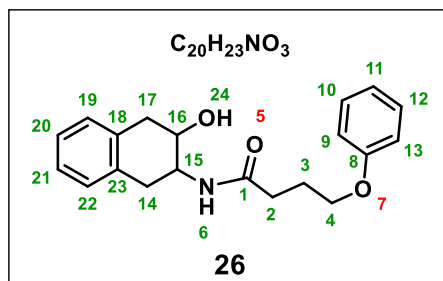
***N*-cyclopentylheptanamide (25)**



L'acide heptanoïque (**11**, 84 μ l, 0,59 mmol) a été couplé avec la cyclopentamine (**1**, 70 μ l, 0,71 mmol) en utilisant la procédure de synthèse **1** pour obtenir 101 mg du produit (**25**) sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 87 %. $R_F = 0,61$ (5/95 ; MeOH/CH₂Cl₂). **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) : $\delta = 5.39$ (s, 1H, H-9), 4.20 (dtt, $J = 7.0, 7.0, 7.0$ Hz, 1H, H-10), 2.12 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-2), 2.04 – 1.92 (m, 2H, H-11, H-14), 1.71 – 1.62 (m, 4H, H-12, H-13), 1.62 – 1.53 (m, 2H, H-3), 1.40 – 1.27 (m, 2H, H-11, H-14), 1.30 – 1.21 (m, 6H, H-4, H-5, H-6), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-7). **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : $\delta = 172.82$ (C-1), 51.16 (C-10), 37.15

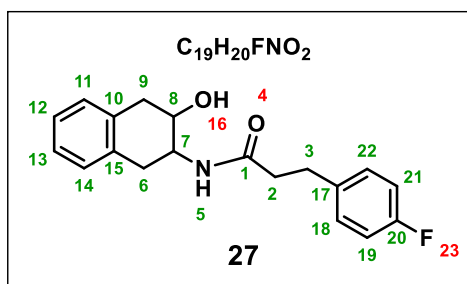
(C-2), 33.31 (C-11, C-14), 31.68 (C-5), 29.09 (C-4), 25.94 (C-3), 23.83 (C-12, C-13), 22.65 (C-6), 14.17 (C-7).

***N*-(3-hydroxy-1,2,3,4-tétrahydronaphthalèn-2-yl)-4-phénoxybutanamide (26)**



L'acide 4-phénoxybutanoïque (**14**, 84 mg, 0,47 mmol) a été couplé avec le 3-amino-1,2,3,4-tétrahydronaphthalèn-2-ol (**5**, 92 mg, 0,56 mmol) selon la procédure **1** pour obtenir 148 mg du produit (**26**) sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 95 %. $R_F = 0,35$ (5/95 ; MeOH/CH₂Cl₂). **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) : $\delta = .32 - 7.26$ (m, 2H, H-10, H-12), 7.14 (ddd, $J = 6.6, 4.4, 2.2$ Hz, 2H, H-20, H-21), 7.09 (dd, $J = 6.5, 2.2$ Hz, 1H, H-19 ou H-22), 7.04 (dd, $J = 6.5, 2.2$ Hz, 1H, H-19 ou H-22), 6.95 (tt, $J = 7.4, 1.0$ Hz, 1H, H-11), 6.89 (dd, $J = 8.8, 1.0$ Hz, 2H, H-9, H-13), 5.77 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-6), 4.29 – 4.10 (m, 1H, H-15 ou H-16), 4.08 – 3.95 (m, 2H, H-4), 3.92 – 3.82 (m, 1H, H-15 ou H-16), 3.23 – 3.12 (m, 3H, H-14, H-17, H-24), 2.86 (dd, $J = 16.7, 8.8$ Hz, 1H, H-17), 2.65 (dd, $J = 16.2, 10.1$ Hz, 1H, H-14), 2.46 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2), 2.23 – 2.09 (m, 2H, H-3). **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : $\delta = 174.34$ (C-1), 158.88 (C-8), 134.10 (C-18 ou C-23), 133.26 (C-18 ou C-23), 129.69 (C-10, C-12), 129.13 (C-19 ou C-22), 128.62 (C-19 ou C-22), 126.69 (C-20 ou C-21), 126.45 (C-20 ou C-21), 121.04 (C-11), 114.59 (C-9, C-13), 71.49 (C-16), 66.77 (C-4), 52.46 (C-15), 37.64 (C-17), 34.45 (C-14), 33.29 (C-2), 25.35 (C-3).

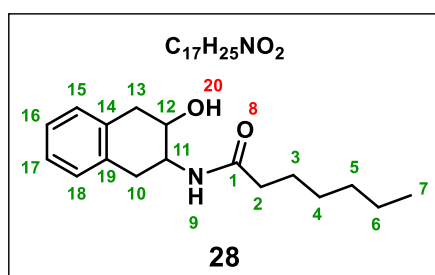
***3*-(4-fluorophényl)-*N*-(3-hydroxy-1,2,3,4-tétrahydronaphthalèn-2-yl)propanamide (27)**



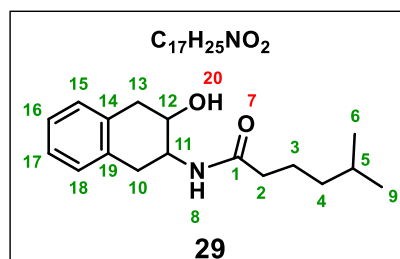
L'acide 3-(4-fluorophényl)propanoïque (**12**, 42 mg, 0,25 mmol) a été couplé avec le 3-amino-1,2,3,4-tétrahydronaphthalèn-2-ol (**5**, 49 mg, 0,30 mmol) selon la procédure **1** pour obtenir 64

mg du produit (**27**) sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 82 %. $R_F = 0,47$ (10/90 ; AcOEt/EP). **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 7.17 - 7.11$ (m, 4H, H-12, H-13, H-18, H-22), 7.12 – 7.01 (m, 1H, H-11 ou H-14), 7.06 – 7.02 (m, 1H, H-11 ou H-14), 6.97 (ddd, $J = 9.0, 6.5, 2.5$ Hz, 2H, H-19, H-21), 5.50 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-5), 4.13 (tdd, $J = 9.1, 6.9, 5.5$ Hz, 1H, H-7), 3.84 (tdd, $J = 8.8, 5.5, 1.0$ Hz, 1H, H-8), 3.17 (dd, $J = 16.2, 5.5$ Hz, 1H, H-6), 3.10 (dd, $J = 16.2, 5.5$ Hz, 1H, H-9), 2.95 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-3), 2.83 (dd, $J = 16.2, 8.8$ Hz, 1H, H-9), 2.60 (dd, $J = 16.2, 9.1$ Hz, 1H, H-6), 2.50 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-2). **RMN ^{13}C** (126 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 173.63$ (C-1), 161.66 (d, $J = 244.4$ Hz, C-20), 136.34 (d, $J = 3.2$ Hz, C-17), 133.98 (C-10 ou C-15), 133.12 (C-10 ou C-15), 129.95 (d, $J = 7.8$ Hz, C-18, C-22), 129.16 (C-11 ou C-14), 128.65 (C-11 ou C-14), 126.73 (C-12 ou C-13), 126.48 (C-12 ou C-13), 115.49 (d, $J = 21.1$ Hz, C-19, C-21), 71.16 (C-8), 52.30 (C-7), 38.75 (d, $J = 1.2$ Hz, C-2), 37.33 (C-9), 34.21 (C-6), 30.98 (C-3).

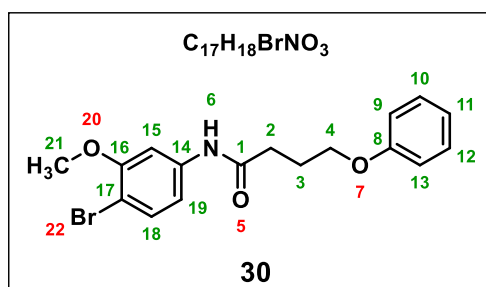
***N*-(3-hydroxy-1,2,3,4-tétrahydronaphthalèn-2-yl)heptanamide (**28**)**



L'acide heptanoïque (**11**, 35 μ l, 0,25 mmol) a été couplé avec le 3-amino-1,2,3,4-tétrahydronaphthalèn-2-ol (**5**, 49 mg, 0,30 mmol) selon la procédure **1** pour obtenir 66 mg du produit (**28**) sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 95 %. $R_F = 0,43$ (80/20 ; AcOEt/EP). **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 7.21 - 7.12$ (m, 2H, H-16, H-17), 7.13 – 7.10 (m, 1H, H-15 ou H-18), 7.09 – 7.04 (m, 1H, H-15 ou H-18), 5.65 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-9), 4.16 (tdd, $J = 9.3, 7.0, 5.5$ Hz, 1H, H-11), 3.90 (tdd, $J = 8.9, 5.3, 1.0$ Hz, 1H, H-12), 3.25 (dd, $J = 16.3, 5.5$ Hz, 1H, H-10), 3.19 (dd, $J = 16.3, 5.3$ Hz, 1H, H-13), 2.88 (dd, $J = 16.6, 8.8$ Hz, 1H, H-13), 2.72 (dd, $J = 16.0, 9.3$ Hz, 1H, H-10), 2.23 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-2), 1.65 (p, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-3), 1.39 – 1.23 (m, 6H, H-4, H-5, H-6), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-7). **RMN ^{13}C** (126 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 175.27$ (C-1), 134.18 (C-14 ou C-19), 133.28 (C-14 ou C-19), 129.14 (C-15 ou C-18), 128.60 (C-15 ou C-18), 126.71 (C-16 ou C-17), 126.46 (C-16 ou C-17), 71.64 (C-12), 52.44 (C-11), 37.69 (C-13), 36.94 (C-2), 34.54 (C-10), 31.65 (C-5), 29.05 (C-4), 25.80 (C-3), 22.63 (C-6), 14.18 (C-7).

N-(3-hydroxy-1,2,3,4-tétrahydronaphthalèn-2-yl)-5-méthylhexanamide (**29**)

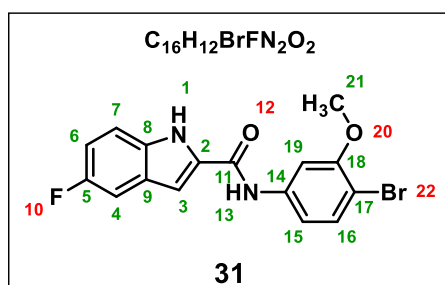
L'acide 5-méthylhexanoïque (**10**, 43 μ l, 0,30 mmol) a été couplé avec le 3-amino-1,2,3,4-tétrahydronaphthalèn-2-ol (**5**, 59 mg, 0,36 mmol) selon la procédure **1** pour obtenir 72 mg du produit (**29**) sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 87 %. $R_F = 0,30$ (50/50 ; AcOEt/EP). **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) : $\delta = 7.16 - 7.12$ (m, 2H, H-16, H-17), 7.12 - 7.10 (m, 1H, H-15 ou H-18), 7.09 - 7.06 (m, 1H, H-15 ou H-18), 5.66 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-8), 4.17 (tdd, $J = 9.2, 7.0, 5.6$ Hz, 1H, H-11), 3.91 (tdd, $J = 8.9, 6.8, 5.4$ Hz, 1H, H-12), 3.32 (s, 1H, H-20), 3.26 (dd, $J = 16.4, 5.6$ Hz, 2H, H-13), 3.19 (dd, $J = 16.4, 5.6$ Hz, 2H, H-10), 2.88 (dd, $J = 16.5, 9.0$ Hz, 1H, H-10), 2.72 (dd, $J = 16.2, 9.5$ Hz, 1H, H-13), 2.21 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-2), 1.70 - 1.60 (m, 2H, H-3), 1.60 - 1.44 (m, 1H, H-5), 1.33 - 1.10 (m, 2H, H-4), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-6, H-9). **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃) : $\delta = 175.06$ (C-1), 134.03 (C-14 ou C-19), 133.15 (C-14 ou C-19), 129.00 (C-15 ou C-18), 128.47 (C-15 ou C-18), 126.56 (C-16 ou C-17), 126.32 (C-16 ou C-17), 71.46 (C-12), 52.28 (C-11), 38.46 (C-4), 37.54 (C-13), 37.00 (C-2), 34.39 (C-10), 27.83 (C-5), 23.56 (C-3), 22.50 (C-19, C-20).

N-(4-bromo-3-méthoxyphényl)-4-phénoxybutanamide (**30**)

L'acide 4-phénoxybutanoïque (**14**, 43 mg, 0,24 mmol) a été couplé avec le 4-bromo-3-méthoxyaniline (**4**, 48 mg, 0,24 mmol) selon la procédure **2** pour obtenir 70 mg du produit (**30**) sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 80 %. $R_F = 0,40$ (30/70 ; AcOEt/EP). **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) : $\delta = 7.49$ (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-15), 7.41 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-18), 7.34 (s, 1H, H-6), 7.29 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-10, H-12), 6.96 (td, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 1H, H-11), 6.90 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-9, H-13), 6.70 (dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz, 1H, H-19), 4.07 (t, $J = 5.8$

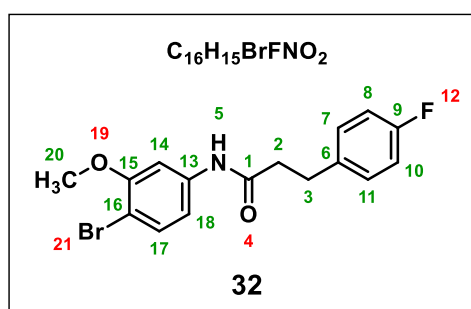
Hz, 2H, H-4), 3.87 (s, 3H, H-21), 2.60 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-2), 2.22 (tt, $J = 7.1, 5.8$ Hz, 2H, H-3). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) : $\delta = 170.91$ (C-1), 158.76 (C-8), 156.30 (C-16), 138.57 (C-14), 133.15 (C-18), 129.73 (C-9, C-13), 121.16 (C-11), 114.57 (C-10, C-12), 112.44 (C-19), 106.01 (C-17), 104.17 (C-15), 66.71 (C-4), 56.36 (C-21), 34.41 (C-2), 25.09 (C-3).

***N*-(4-bromo-3-méthoxyphényl)-5-fluoro-1H-indole-2-carboxamide (31)**



L'acide 5-fluoro-1H-indole-2-carboxylique (**3**, 133 mg, 0,74 mmol) a été couplé avec le 4-bromo-3-méthoxyaniline (**4**, 150 mg, 0,74 mmol) en utilisant la procédure de synthèse **2** pour obtenir 222 mg du produit (**31**) sous la forme d'un solide marron avec un rendement de 77 %. $R_F = 0,28$ (30/70 ; AcOEt/EP). **RMN** ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) : $\delta = 11.89$ (s, 1H, H-1), 10.36 (s, 1H, H-13), 7.64 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-19), 7.55 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-16), 7.52 – 7.40 (m, 3H, H-3, H-7, H-15), 7.43 (dd, $J = 10.0, 2.2$ Hz, 1H, H-4), 7.10 (ddd, $J = 9.1, 2.2$ Hz, 1H, H-6), 3.86 (s, 3H, H-21). **RMN** ^{13}C (126 MHz, DMSO) : $\delta = 159.50$ (C-11), 157.23 (d, $J = 233.0$ Hz, C-5), 155.30 (C-18), 139.75 (C-14), 133.63 (C-8), 132.90 (C-2), 132.69 (C-16), 127.02 (d, $J = 10.5$ Hz, C-9), 113.64 (d, $J = 9.7$ Hz, C-7), 113.32 (C-15), 112.73 (d, $J = 26.6$ Hz, C-6), 105.94 (d, $J = 23.0$ Hz, C-4), 104.55 (C-19), 104.25 (C-17), 104.00 (d, $J = 5.3$ Hz, C-3), 55.97 (C-21).

***N*-(4-bromo-3-méthoxyphényl)-3-(4-fluorophényl)propanamide (32)**



L'acide 3-(4-fluorophényl)propanoïque (**12**, 40 mg, 0,24 mmol) a été couplé avec le 4-bromo-3-méthoxyaniline (**4**, 48 mg, 0,24 mmol) selon la procédure **2** pour obtenir 66 mg du produit

(32) sous la forme d'un solide avec un rendement de 75 %. $R_F = 0,36$ (30/70 ; AcOEt/EP).
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) : $\delta = 7.48$ (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-14), 7.41 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-17), 7.22 – 7.15 (m, 2H, H-7, H-11), 7.03 (s, 1H, H-5), 6.98 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.65 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H, H-18), 3.89 (s, 3H, H-20), 3.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-3), 2.63 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-2). **RMN ^{13}C** (126 MHz, CDCl_3) : $\delta = 170.27$ (C-1), 161.70 (d, $J = 244.6$ Hz, C-9), 156.32 (C-15), 138.36 (C-13), 136.21 (d, $J = 3.3$ Hz, C-6), 133.15 (C-17), 129.95 (d, $J = 7.9$ Hz, C-7, C-11), 115.60 (d, $J = 21.2$ Hz, C-8, C-10), 112.50 (C-18), 106.22 (C-16), 104.30 (C-14), 56.37 (C-20), 39.75 (C-2), 30.66 (C-3)

Conclusion Générale

et

perspectives

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Ce projet de recherche concerne le développement de nouveaux antibiotiques du pathogène *Bacillus anthracis* en ciblant la voie du MEP à l'aide d'une approche par fragment. C'est donc une cible intéressante pour développer des antibiotiques avec des effets secondaires limités comme l'atteste l'utilisation de la fosmidomycine, un inhibiteur de la seconde enzyme de la voie du MEP, dans la lutte contre la malaria. Notre étude concerne l'inhibition de la troisième enzyme de la voie du MEP, la 4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol synthase (IspD). Cette cible a d'ailleurs fait l'objet ces dernières années, de publication de plusieurs inhibiteurs d'IspD d'organismes comme *P. falciparum*, *P. vivax* et *A. thaliana*. Ces molécules ont montrés de bons pouvoirs inhibiteurs avec des IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire. IspD semble être une cible thérapeutique intéressante pour lutter contre *Bacillus anthracis*.

La première partie de cette thèse a été consacrée à la mise en place d'une méthode de criblage par SPR d'une librairie de 500 fragments en utilisant les enzymes IspD de *Bacillus anthracis* et d'*Escherichia coli* comme cibles.

Un premier objectif a consisté à immobiliser ces deux enzymes sur une surface d'or tout en gardant leur site actif accessible. Les résultats ont montré qu'une immobilisation covalente par réaction des amines présentes sur les protéines (Ba-IspD et Ec-IspD) avec les groupements carboxyles de la surface CM5 permettait d'obtenir des taux d'immobilisation moyen de 12 000 et 9000 RU respectivement pour les enzymes Ba-IspD et Ec-IspD. Les constantes de dissociation K_D et le R_{max} mesurés entre le CTP et les enzymes immobilisées Ba-IspD et Ec-IspD sont respectivement de 82 μ M et 80 RU et 118 μ M et 35 RU.

En parallèle, une courbe de calibration du DMSO a été mise en place afin de corriger les variations de la concentration en solvant nécessaire à la solubilisation des fragments, en utilisant une gamme de solutions comprise entre 4,5 % et 5,8 % en DMSO

Après la mise en place de la méthode SPR, le deuxième objectif a été de sélectionner les fragments ayant une affinité pour l'enzyme Ba-IspD à partir d'une librairie constituée de 500 molécules. Le criblage des fragments à une concentration de 100 μ M a conduit à la sélection de 23 molécules. À la suite de ce travail, le K_D du fragment **B4H08** a été déterminé par SPR de façon précise à $104 \pm 10 \mu$ M. Le calcul du LE à $0,39 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{HA}^{-1}$ laisse présager son

optimisation favorable vers un candidat-médicament. Les K_D des autres molécules n'ont pas pu être déterminés de façon précise. Des expériences avec des concentrations plus élevées en fragment sont nécessaires. Néanmoins, des K_D acceptables ont été obtenus par SPR pour huit fragments **B4D12**, **B5E07**, **B3F10**, **B4B12**, **B1F11**, **B3D04**, **B6D12**, **B3H05** avec des résultats encourageants de l'ordre du millimolaire.

La deuxième partie de cette thèse avait pour objectif de confirmer l'interaction entre l'enzyme IspD de *Bacillus anthracis* et les 23 fragments sélectionnés précédemment ainsi que de tester leur pouvoir inhibiteur. Pour ce travail des techniques de biophysiques (RMN et Docking) ainsi que des méthodes biochimiques (test enzymatiques) ont été employées.

Des expériences par RMN STD en présence du substrat CTP et de Ba-IspD ont permis de mettre au point cette méthode qui par la suite a permis de confirmer l'interaction entre Ba-IspD et les fragments : **B1B02**, **B1B10**, **B1D02**, **B3E01**, **B3H05**, **B4D12**, **B5E07**, **B5E12**, **B5G02** et **B6D12**.

En parallèle, notre collaborateur, le Dr. Franck Borel de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble, a réussi à déterminer les conditions de cristallisation de l'enzyme IspD de *Bacillus anthracis* en présence et en l'absence de CTP. Ainsi, des essais de co-cristallisation entre les 23 fragments sélectionnés et l'enzyme Ba-IspD ont été réalisés. Malheureusement, aucun cristal n'a pu être obtenu. L'absence de cristal nous a poussés à réaliser des expériences de Docking de Ba-IspD avec ces 23 fragments sélectionnés par SPR. Les résultats du Docking suggèrent la présence de trois sites de fixation, le site actif où se fixe le CTP et le MEP et deux autres sites, le site Y (Y203) et le site F (F108). Des scores de docking intéressants ont été obtenus pour les fragments **B1H10**, **B3A11**, **B3D04**, **B4D12** et **B4H08** dans les deux sites F et Y et les fragments **B5E12** et **B6G02** pour le site CTP.

Finalement, des tests enzymatiques réalisés en présence des 23 fragments sélectionnés ont permis de déterminer les IC_{50} des fragments **B4H08**, **B3D04** et **B1D02** qui s'élèvent à 59 μ M, 130 μ M et 58 μ M respectivement. Cependant, des problèmes de reproductibilité n'ont pas permis de confirmer ces résultats. Des tests d'inhibition réalisés à 1 mM ont permis de confirmer que les fragments **B1D02**, **B6G02**, **B4B01**, **B6D12**, **B1B10**, **B4H08**, **B3D04** et **B5E07** inhibaient l'enzyme Ba-IspD.

Dans la dernière partie de cette thèse, l'objectif était de sélectionner les meilleurs fragments et de les faire évoluer vers des molécules plus grandes pour augmenter leur pouvoir inhibiteur. Pour cela, les différents résultats obtenus par SPR, RMN STD, Docking et cinétique ont été recoupés et quatre fragments **B1D02**, **B3D04**, **B6D12** et **B6G02** ont été choisis pour une évolution de fragment (Tableau 32). Le paramètre le plus important dans le choix de ces fragments était la capacité à inhiber l'enzyme Ba-IspD.

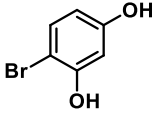
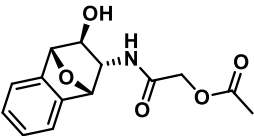
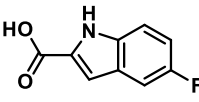
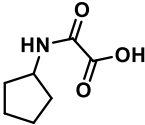
	 B1D02	 B3D04	 B6D12	 B6G02
K_D (SPR)	3 mM	830 μM	960 μM	> 10 ⁻² M
Interaction (STD)	✓	✗	✓	Non analysé
Docking (DS)	Site F : -6	Site F: -10	Site CTP/F: -7	Site CTP : -11
Inhibition	✓	✓	✓	✓
LE	0,6	0,21	0,32	Non déterminé

Tableau 32 : Résumé des résultats obtenus pour les quatre fragments choisis pour l'évolution de fragment. Seul le meilleur DS a été indiqué.

Une stratégie « fragment growing » a été appliquée à partir d'analogues de ces fragments commerciaux ou synthétisés. Chacun des analogues présentent des fonctions amines pouvant être engagées dans des couplages peptidiques avec différentes molécules ayant d'une part une fonction acide carboxylique pour le couplage, et d'autre part des chaînes aliphatiques et des aromatiques.

La synthèse de 18 molécules a été réalisée à partir de quatre analogues de fragment avec des rendements moyens de 80 %. Des tests enzymatiques devront être réalisés afin de déterminer leurs pouvoirs inhibiteurs sur l'enzyme Ba-IspD.

Perspectives

Le projet de ma thèse concerne la recherche d'inhibiteurs de l'enzyme IspD de *Bacillus anthracis* en utilisant une approche nouvelle pour le laboratoire, l'approche par fragment. Cette méthode nécessite des techniques qui n'étaient jusque-là pas utilisées au laboratoire, comme la SPR ou la RMN STD. La maîtrise de ces techniques et l'exploitation des résultats demandent un peu d'expérience comme l'illustre la détermination des K_D des fragments sélectionnés.

En effet, la mesure du K_D entre un fragment et Ba-IspD par SPR devrait être faite en triplicata avec un même taux d'immobilisation d'enzyme afin d'obtenir des résultats plus précis et reproductibles. De plus, pour les fragments dont le plateau n'est pas atteint, des expériences à plus hautes concentrations en fragment permettraient de déterminer plus précisément le K_D mais, la solubilité des fragments pouvait poser problème. La RMN STD peut également permettre de déterminer un K_D ^{133,247}, ce qui pourrait être une autre solution en cas de difficultés rencontrées en SPR.

Lors de la sélection des fragments par SPR, l'enzyme Ec-IspD a été également immobilisée de façon covalente. Cependant, de façon relativement surprenante, les résultats obtenus avec cette enzyme immobilisée semblent difficilement interprétables comparés à ceux obtenus avec Ba-IspD. L'immobilisation par capture entre l'étiquette Histidine de l'enzyme Ec-IspD et une surface greffée avec des molécules d'acide nitrilotriacétique en présence de nickel (Ni-NTA) permettrait une orientation moins aléatoire de la protéine sur la surface qui pourraient être une autre stratégie pour le criblage des fragments avec Ec-IspD.

L'objectif principal de cette thèse, est la synthèse d'un inhibiteur de l'enzyme Ba-IspD. Ainsi, après avoir sélectionné des fragments se liant à Ba-IspD, il est important de mesurer leur pouvoir inhibiteur. Les premiers tests réalisés par cinétiques enzymatiques sont peu reproductibles et nécessitent une optimisation du test enzymatique avec une vérification de la qualité des substrats (CTP et MEP).

Le criblage des fragments nous a permis de sélectionner 23 molécules, dont quatre ont servi de squelette pour être agrandi. Plusieurs fragments ont donc pour le moment été mis de côté pour diverses raisons, notamment temporelles. Il serait donc intéressant de s'attarder plus en détail sur plusieurs fragments criblés, dont le **B4H08**. Ce dernier n'a pas été sélectionné malgré les résultats encourageants obtenus par SPR, avec un K_D de 104 μM et une IC_{50} ($n=1$) de 59 μM . En effet, la stratégie de synthèse de ce fragment semblait compliquée à mettre en place dans un temps relativement court.

Cependant, avec le temps nécessaire pour réaliser la synthèse de ce fragment, la même stratégie de « fragment growing » que celle utilisée pourrait permettre de le faire grandir. La présence d'une amine sur ce fragment peut conduire à une bibliothèque de molécules par couplage peptidique avec différents acides carboxyliques.

Avant de parler d'évolution des fragments, il est nécessaire de tester les molécules synthétisées afin de savoir si elles permettent ou non d'inhiber l'activité de Ba-IspD. Selon les résultats obtenus, il existe plusieurs possibilités. Si ces molécules inhibent l'activité de Ba-IspD, des essais de co-cristallisation de ces molécules avec Ba-IspD peuvent être envisagées afin de faire évoluer d'avantage ces molécules à partir d'informations structurales. Si ces molécules ont peu d'influence sur l'activité de l'enzyme, on peut envisager d'autres évolutions des fragments sélectionnés, comme la modification de la nature des chaînes ajoutées aux fragments comme des substituants plus hydrophiles tels des alcools, cétones ou des amines.

D'autre part, les résultats de docking ont montré que ces différents fragments se positionnaient dans trois sites distincts de l'enzyme. Une stratégie pour relier ces fragments avec un espaceur peut ainsi être envisagée. Une idée de stratégie serait l'ajout de groupement alcyne et azoture. Ces fonctions peuvent être ajoutées aux fragments en adoptant la même stratégie que précédemment par le biais de couplage peptidique (Figure 128).

Les fonctions azoture ou alcyne portées par les molécules synthétisées vont permettre de faire grandir les fragments en utilisant la cycloaddition [3+2] catalysée au cuivre CuAAC établie par Sharpless *et al.*²⁴⁸ en 2002 permettant de réaliser un couplage simple (pression atmosphérique, TA, air ambiant) catalysée au cuivre (I). Plus récemment, le mécanisme a été actualisé par Fokin *et al.*²⁴⁹ en démontrant l'intervention d'un intermédiaire cuivre bi-nucléaire impliquant la nécessité d'avoir un alcyne vrai lors de la catalyse. Un espaceur PEG peut être utilisé afin d'augmenter la solubilité des molécules dans les milieux biologiques²⁵⁰. Une chaîne PEG de (**n** = 1 à 3 motifs) contenant l'alcyne vrai permettrait d'obtenir différentes longueurs d'espaces et de couvrir un plus large espace chimique.

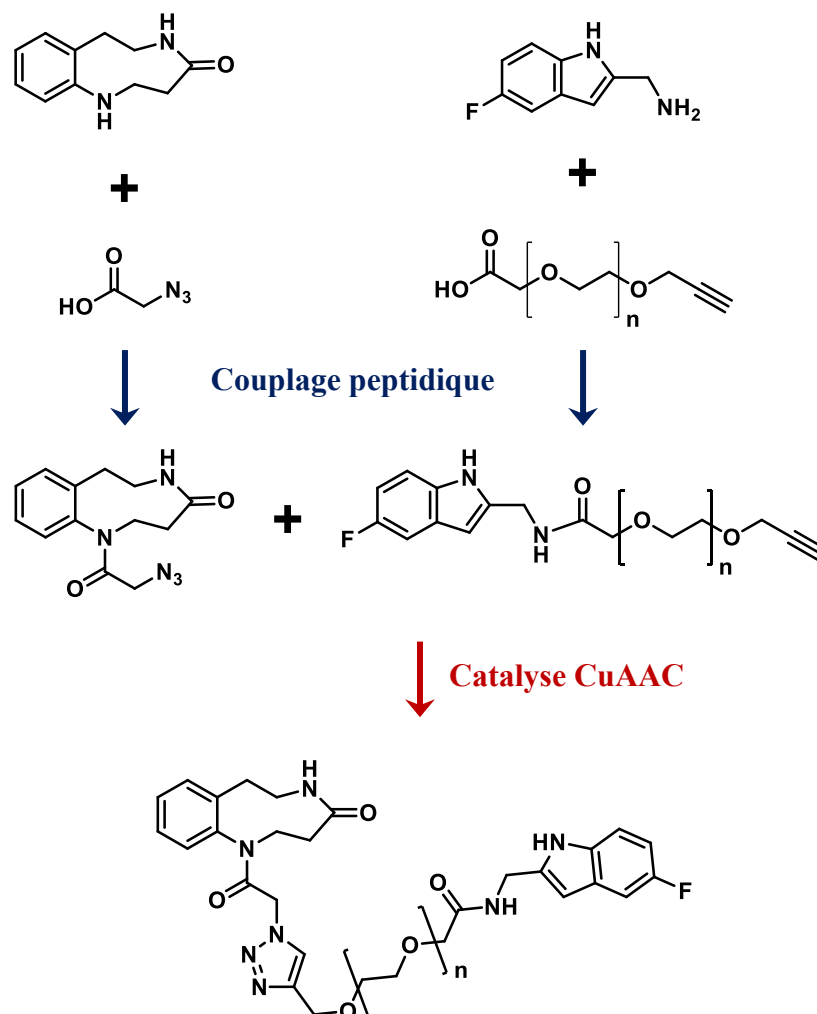


Figure 128 : Exemple d'une stratégie de synthèse par catalyse au cuivre (I) CuAAC.

De plus, il a été montré au laboratoire que le MEP-N₃ (Tableau 1, entrée 3, p. 35) est un inhibiteur de Ec-IspD qui se positionne dans le site actif. Le MEP-N₃ pourra être testé sur Ba-IspD et utilisé dans des couplages avec les fragments substitués par un alcyne par chimie Click. L'association de ces molécules pourrait conduire à un potentiel inhibiteur de l'enzyme Ba-IspD.

Pour conclure, les résultats décrits dans ce manuscrit ouvrent plusieurs perspectives, notamment dans l'évolution des fragments sélectionnés. Les inhibiteurs potentiels de Ba-IspD pourront être testés sur Ec-IspD, mais également sur d'autres enzymes issues d'autres organismes comme *P. falciparum* responsable de la malaria. On peut également envisager d'utiliser cette approche par fragment sur d'autres cibles étudiées au laboratoire.

Références

Références

1. McSherry, J. & Kilpatrick, R. The plague of Athens. *J. R. Soc. Med.* **85**, 713 (1992).
2. Rayet, P.-F.-O. *Inoculation du sang de rate*. (J.-B. Baillière, 1850).
3. Hudson, M. J., Beyer, W., Böhm, R., Fasanella, A., Garofolo, G., Golinski, R., Goossens, P. L., Hahn, U., Hallis, B., King, A., Mock, M., Montecucco, C., Ozin, A., Tonello, F. & Kaufmann, S. H. E. *Bacillus anthracis*: Balancing innocent research with dual-use potential. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 345-364 (2008).
4. Moayeri, M. & Leppla, S. H. Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol. Asp. Med.* **30**, 439-455 (2009).
5. *Anthrax in humans and animals*. (World Health Organization, 2008).
6. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. (Elsevier/Saunders, 2015).
7. Shadomy, S., Idrissi, A. E., Raizman, E., Bruni, M., Palamara, E., Pittiglio, C. & Lubroth, J. Anthrax outbreaks: a warning for improved prevention, control and heightened awareness. *EMPRES Watch*, **37**, (2016).
8. Swick, M. C., Koehler, T. M. & Driks, A. Surviving Between Hosts: Sporulation and Transmission. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
9. Zasada, A. Injectional anthrax in human: A new face of the old disease. *Adv. Clin. Exp. Med.* **27**, 553-558 (2018).
10. Abrami, L., Reig, N. & van der Goot, F. G. Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol.* **13**, 72-78 (2005).
11. Cote, C. & Welkos, S. Anthrax Toxins in Context of *Bacillus anthracis* Spores and Spore Germination. *Toxins* **7**, 3167-3178 (2015).

12. Keim, P., Gruendike, J. M., Klevytska, A. M., Schupp, J. M., Challacombe, J. & Okinaka, R. The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Mol. Asp. Med.* **30**, 397-405 (2009).
13. Baldari, C. T., Tonello, F., Paccani, S. R. & Montecucco, C. Anthrax toxins: a paradigm of bacterial immune suppression. *Trends in Immunol.* **27**, 434-440 (2006).
14. Inglesby, T. V., O'Toole, T., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Friedlander, A. M., Gerberding, J., Hauer, J., Hughes, J., McDade, J., Osterholm, M. T., Parker, G., Perl, T. M., Russell, P. K., Tonat, K. & for the Working Group on Civilian Biodefense. Anthrax as a Biological Weapon, 2002: Updated Recommendations for Management. *JAMA* **287**, 2236 (2002).
15. Smith, K. A. Louis Pasteur, the Father of Immunology? *Front. Immun.* **3**, (2012).
16. Benn Felix, J., Chaki, S. P., Ficht, T. A., Rice-Ficht, A. C. & Cook, W. *Bacillus anthracis* Sterne Strain 34f2 Vaccine Antibody Dose Response by Subcutaneous and Oral Administration. *Poult. Fish. Wildl. Sci.* **07**, (2019).
17. Cassini, A. *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* **19**, 56-66 (2019).
18. Pan, Y., Xu, Y., Wang, Z., Fang, Y. & Shen, J. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* **198**, 565-571 (2016).
19. Etebu, E. & Ukpung, M. Bacterial resistance to antibiotics: Update on molecular perspectives. *Microbiol. Res. Int.* **4**, 11 (2016).
20. Shepard, C. W., Soriano-Gabarro, M., Zell, E. R., Hayslett, J., Lukacs, S., Goldstein, S., Factor, S., Jones, J., Ridzon, R., Williams, I., Rosenstein, N. & the CDC Adverse Events Working Group. Antimicrobial Postexposure Prophylaxis for Anthrax: Adverse Events and Adherence. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 1124-1132 (2002).

21. Bradaric, N. & Punda-Polic, V. Cutaneous anthrax due to penicillin-resistant *Bacillus anthracis* transmitted by an insect bite. *Lancet* **340**, 306-307 (1992).
22. Coker, P. R., Smith, K. L. & Hugh-Jones, M. E. Antimicrobial Susceptibilities of Diverse *Bacillus anthracis* Isolates. *AAC* **46**, 3843-3845 (2002).
23. Chen, Y., Succi, J., Tenover, F. C. & Koehler, T. M. β -Lactamase Genes of the Penicillin-Susceptible *Bacillus anthracis* Sterne Strain. *J. Bacteriol. Res.* **185**, 823-830 (2003).
24. Athamna, A. Selection of *Bacillus anthracis* isolates resistant to antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 424-428 (2004).
25. Xing, Y., Wang, W., Dai, S., Liu, T., Tan, J., Qu, G., Li, Y., Ling, Y., Liu, G., Fu, X. & Chen, H. Daptomycin exerts rapid bactericidal activity against *Bacillus anthracis* without disrupting membrane integrity. *Acta Pharmacol. Sin.* **35**, 211-218 (2014).
26. Taylor, S. D. & Palmer, M. The action mechanism of daptomycin. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 6253-6268 (2016).
27. Christianson, D. W. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chem. Rev.* **117**, 11570-11648 (2017).
28. Wallach, O. Zur Kenntniss der Terpene und ätherischen Oele. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **238**, 78-89 (1887).
29. Croteau, R. The Discovery of Terpenes. in *Discoveries in Plant Biology* 329-343 (WORLD SCIENTIFIC, 1998).
30. Ruzicka, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* **9**, 357-367 (1953).
31. Ramos-Valdivia, A. C., van der Heijden, R. & Verpoorte, R. Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function. *Nat. Prod. Rep.* **14**, 591 (1997).

32. Ogura, K. & Koyama, T. Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem. Rev.* **98**, 1263-1276 (1998).
33. Bloch, K. The Biological Synthesis of Cholesterol. *Science* **150**, 19-28 (1965).
34. Bloch, K. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* **57**, 378-383 (1992).
35. Miziorko, H. M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **505**, 131-143 (2011).
36. VanNice, J. C., Skaff, D. A., Keightley, A., Addo, J. K., Wyckoff, G. J. & Miziorko, H. M. Identification in *Haloferax volcanii* of Phosphomevalonate Decarboxylase and Isopentenyl Phosphate Kinase as Catalysts of the Terminal Enzyme Reactions in an Archaeal Alternate Mevalonate Pathway. *J. Bacteriol. Res.* **196**, 1055-1063 (2014).
37. Vinokur, J. M., Cummins, M. C., Korman, T. P. & Bowie, J. U. An Adaptation To Life In Acid Through A Novel Mevalonate Pathway. *Sci. Rep.* **6**, 39737 (2016).
38. Hayakawa, H., Motoyama, K., Sobue, F., Ito, T., Kawaide, H., Yoshimura, T. & Hemmi, H. Modified mevalonate pathway of the archaeon *Aeropyrum pernix* proceeds via *trans* - anhydromevalonate 5-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, 10034-10039 (2018).
39. Anderson, D. G., Norgard, D. W. & Porter, J. W. The Incorporation of Mevalonic Acid-2-C¹⁴ and Dimethylacrylic Acid-3-C¹⁴ into Carotenes. *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 68-77 (1960).
40. Ramasarma, T. & Ramakrishnan, T. Incorporation of [2-¹⁴C]mevalonic acid and [2-¹⁴C]acetic acid into lipids of mycobacteria. *Biochem. J.* **81**, 303-308 (1961).
41. Pandian, S., Saengchjan, S. & Raman, T. S. An alternative pathway for the biosynthesis of isoprenoid compounds in bacteria. *Biochem. J.* **196**, 675-681 (1981).
42. Zhou, D. & White, R. H. Early steps of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **273**, 627-634 (1991).

43. Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. & Sahm, H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**, 517-524 (1993).
44. Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2564-2566 (1996).
45. Broers, S. T. J. Ueber die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*. (ETH Zürich, 1994).
46. Schwarz, M. & Arigoni, D. Schwarz, M. & Arigoni, D. 2.14 Ginkgolide Biosynthesis. in *Comprehensive Natural Products Chemistry* (eds. Barton, S. D., Nakanishi, K. & Meth-Cohn, O.) 367-400 (Pergamon, 1999).
47. Lichtenthaler, H. K. Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 5 (2000).
48. Sprenger, G. A., Schorken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, A. A., Taylor, S. V., Begley, T. P., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12857-12862 (1997).
49. Lois, L. M., Campos, N., Putra, S. R., Danielsen, K., Rohmer, M. & Boronat, A. Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2105-2110 (1998).
50. Enzymatic Carbon-Carbon Bond Formation. in *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry* 148-180 (John Wiley & Sons, Ltd, 2012).

51. Chen, P. Y.-T., DeColli, A. A., Freel Meyers, C. L. & Drennan, C. L. X-ray crystallography-based structural elucidation of enzyme-bound intermediates along the 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase reaction coordinate. *J. Biol. Chem.* **294**, 12405-12414 (2019).
52. Masini, T., Pilger, J., Kroezen, B. S., Illarionov, B., Lottmann, P., Fischer, M., Griesinger, C. & Hirsch, A. K. H. De novo fragment-based design of inhibitors of DXS guided by spin-diffusion-based NMR spectroscopy. *Chem. Sci.* **5**, 3543-3551 (2014).
53. Sánchez-Pedregal, V. M., Reese, M., Meiler, J., Blommers, M. J. J., Griesinger, C. & Carlomagno, T. The INPHARMA Method: Protein-Mediated Interligand NOEs for Pharmacophore Mapping. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 4172-4175 (2005)
54. Bartee, D. & Freel Meyers, C. L. Targeting the Unique Mechanism of Bacterial 1-Deoxy-D -xylulose-5-phosphate Synthase. *Biochemistry* **57**, 4349-4356 (2018).
55. Duvold, T., Calf, P., Bravo, J.-M. & Rohmer, M. Incorporation of 2-C-Methyl-D-erythritol, a Putative Isoprenoid Precursor in the Mevalonate-Independent Pathway, into Ubiquinone and Menaquinone of *Escherichia coli*. *Tetrahedron Lett.* **35**, 6181-6184 (1997).
56. Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H. & Seto, H. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9879-9884 (1998).
57. Wong, U. & Cox, R. J. The Chemical Mechanism of D-1-Deoxyxylulose-5-phosphate Reductoisomerase from *Escherichia coli*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 4926-4929 (2007).
58. Yajima, S., Hara, K., Iino, D., Sasaki, Y., Kuzuyama, T., Ohsawa, K. & Seto, H. Structure of 1-deoxy- D -xylulose 5-phosphate reductoisomerase in a quaternary complex with a magnesium ion, NADPH and the antimalarial drug fosmidomycin. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun* **63**, 466-470 (2007).

59. Kuzuyama, T., Shimizu, T., Takahashi, S. & Seto, H. Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**, 7913-7916 (1998).
60. R. Jackson, E. & S. Dowd, C. Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase (Dxr): A Review of the Synthesis and Biological Evaluation of Recent Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 706-728 (2012).
61. Martens, E. & Demain, A. L. An Overview of the Industrial Aspects of Antibiotic Discovery. in *Microbial Resources* 149-168 (Elsevier, 2017).
62. Behrendt, C. T., Kunfermann, A., Illarionova, V., Matheussen, A., Gräwert, T., Groll, M., Rohdich, F., Bacher, A., Eisenreich, W., Fischer, M., Maes, L. & Kurz, T. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Highly Active Reverse Analogues of the Antimalarial Drug Candidate Fosmidomycin. *ChemMedChem* **5**, 1673-1676 (2010).
63. Behrendt, C. T., Kunfermann, A., Illarionova, V., Matheussen, A., Pein, M. K., Gräwert, T., Kaiser, J., Bacher, A., Eisenreich, W., Illarionov, B., Fischer, M., Maes, L., Groll, M. & Kurz, T. Reverse Fosmidomycin Derivatives against the Antimalarial Drug Target IspC (Dxr). *J. Med. Chem.* **54**, 6796-6802 (2011).
64. Xue, J., Diao, J., Cai, G., Deng, L., Zheng, B., Yao, Y. & Song, Y. Antimalarial and Structural Studies of Pyridine-Containing Inhibitors of 1-Deoxyxylulose-5-phosphate Reductoisomerase. *ACS Med. Chem. Lett.* **4**, 278-282 (2013).
65. Mercklé, L., de Andrés-Gómez, A., Dick, B., Cox, R. J. & Godfrey, C. R. A. A Fragment-Based Approach to Understanding Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *ChemBioChem* **6**, 1866-1874 (2005).
66. Rohdich, F., Wungsintaweeikul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A. & Zenk, M. H. Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis

- of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11758-11763 (1999).
67. Richard, S. B., Bowman, M. E., Kwiatkowski, W., Kang, I., Chow, C., Lillo, A. M., Cane, D. E. & Noel, J. P. Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol synthetase involved in mevalonate-independent isoprenoid biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 641-648 (2001).
68. Richard, S. B., Lillo, A. M., Tetzlaff, C. N., Bowman, M. E., Noel, J. P. & Cane, D. E. Kinetic Analysis of *Escherichia coli* 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate Cytidyltransferase, Wild Type and Mutants, Reveals Roles of Active Site Amino Acids. *Biochemistry* **43**, 12189-12197 (2004).
69. Luttgen, H., Rohdich, F., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M. H., Bacher, A. & Eisenreich, W. Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1062-1067 (2000).
70. Kuzuyama, T., Takagi†, M., Kaneda, K., Dairi, T. & Seto, H. Formation of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol from 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate by 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, a new enzyme in the nonmevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.* **41**, 703-706 (2000).
71. Kuzuyama, T., Takagi, M., Kaneda, K., Watanabe, H., Dairi, T. & Seto, H. Studies on the nonmevalonate pathway: conversion of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol to its 2-phospho derivative by 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase. *Tetrahedron Lett.* **41**, 2925-2928 (2000).
72. Miallau, L., Alphey, M. S., Kemp, L. E., Leonard, G. A., McSweeney, S. M., Hecht, S., Bacher, A., Eisenreich, W., Rohdich, F. & Hunter, W. N. Biosynthesis of isoprenoids:

- Crystal structure of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 9173-9178 (2003).
73. Hirsch, A. K. H., Lauw, S., Gersbach, P., Schweizer, W. B., Rohdich, F., Eisenreich, W., Bacher, A. & Diederich, F. Nonphosphate Inhibitors of IspE Protein, a Kinase in the Non-Mevalonate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis and a Potential Target for Antimalarial Therapy. *ChemMedChem* **2**, 806-810 (2007).
74. Crane, C. M., Hirsch, A. K. H., Alphey, M. S., Sgraja, T., Lauw, S., Illarionova, V., Rohdich, F., Eisenreich, W., Hunter, W. N., Bacher, A. & Diederich, F. Synthesis and Characterization of Cytidine Derivatives that Inhibit the Kinase IspE of the Non-Mevalonate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis. *ChemMedChem* **3**, 91-101 (2008).
75. Richard, S. B., Ferrer, J.-L., Bowman, M. E., Lillo, A. M., Tetzlaff, C. N., Cane, D. E. & Noel, J. P. Structure and Mechanism of 2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-Cyclodiphosphate Synthase: an enzyme in the mevalonate-independent isoprenoid biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 8667-8672 (2002).
76. Geist, J. G., Lauw, S., Illarionova, V., Illarionov, B., Fischer, M., Gräwert, T., Rohdich, F., Eisenreich, W., Kaiser, J., Groll, M., Scheurer, C., Wittlin, S., Alonso-Gómez, J. L., Schweizer, W. B., Bacher, A. & Diederich, F. Thiazolopyrimidine Inhibitors of 2-Methylerythritol 2,4-Cyclodiphosphate Synthase (IspF) from *Mycobacterium tuberculosis* and *Plasmodium falciparum*. *ChemMedChem.* **5**, 1092-1101 (2010).
77. a) Begley, D. W., Hartley, R. C., Davies, D. R., Edwards, T. E., Leonard, J. T., Abendroth, J., Burris, C. A., Bhandari, J., Myler, P. J., Staker, B. L. & Stewart, L. J. Leveraging structure determination with fragment screening for infectious disease drug targets: MECP synthase from *Burkholderia pseudomallei*. *J. Struct. Funct. Genomics* **12**, 63-76 (2011).
- b) Zhang, Z., Jakkaraju, S., Blain, J., Gogol, K., Zhao, L., Hartley, R. C., Karlsson, C. A., Stake, B. L., Edwards, T. E., Stewart, L. J., Myler, P. J., Clare, M., Begley, D. W., Horn

- J. R., Hagen T. J., Cytidine derivatives as IspF inhibitors of *Burkholderia pseudomallei*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 6860-6863 (2013).
78. Gabrielsen, M., Rohdich, F., Eisenreich, W., Gräwert, T., Hecht, S., Bacher, A. & Hunter, W. N. Biosynthesis of isoprenoids: A bifunctional IspDF enzyme from *Campylobacter jejuni*. *Eur. J. of Biochem.* **271**, 3028-3035 (2004).
79. Baker, J., Franklin, D. B. & Parker, J. Sequence and characterization of the *gcpE* gene of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **94**, 175-180 (1992).
80. Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Seemann, M., Rohmer, M. & Boronat, A. Identification of *gcpE* as a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **488**, 170-173 (2001).
81. Seemann, M., Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Hoeffler, J.-F., Grosdemange-Billiard, C., Boronat, A. & Rohmer, M. Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: accumulation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in a *gcpE* deficient mutant of *Escherichia coli*. *Tetrahedron Lett.* **43**, 775-778 (2002).
82. Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D. & Rohdich, F. Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14837-14842 (2001).
83. Seemann, M., Bui, B. T. S., Wolff, M., Tritsch, D., Campos, N., Boronat, A., Marquet, A. & Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis through the Methylerythritol Phosphate Pathway: The (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl Diphosphate Synthase (GcpE) is a [4Fe-4S] Protein. *Angew. Chem., Int. Ed.* **41**, 3 (2002).
84. Seemann, M., Wegner, P., Schünemann, V., Bui, B. T. S., Wolff, M., Marquet, A., Trautwein, A. X. & Rohmer, M. Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe-4S] protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* **10**, 131-137 (2005).

85. Quitterer, F., Frank, A., Wang, K., Rao, G., O'Dowd, B., Li, J., Guerra, F., Abdel-Azeim, S., Bacher, A., Eppinger, J., Oldfield, E. & Groll, M. Atomic-Resolution Structures of Discrete Stages on the Reaction Coordinate of the [Fe₄S₄] Enzyme IspG (GcpE). *J. Mol. Biol.* **427**, 2220-2228 (2015).
86. Liu, Y.-L., Guerra, F., Wang, K., Wang, W., Li, J., Huang, C., Zhu, W., Houlihan, K., Li, Z., Zhang, Y., Nair, S. K. & Oldfield, E. Structure, function and inhibition of the two- and three-domain 4Fe-4S IspG proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 8558-8563 (2012).
87. Gustafson, C. E., Kaul, S. & Ishiguro, E. E. Identification of the *Escherichia coli* *lytB* Gene, Which Is Involved in Penicillin Tolerance and Control of the Stringent Response. *J. Bacteriol. Res.* **175**, 1203-1205 (1993).
88. Cunningham, F. X., Lafond, T. P. & Gantt, E. Evidence of a Role for LytB in the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**, 5841-5848 (2000).
89. McAteer, S., Coulson, A., McLennan, N. & Masters, M. The *lytB* Gene of *Escherichia coli* Is Essential and Specifies a Product Needed for Isoprenoid Biosynthesis. *J. Bacteriol.* **183**, 7403-7407 (2001).
90. Rohdich, F., Hecht, S., Gartner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A. & Eisenreich, W. Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1158-1163 (2002).
91. Wolff, M., Seemann, M., Tse Sum Bui, B., Frapart, Y., Tritsch, D., Estrabot, A. G., Rodríguez-Concepción, M., Boronat, A., Marquet, A. & Rohmer, M. Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* is a [4Fe-4S] protein. *FEBS Lett.* **541**, 115-120 (2003).
92. Seemann, M., Janthawornpong, K., Schweizer, J., Böttger, L. H., Janoschka, A., Ahrens-Botzong, A., Tambou, E. N., Rotthaus, O., Trautwein, A. X. & Rohmer, M. Isoprenoid

- Biosynthesis via the MEP Pathway: In Vivo Mössbauer Spectroscopy Identifies a [4Fe-4S]²⁺ Center with Unusual Coordination Sphere in the LytB Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 13184-13185 (2009).
93. Ahrens-Botzong, A., Janthawornpong, K., Wolny, J. A., Tambou, E. N., Rohmer, M., Krasutsky, S., Poulter, C. D., Schünemann, V. & Seemann, M. Biosynthesis of Isoprene Units: Mössbauer Spectroscopy of Substrate and Inhibitor Binding to the [4Fe-4S] Cluster of the LytB/IspH Enzyme. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 11976-11979 (2011).
94. Wang, W. & Oldfield, E. Bioorganometallic Chemistry with IspG and IspH: Structure, Function, and Inhibition of the [Fe₄S₄] Proteins Involved in Isoprenoid Biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 4294-4310 (2014).
95. Chaignon, P., Petit, B. E., Vincent, B., Allouche, L. & Seemann, M. Methylerythritol Phosphate Pathway: Enzymatic Evidence for a Rotation in the LytB/IspH-Catalyzed Reaction. *Chem. Eur. J.* **26**, 1032-1036 (2020).
96. Wang, W., Wang, K., Liu, Y.-L., No, J.-H., Li, J., Nilges, M. J. & Oldfield, E. Bioorganometallic mechanism of action, and inhibition, of IspH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 4522-4527 (2010).
97. Rekitke, I., Olkhova, E., Wiesner, J., Demmer, U., Warkentin, E., Jomaa, H. & Ermler, U. Structure of the (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-diphosphate reductase from *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett.* **587**, 3968-3972 (2013).
98. Janthawornpong, K., Krasutsky, S., Chaignon, P., Rohmer, M., Poulter, C. D. & Seemann, M. Inhibition of IspH, a [4Fe-4S]²⁺ Enzyme Involved in the Biosynthesis of Isoprenoids via the Methylerythritol Phosphate Pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1816-1822 (2013).
99. Borel, F., Barbier, E., Krasutsky, S., Janthawornpong, K., Chaignon, P., Poulter, C. D., Ferrer, J.-L. & Seemann, M. Further Insight into Crystal Structures of *Escherichia coli*

- IspH/LytB in Complex with Two Potent Inhibitors of the MEP Pathway: A Starting Point for Rational Design of New Antimicrobials. *ChemBioChem* **18**, 2137-2144 (2017).
100. Span, I., Wang, K., Wang, W., Jauch, J., Eisenreich, W., Bacher, A., Oldfield, E. & Groll, M. Structures of Fluoro, Amino, and Thiol Inhibitors Bound to the [Fe₄S₄] Protein IspH. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 2118-2121 (2013).
101. Singh, N., Cheve, G., Avery, M. & McCurdy, C. Targeting the Methyl Erythritol Phosphate (MEP) Pathway for Novel Antimalarial, Antibacterial and Herbicidal Drug Discovery: Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase (DXR) Enzyme. *Curr. Pharm. Des* **13**, 1161-1177 (2007).
102. Rodriguez-Concepcion, M. The MEP Pathway: A New Target for the Development of Herbicides, Antibiotics and Antimalarial Drugs. *Curr. Pharm. Des* **10**, 2391-2400 (2004).
103. Masini, T., Kroezen, B. S. & Hirsch, A. K. H. Druggability of the enzymes of the non-mevalonate-pathway. *Drug Discov. Today* **18**, 1256-1262 (2013).
104. Lillo, A. M., Tetzlaff, C. N., Sangari, F. J. & Cane, D. E. Functional expression and characterization of eryA, the erythritol kinase of *Brucella abortus*, and enzymatic synthesis of l-Erythritol-4-phosphate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 737-739 (2003).
105. Zhang, B., Watts, K. M., Hodge, D., Kemp, L. M., Hunstad, D. A., Hicks, L. M. & Odom, A. R. A Second Target of the Antimalarial and Antibacterial Agent Fosmidomycin Revealed by Cellular Metabolic Profiling. *Biochemistry* **50**, 3570-3577 (2011).
106. Baatarkhuu, Z., Chaignon, P., Borel, F., Ferrer, J.-L., Wagner, A. & Seemann, M. Synthesis and Kinetic evaluation of an azido analogue of methylerythritol phosphate: a Novel Inhibitor of *E. coli* YgbP/IspD. *Sci. Rep.* **8**, 17892 (2018).
107. Bartee, D., Wheadon, M. J. & Freel Meyers, C. L. Synthesis and Evaluation of Fluoroalkyl Phosphonyl Analogues of 2- C -Methylerythritol Phosphate as Substrates and Inhibitors of IspD from Human Pathogens. *J. Org. Chem.* **83**, 9580-9591 (2018).

108. Wu, W., Herrera, Z., Ebert, D., Baska, K., Cho, S. H., DeRisi, J. L. & Yeh, E. A Chemical Rescue Screen Identifies a *Plasmodium falciparum* Apicoplast Inhibitor Targeting MEP Isoprenoid Precursor Biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 356-364 (2015).
109. Imlay, L. S., Armstrong, C. M., Masters, M. C., Li, T., Price, K. E., Edwards, R. L., Mann, K. M., Li, L. X., Stallings, C. L., Berry, N. G., O'Neill, P. M. & Odom, A. R. *Plasmodium* IspD (2-C-Methyl-D-erythritol 4-Phosphate Cytidyltransferase), an Essential and Druggable Antimalarial Target. *ACS Infect. Dis.* **1**, 157-167 (2015).
110. Price, K. E., Armstrong, C. M., Imlay, L. S., Hodge, D. M., Pidathala, C., Roberts, N. J., Park, J., Mikati, M., Sharma, R., Lawrenson, A. S., Tolia, N. H., Berry, N. G., O'Neill, P. M. & John, A. R. O. Molecular Mechanism of Action of Antimalarial Benzoisothiazolones: Species-Selective Inhibitors of the *Plasmodium* spp. MEP Pathway enzyme, IspD. *Sci. Rep.* **6**, 36777 (2016).
111. Witschel, M. C., Höffken, H. W., Seet, M., Parra, L., Mietzner, T., Thater, F., Niggeweg, R., Röhl, F., Illarionov, B., Rohdich, F., Kaiser, J., Fischer, M., Bacher, A. & Diederich, F. Inhibitors of the Herbicidal Target IspD: Allosteric Site Binding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 7931-7935 (2011).
112. Kunfermann, A., Witschel, M., Illarionov, B., Martin, R., Rottmann, M., Höffken, H. W., Seet, M., Eisenreich, W., Knölker, H.-J., Fischer, M., Bacher, A., Groll, M. & Diederich, F. Pseudilins: Halogenated, Allosteric Inhibitors of the Non-Mevalonate Pathway Enzyme IspD. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 2235-2239 (2014).
113. Schwab, A., Illarionov, B., Frank, A., Kunfermann, A., Seet, M., Bacher, A., Witschel, M. C., Fischer, M., Groll, M. & Diederich, F. Mechanism of Allosteric Inhibition of the Enzyme IspD by Three Different Classes of Ligands. *ACS Chem. Biol.* **12**, 2132-2138 (2017).

114. Wang, J., Zhou, Y., Wang, X., Duan, L., Duan, J., Li, W. & Zhang, A. Synthesis and Evaluation of Halogenated 5-(2-Hydroxyphenyl)pyrazoles as Pseudilin Analogues Targeting the Enzyme IspD in the Methylerythritol Phosphate Pathway. *J. Agric. Food Chem.* **68**, 3071-3078 (2020).
115. Hughes, J., Rees, S., Kalindjian, S. & Philpott, K. Principles of early drug discovery: Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 1239-1249 (2011).
116. Macarron, R., Banks, M. N., Bojanic, D., Burns, D. J., Cirovic, D. A., Garyantes, T., Green, D. V. S., Hertzberg, R. P., Janzen, W. P., Paslay, J. W., Schopfer, U. & Sittampalam, G. S. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 188-195 (2011).
117. Erlanson, D. A., Fesik, S. W., Hubbard, R. E., Jahnke, W. & Jhoti, H. Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 605-619 (2016).
118. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23**, 3-25 (1997).
119. Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **44**, 235-249 (2000).
120. Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W. & Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **45**, 2615-2623 (2002).
121. Hann, M. M., Leach, A. R. & Harper, G. Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **41**, 856 (2001).
122. Siegel, M. G. & Vieth, M. Drugs in other drugs: a new look at drugs as fragments. *Drug Discov. Today* **12**, 71-79 (2007).

123. Blum, L. C. & Reymond, J.-L. 970 Million Druglike Small Molecules for Virtual Screening in the Chemical Universe Database GDB-13. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 8732-8733 (2009).
124. Ruddigkeit, L., van Deursen, R., Blum, L. C. & Reymond, J.-L. Enumeration of 166 Billion Organic Small Molecules in the Chemical Universe Database GDB-17. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 2864-2875 (2012).
125. Congreve, M., Carr, R., Murray, C. & Jhoti, H. A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery? *Drug Discovery Today* **8**, 876-877 (2003).
126. Leach, A. R. & Hann, M. M. Molecular complexity and fragment-based drug discovery: ten years on. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 489-496 (2011).
127. Schuffenhauer, A., Ruedisser, S., Marzinzik, A., Jahnke, W., Selzer, P. & Jacoby, E. Library Design for Fragment Based Screening. *Curr. Top. Med. Chem.* **5**, 751-762 (2005).
128. Rees, D. C., Congreve, M., Murray, C. W. & Carr, R. Fragment-based lead discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 660 (2004).
129. Price, A. J., Howard, S. & Cons, B. D. Fragment-based drug discovery and its application to challenging drug targets. *Essays Biochem.* **61**, 475-484 (2017).
130. Ciulli, A. Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands. in *Protein-Ligand Interactions* (eds. Williams, M. A. & Daviter, T.) 357-388 (Humana Press, 2013).
131. Schiebel, J., Krimmer, S. G., Röwer, K., Knörlein, A., Wang, X., Park, A. Y., Stieler, M., Ehrmann, F. R., Fu, K., Radeva, N., Krug, M., Huschmann, F. U., Glöckner, S., Weiss, M. S., Mueller, U., Klebe, G. & Heine, A. High-Throughput Crystallography: Reliable and Efficient Identification of Fragment Hits. *Structure* **24**, 1398-1409 (2016).
132. Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. & Fesik, S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **274**, 1531 (1996).

133. Viegas, A., Manso, J., Nobrega, F. L. & Cabrita, E. J. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.* **88**, 990-994 (2011).
134. Meyer, B. & Peters, T. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 864-890 (2003).
135. Homola, J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 528-539 (2003).
136. Kodoyianni, V. Label-free analysis of biomolecular interactions using SPR imaging. *BioTechniques* **50**, 32-40 (2011).
137. Niesen, F. H., Berglund, H. & Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2**, 2212-2221 (2007).
138. Torres, F. E., Recht, M. I., Coyle, J. E., Bruce, R. H. & Williams, G. Higher throughput calorimetry: opportunities, approaches and challenges. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 598-605 (2010).
139. Caldwell, R., Liu-Bujalski, L., Qiu, H., Mochalkin, I., Jones, R., Neagu, C., Goutopoulos, A., Grenningloh, R., Johnson, T., Sherer, B., Gardberg, A., Follis, A. V., Morandi, F. & Head, J. Discovery of a novel series of pyridine and pyrimidine carboxamides as potent and selective covalent inhibitors of Btk. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **28**, 3419-3424 (2018).
140. Souers, A. J. *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **19**, 202-208 (2013).
141. Baell, J. B. & Nissink, J. W. M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017-Utility and Limitations. *ACS Chem. Biol.* **13**, 36-44 (2018).
142. Hopkins, A. L., Groom, C. R. & Alex, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discov. Today* **9**, 430-431 (2004).

143. Reynolds, C. H., Bembenek, S. D. & Tounge, B. A. The role of molecular size in ligand efficiency. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 4258-4261 (2007).
144. Davis, B. J. & Roughley, S. D. Fragment-Based Lead Discovery. in *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 371-439 (Elsevier, 2017).
145. Ciulli, A. & Abell, C. Fragment-based approaches to enzyme inhibition. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 489-496 (2007).
146. Murray, C. W. & Verdonk, M. L. The consequences of translational and rotational entropy lost by small molecules on binding to proteins. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **16**, 741-753 (2002).
147. Lehn, J.-M. Dynamic Combinatorial Chemistry and Virtual Combinatorial Libraries. *J. Comb. Chem.* 2455-2463 (1999).
148. Ramström, O. & Lehn, J.-M. Drug discovery by dynamic combinatorial libraries. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 26-36 (2002).
149. Kolb, H. C. & Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today* **8**, 1128-1137 (2003).
150. Sahner, J. H., Empting, M., Kamal, A., Weidel, E., Groh, M., Börger, C. & Hartmann, R. W. Exploring the chemical space of ureidothiophene-2-carboxylic acids as inhibitors of the quorum sensing enzyme PqsD from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Med. Chem.* **96**, 14-21 (2015).
151. Lamoree, B. & Hubbard, R. E. Current perspectives in fragment-based lead discovery (FBLD). *Essays Biochem.* **61**, 453-464 (2017).
152. Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K. & Hirth, P. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 873-886 (2012).
153. Yang, H., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Go, Z., Iyer, R., Kolis, S., Zhao, S., Lee, R., Grippo, J. F., Schostack, K., Simcox, M. E., Heimbrook, D., Bollag, G. & Su, F.

- RG7204 (PLX4032), a Selective BRAF^{V600E} Inhibitor, Displays Potent Antitumor Activity in Preclinical Melanoma Models. *Cancer Res.* **70**, 5518-5527 (2010).
154. Su, H., Zou, Y., Chen, G., Dou, H., Xie, H., Yuan, X., Zhang, X., Zhang, N., Li, M. & Xu, Y. Exploration of Fragment Binding Poses Leading to Efficient Discovery of Highly Potent and Orally Effective Inhibitors of FABP4 for Anti-inflammation. *J. Med. Chem.* **63**, 4090-4106 (2020).
155. Hao, J., Zhang, Y., Yan, X., Yan, F., Sun, Y., Zeng, J., Waigel, S., Yin, Y., Fraig, M. M., Egilmez, N. K., Suttles, J., Kong, M., Liu, S., Cleary, M. P., Sauter, E. & Li, B. Circulating Adipose Fatty Acid Binding Protein Is a New Link Underlying Obesity-Associated Breast/Mammary Tumor Development. *Cell Metab.* **28**, 689-705.e5 (2018).
156. Wood, R. W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Phil. Magm.* **4** 396-402 (1902).
157. Fano, U. The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves). *J. Opt. Soc. Am.* **31**, 213 (1941).
158. Hessel, A. & Oliner, A. A. A New Theory of Wood's Anomalies on Optical Gratings. *Appl. Opt.* **4**, 1275 (1965).
159. Kretschmann, E. & Raether, H. Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Z. Naturforsch. A* **23**, (1968).
160. Otto, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. Phys. A-Hadron Nucl.* **216**, 398-410 (1968).
161. Liedberg, B., Nylander, C. & Lunström, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuat.* **4**, 299-304 (1983).
162. Sternesjo, A., Mellgren, C. & Bjorck, L. Determination of Sulfamethazine Residues in Milk by a Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor Assay. *Anal. Biochem.* **226**, 175-181 (1995).

163. Haasnoot, W., Olieman, K., Cazemier, G. & Verheijen, R. Direct Biosensor Immunoassays for the Detection of Nonmilk Proteins in Milk Powder. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5201-5206 (2001).
164. Cimitan, S., Lindgren, M. T., Bertucci, C. & Danielson, U. H. Early Absorption and Distribution Analysis of Antitumor and Anti-AIDS Drugs: Lipid Membrane and Plasma Protein Interactions. *J. Med. Chem.* **48**, 3536-3546 (2005).
165. Reddy, T. R. K., Mutter, R., Heal, W., Guo, K., Gillet, V. J., Pratt, S. & Chen, B. Library Design, Synthesis, and Screening: Pyridine Dicarbonitriles as Potential Prion Disease Therapeutics. *J. Med. Chem.* **49**, 607-615 (2006).
166. Thaler, M., Metzger, J., Schreiegg, A., Denk, B., Gleixner, A., Hauptmann, H. & Lippa, P. B. Immunoassay for Sex Hormone-Binding Globulin in Undiluted Serum Is Influenced by High-Molecular-Mass Aggregates. *Clin. Chem.* **51**, 401-407 (2005).
167. Haes, A. J., Chang, L., Klein, W. L. & Van Duyne, R. P. Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2264-2271 (2005).
168. Forzani, E. S., Zhang, H., Chen, W. & Tao, N. Detection of Heavy Metal Ions in Drinking Water Using a High-Resolution Differential Surface Plasmon Resonance Sensor. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 1257-1262 (2005).
169. Zhang, W., Krishnan, N. & Becker, D. F. Kinetic and thermodynamic analysis of *Bradyrhizobium japonicum* PutA-membrane associations. *Arch. Biochem. Biophys.* **445**, 174-183 (2006).
170. Pizarro, J. C., Vulliez-le Normand, B., Riottot, M.-M., Budkowska, A. & Bentley, G. A. Structural and functional characterization of a monoclonal antibody specific for the preS1 region of hepatitis B virus. *FEBS Lett.* **509**, 463-468 (2001).

171. Boltovets, P. M., Snopok, B. A., Boyko, V. R., Shevchenko, T. P., Dyachenko, N. S. & Shirshov, Yu. M. Detection of plant viruses using a surface plasmon resonance *via* complexing with specific antibodies. *J. Virol. Methods* **121**, 101-106 (2004).
172. Ghosh, N., Gupta, N., Gupta, G., Boopathi, M., Pal, V. & Goel, A. K. Detection of protective antigen, an anthrax specific toxin in human serum by using surface plasmon resonance. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **77**, 14-19 (2013).
173. Gopinath, S. C. B., Shikamoto, Y., Mizuno, H. & Kumar, P. K. R. Snake-venom-derived Factor IX-binding protein specifically blocks the γ -carboxyglutamic acid-rich-domain-mediated membrane binding of human Factors IX and X. *Biochem. J.* **405**, 351-357 (2007).
174. Nguyen, H., Park, J., Kang, S. & Kim, M. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors* **15**, 10481-10510 (2015).
175. Shumaker-Parry, J. S., Aebersold, R. & Campbell, C. T. Parallel, Quantitative Measurement of Protein Binding to a 120-Element Double-Stranded DNA Array in Real Time Using Surface Plasmon Resonance Microscopy. *Anal. Chem.* **76**, 2071-2082 (2004).
176. Rodríguez-Frade, J. M., Martínez-Muñoz, L., Villares, R., Cascio, G., Lucas, P., Gomariz, R. P. & Mellado, M. Chemokine Detection Using Receptors Immobilized on an SPR Sensor Surface. in *Methods in Enzymology* 1-18 (Elsevier, 2016).
177. Patching, S. G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 43-55 (2014).
178. Helmerhorst, E., Chandler, D. J., Nussio, M. & Mamotte, C. D. Real-time and Label-free Bio-sensing of Molecular Interactions by Surface Plasmon Resonance: A Laboratory Medicine Perspective. *Clin. Biochem. Rev.* **33**, 161-173 (2012).

179. Nordin, H., Jungnelius, M., Karlsson, R. & Karlsson, O. P. Kinetic studies of small molecule interactions with protein kinases using biosensor technology. *Anal. Biochem.* **340**, 359-368 (2005).
180. Wegner, G. J., Wark, A. W., Lee, H. J., Codner, E., Saeki, T., Fang, S. & Corn, R. M. Real-Time Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements for the Multiplexed Determination of Protein Adsorption/Desorption Kinetics and Surface Enzymatic Reactions on Peptide Microarrays. *Anal. Chem.* **76**, 5677-5684 (2004).
181. Nygren-Babol, L., Sternesjö, Å., Jägerstad, M. & Björck, L. Affinity and Rate Constants for Interactions of Bovine Folate-Binding Protein and Folate Derivatives Determined by Optical Biosensor Technology. Effect of Stereoselectivity. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5473-5478 (2005).
182. Homola, J. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chem. Rev.* **108**, 462-493 (2008).
183. Raether, H. *Excitation of plasmons and interband transitions by electrons*. (Springer, 1980).
184. Homola, J. Electromagnetic Theory of Surface Plasmons. in *Surface Plasmon Resonance Based Sensors* (ed. Homola, J.) 3-44 (Springer Berlin Heidelberg, 2006).
185. Caucheteur, C. Plasmons de surface : principes physiques et applications. *Techniques de l'ingénieur États de la matière* (2014).
186. Baird, C. L. & Myszka, D. G. Current and emerging commercial optical biosensors. *J. Mol. Recognit.* **14**, 261-268 (2001).
187. Englebienne, P., Hoonacker, A. V. & Verhas, M. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *Spectroscopy* **17**, 255-273 (2003).

-
188. Lortat-Jacob, H. & Richard-Blum, S. Use of plasmon resonance (BIAcore™) for the analysis of ligand-receptor interactions. in *Visualization of receptors: methods in light and electron microscopy* 161-180 (CRC Press, 1997).
189. Rich, R. L. & Myszka, D. G. Survey of the year 2005 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* **19**, 478-534 (2006).
190. Monchaux, E. & Vermette, P. Development of Dextran-Derivative Arrays To Identify Physicochemical Properties Involved in Biofouling from Serum. *Langmuir* **23**, 3290-3297 (2007).
191. Monchaux, E. & Vermette, P. Cell adhesion resistance mechanisms using arrays of dextran-derivative layers. *J. Biomed. Mater. Res.* **85A**, 1052-1063 (2008).
192. Tudos, A. J. & Schasfoort, R. B. M. Chapter 1. Introduction to Surface Plasmon Resonance. in *Handbook of Surface Plasmon Resonance* (eds. Schasfoort, R. B. M. & Tudos, A. J.) 1-14 (Royal Society of Chemistry, 2008)..
193. Ravi Shankaran, D. & Miura, N. Trends in interfacial design for surface plasmon resonance based immunoassays. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **40**, 7187-7200 (2007).
194. Rich, R. L. & Myszka, D. G. Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* **21**, 355-400 (2008).
195. Stigter, E. C. A., Jong, G. J. de & van Bennekom, W. P. An improved coating for the isolation and quantitation of interferon- γ in spiked plasma using surface plasmon resonance (SPR). *Biosens. Bioelectron.* **21**, 474-482 (2005).
196. Day, Y. S. N., Baird, C. L., Rich, R. L. & Myszka, D. G. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods. *Protein Sci.* **11**, 1017-1025 (2002).

-
197. Bowles, M. R., Hall, D. R., Pond, S. M. & Winzor, D. J. Studies of Protein Interactions by Biosensor Technology: An Alternative Approach to the Analysis of Sensorgrams Deviating from Pseudo-First-Order Kinetic Behavior. *Anal. Biochem.* **244**, 133-143 (1997).
198. Karlsson, R. & Fält, A. Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J. Immunol. Methods* **200**, 121-133 (1997).
199. Schuck, P. & Minton, A. P. Analysis of Mass Transport-Limited Binding Kinetics in Evanescent Wave Biosensors. *Anal. Biochem.* **240**, 262-272 (1996).
200. De Crescenzo, G., Grothe, S., Zwaagstra, J., Tsang, M. & O'Connor-McCourt, M. D. Real-time Monitoring of the Interactions of Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Isoforms with Latency-associated Protein and the Ectodomains of the TGF- β Type II and III Receptors Reveals Different Kinetic Models and Stoichiometries of Binding. *J. Biol. Chem.* **276**, 29632-29643 (2001).
201. De Crescenzo, Grothe, S., Lortie, R., Debanne, M. T. & O'Connor-McCourt, M. Real-Time Kinetic Studies on the Interaction of Transforming Growth Factor α with the Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Reveal a Conformational Change Model. *Biochemistry* **39**, 9466-9476 (2000).
202. Schasfoort, R. B. M. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. 524 (The Royal Society of Chemistry, 2017).
203. Papalia, G. A. *et al.* Comparative analysis of 10 small molecules binding to carbonic anhydrase II by different investigators using Biacore technology. *Anal. Biochem.* **359**, 94-105 (2006).
204. Murray, R. K., Granner, D. K. & Rodwell, V. W. *Biochimie de Harper*. (2008).
205. GE Healthcare. Biacore T200 Software Handbook. (2015).

206. Gustafsson, S. S., Vrang, L., Terelius, Y. & Danielson, U. H. Quantification of interactions between drug leads and serum proteins by use of “binding efficiency”. *Anal. Biochem.* **409**, 163-175 (2011).
207. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
208. Lepre, C. A., Moore, J. M. & Peng, J. W. Theory and Applications of NMR-Based Screening in Pharmaceutical Research. *Chem. Rev.* **104**, 3641-3676 (2004).
209. Venkitakrishnan, R. P., Benard, O., Max, M., Markley, J. L. & Assadi-Porter, F. M. Use of NMR Saturation Transfer Difference Spectroscopy to Study Ligand Binding to Membrane Proteins. in *Membrane Protein Structure and Dynamics* (eds. Vaidehi, N. & Klein-Seetharaman, J.) 47-63 (Humana Press, 2012).
210. Liepinsh, E. & Otting, G. Proton exchange rates from amino acid side chains-implications for image contrast. *Magn. Reson. Med.* **35**, 30-42 (1996).
211. Bajorath, J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 882-894 (2002).
212. Langer, T. & Hoffmann, R. Virtual Screening An Effective Tool for Lead Structure Discovery. *Curr. Pharm. Des* **7**, 509-527 (2001).
213. Walters, W. P., Stahl, M. T. & Murcko, M. A. Virtual screening-an overview. *Drug Discov. Today* **3**, 160-178 (1998).
214. McConkey, B. J., Sobolev, V. & Edelman, M. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Curr. Sci. Assoc.* **83**, 845-856 (2002).
215. Kastholz, M. A., Pastor, M., Cruciani, G., Haaksma, E. E. J. & Fox, T. GRID/CPCA: A New Computational Tool To Design Selective Ligands. *J. Med. Chem.* **43**, 3033-3044 (2000).

-
216. Levitt, D. G. & Banaszak, L. J. POCKET: A computer graphics method for identifying and displaying protein cavities and their surrounding amino acids. *J. Mol. Graph.* **10**, 229-234 (1992).
217. Brady Jr., G. P. & Stouten, P. F. W. Fast prediction and visualization of protein binding pockets with PASS. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **14**, 383-401 (2000).
218. Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R. & Ferrin, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **161**, 269-288 (1982).
219. 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* **7**, 146-157 (2011).
220. Koshland, D. E. Correlation of Structure and Function in Enzyme Action. *Science* **142**, 1533-1541 (1963).
221. Sherman, W., Day, T., Jacobson, M. P., Friesner, R. A. & Farid, R. Novel Procedure for Modeling Ligand/Receptor Induced Fit Effects. *J. Med. Chem.* **49**, 534-553 (2006).
222. Michaelis, L. & Menten, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **49**, 333-369 (1913).
223. Johnson, K. & Goody, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Mente Paper. *Biochemistry* **50**, 8264-8269 (2011).
224. Bernal, C., Palacin, C., Boronat, A. & Imperial, S. A colorimetric assay for the determination of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate synthase activity. *Anal. Biochem.* **337**, 55-61 (2005).
225. Cleland, W. W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. *Biochim. Biophys. Acta - Specialized Section on Enzymological Subjects* **67**, 104-137 (1963).

226. 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.* **22**, 3099-3108 (1973).
227. Baatarkhuu, Z. Metabolic labelling of bacterial isoprenoids produced by the Methylerythritol phosphate pathway : A starting point towards a new inhibitor. (Université de Strasbourg, 2017).
228. Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C. A., Hecht, S., Zenk, M. H. & Bacher, A. Biosynthesis of terpenoids: 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6451-6456 (2000).
229. Webb, M. R. A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4884-4887 (1992).
230. Burns, D. T., Chimpalee, D., Chimpalee, N. & Ittipornkul, S. Flow-injection spectrophotometric determination of phosphate using Crystal Violet. *Anal. Chim. Acta* **254**, 197-200 (1991).
231. Soyenkoff, B. A micromethod of phosphate determination. *J. Biol. Chem.* **168**, 447-457 (1947).
232. Chen, P. S., Toribara, T. Y. & Warner, Huber. Microdetermination of Phosphorus. *Anal. Chem.* **28**, 1756-1758 (1956).
233. Murphy, J. & Riley, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* **27**, 31-36 (1962).
234. Cogan, E. B., Birrell, G. B. & Griffith, O. H. A Robotics-Based Automated Assay for Inorganic and Organic Phosphates. *Anal. Biochem.* **271**, 29-35 (1999).
235. Parella, T. Pulse Program Catalogue, NMR Guide 4.0, Bruker BioSpin. (2004).

236. Krężel, A. & Bal, W. A formula for correlating p K_a values determined in D₂O and H₂O. *J. Inorg. Biochem* **98**, 161-166 (2004).
237. Duclos, R. I. The total syntheses of D-erythro-sphingosine, N-palmitoylsphingosine (ceramide), and glucosylceramide (cerebroside) via an azidosphingosine analog. *Chem. Phys. Lipids*. **111**, 111-138 (2001).
238. Lagisetti, C., Urbansky, M. & Coates, R. M. The Dioxanone Approach to (2*S*, 3*R*)-2-*C*-Methylerythritol 4-Phosphate and 2,4-Cyclodiphosphate, and Various MEP Analogues. *J. Org. Chem.* **72**, 9886-9895 (2007).
239. Klapars, A., Parris, S., Anderson, K. W. & Buchwald, S. L. Synthesis of Medium Ring Nitrogen Heterocycles *via* a Tandem Copper-Catalyzed C-N Bond Formation-Ring-Expansion Process. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3529-3533 (2004).
240. Mandewale, M. C., Thorat, B., Patil, U. & Yamgar, R. Review : Synthesis and Application of Schiff Bases. *Int. J. Chem, Pharm, Sci.* **3**, 1919-1928 (2015).
241. Colvin, E. W., McGarry, D. & Nugent, M. J. Silicon-assisted synthesis of β-lactams. *Tetrahedron* **44**, 4157-4172 (1988).
242. Das, B., Venkateswarlu, K., Damodar, K. & Suneel, K. Ammonium acetate catalyzed improved method for the regioselective conversion of olefins into halohydrins and haloethers at room temperature. *J. Mol. Catal. A Chem.* **269**, 17-21 (2007).
243. Michel, B. Y. & Strazewski, P. Total Syntheses of a Conformationally Locked *North* - Type Methanocarba Puromycin Analogue and a Dinucleotide Derivative. *Chem. Eur. J.* **15**, 6244-6257 (2009).
244. Brant, M. G., Goodwin-Tindall, J., Stover, K. R., Stafford, P. M., Wu, F., Meek, A. R., Schiavini, P., Wohnig, S. & Weaver, D. F. Identification of Potent Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitors Based on a Phenylimidazole Scaffold. *ACS Med. Chem. Lett.* **9**, 131-136 (2018).

245. Purser, S., Moore, P. R., Swallow, S. & Gouverneur, V. Fluorine in medicinal chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 320-330 (2008).
246. Onda, K., Suzuki, T., Shiraki, R., Yonetoku, Y., Negoro, K., Momose, K., Katayama, N., Orita, M., Yamaguchi, T., Ohta, M. & Tsukamoto, S. Synthesis of 5-chloro-N-aryl-1H-indole-2-carboxamide derivatives as inhibitors of human liver glycogen phosphorylase a. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 5452-5464 (2008).
247. Fielding, L. NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **51**, 219-242 (2007).
248. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 2596-2599 (2002).
249. Worrell, B. T., Malik, J. A. & Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **340**, 457-460 (2013).
250. Harris, J. M. & Chess, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 214-221 (2003).

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Résolution des équations de Maxwell

Équations de Maxwell

$$\begin{aligned}
 \operatorname{div} \vec{D} = \nabla \cdot \vec{D} &= \rho & \vec{E} &= \text{champ électrique} \\
 \operatorname{div} \vec{B} = \nabla \cdot \vec{B} &= 0 & \vec{B} &= \text{champ magnétique} \\
 \overrightarrow{\operatorname{Rot}} \vec{E} = \nabla \wedge \vec{E} &= -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} & \vec{D} &= \text{déplacement électrique} \\
 \overrightarrow{\operatorname{Rot}} \vec{H} = \nabla \wedge \vec{H} &= \vec{J} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} & \vec{H} &= \text{champ magnétique de la matière} \\
 & & \vec{J} &= \text{densité de courant électrique} \\
 & & \rho &= \text{densité de charges électriques libres}
 \end{aligned}$$

Équations constitutives

$$\begin{aligned}
 \vec{D} &= \varepsilon_0 \varepsilon_r \vec{E} & \varepsilon_0 &= \text{permittivité électrique dans le vide} \\
 \vec{B} &= \mu_0 \mu_r \vec{H} & \varepsilon_r &= \text{constante diélectrique relative} \\
 \vec{J} &= \sigma \vec{E} & \mu_0 &= \text{perméabilité magnétique dans le vide} \\
 & & \mu_r &= \text{perméabilité magnétique relative} \\
 & & \sigma &= \text{conductivité}
 \end{aligned}$$

Dans le cas de plasmon de surface, nous considérons deux milieux semi-infinis linéaires et isotropes.

- les milieux sont non magnétiques : $\mu_r = 1$
- en absence de stimulus externe : $\vec{J} = \vec{0}$

alors :

$$\begin{aligned}
 \nabla \cdot \vec{D} &= \nabla (\varepsilon_0 \varepsilon_r \vec{E}) = 0 \\
 \nabla \cdot \vec{B} &= \nabla (\mu_0 \vec{H}) = 0 \\
 \nabla \wedge \vec{E} &= -\mu_0 \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \\
 \nabla \wedge \vec{H} &= 0 + \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\partial \vec{E}}{\partial t}
 \end{aligned}$$

À la surface d'un métal (ε_1) et de l'air (ε_2) d'une onde polarisé TM se propage dans la direction x et son champs magnétiques \vec{H} est dans le plan de l'interface métal-diélectrique et est perpendiculaire à la direction (Figure 37).

Les vecteurs champs H_i et E_i s'écrivent (avec $i = 1$ pour le métal et $i = 2$ pour le diélectrique) selon¹⁸⁴ :

Si $Z > 0$:

$$H_2 = (0, H_{y_2}, 0)e^{i(k_{x_2}x+k_{z_2}z-\omega t)}$$

$$E_2 = (E_{x_2}, 0, E_{z_2})e^{i(k_{x_2}x+k_{z_2}z-\omega t)}$$

Si $Z < 0$:

$$H_1 = (0, H_{y_1}, 0)e^{i(k_{x_1}x-k_{z_1}z-\omega t)}$$

$$E_1 = (E_{x_1}, 0, E_{z_1})e^{i(k_{x_1}x-k_{z_1}z-\omega t)}$$

$$\nabla \wedge \vec{H} = \begin{cases} \frac{\partial H_z}{\partial y} - \frac{\partial H_y}{\partial z} \\ \frac{\partial H_x}{\partial z} - \frac{\partial H_z}{\partial x} \\ \frac{\partial H_y}{\partial x} - \frac{\partial H_x}{\partial y} \end{cases}$$

Seul H_y n'est pas nul et H_i ne dépend pas de y

$$\nabla \wedge \vec{H} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad \begin{cases} \frac{\partial H_z}{\partial y} - \frac{\partial H_y}{\partial z} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\partial E_x}{\partial t} = -\frac{\partial H_y}{\partial z} \\ \frac{\partial H_x}{\partial z} - \frac{\partial H_z}{\partial x} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\partial E_y}{\partial t} = 0 \\ \frac{\partial H_y}{\partial x} - \frac{\partial H_x}{\partial y} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\partial E_z}{\partial t} = \frac{\partial H_y}{\partial x} \end{cases}$$

Avec $Z > 0$:

$$\begin{array}{l} \frac{\partial H_{y_2}}{\partial z} = -\varepsilon_2 \frac{\partial E_{x_2}}{\partial t} \\ H_{y_2} * \frac{\partial e^{i(k_{x_2}x+k_{z_2}z-\omega t)}}{\partial z} = -\varepsilon_2 \frac{\partial e^{i(k_{x_2}x+k_{z_2}z-\omega t)}}{\partial t} * E_{x_2} \\ k_{z_2} H_{y_2} = \varepsilon_2 \omega E_{x_2} \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{avec } \varepsilon_i = \varepsilon_0 \varepsilon_r \\ H_{y_2} * \frac{\partial e^{i(k_{x_2}x+k_{z_2}z-\omega t)}}{\partial x} = \varepsilon_2 \frac{\partial e^{i(k_{x_2}x+k_{z_2}z-\omega t)}}{\partial t} * E_{z_2} \\ k_{x_2} H_{y_2} = -\varepsilon_2 \omega E_{z_2} \end{array}$$

Avec $Z < 0$:

$$\begin{array}{l} \frac{\partial H_{y_1}}{\partial z} = -\varepsilon_1 \frac{\partial E_{x_1}}{\partial t} \\ \frac{\partial H_{y_1}}{\partial x} = \varepsilon_1 \frac{\partial E_{z_1}}{\partial t} \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{avec } \varepsilon_i = \varepsilon_0 \varepsilon_r \end{array}$$

$$H_{y_1} * \frac{\partial e^{i(k_{x_1}x - k_{z_1}z - \omega t)}}{\partial z} = -\varepsilon_1 \frac{\partial e^{i(k_{x_1}x - k_{z_1}z - \omega t)}}{\partial t} * E_{x_1} \quad \left| \quad H_{y_1} * \frac{\partial e^{i(k_{x_1}x - k_{z_1}z - \omega t)}}{\partial x} = \varepsilon_1 \frac{\partial e^{i(k_{x_1}x - k_{z_1}z - \omega t)}}{\partial t} * E_{z_1} \right.$$

$$k_{z_1} H_{y_1} = -\varepsilon_1 \omega E_{x_1} \quad \left| \quad k_{x_1} H_{y_1} = -\varepsilon_1 \omega E_{z_1} \right.$$

Les relations de continuité vont donner :

$$E_{x_1} = E_{x_2} \quad \text{et} \quad H_{y_1} = H_{y_2}$$

$$\text{et} \quad k_x = k_{x_1} = k_{x_2}$$

$$\begin{cases} k_{z_1} H_{y_1} = -\varepsilon_1 \omega E_{x_1} \\ k_{z_2} H_{y_2} = \varepsilon_2 \omega E_{x_2} \end{cases} \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{k_{z_1} H_{y_1}}{k_{z_2} H_{y_2}} = -\frac{\varepsilon_1 \omega E_{x_1}}{\varepsilon_2 \omega E_{x_2}} \\ \Rightarrow k_{z_1} \varepsilon_2 = -k_{z_2} \varepsilon_1 \end{array} \right.$$

$$\begin{cases} k_{x_1} H_{y_1} = -\varepsilon_1 \omega E_{z_1} \\ k_{x_2} H_{y_2} = -\varepsilon_2 \omega E_{z_2} \end{cases} \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{k_{x_1} H_{y_1}}{k_{x_2} H_{y_2}} = \frac{\varepsilon_1 \omega E_{z_1}}{\varepsilon_2 \omega E_{z_2}} \\ \Rightarrow E_{z_2} \varepsilon_2 = E_{z_1} \varepsilon_1 \end{array} \right.$$

D'autre part,

$$|k| = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2} = \frac{2\pi}{\lambda} n = n \frac{\omega}{c}$$

Ici $k_y = 0$ et $n^2 = \varepsilon$

$$\text{donc} \quad k_x^2 = n^2 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_z^2 = \varepsilon \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_z^2$$

$$\text{donc} \quad k_{x_1}^2 = \varepsilon_1 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{z_1}^2 \quad \text{et} \quad k_{x_2}^2 = \varepsilon_2 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{z_2}^2$$

Les relations de continuité vont donner : $k_{x_1} = k_{x_2}$

donc

$$k_x^2 = \varepsilon_1 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{z_1}^2$$

$$k_x^2 = \varepsilon_2 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{z_2}^2$$

$$\text{et} \quad k_{z_1}^2 = k_{z_2}^2 \left(\frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2}\right)^2$$

On a donc 3 équations à 3 inconnues donc on peut trouver k_x , k_{z_1} et k_{z_2}

$$\text{Et} \quad a^2 - b^2 = (a - b)(a + b)$$

donc

$$\varepsilon_1 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{z_1}^2 = \varepsilon_2 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{z_2}^2$$

$$(\varepsilon_1 - \varepsilon_2) \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{z_2}^2 \left[\left(\frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2}\right)^2 - 1 \right] = 0$$

$$(\varepsilon_1 - \varepsilon_2) - k_{z_2}^2 \left[\left(\frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2}\right)^2 - 1 \right] = 0$$

$$k_{z_2}^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \frac{\varepsilon_2^2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}$$

et

$$k_{z_1}^2 = k_{z_2}^2 \left(\frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2}\right)^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \frac{\varepsilon_1^2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}$$

soit

$$k_x^2 = \varepsilon_1 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{z_1}^2 = \varepsilon_1 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \frac{\varepsilon_1^2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} = \varepsilon_1 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \left(1 - \frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}\right) = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \varepsilon_1 \left(\frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}\right)$$

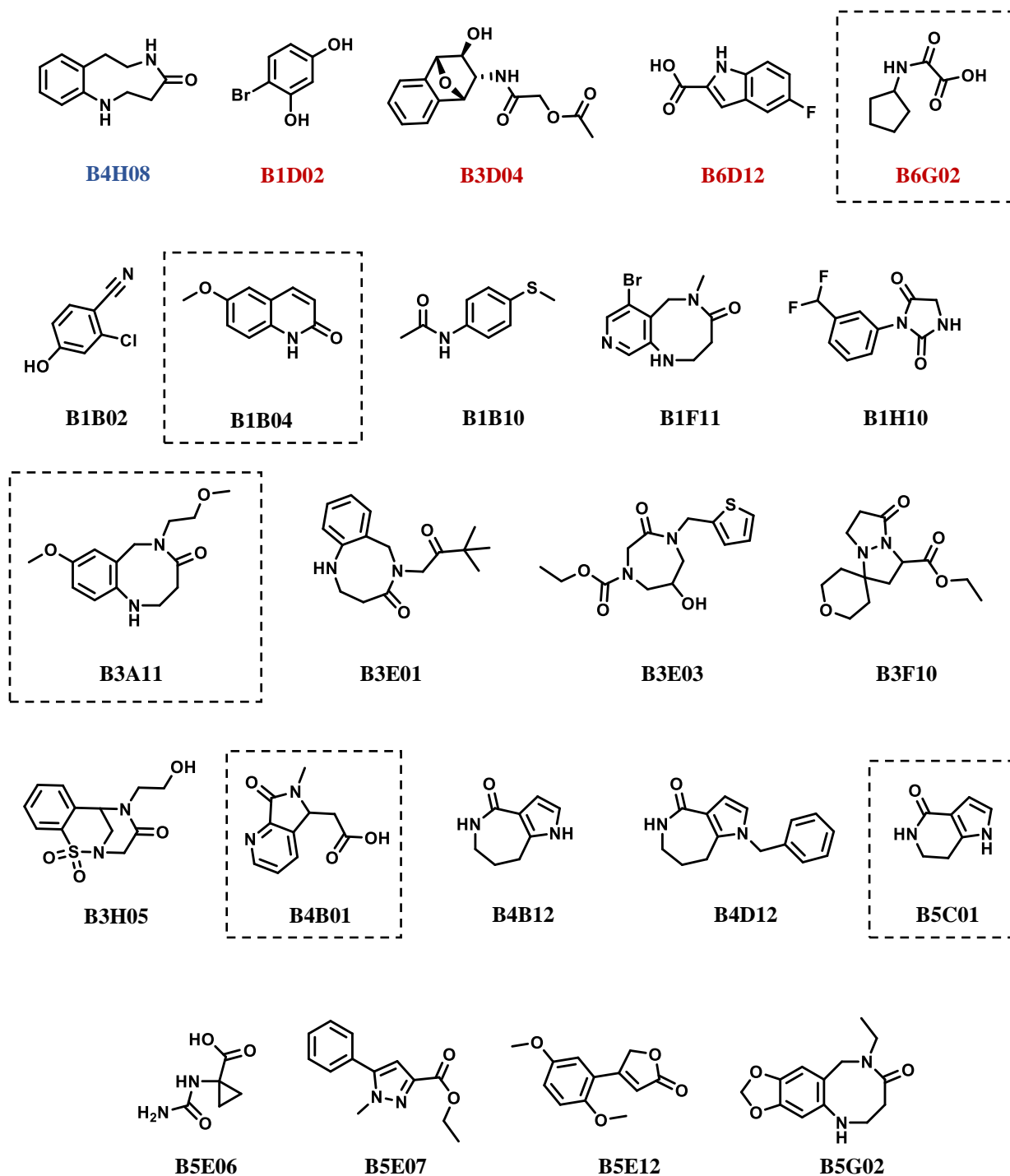
$$k_x^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}$$

soit

$$k_x = \left(\frac{\omega}{c}\right) \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}}$$

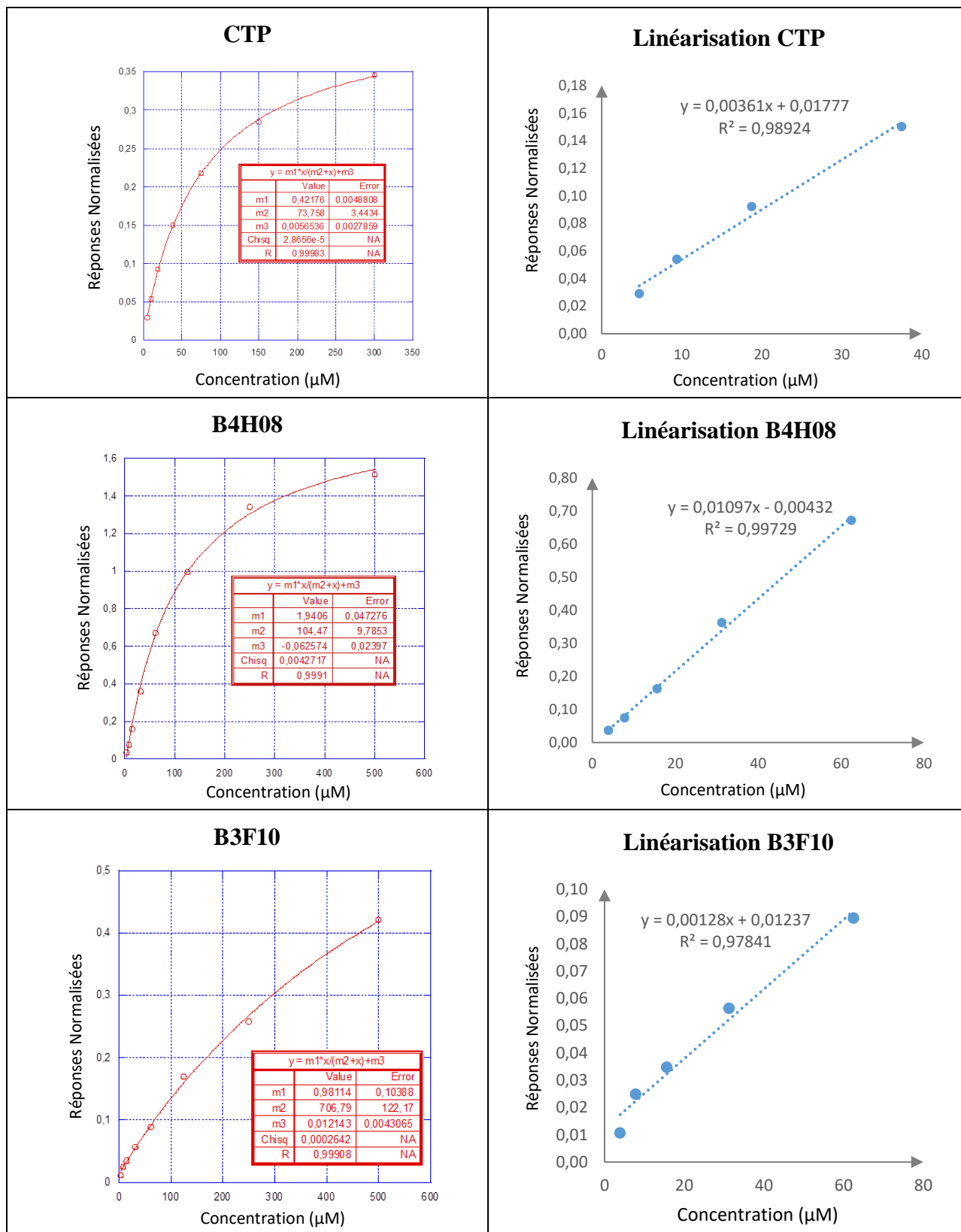
Si $\varepsilon_1 < 0$ pour l'or ou l'argent, $\varepsilon_2 > 0$ pour un diélectrique et $|\varepsilon_1| > \varepsilon_2$ alors $k_{z_i}^2 < 0$ donc k_{z_i} est un nombre imaginaire donc est une onde évanescente.

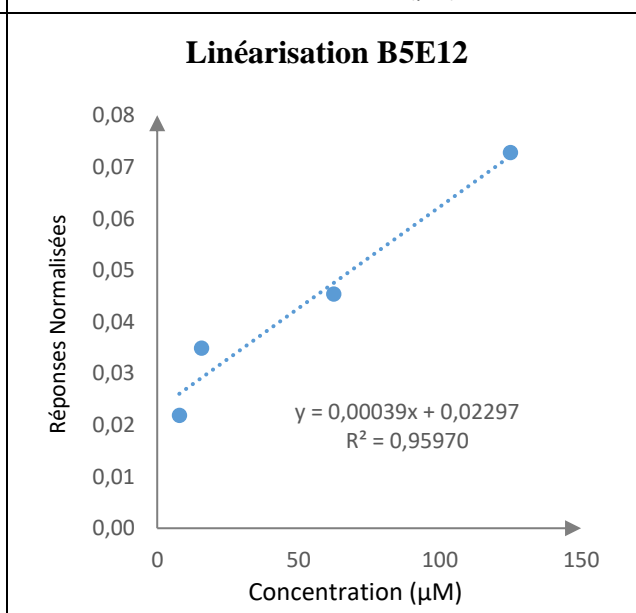
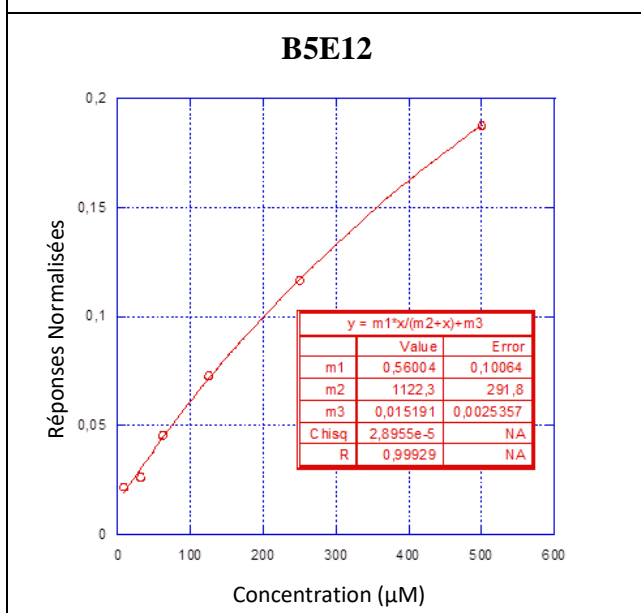
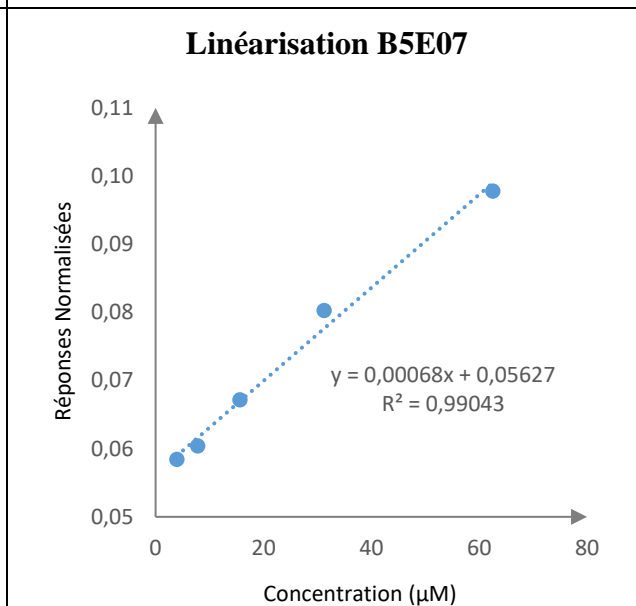
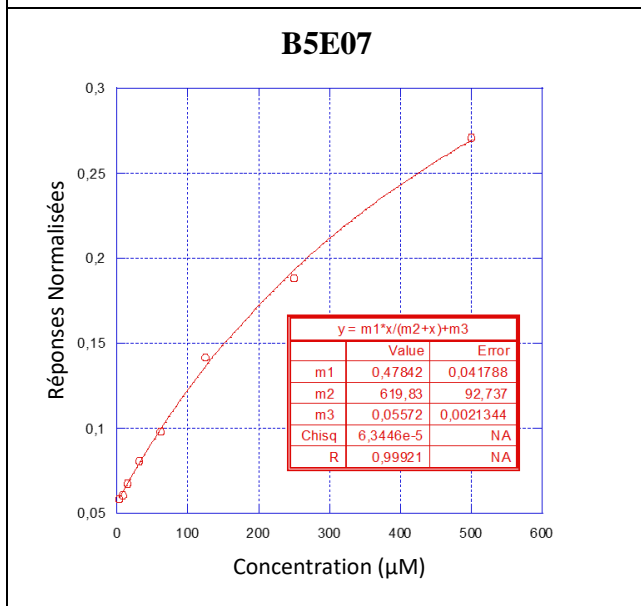
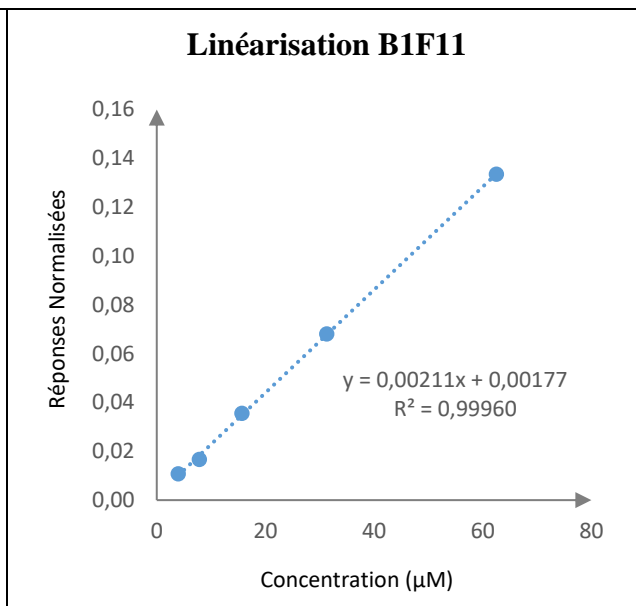
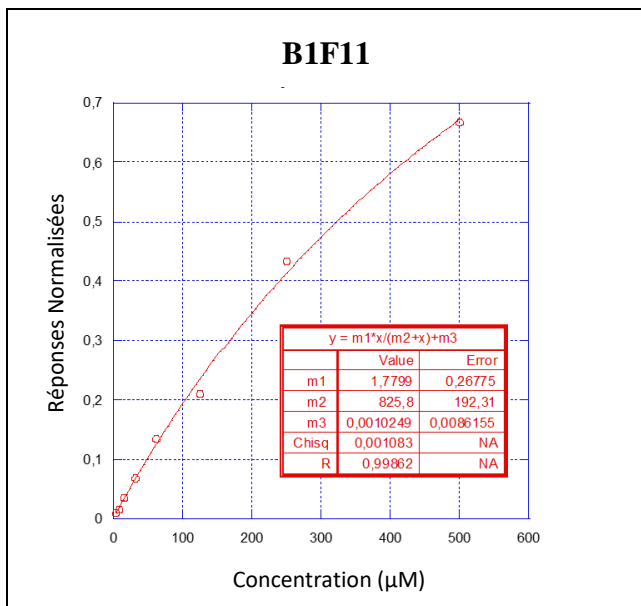
Annexe 2 : Les structures des 23 fragments sélectionnés et leurs noms associés

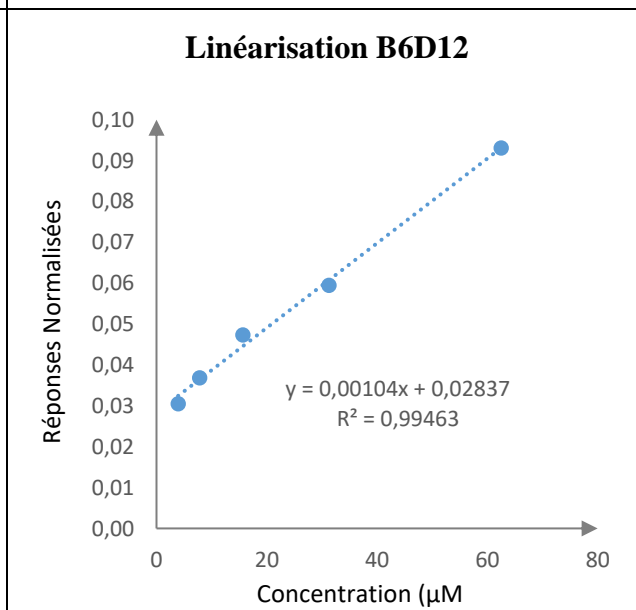
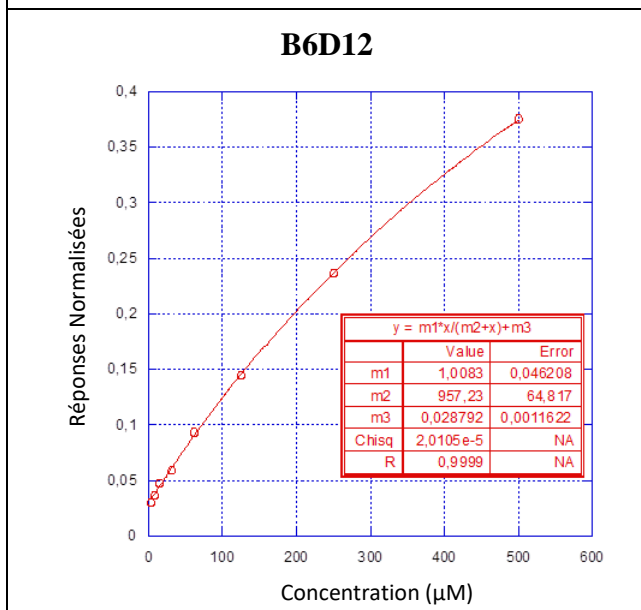
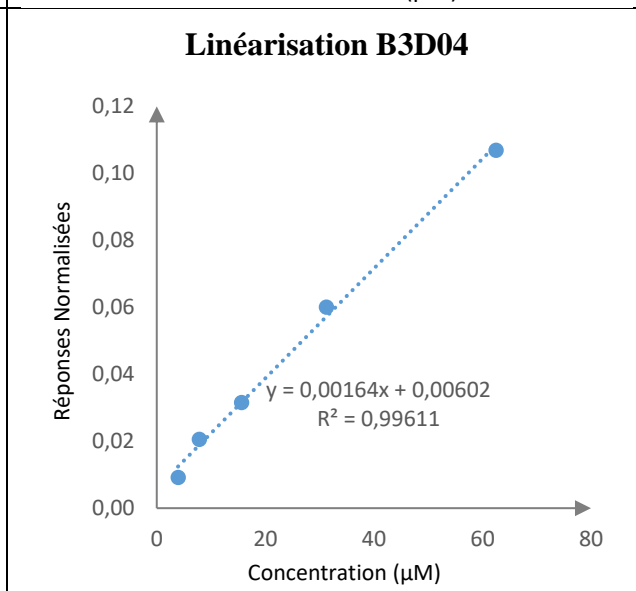
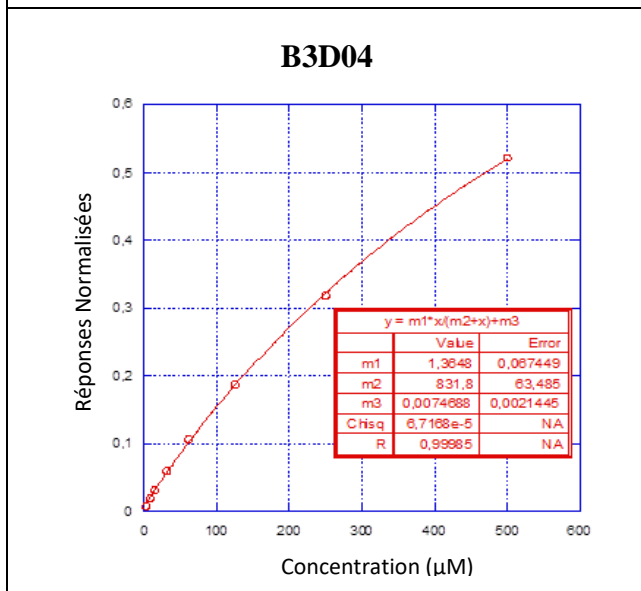
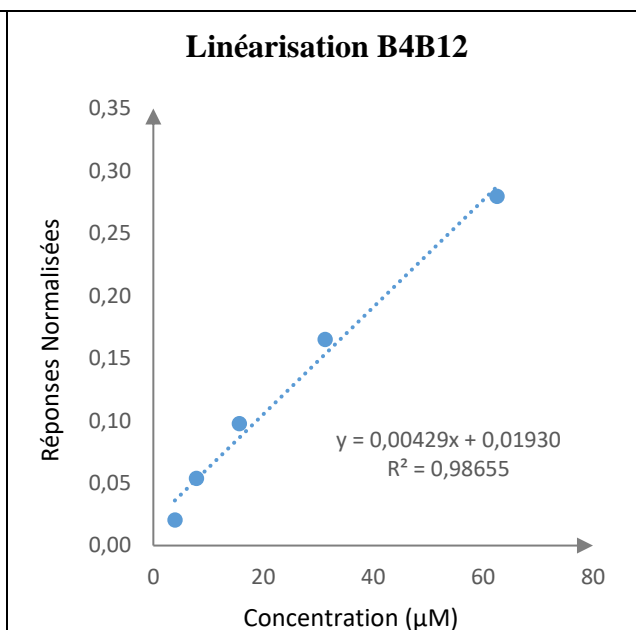
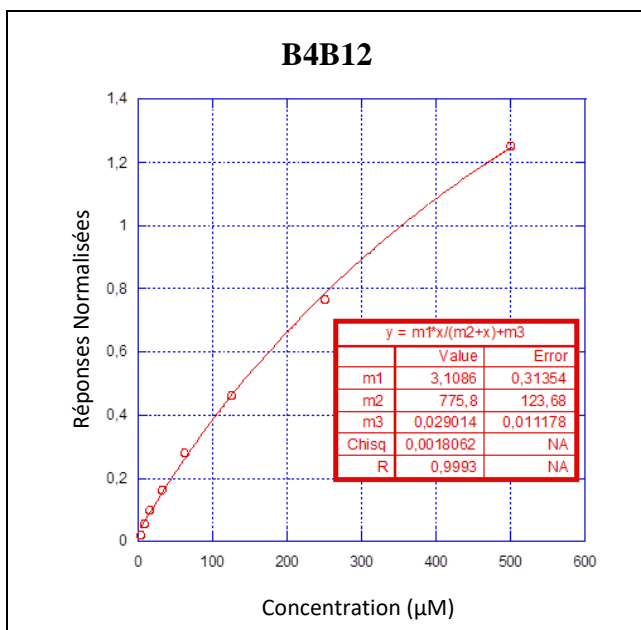


Les fragments encadrés en noir sont ceux dont le K_D n'a pas pu être mesuré de façon reproductible.

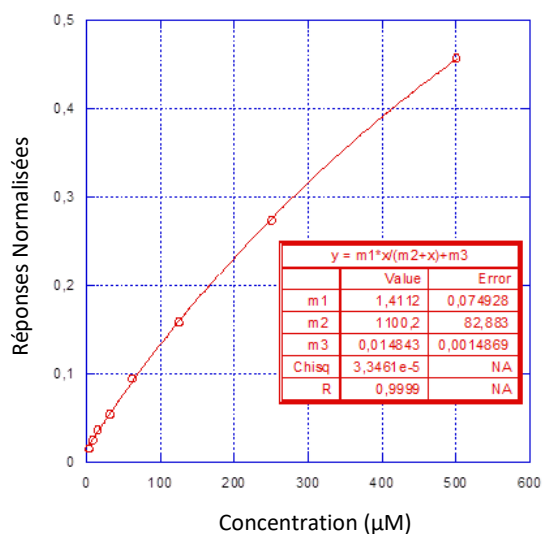
Annexe 3 : Analyse de la réponse SPR des fragments, ajustement des courbes selon une régression linéaire (à droite) et non linéaire (à gauche).



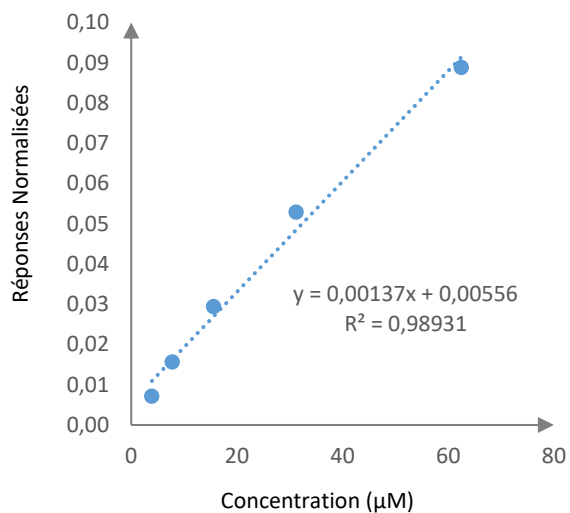




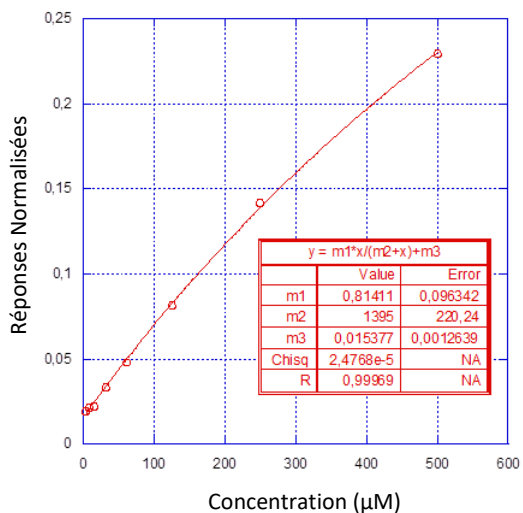
B3H05



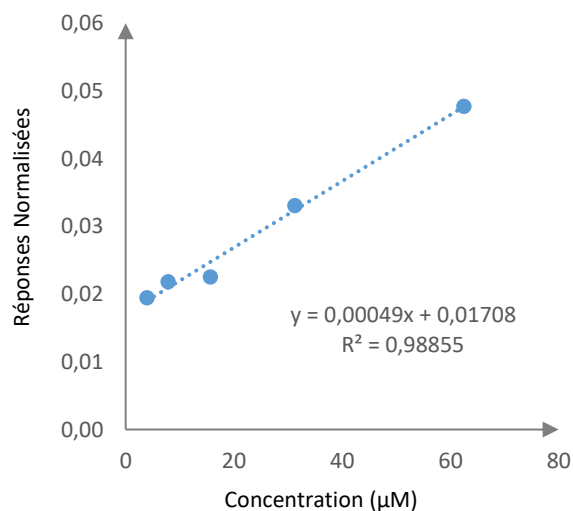
Linéarisation B3H05



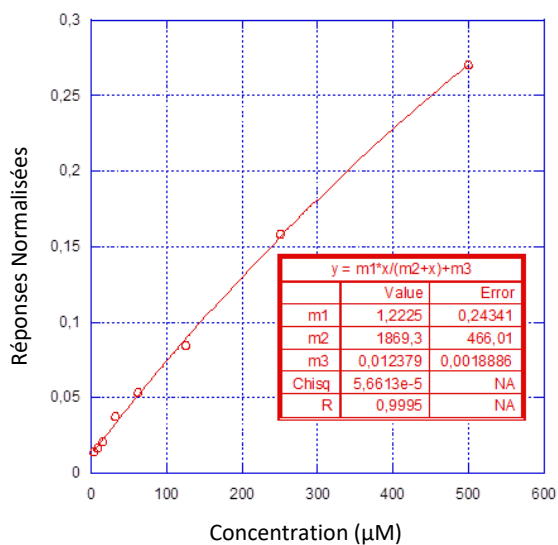
B3E01



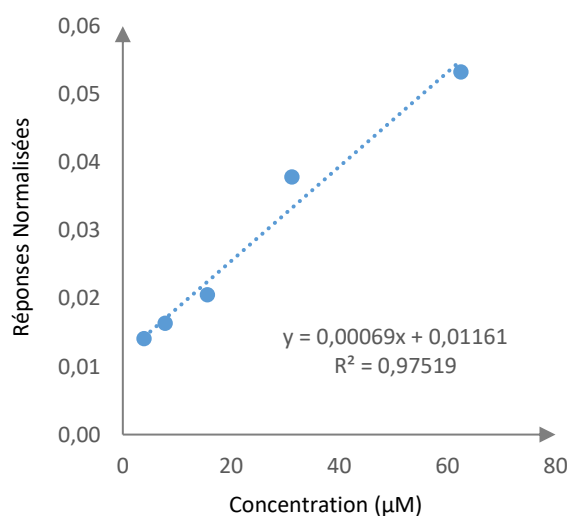
Linéarisation B3E01

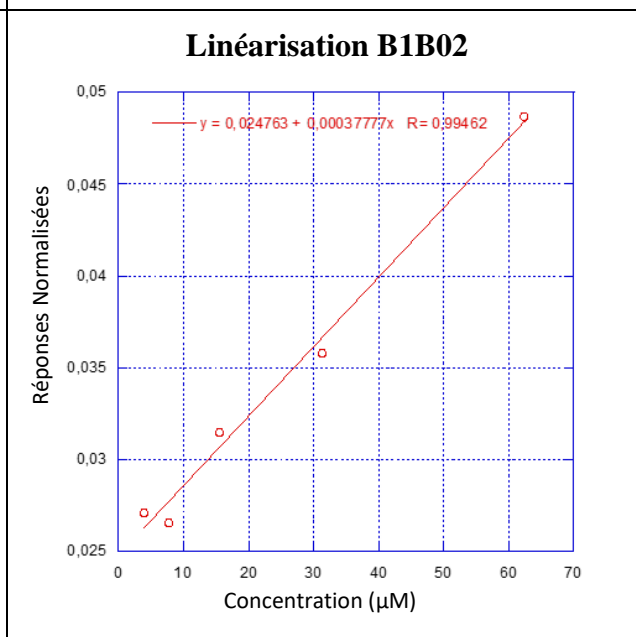
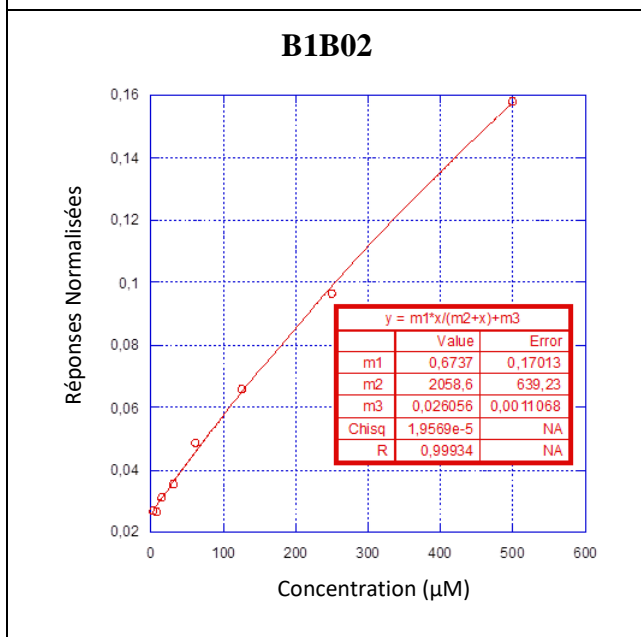
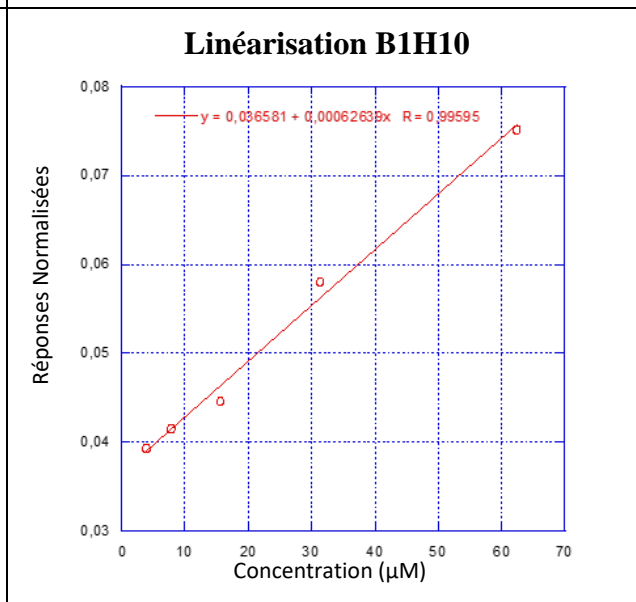
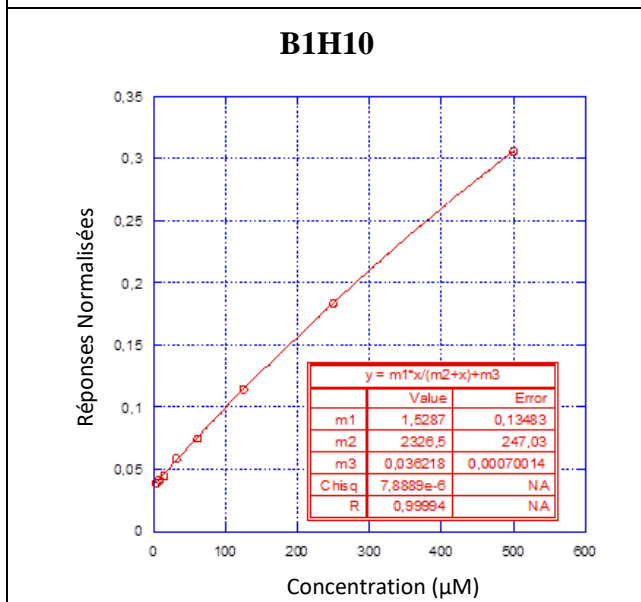
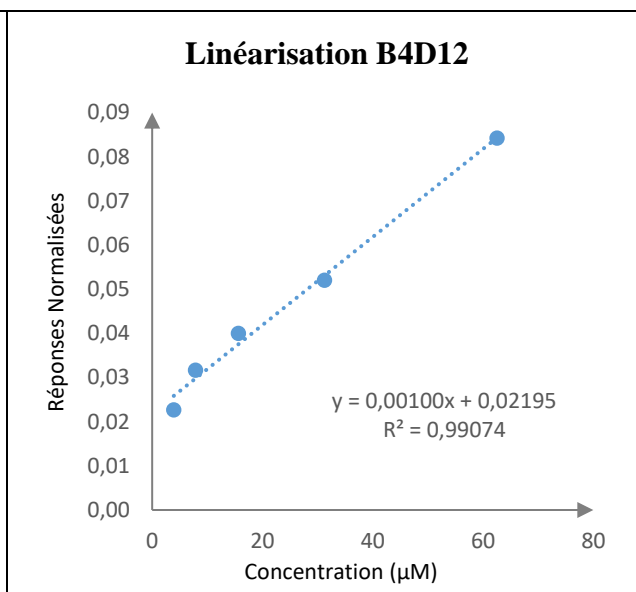
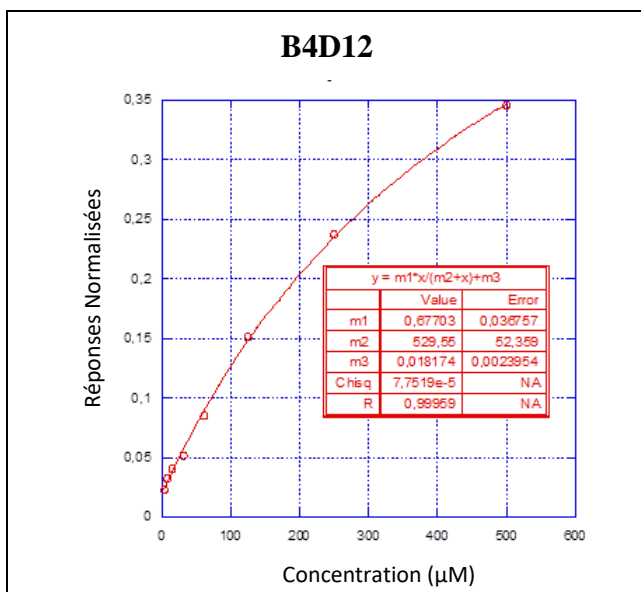


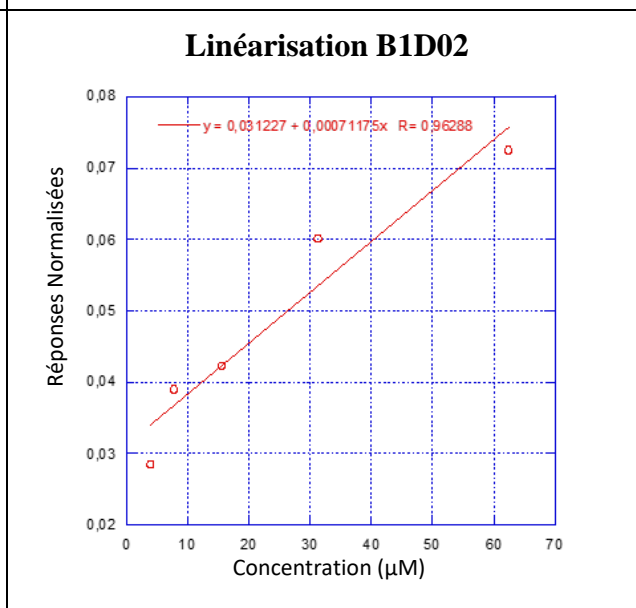
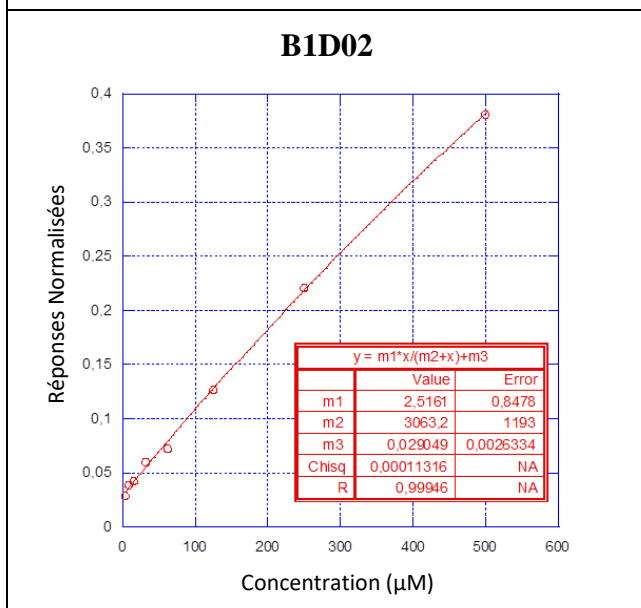
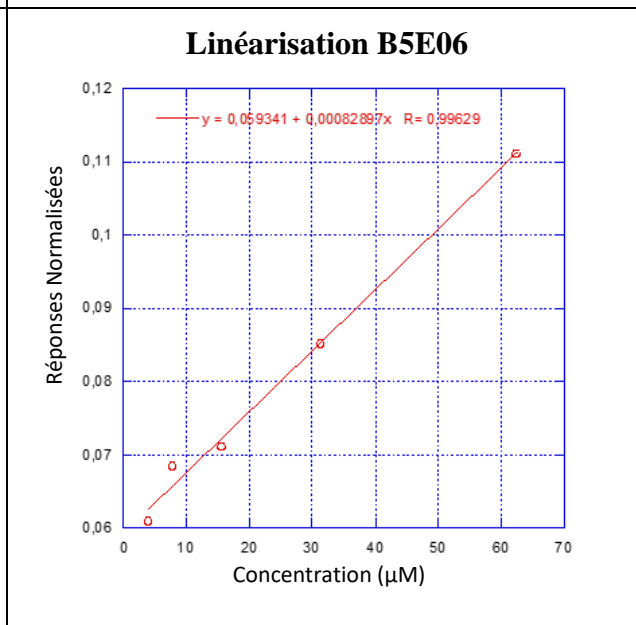
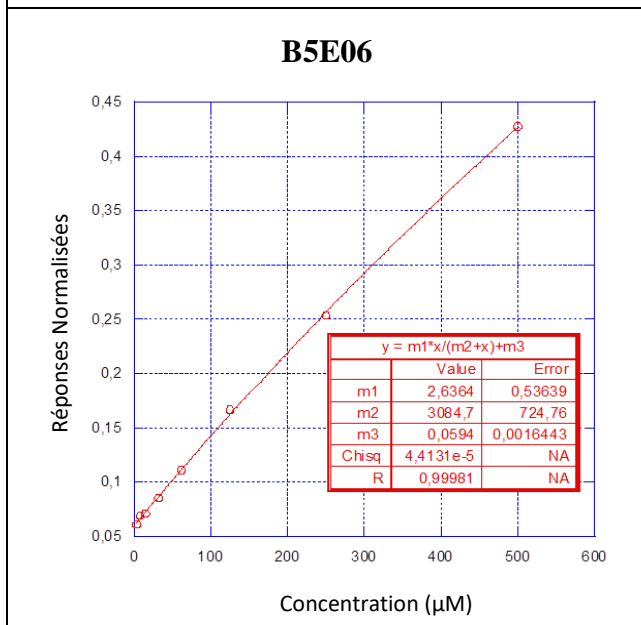
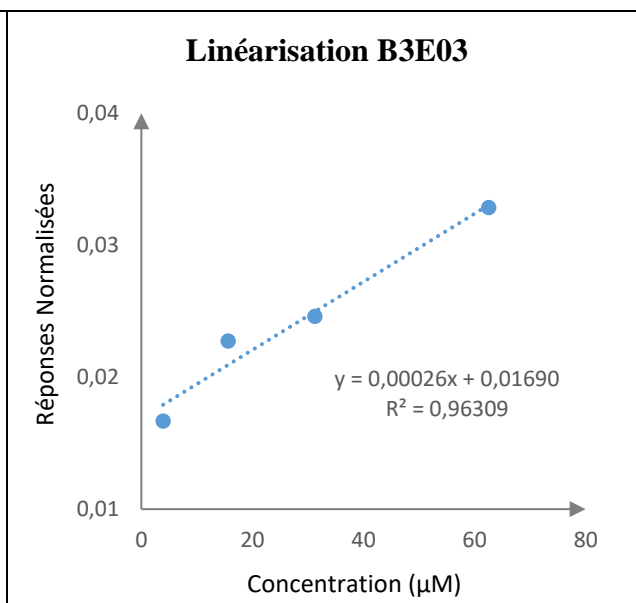
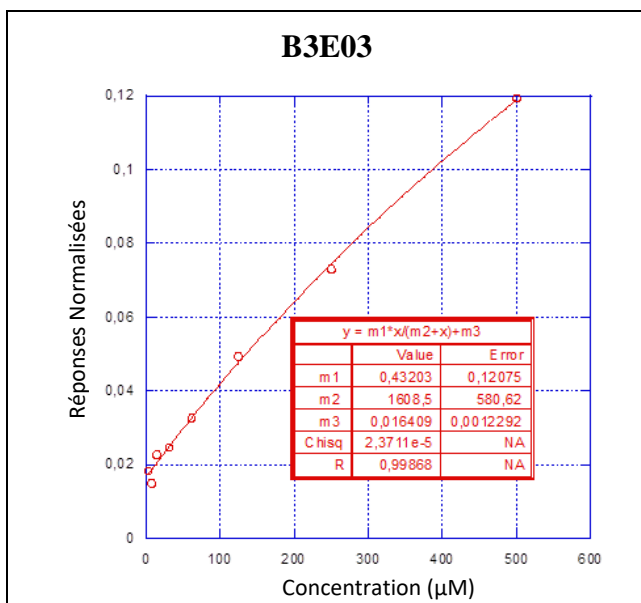
B1B10

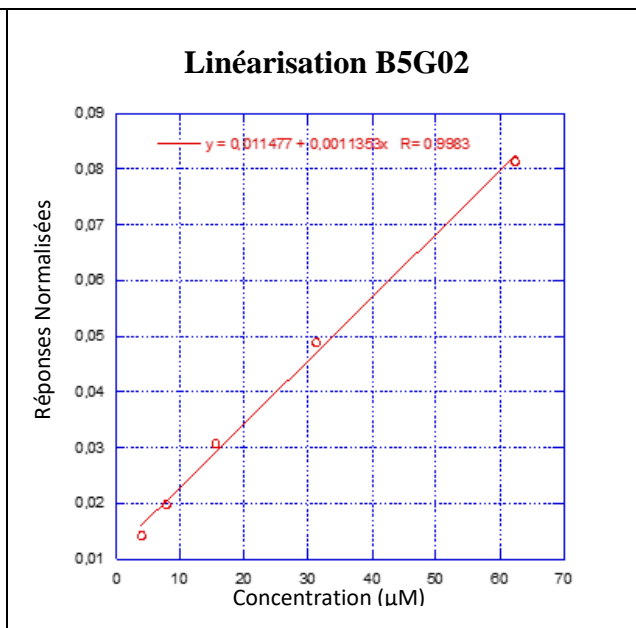
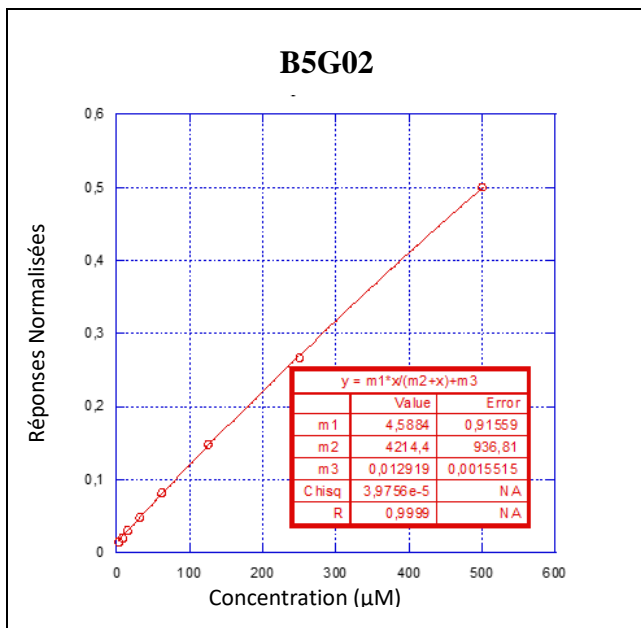


Linéarisation B1B10

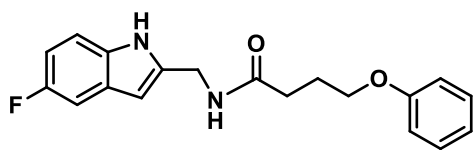




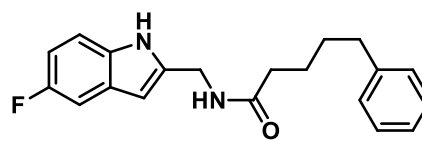




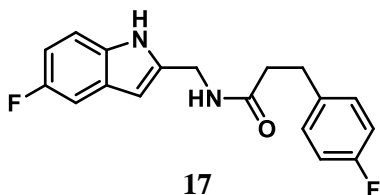
Annexe 4 : Structures des molécules synthétisées



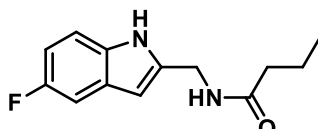
15



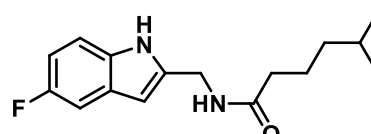
16



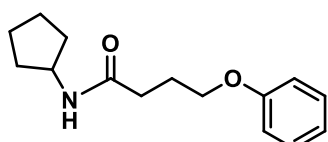
17



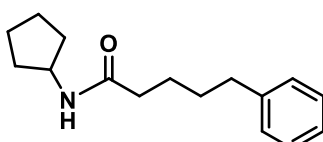
18



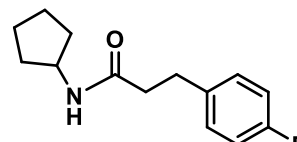
19



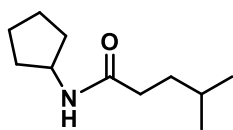
20



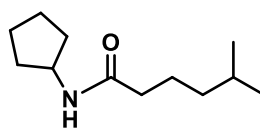
21



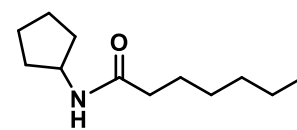
22



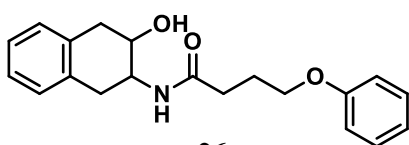
23



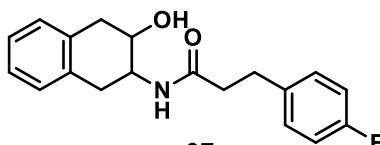
24



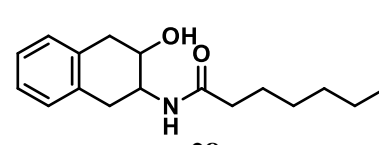
25



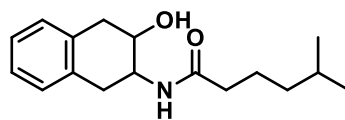
26



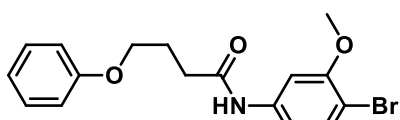
27



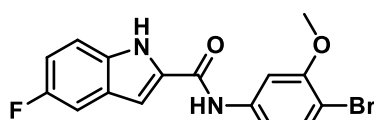
28



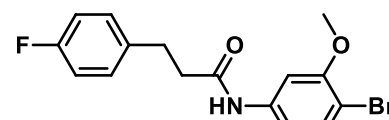
29



30

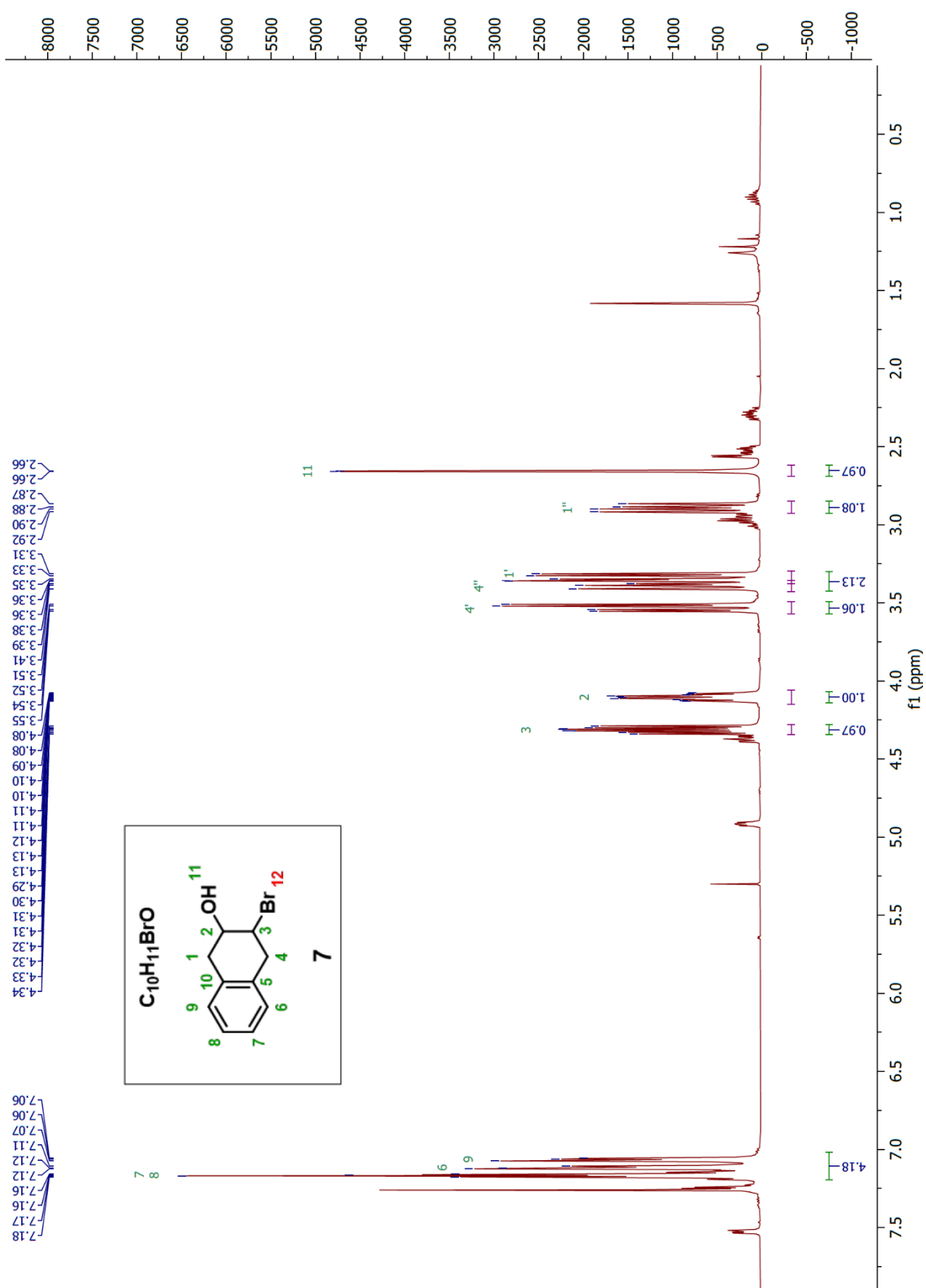


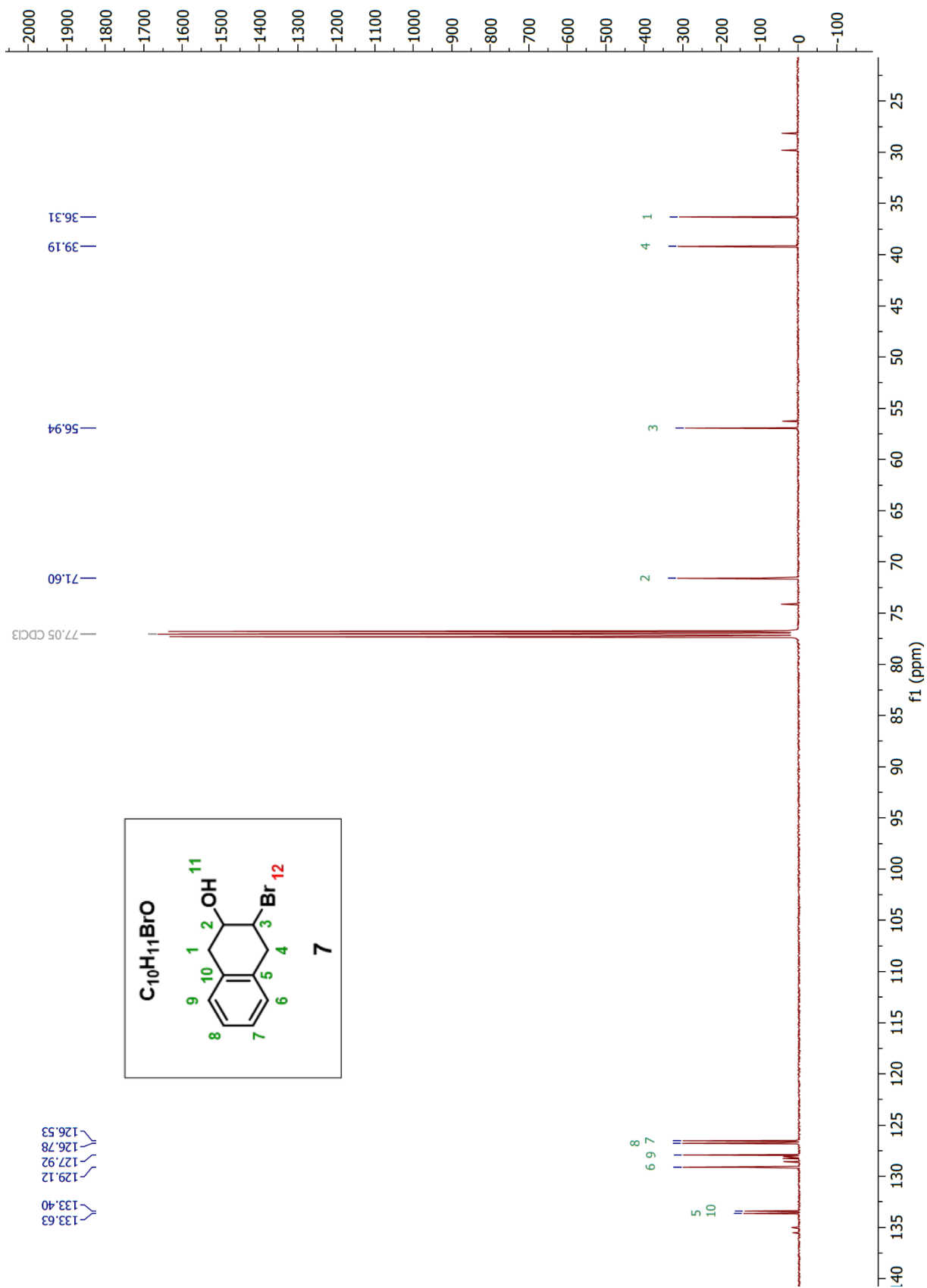
31

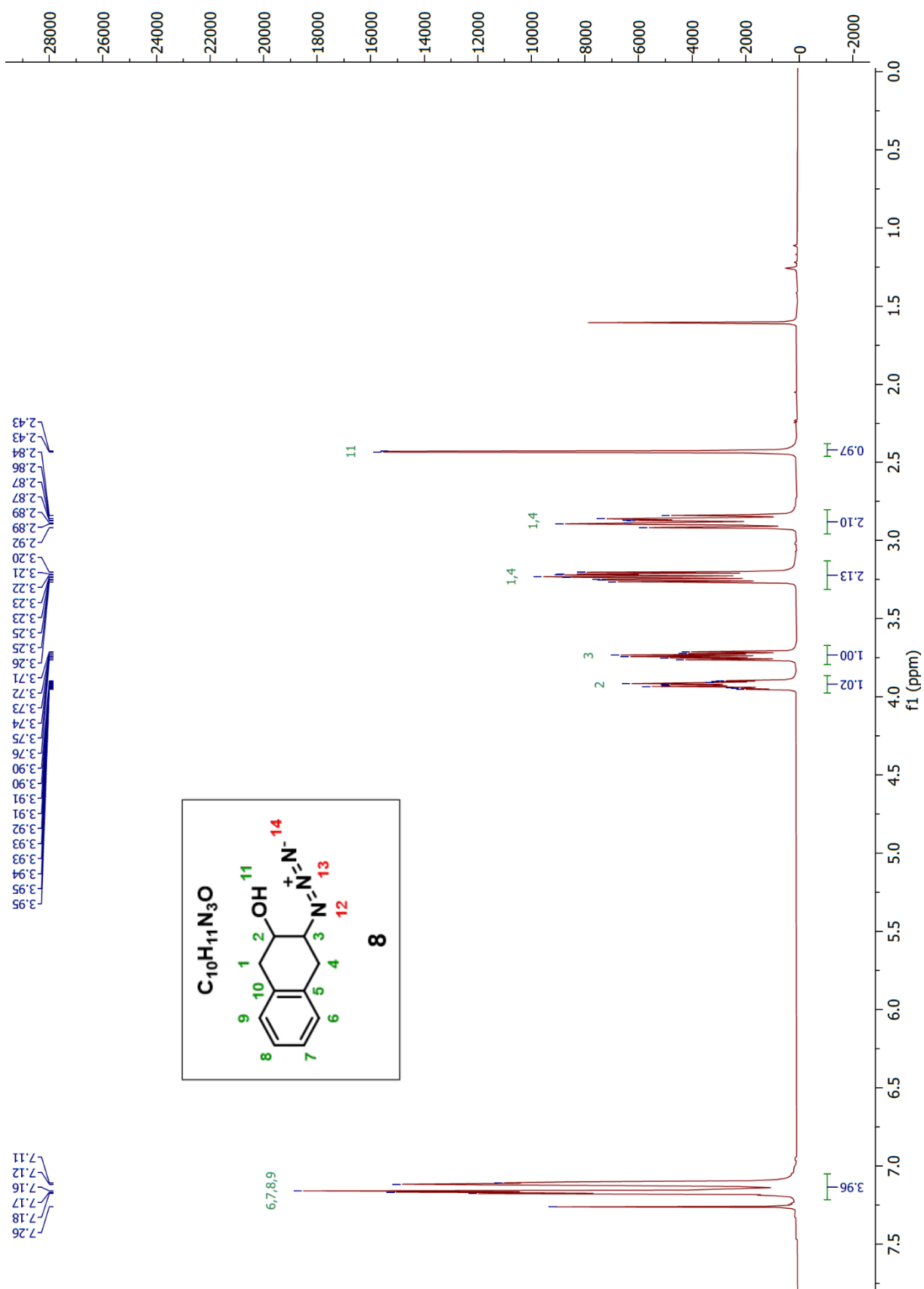


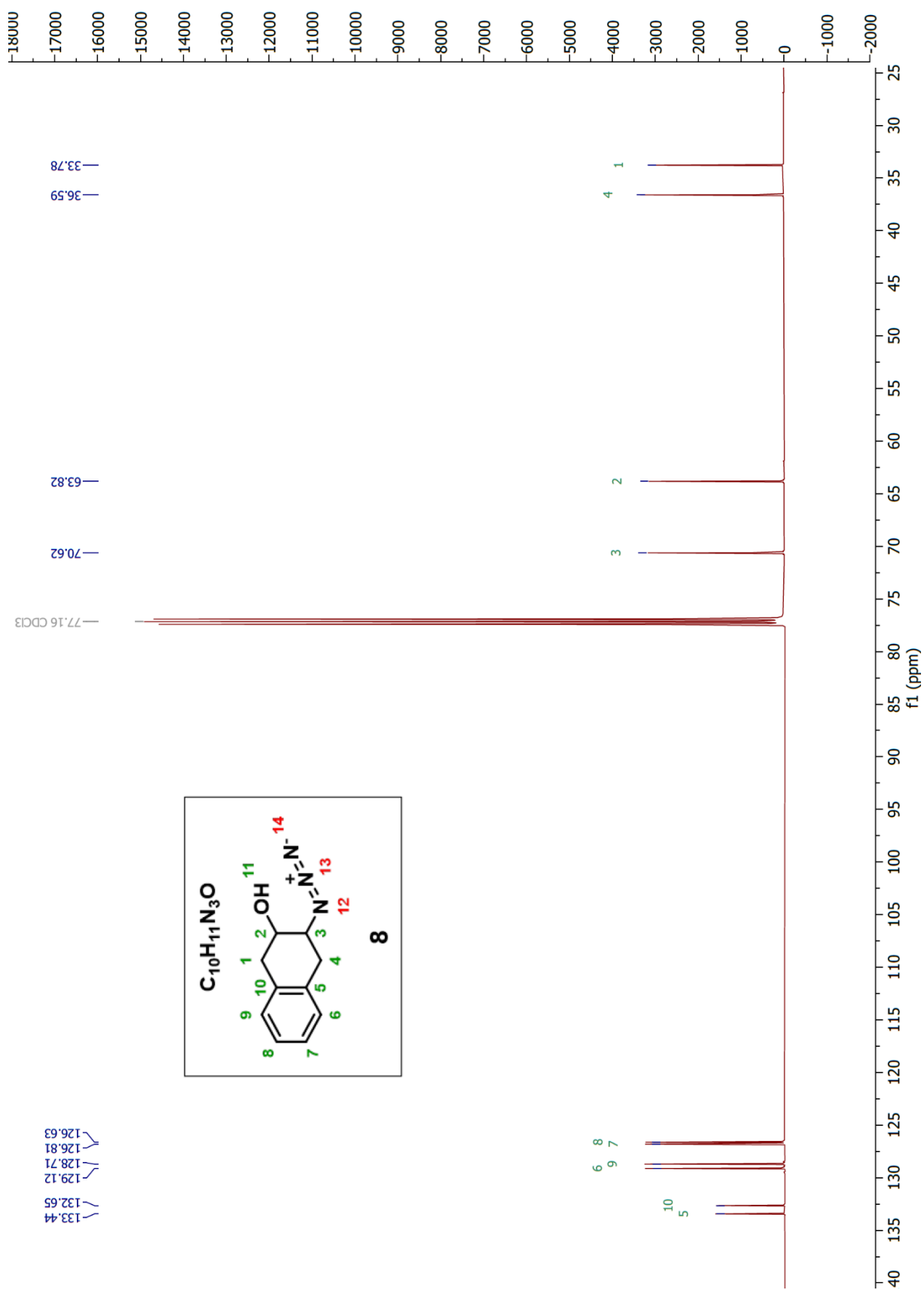
32

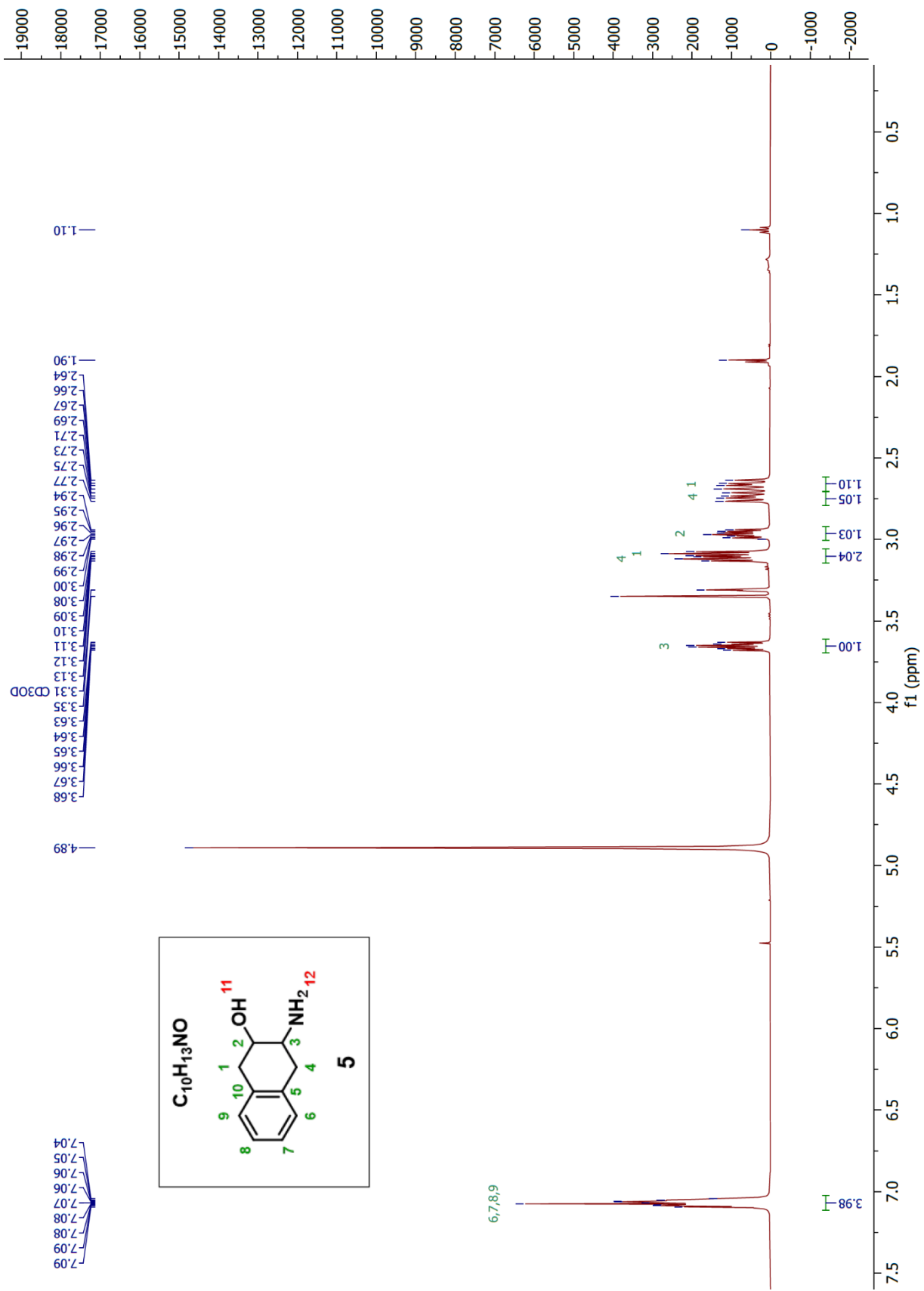
Annexe 5 : Spectres RMN des molécules synthétisées

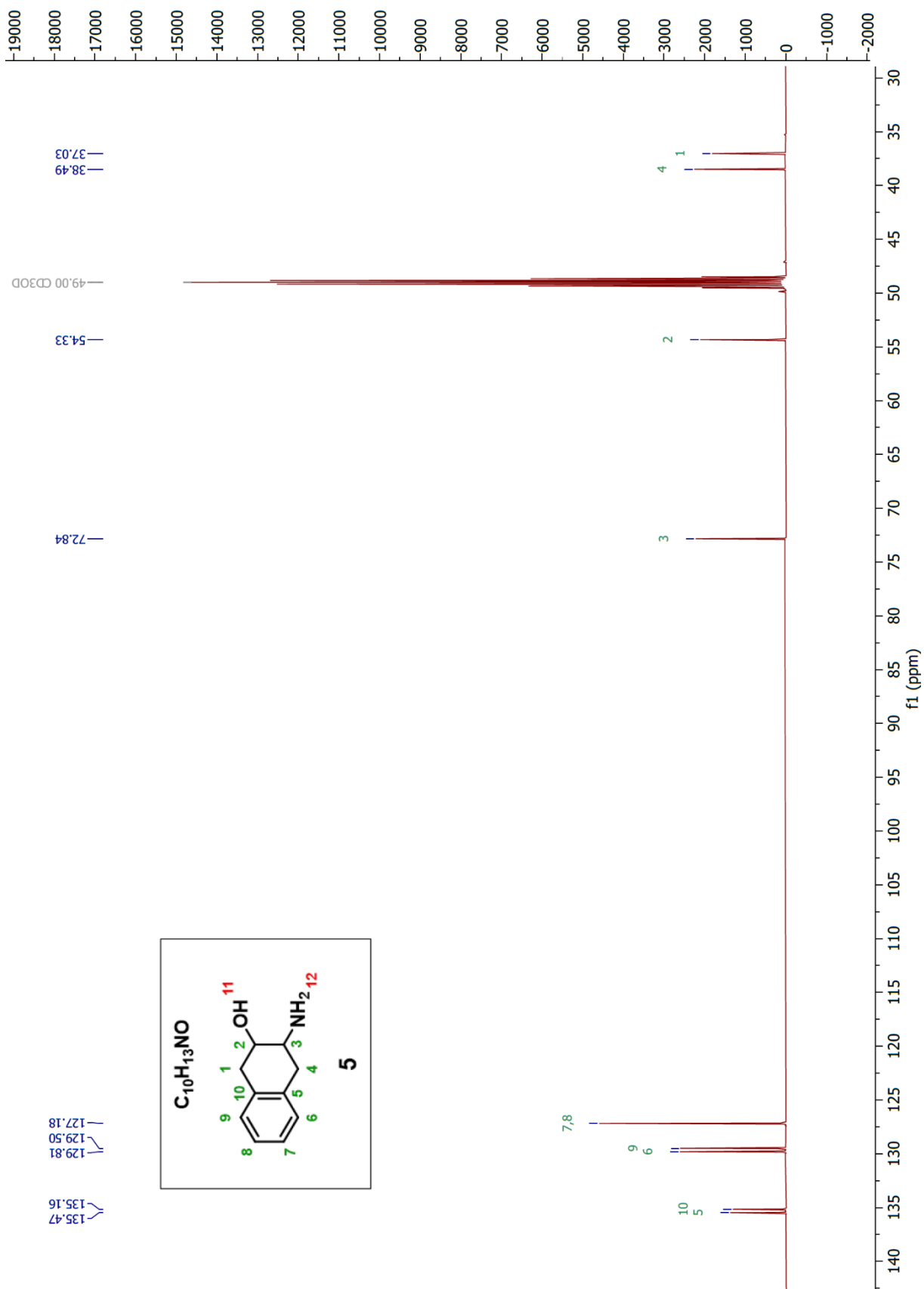


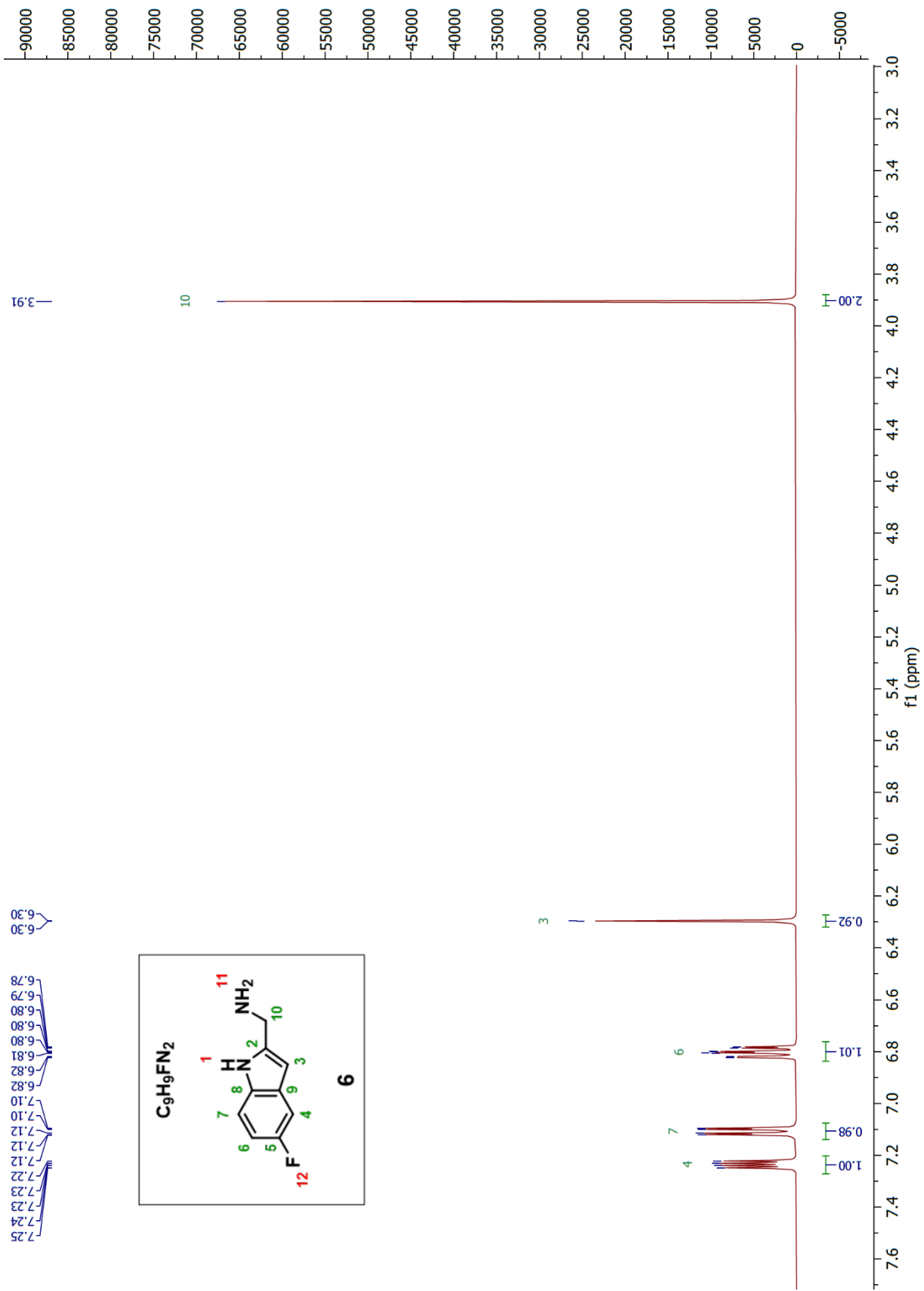


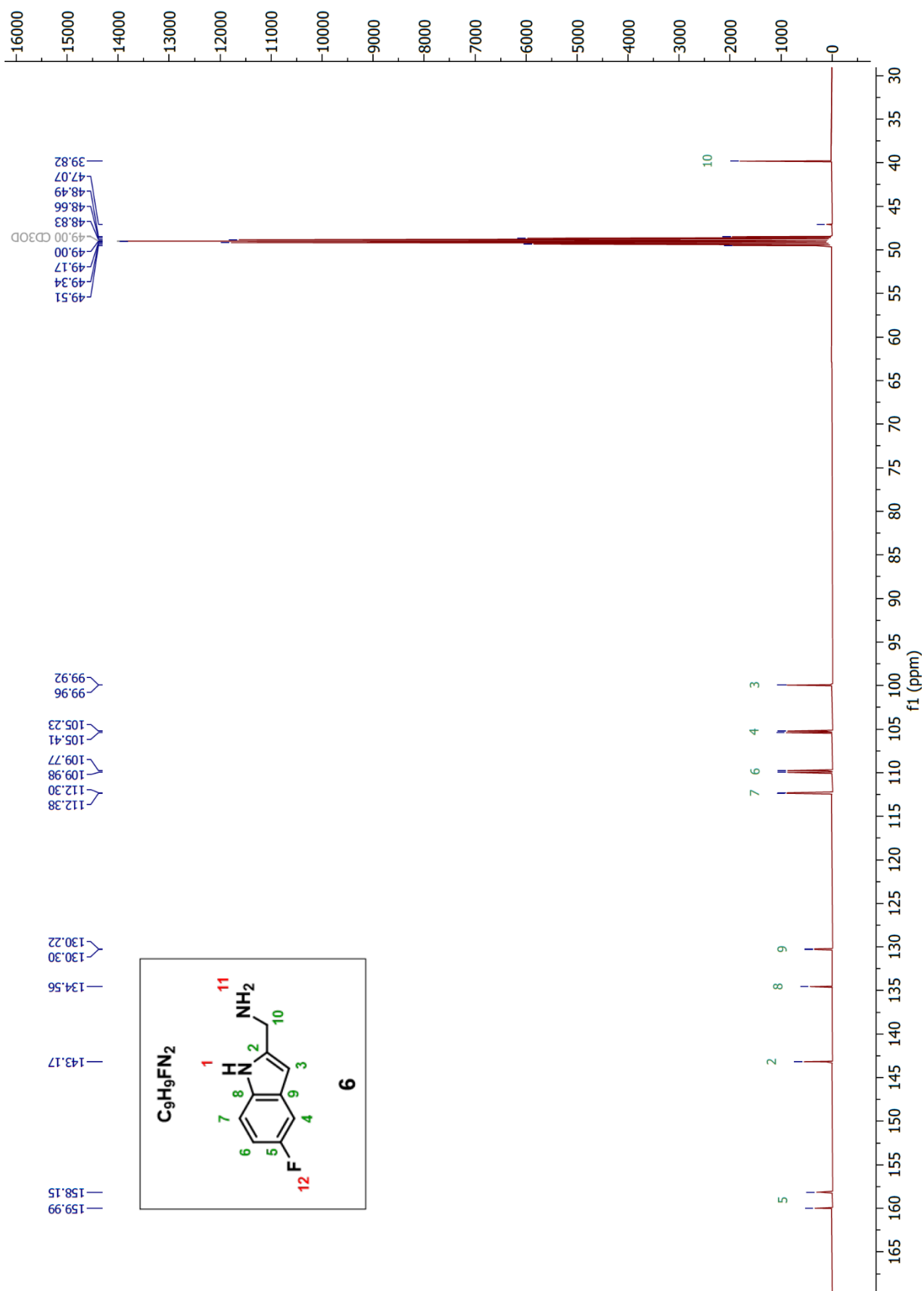


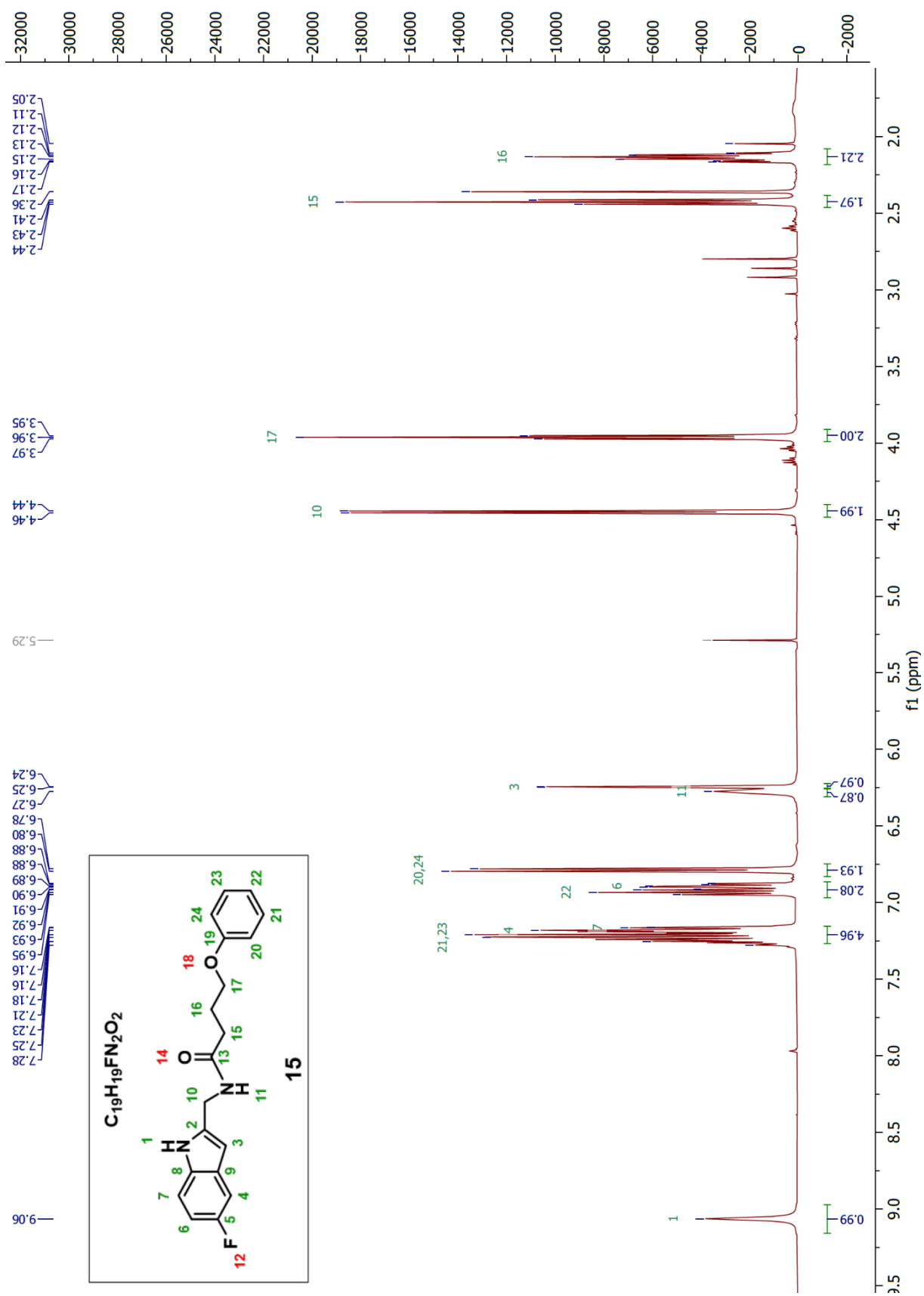


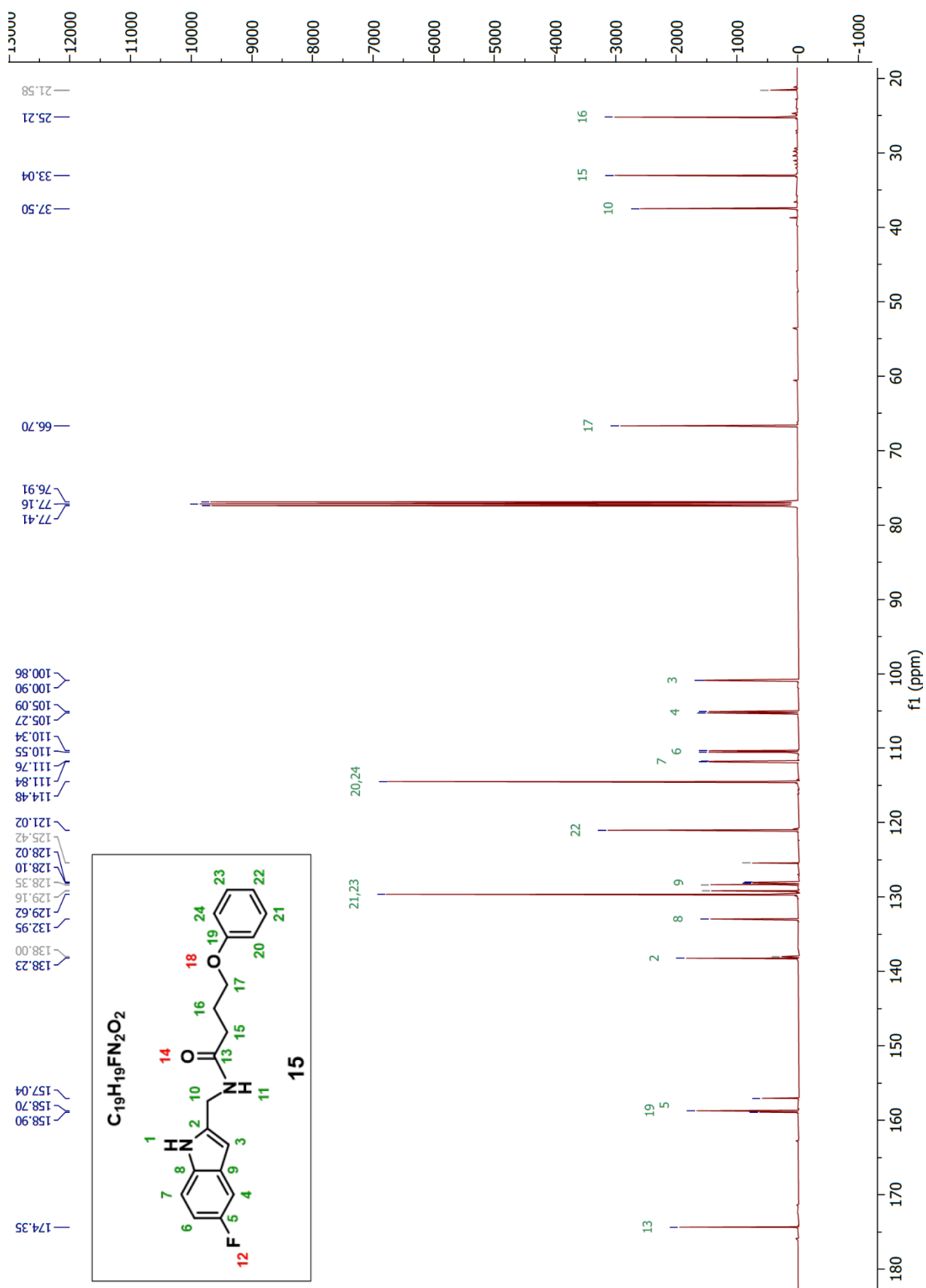


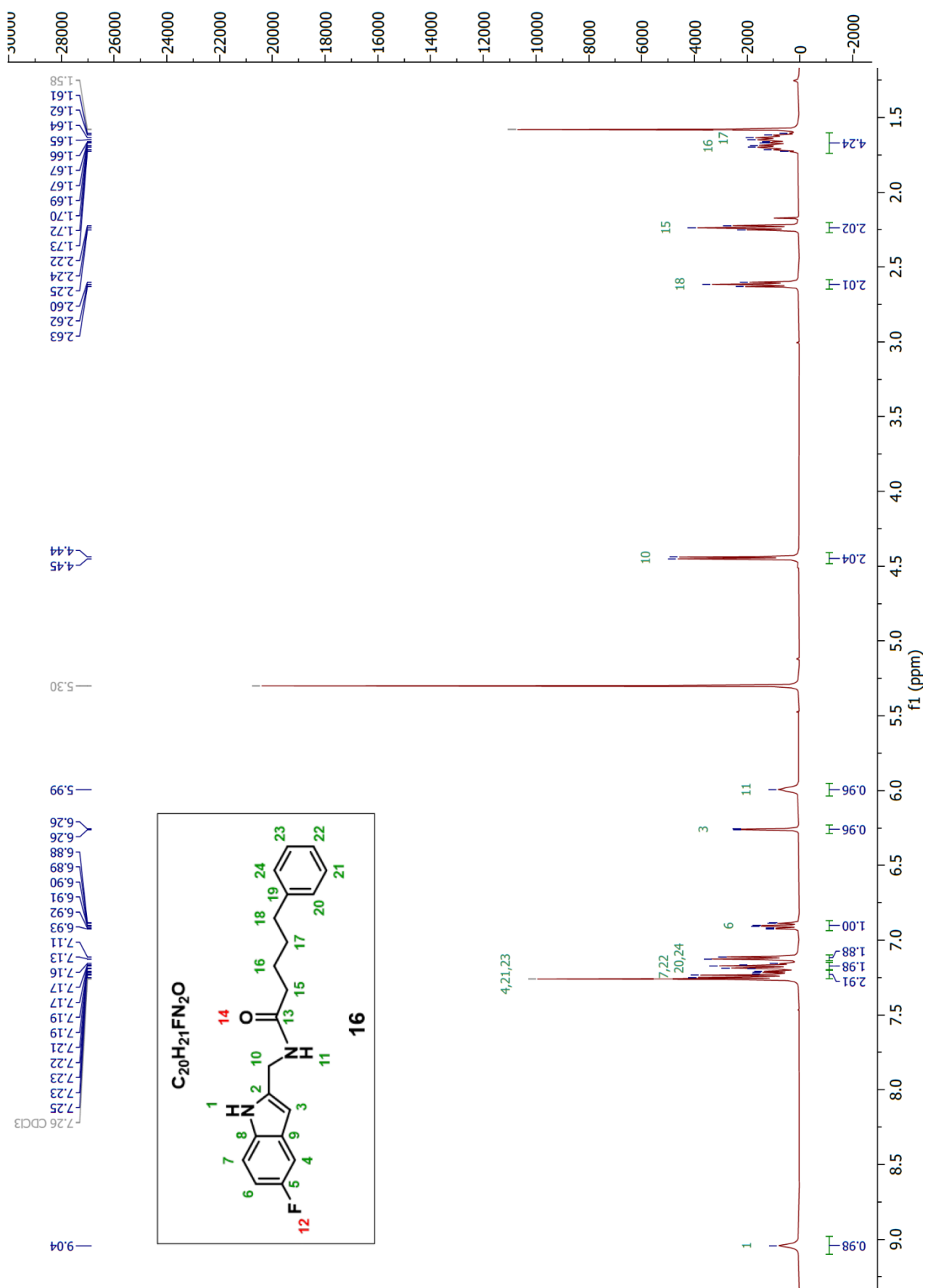


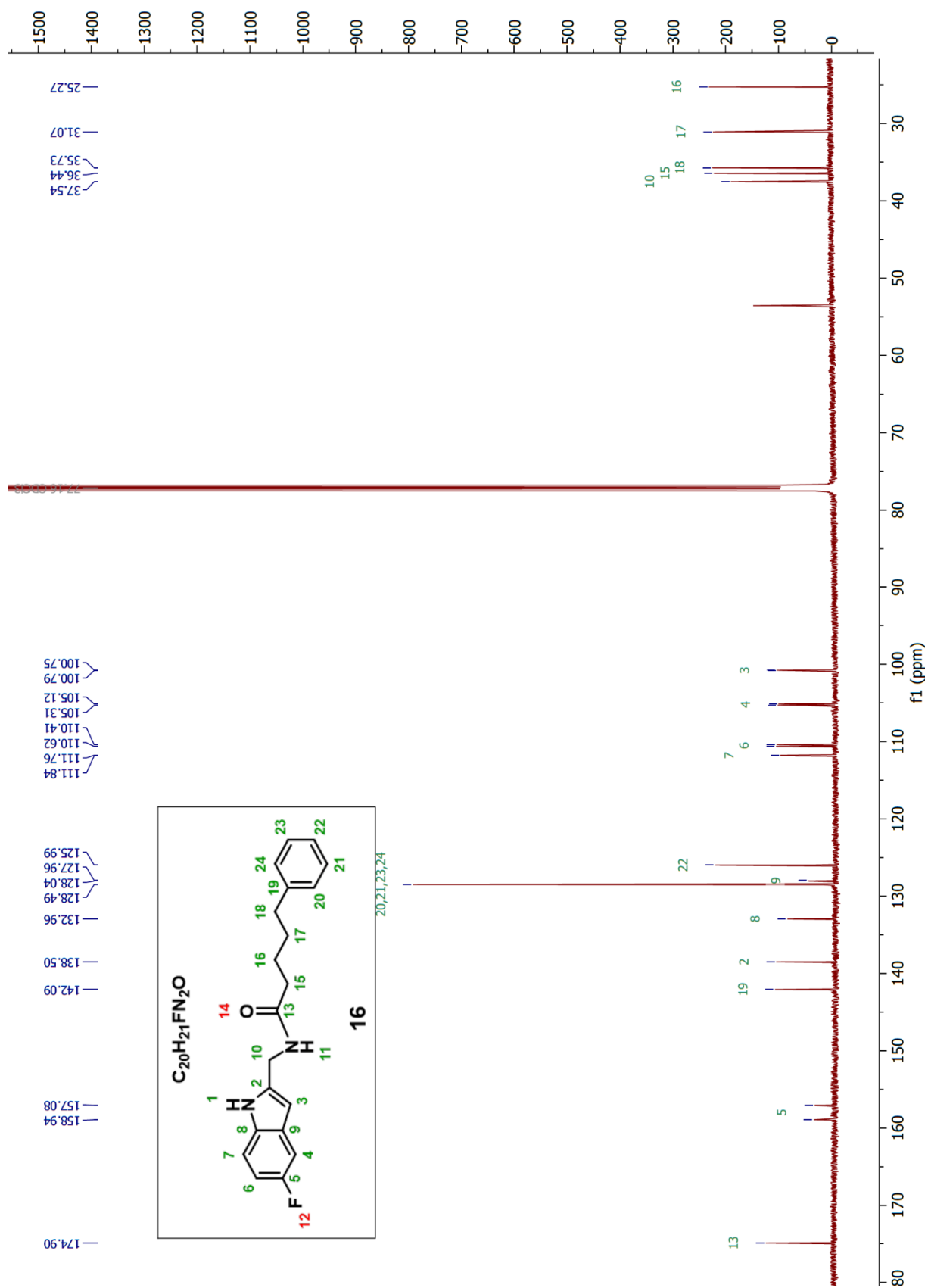


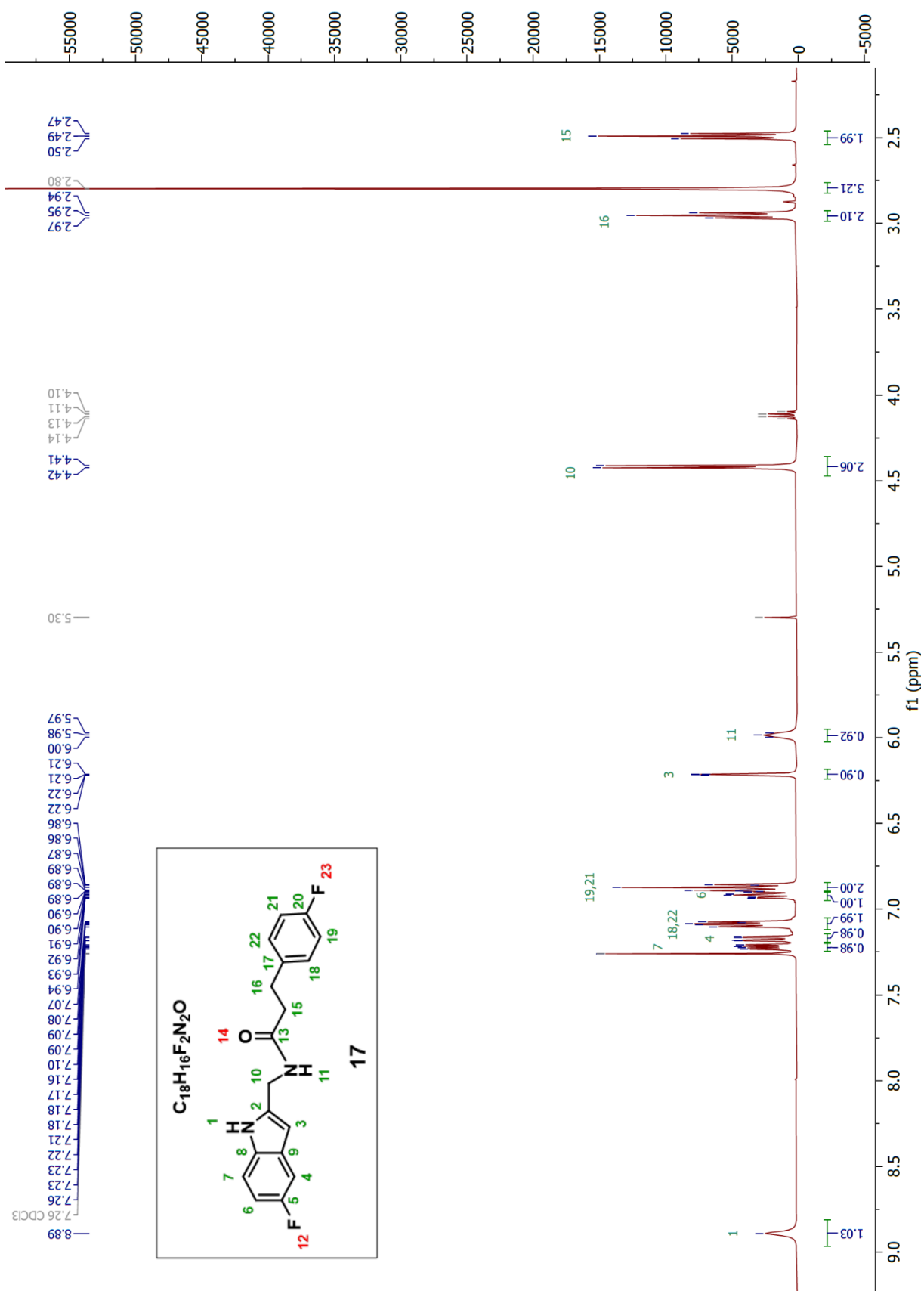


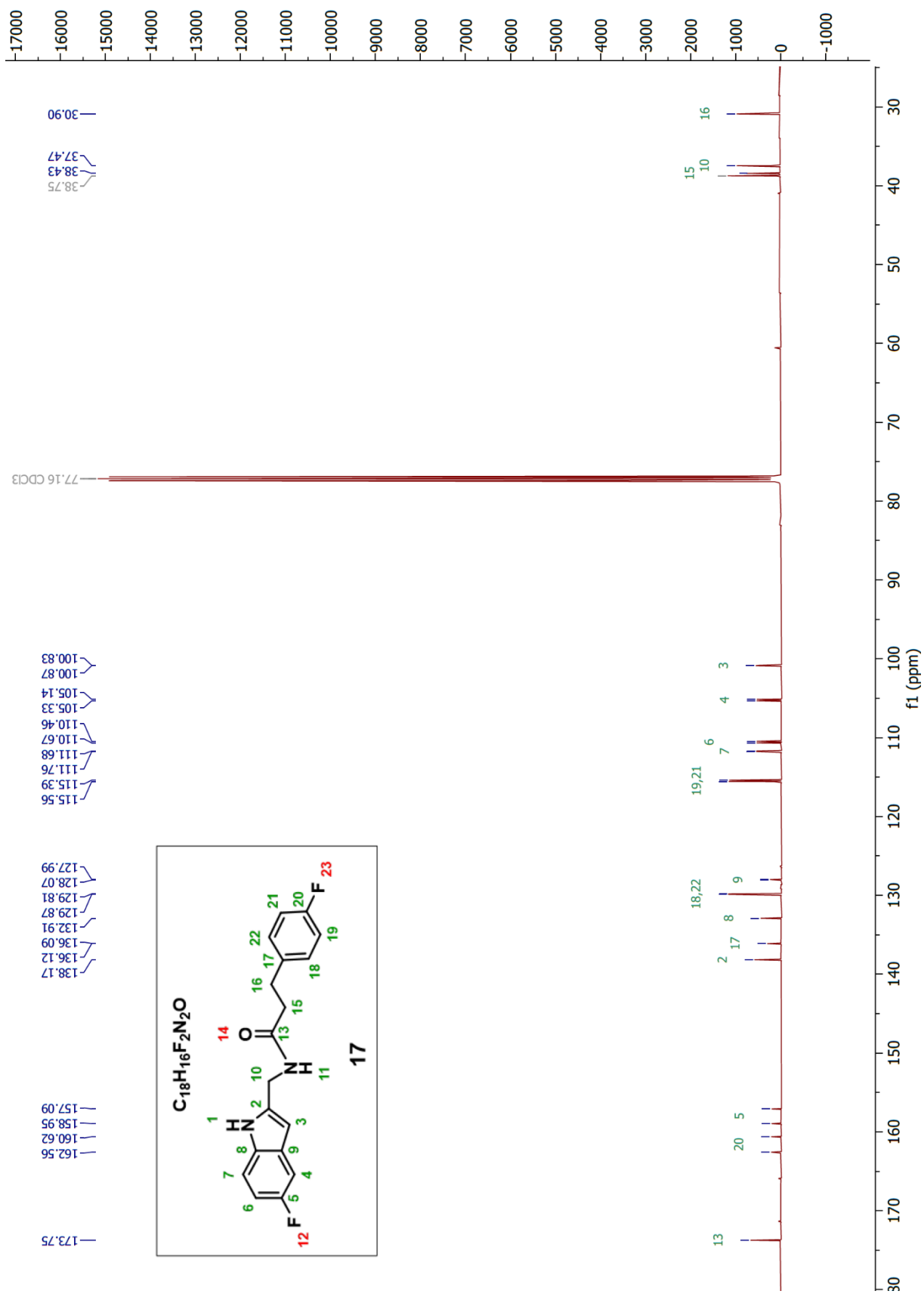


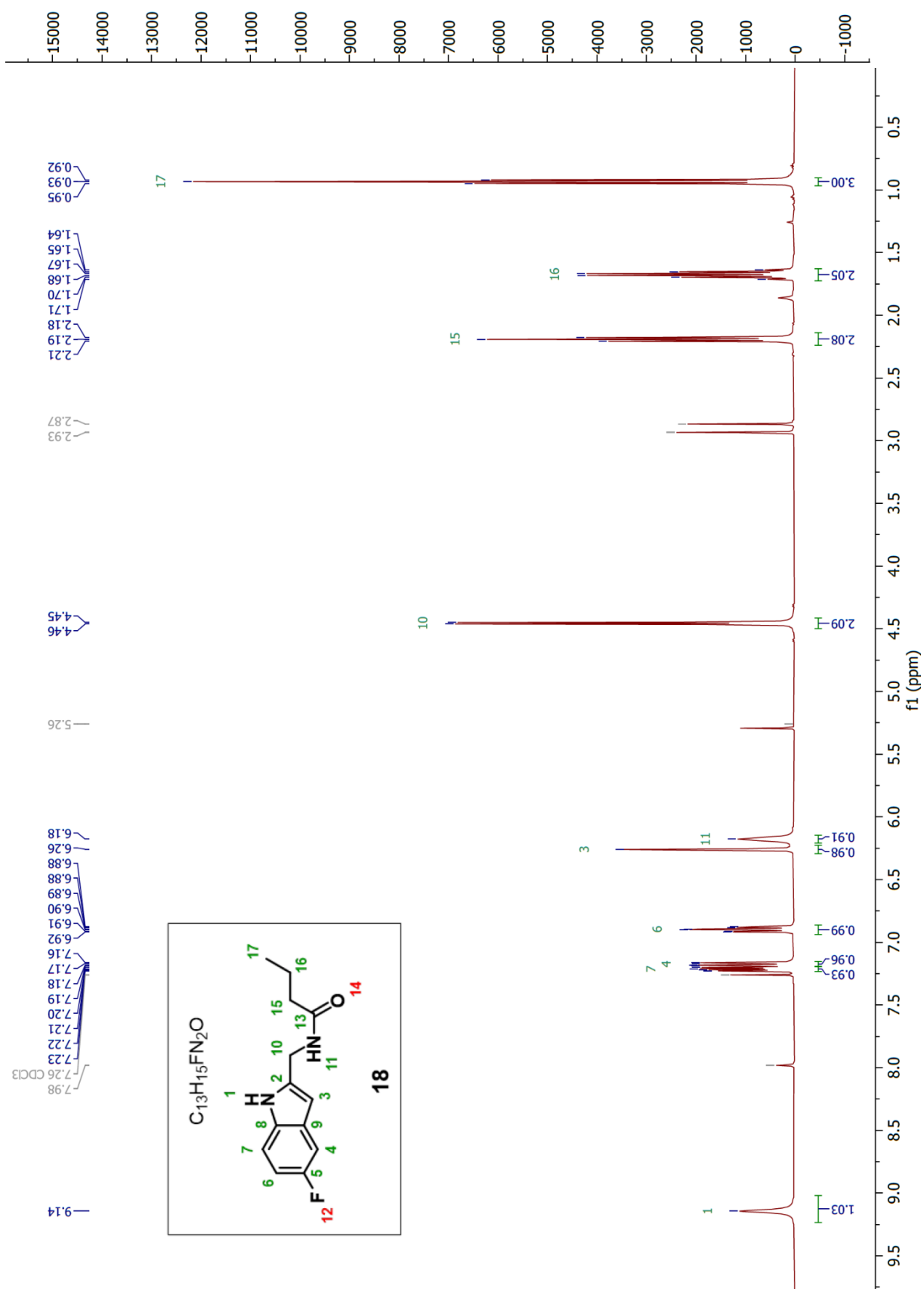


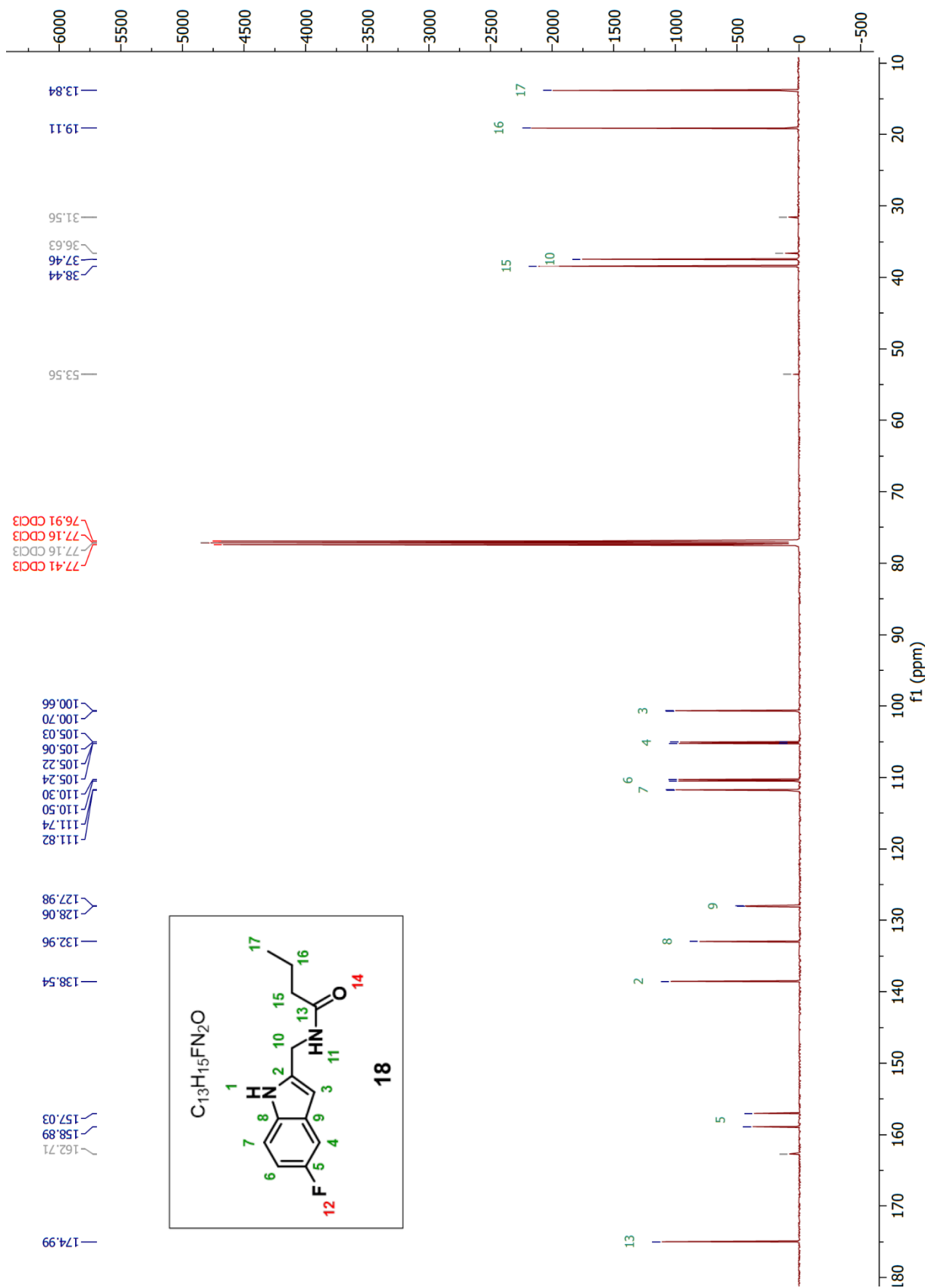


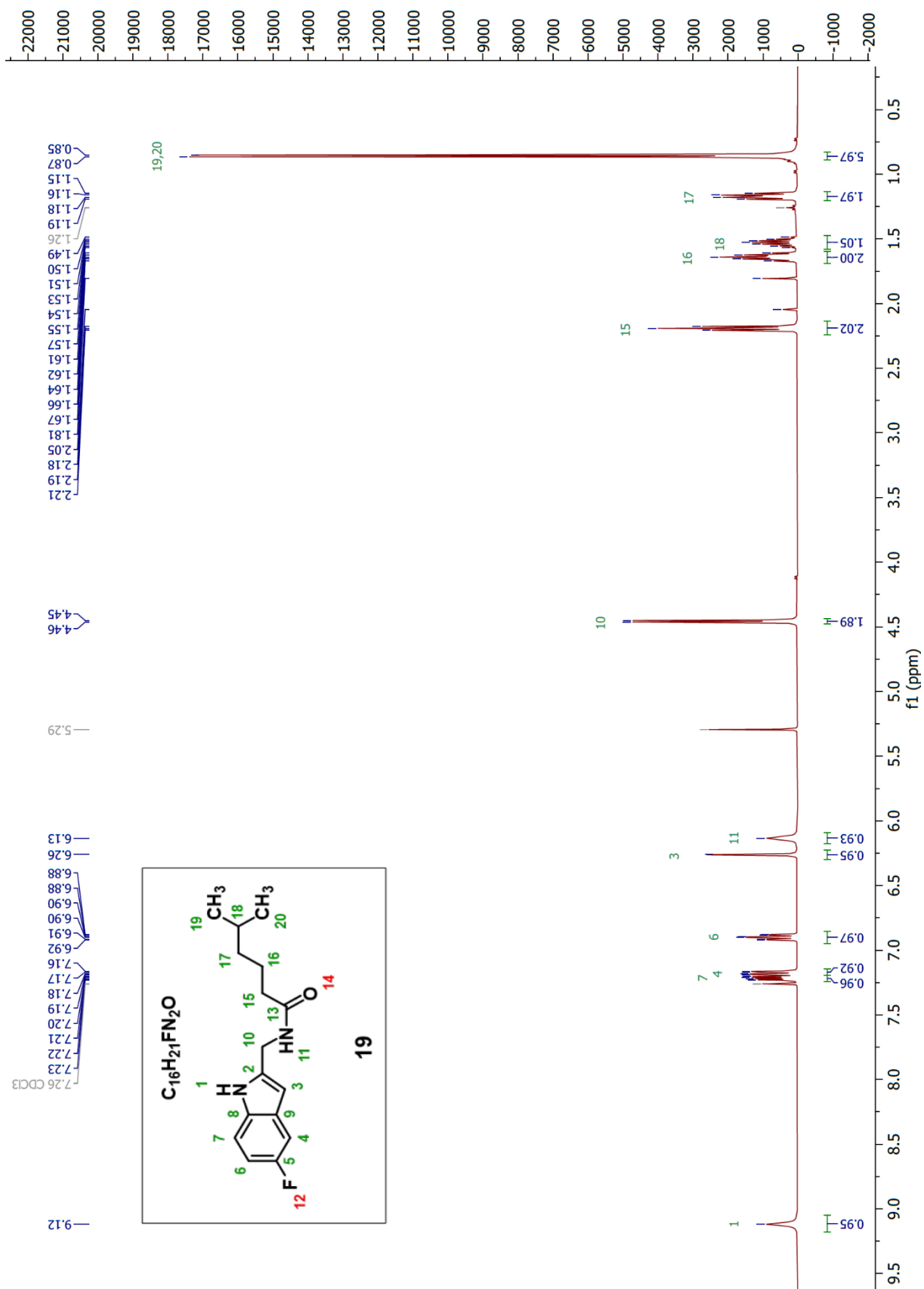


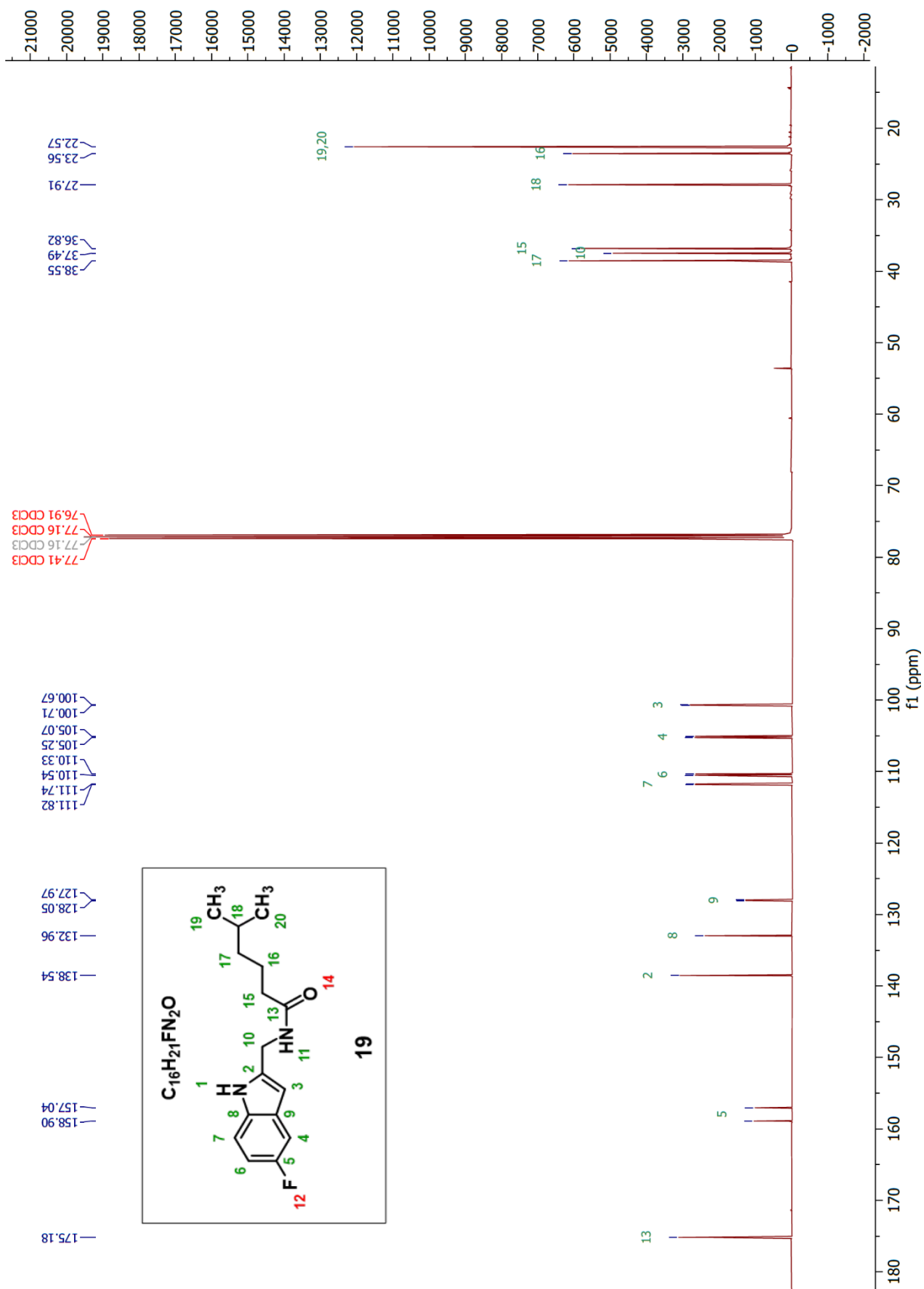


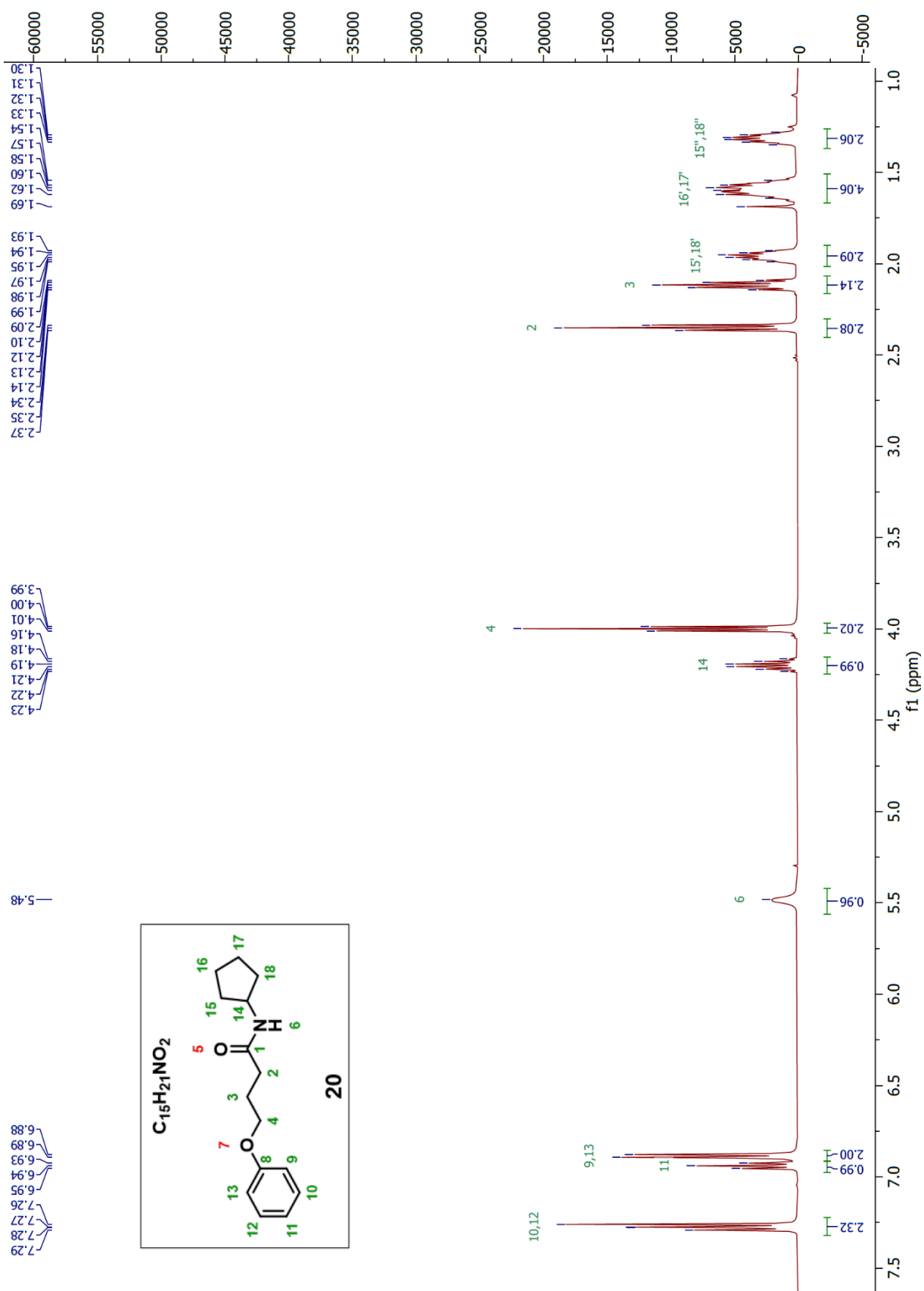


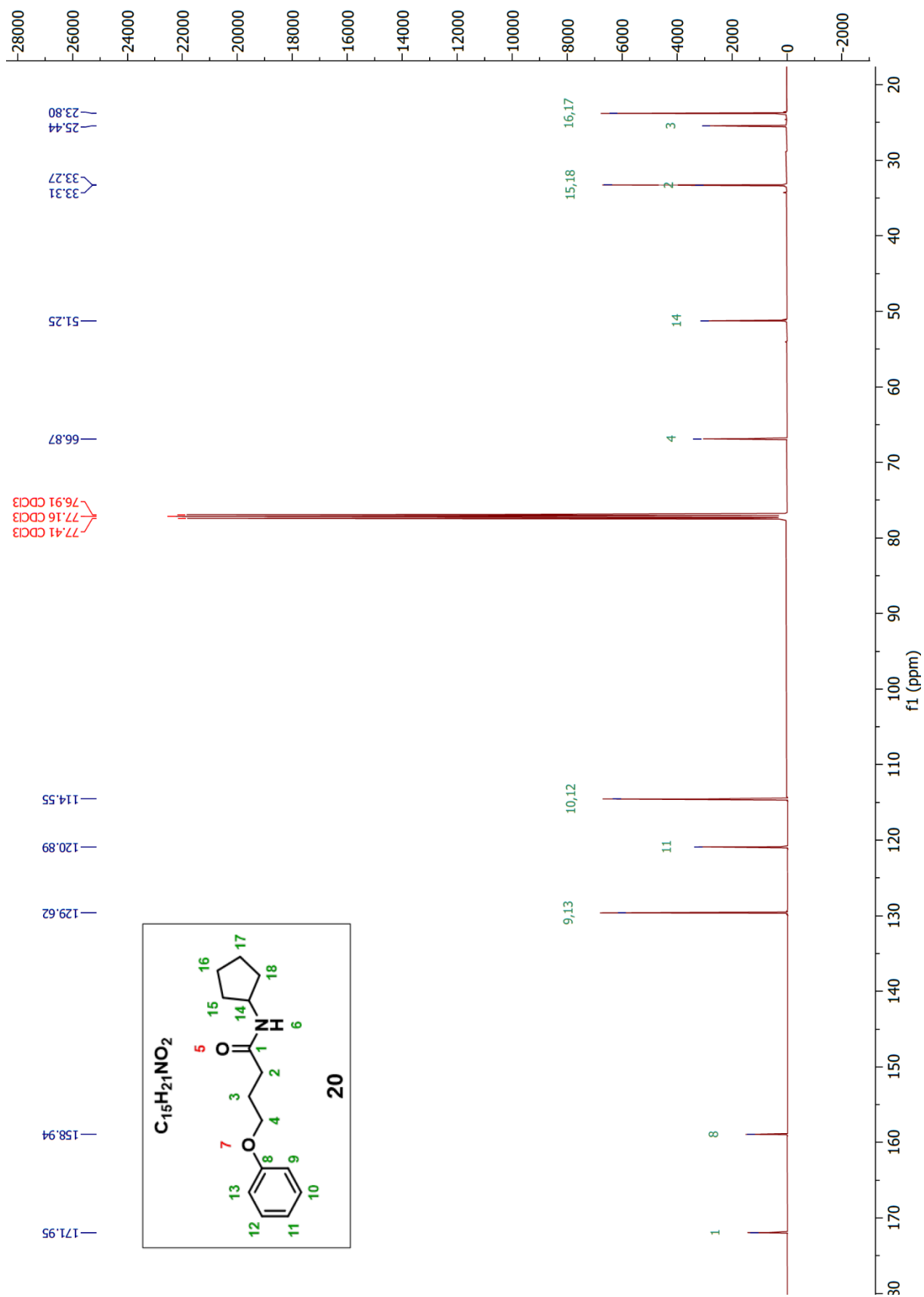


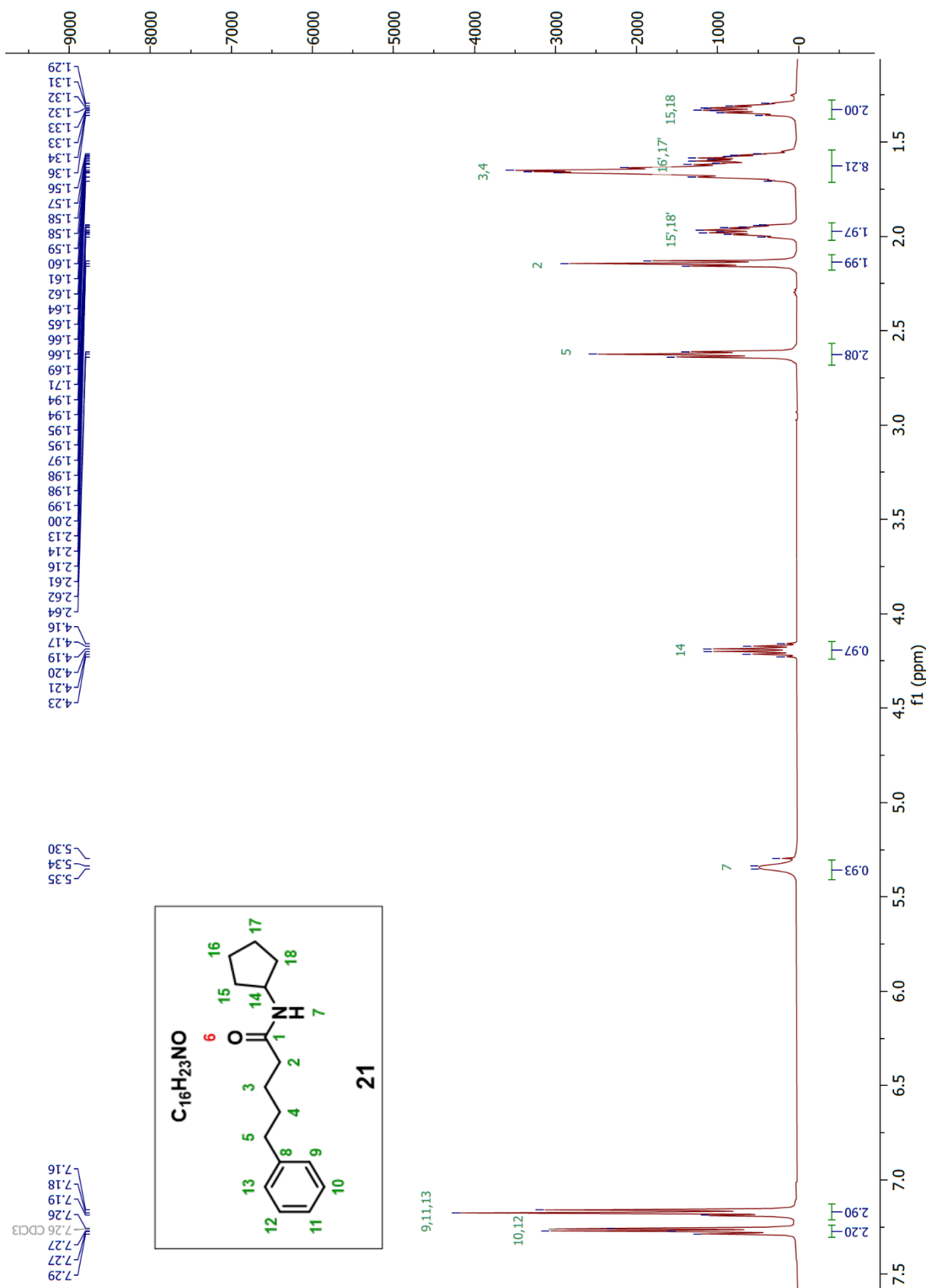


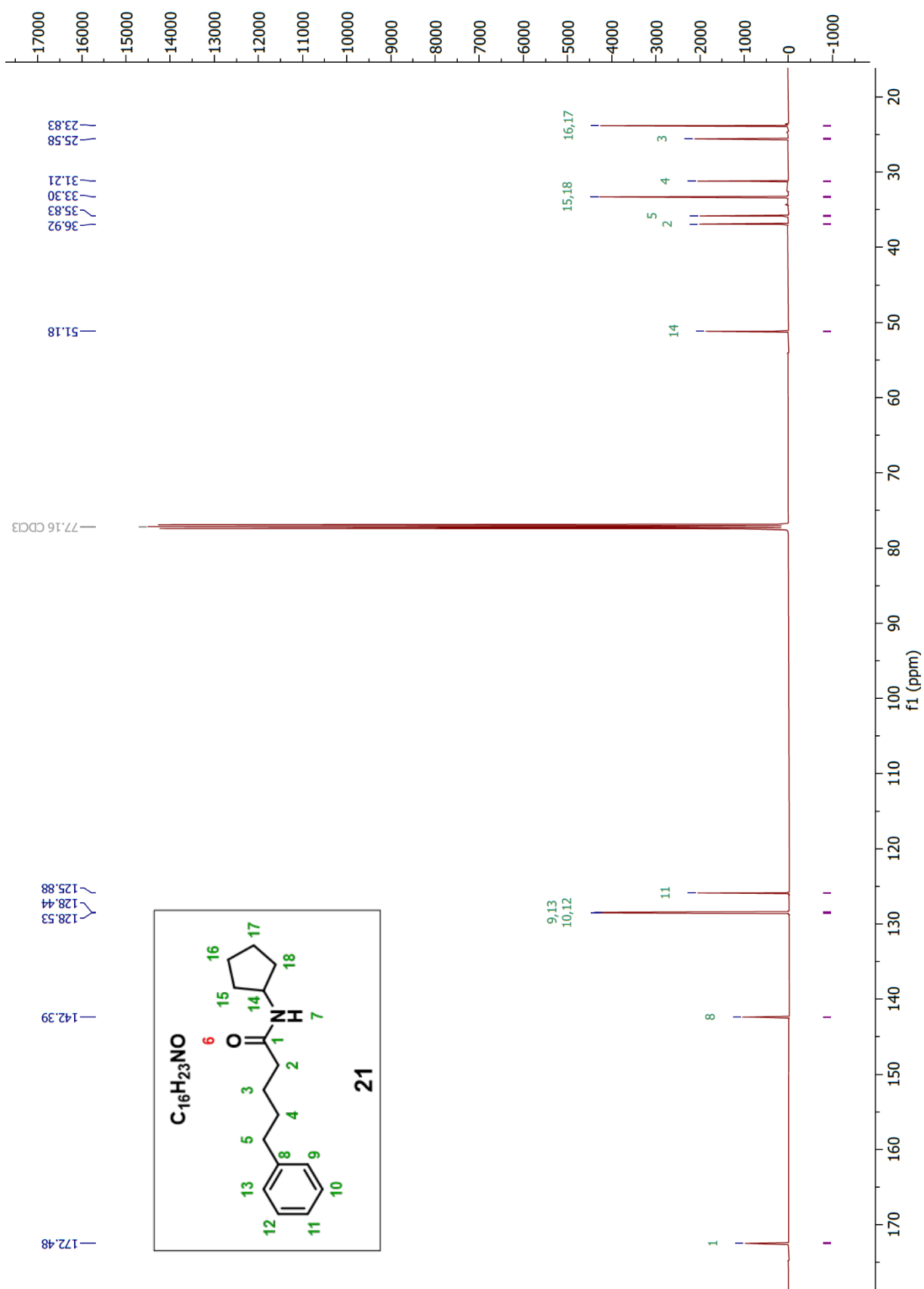


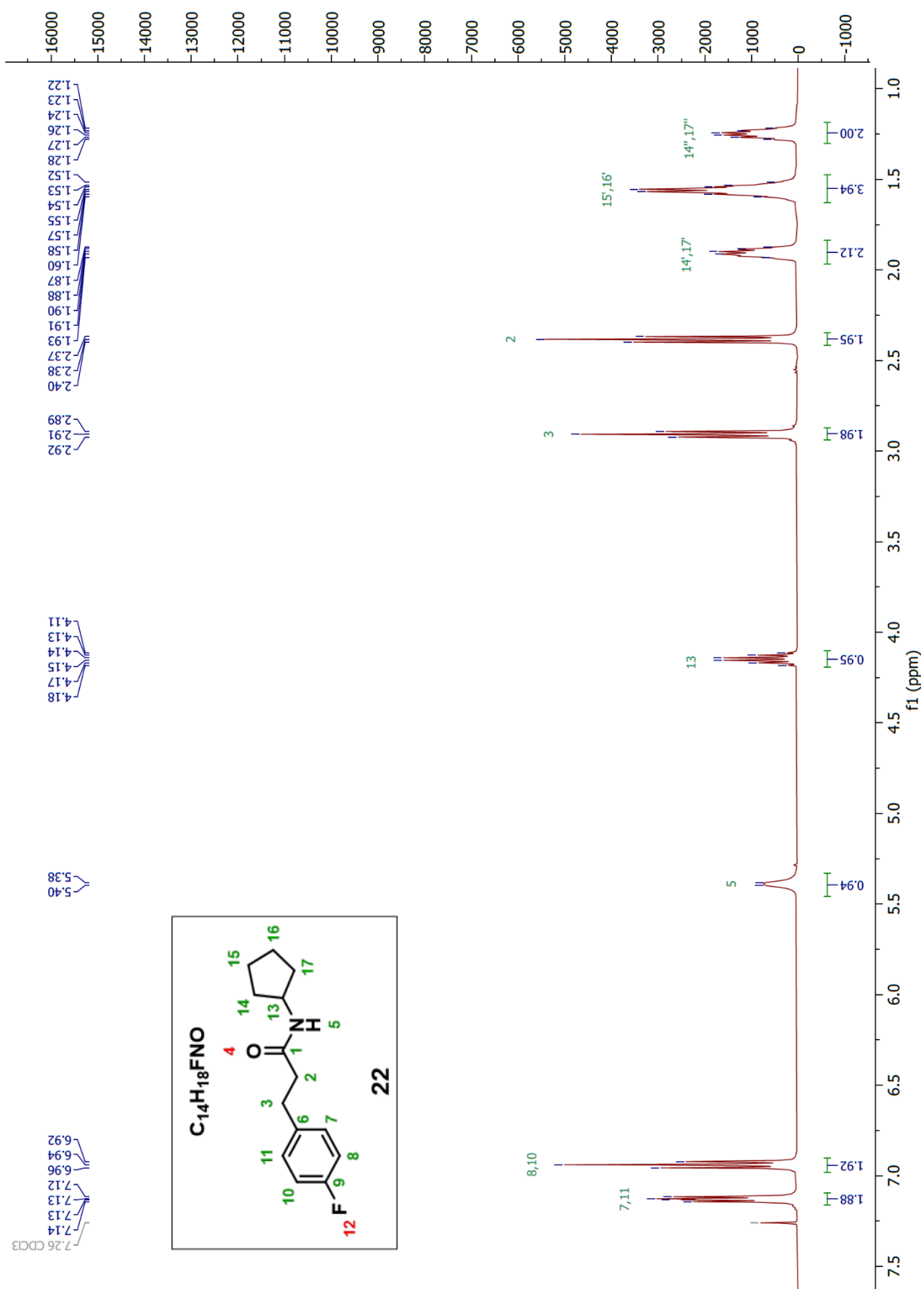


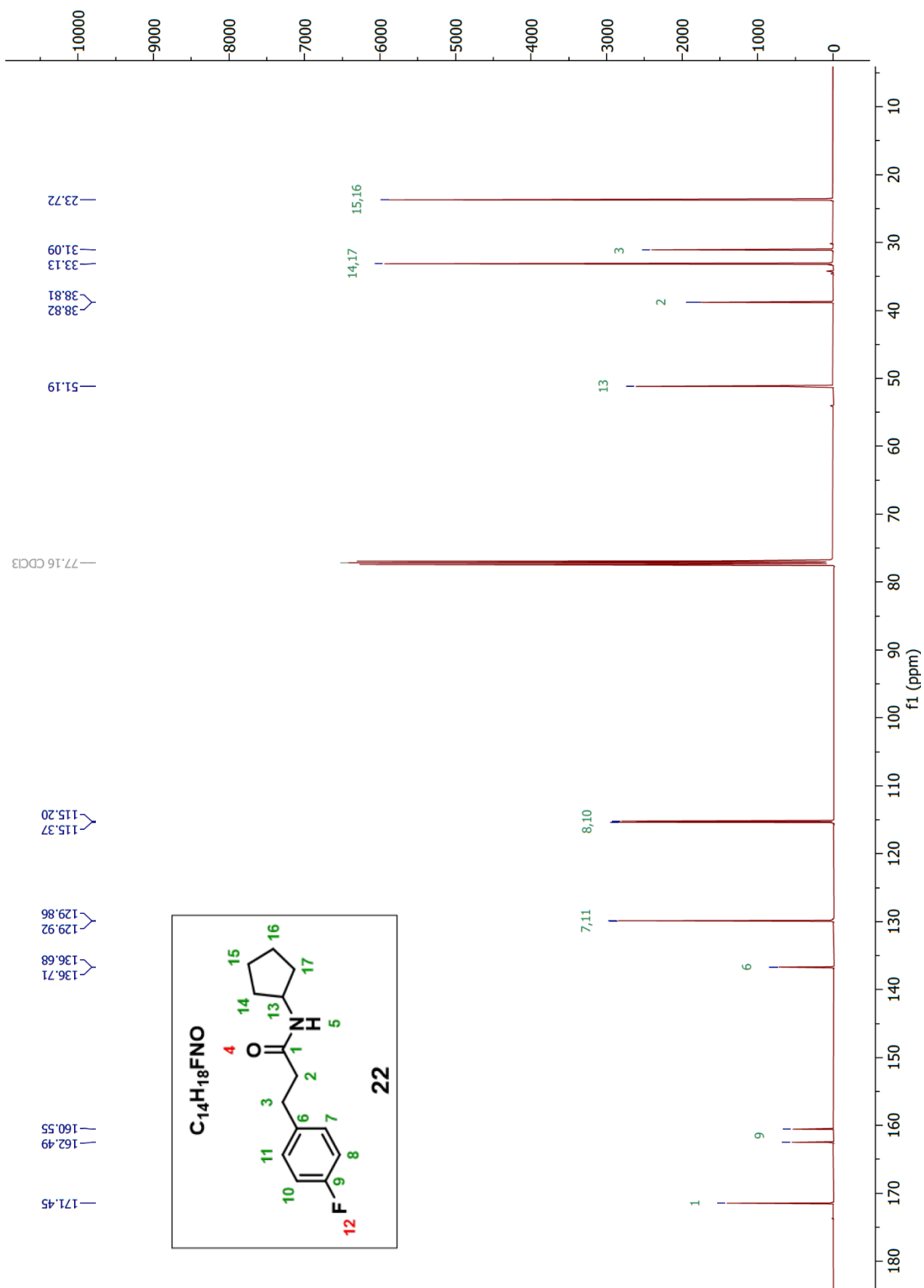


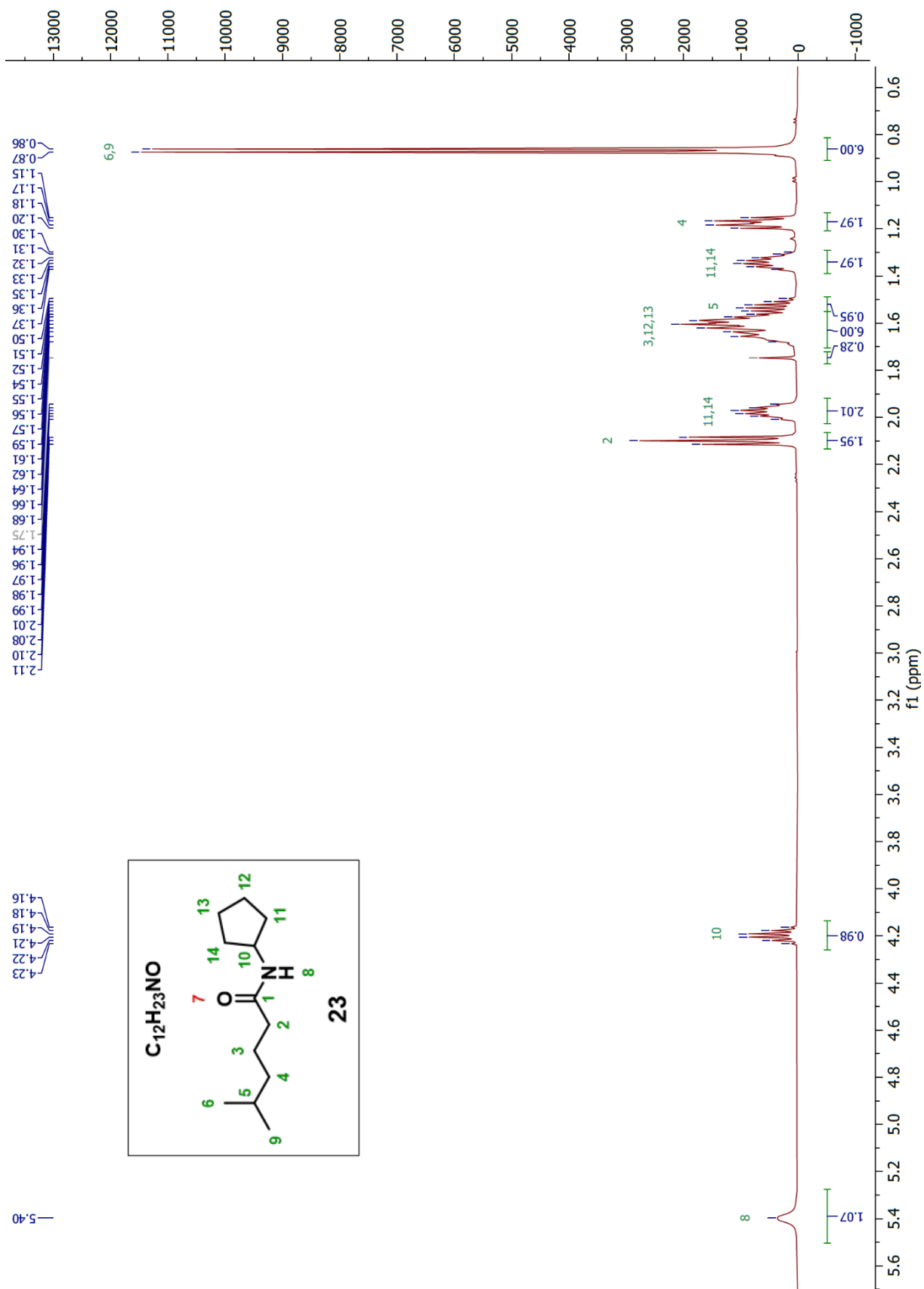


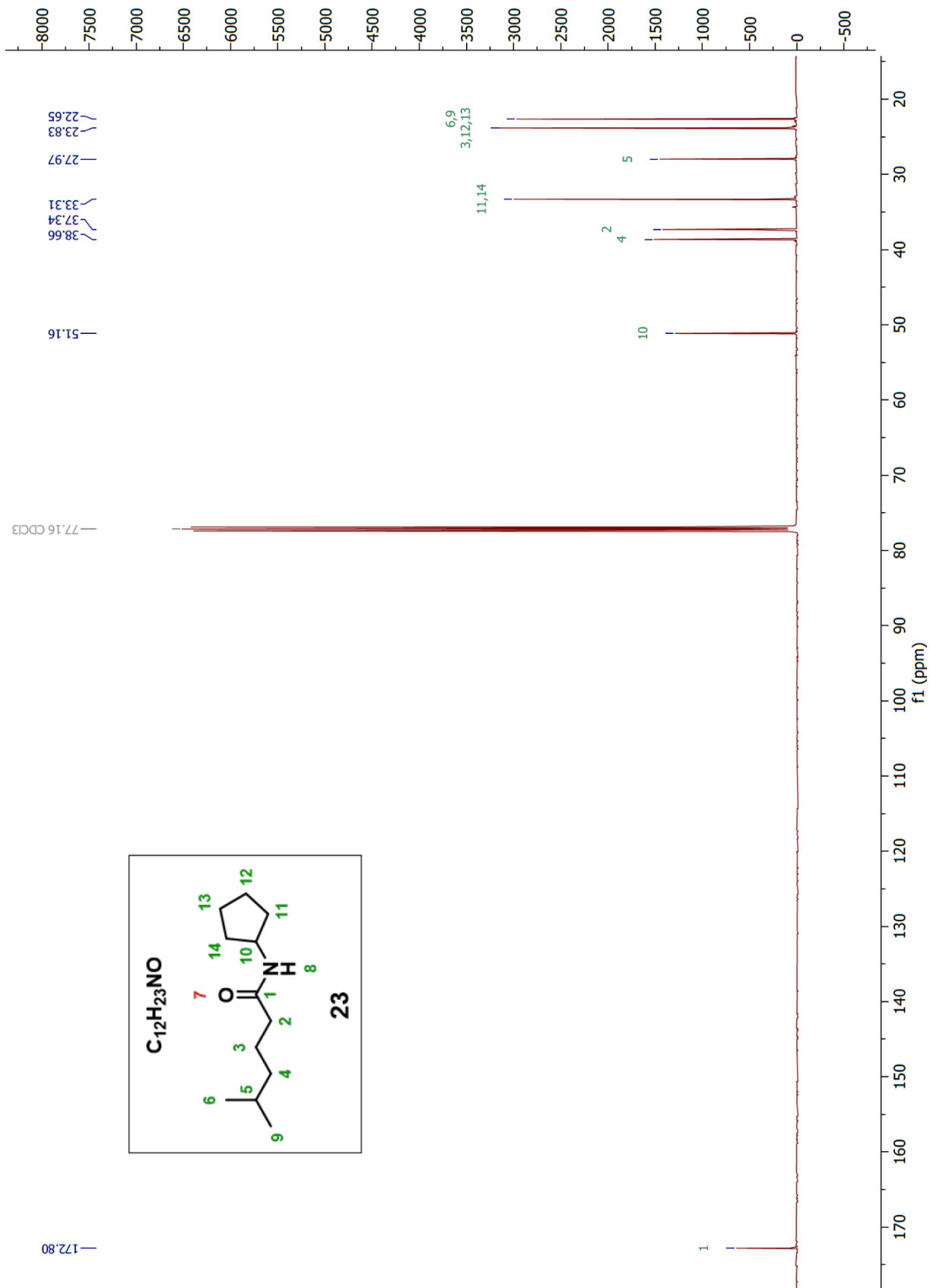


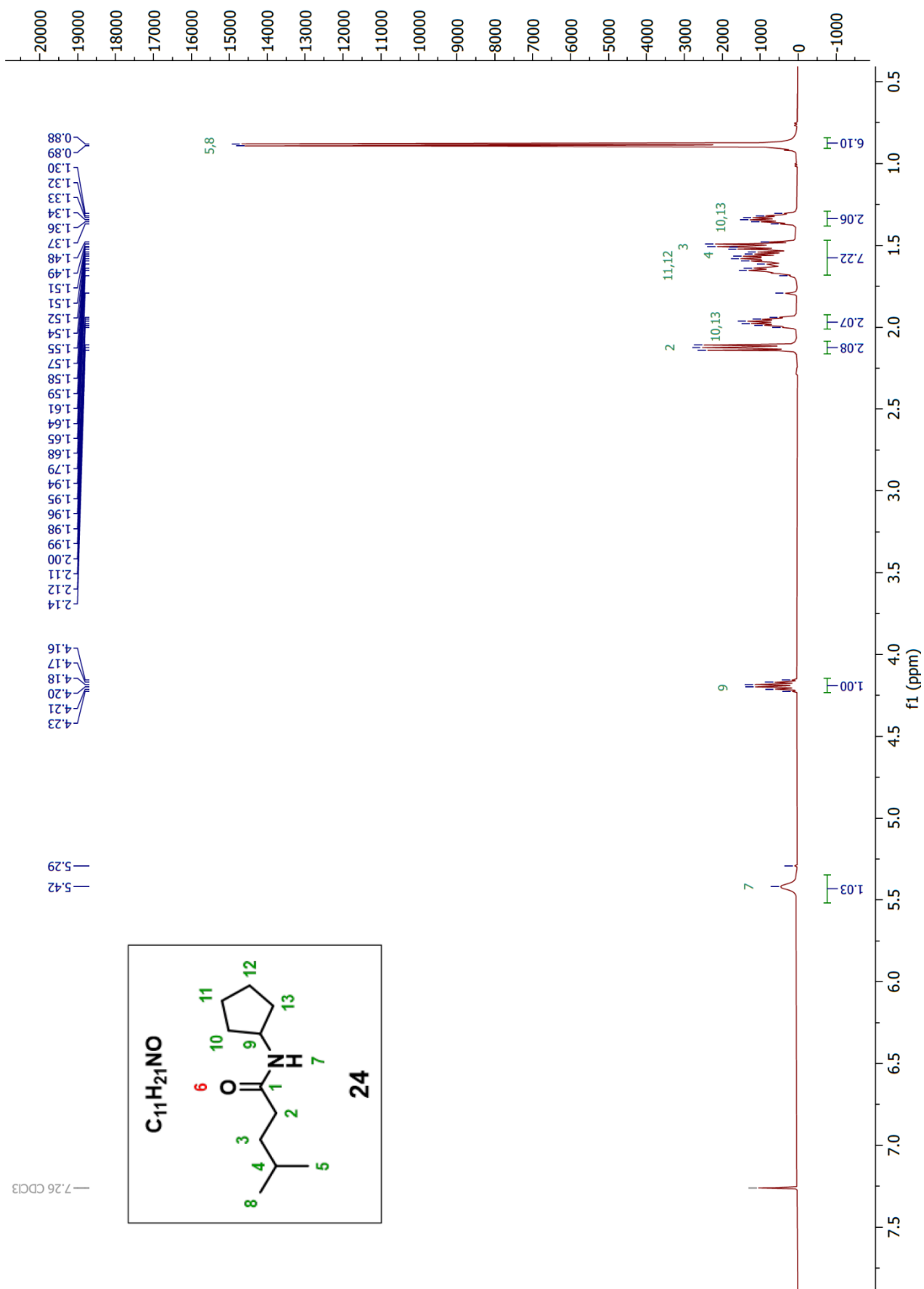


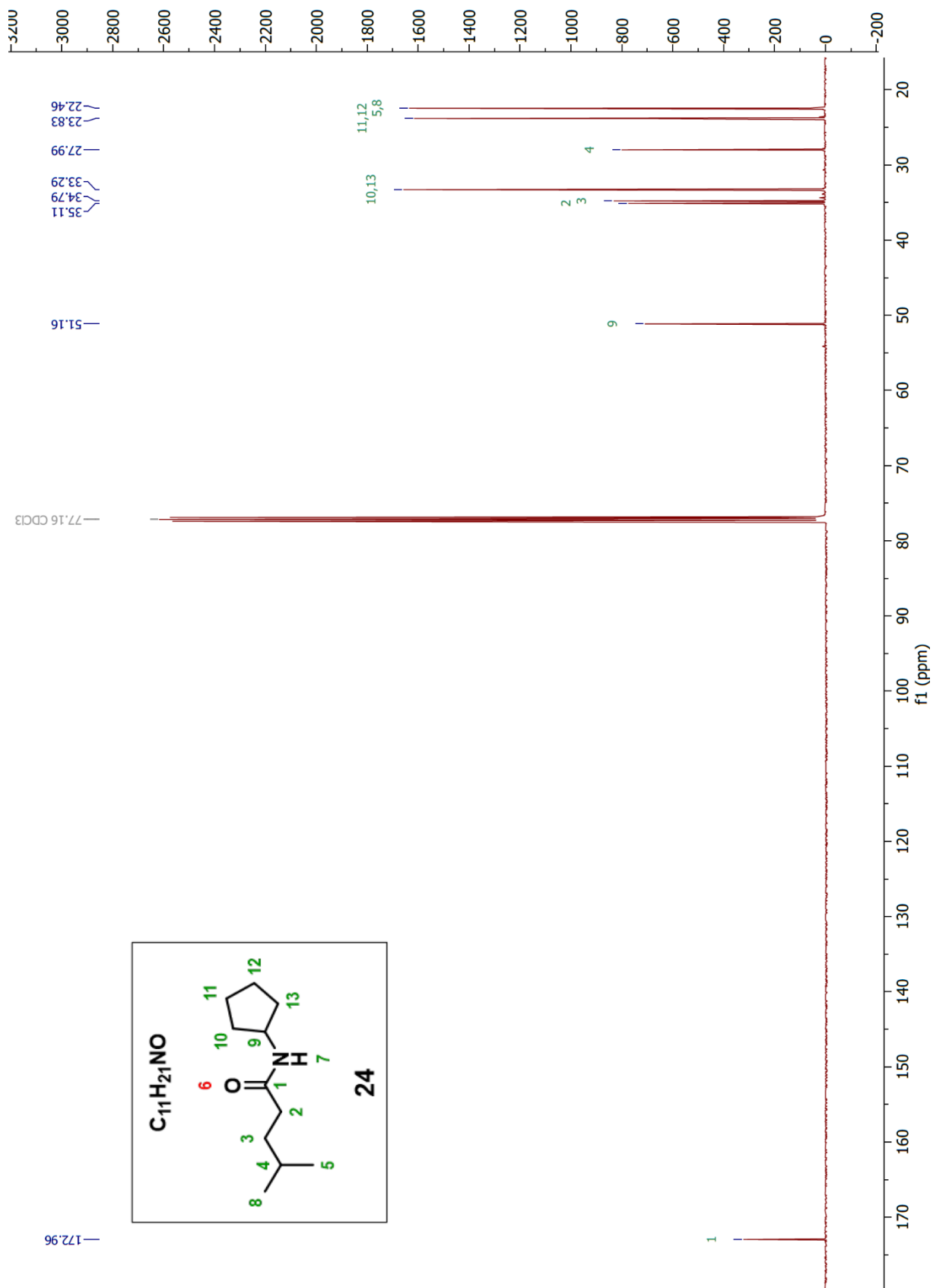


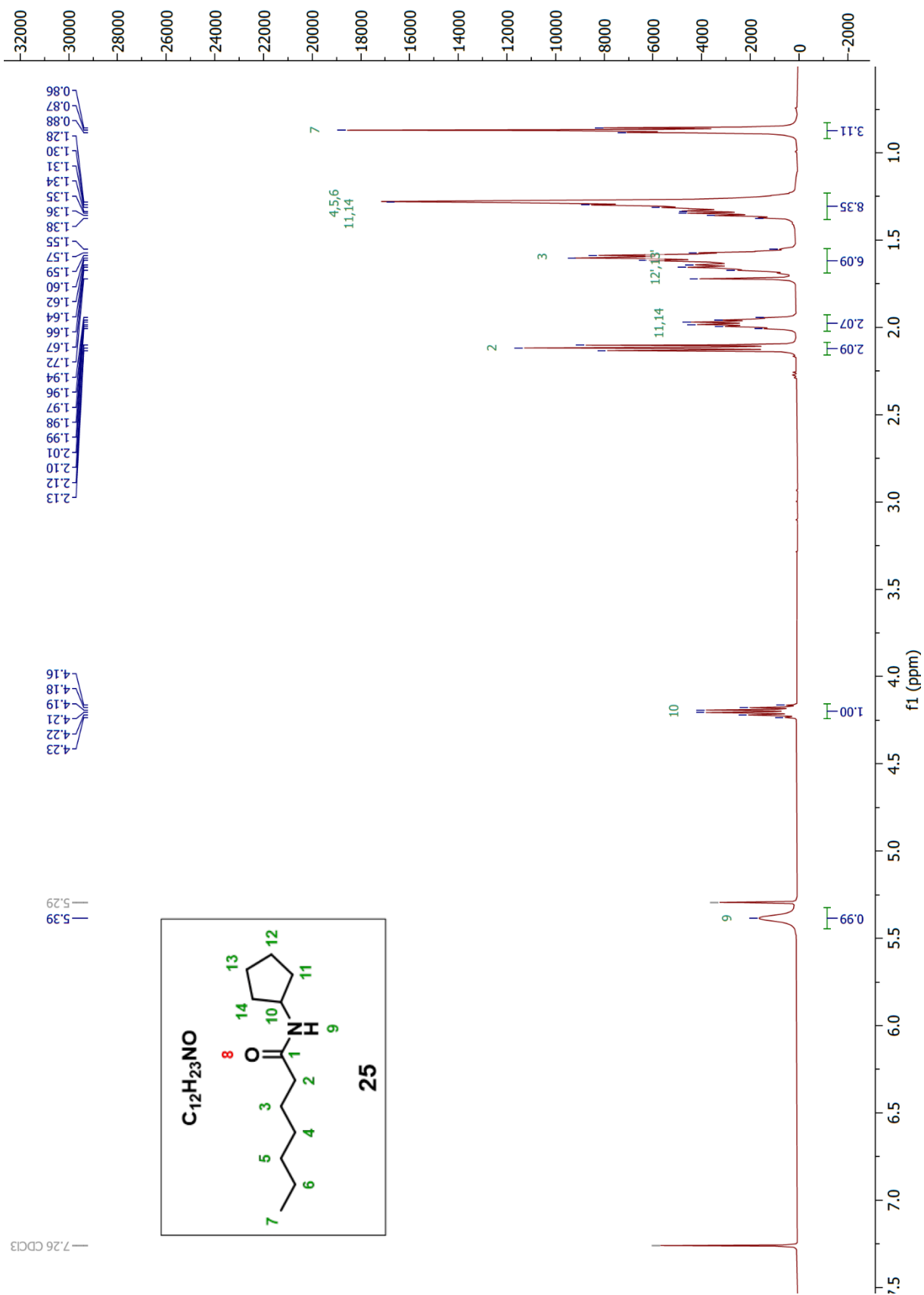


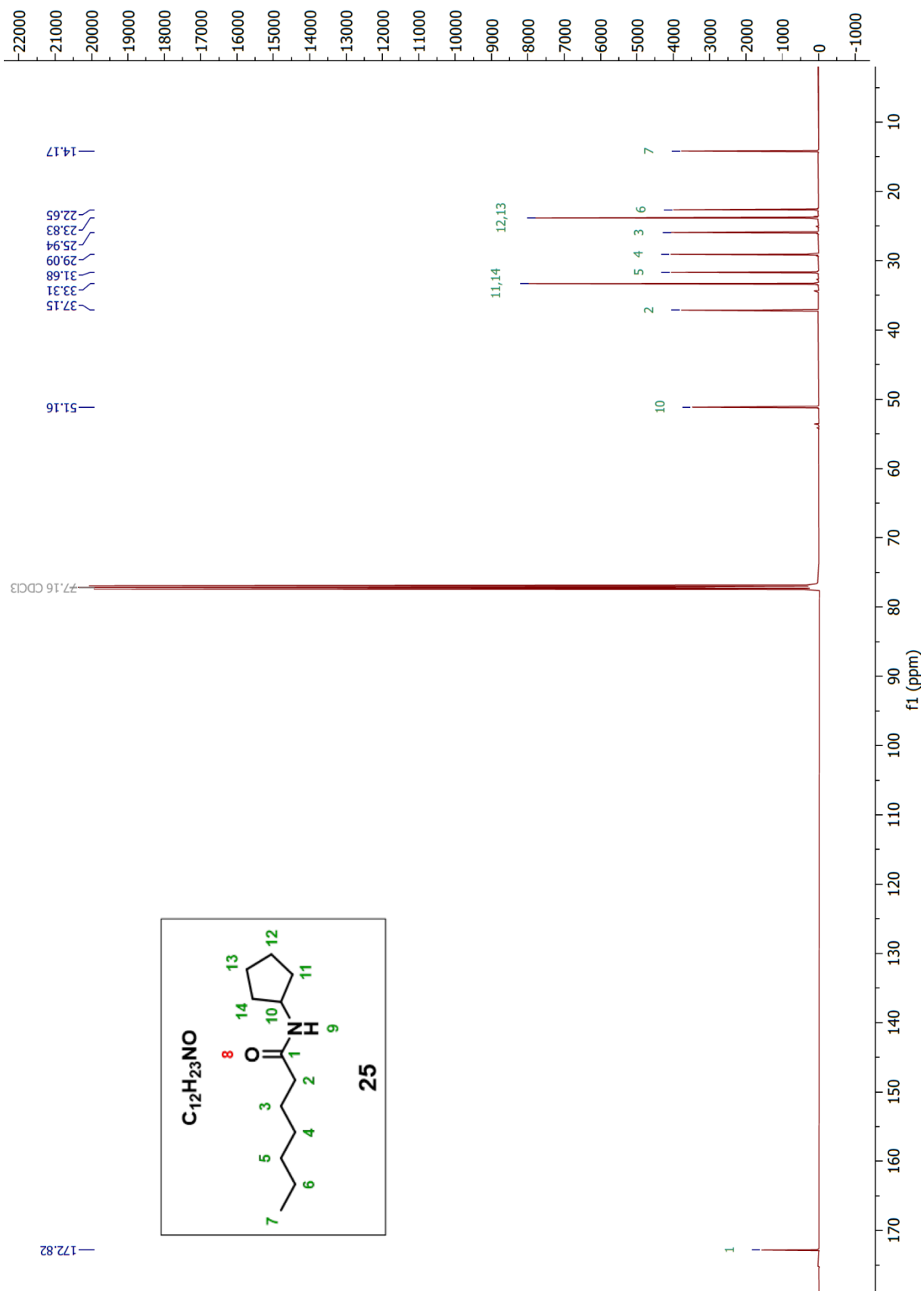


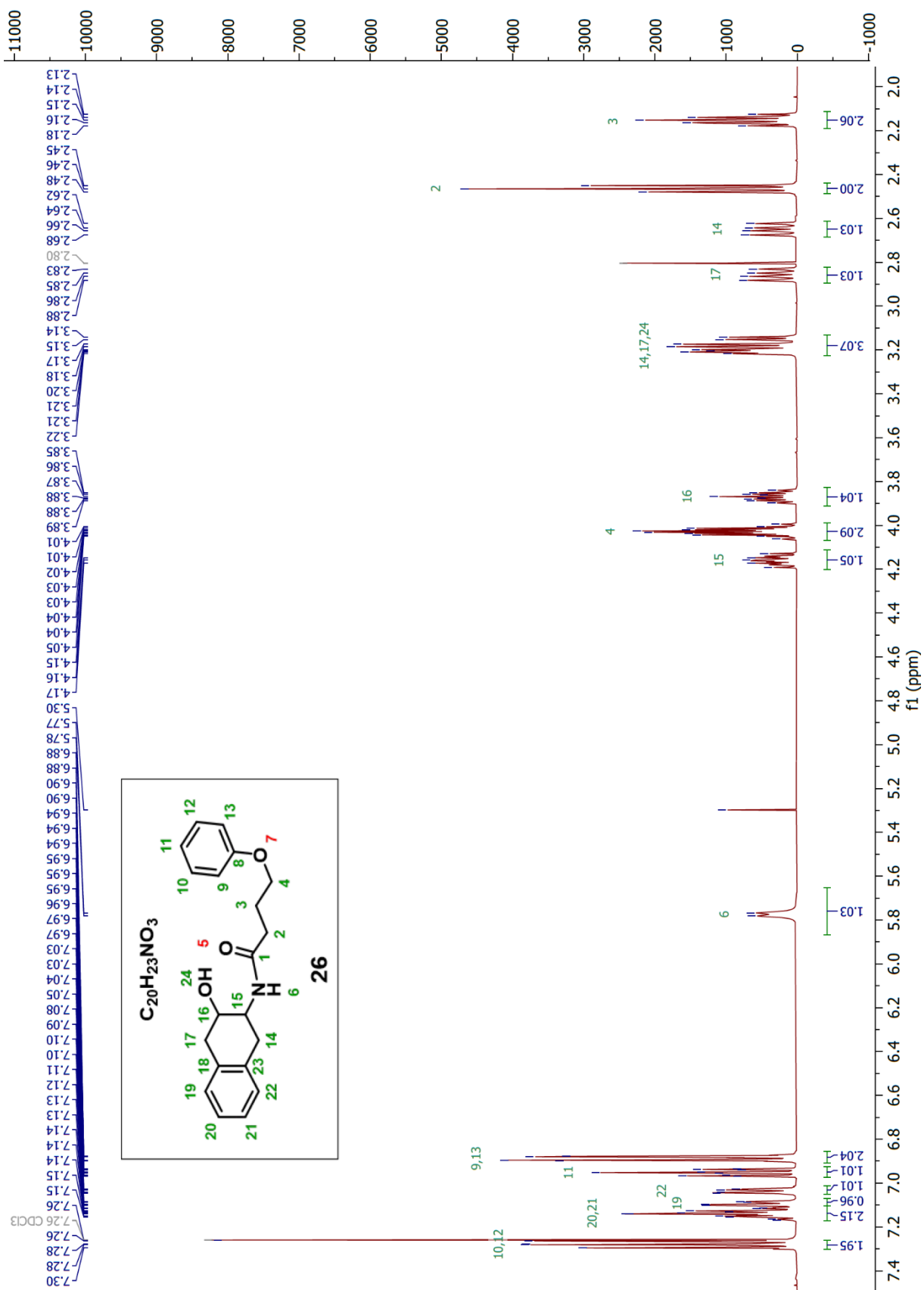


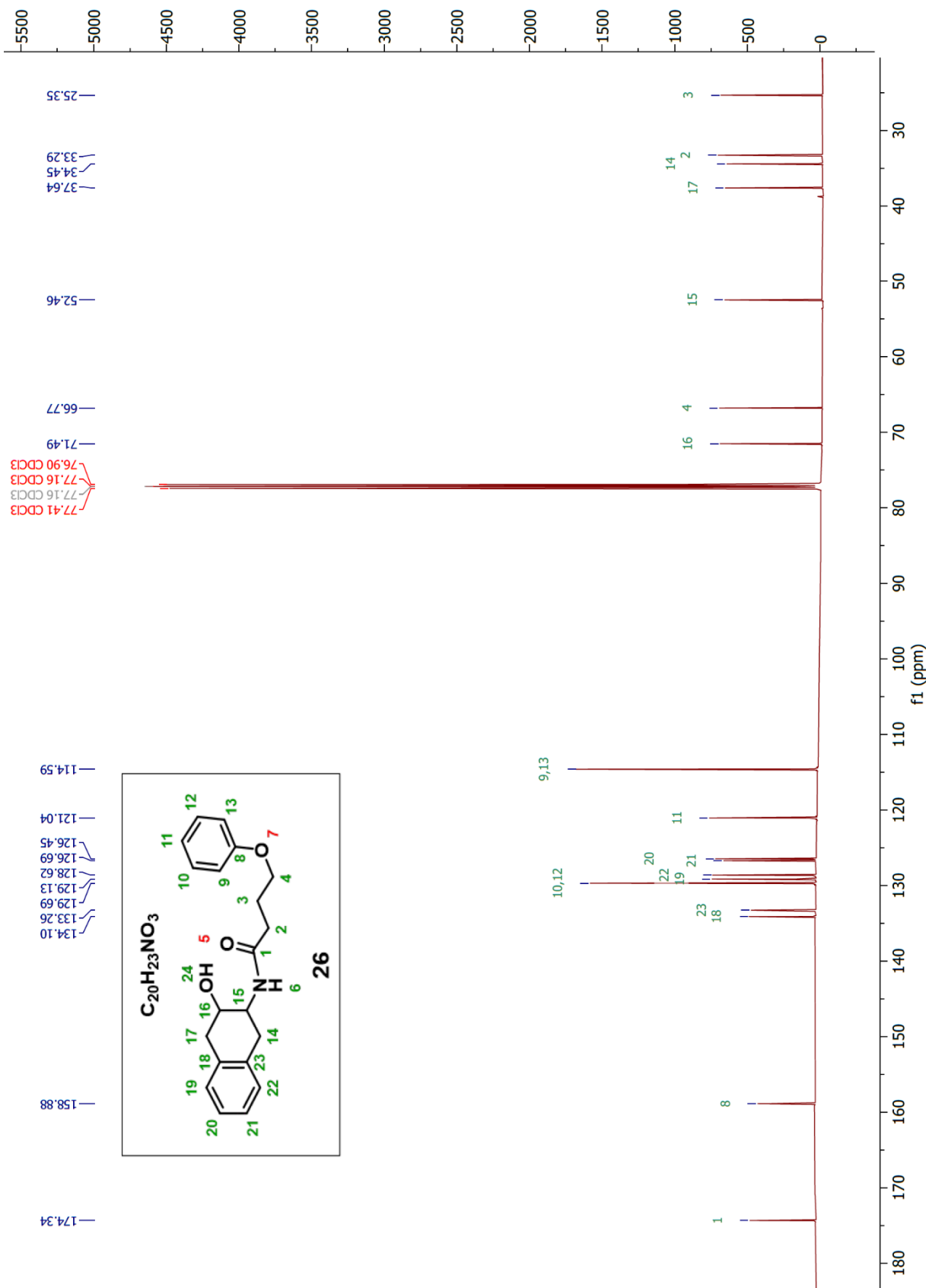


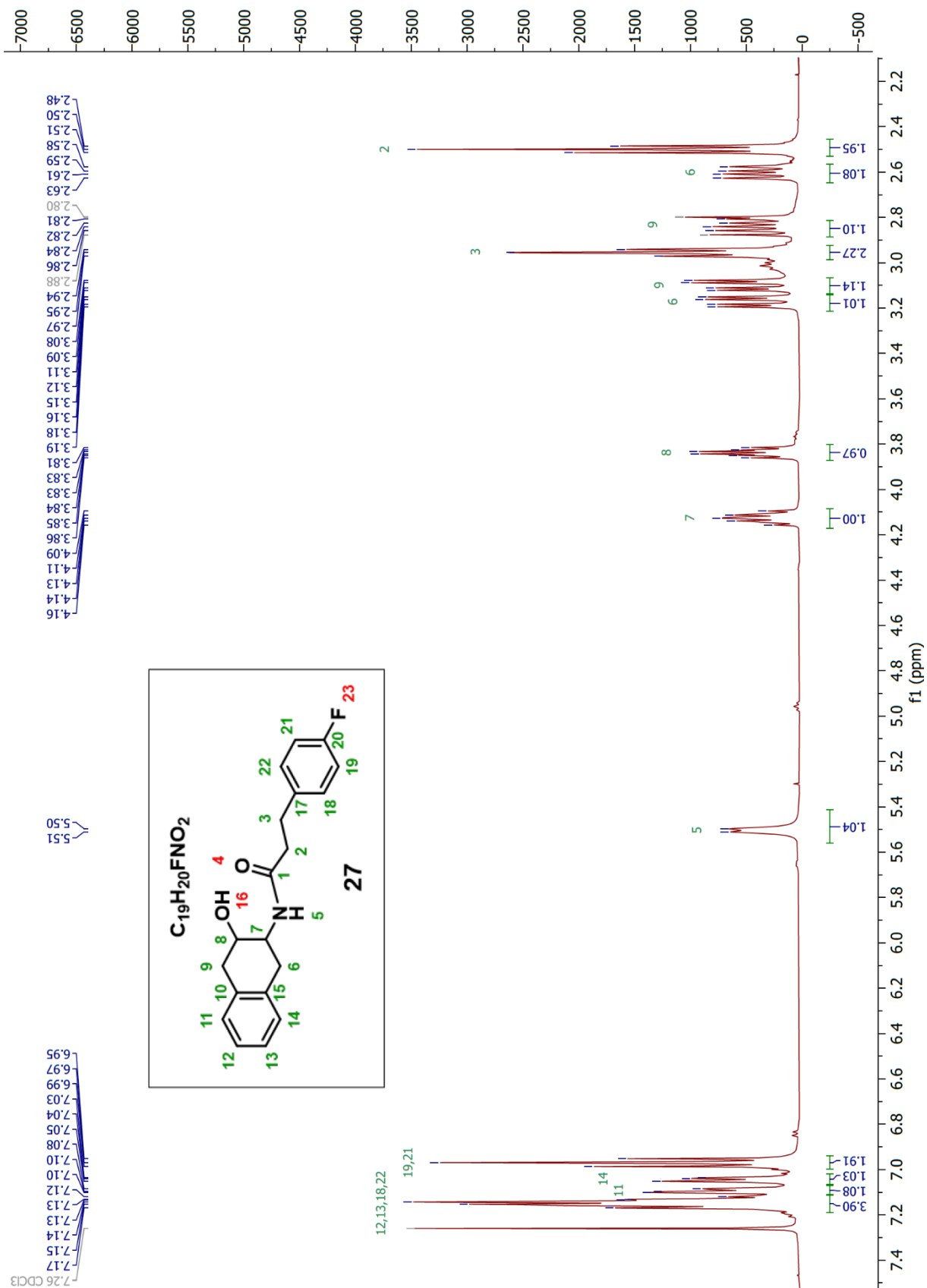


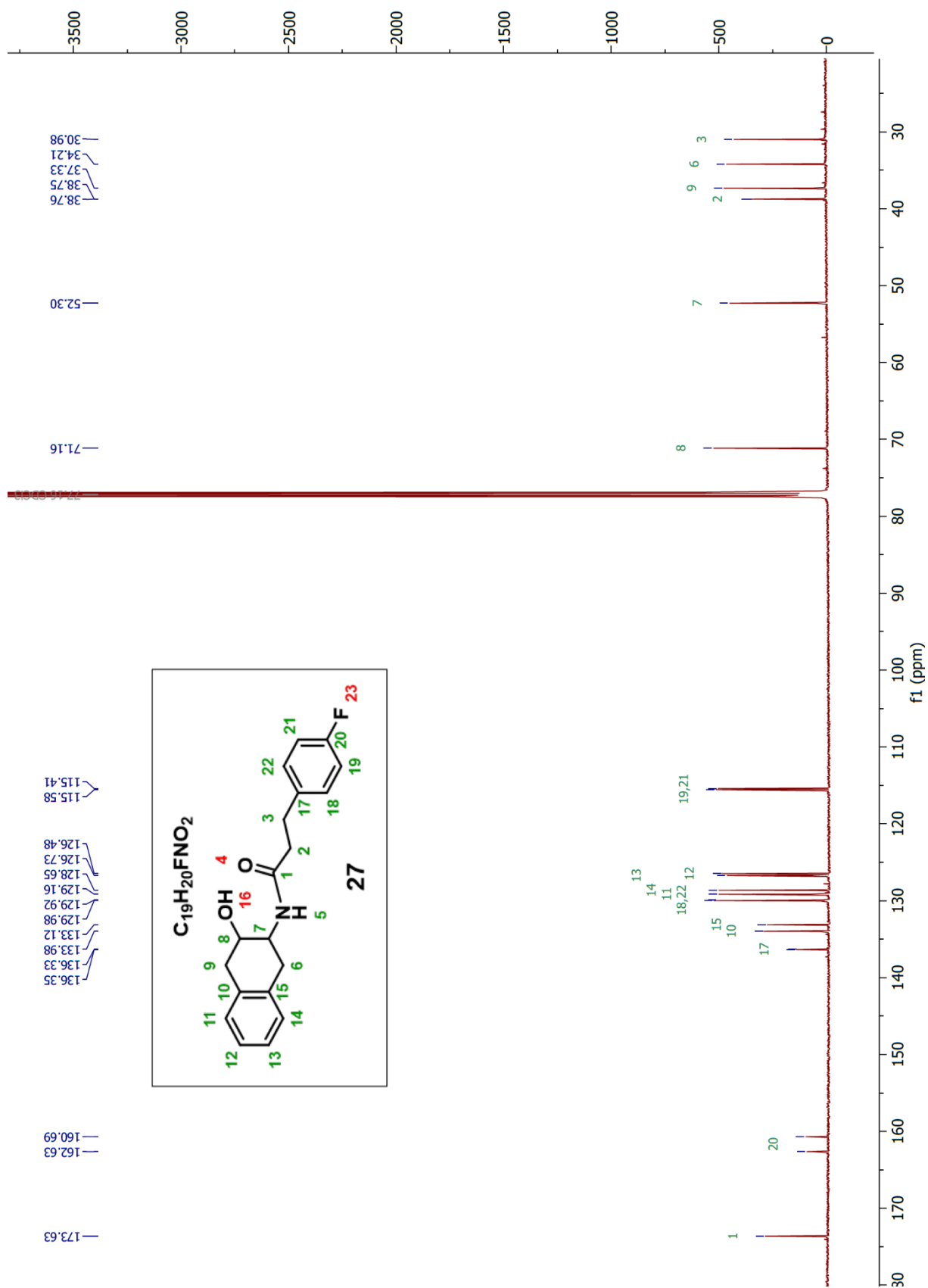


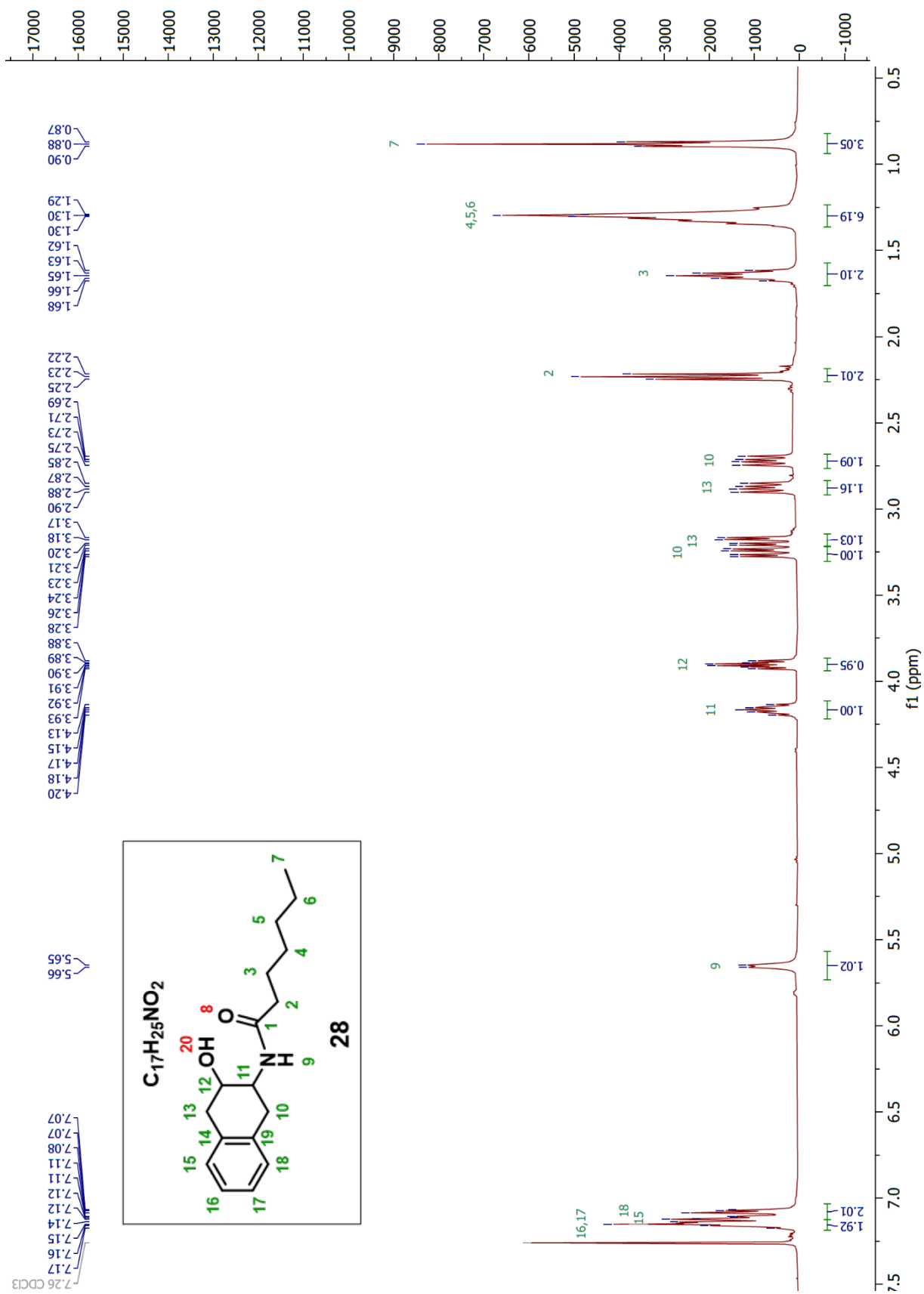


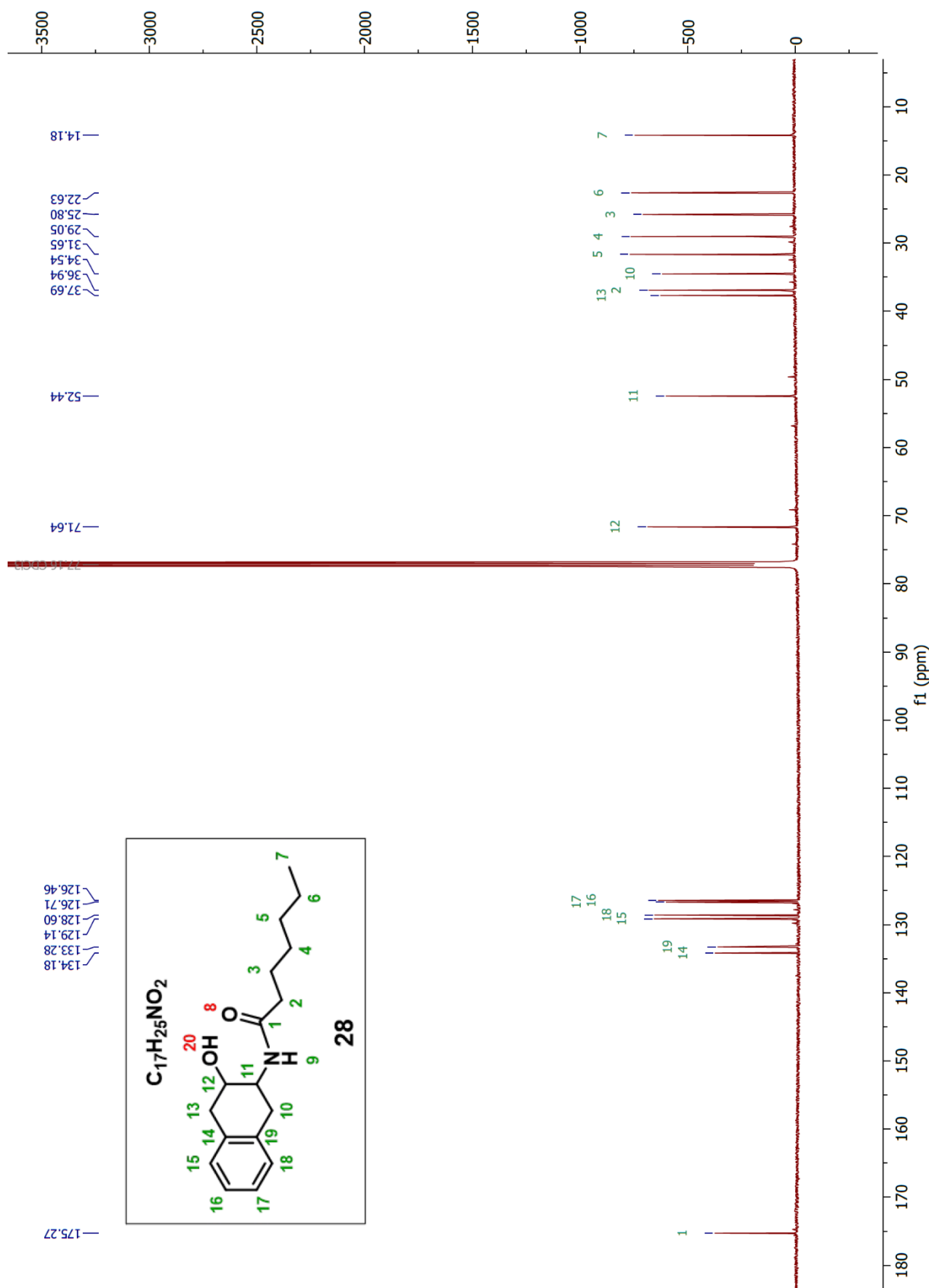


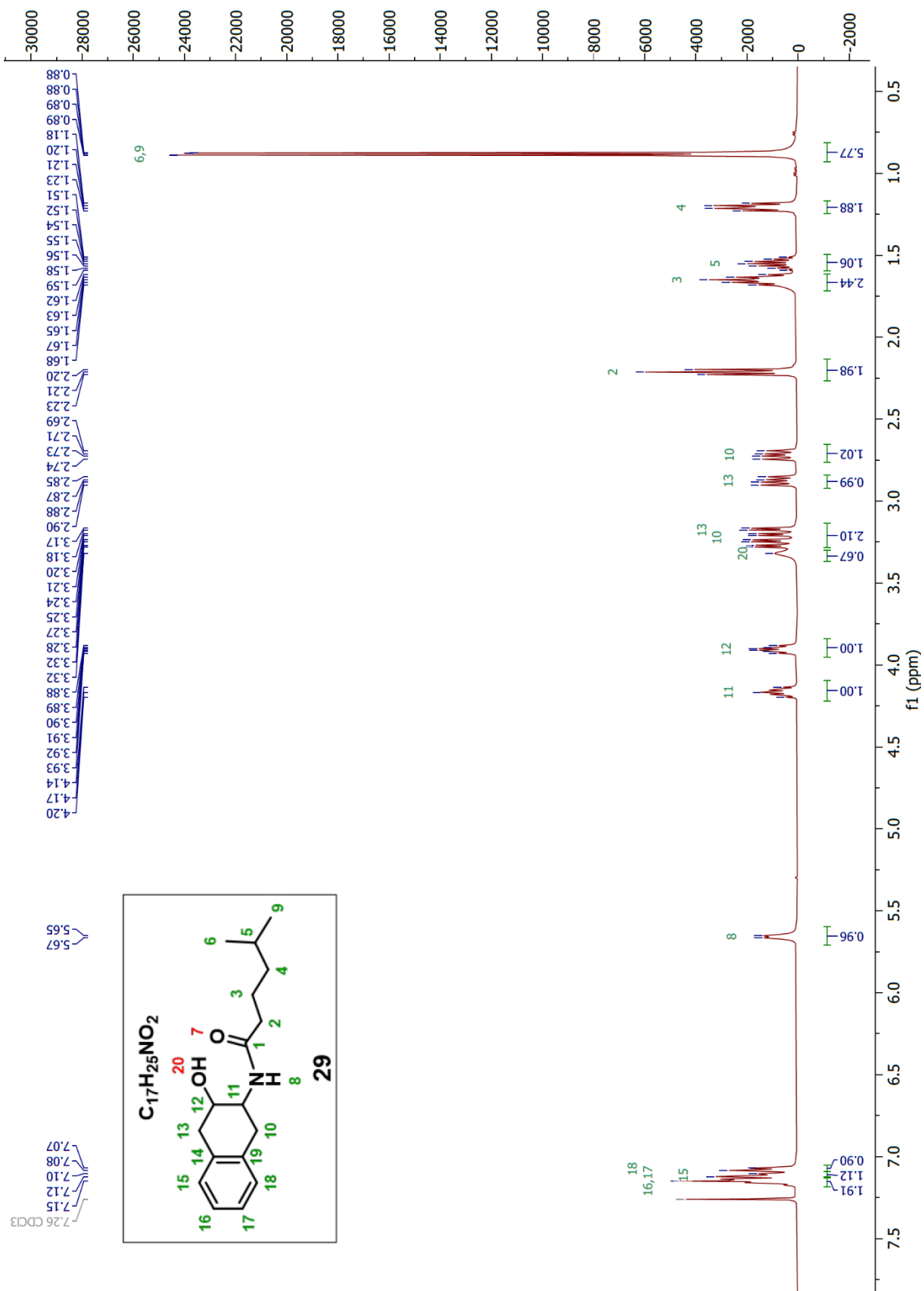


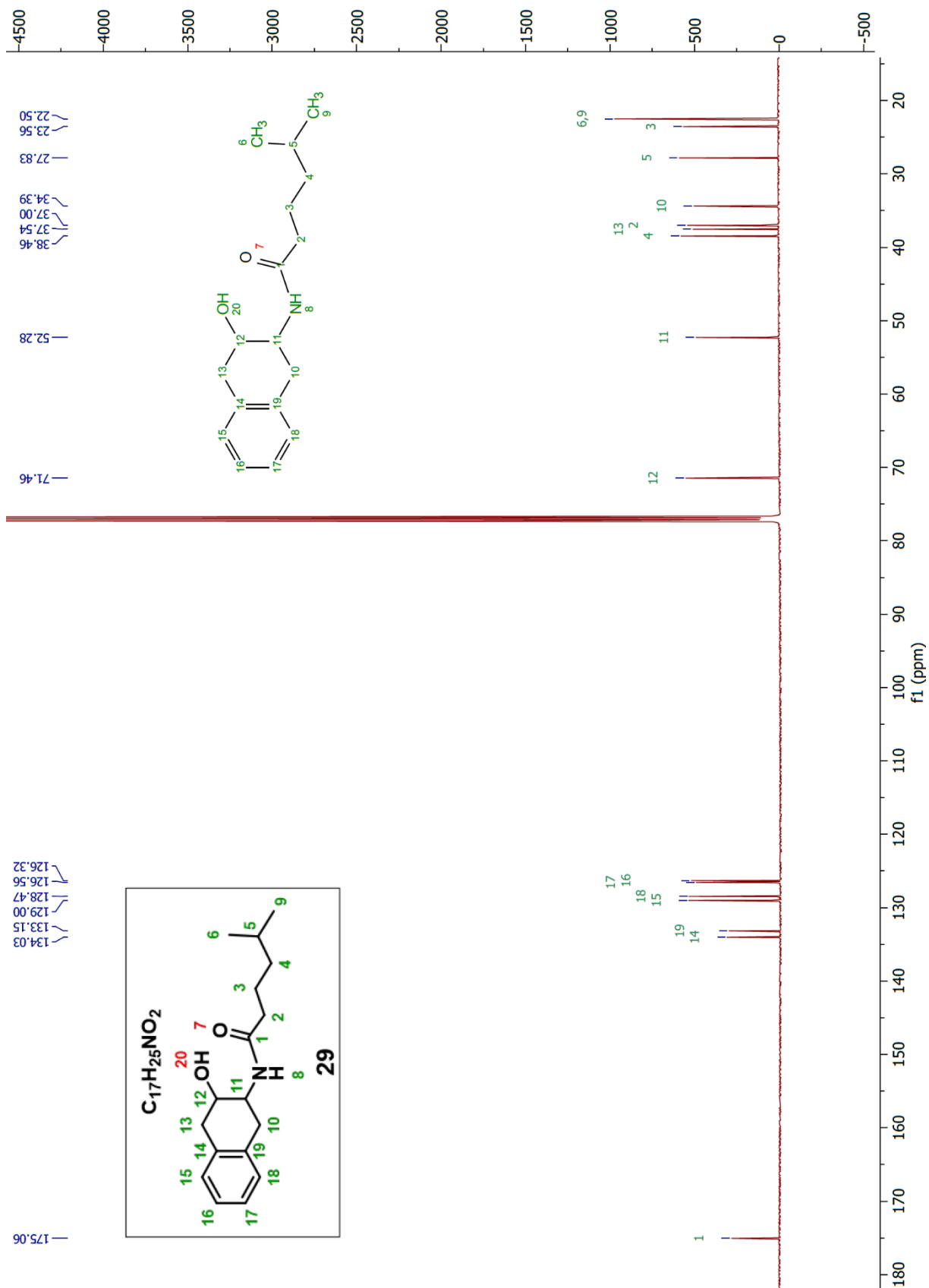


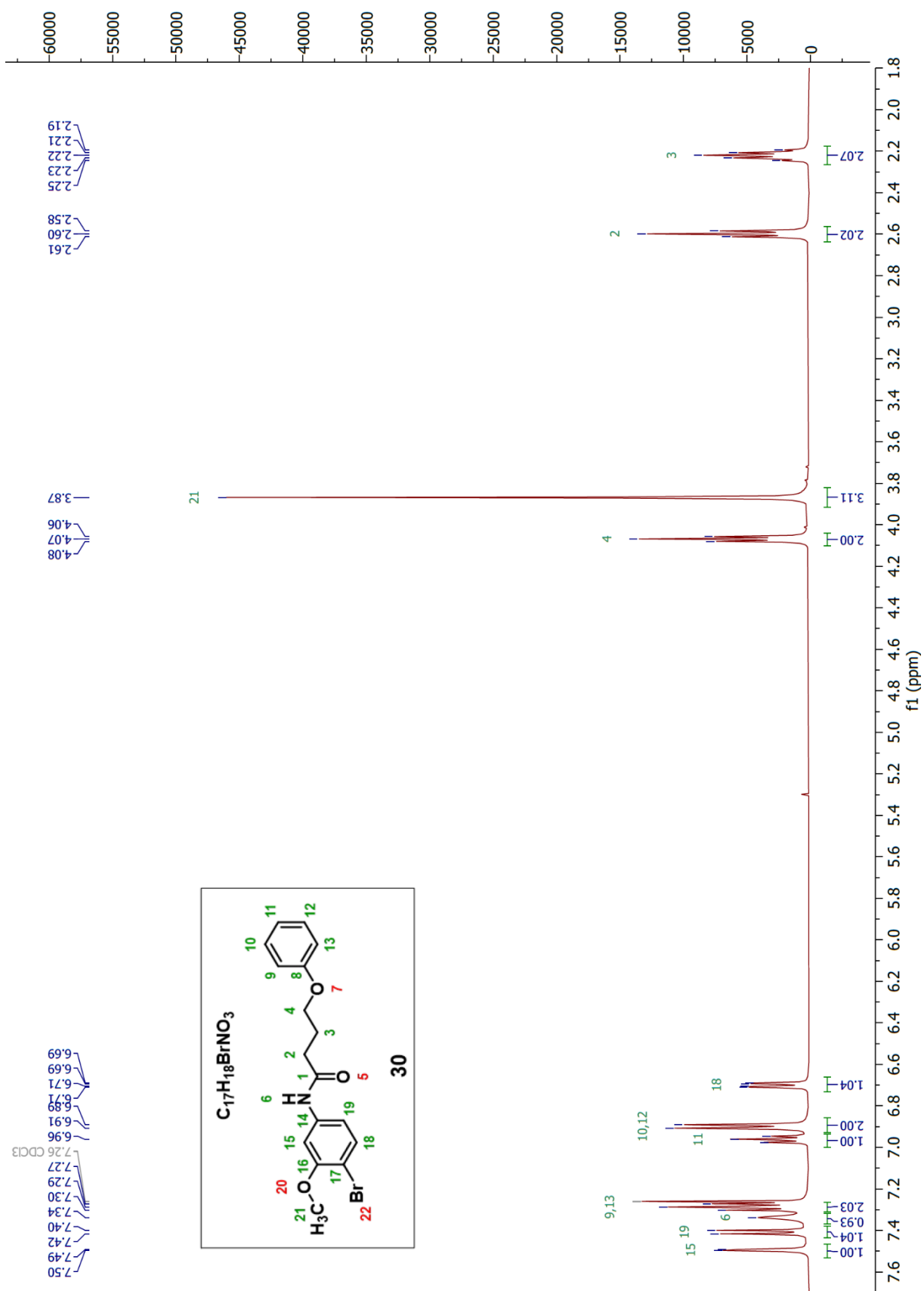


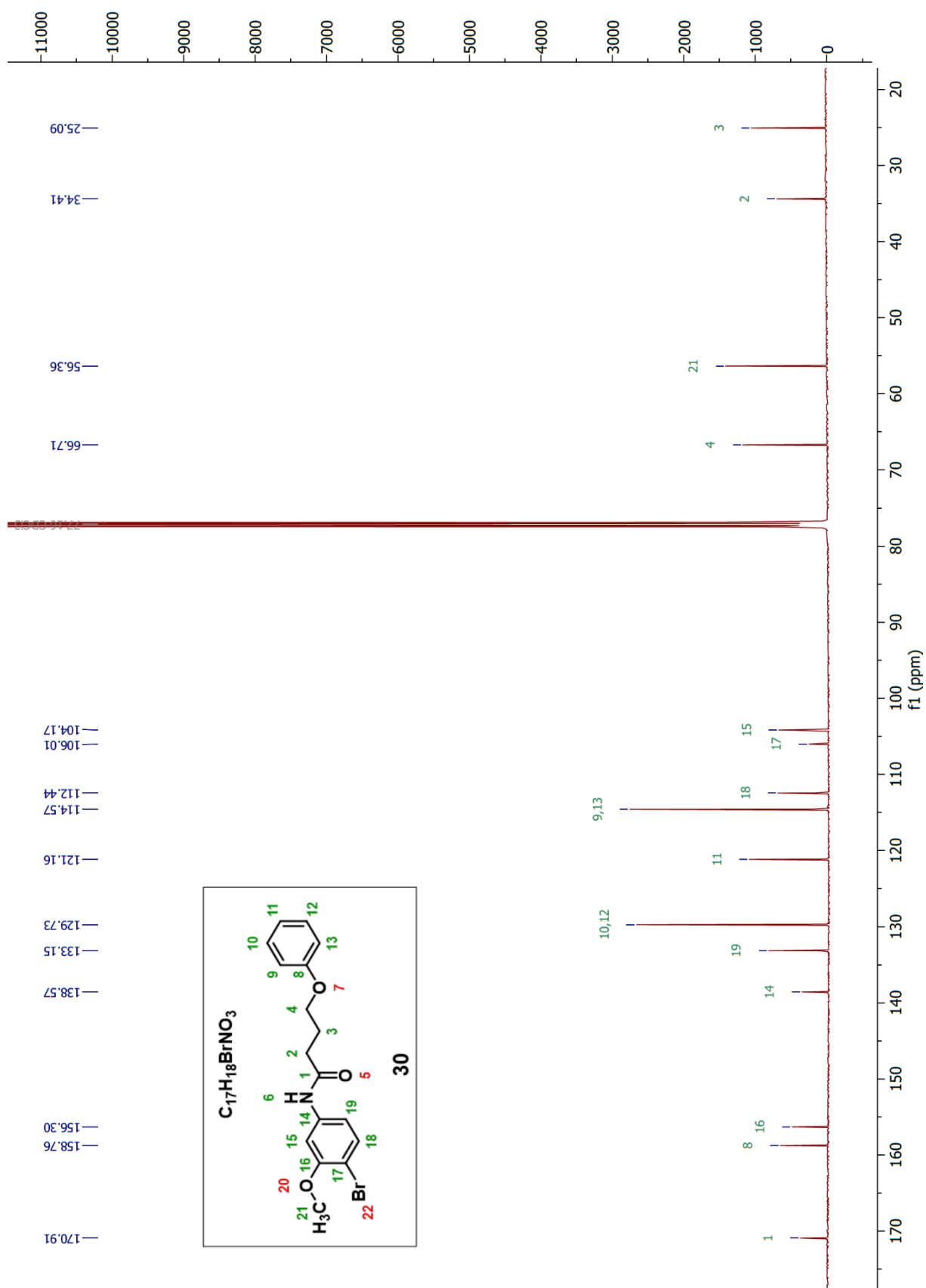


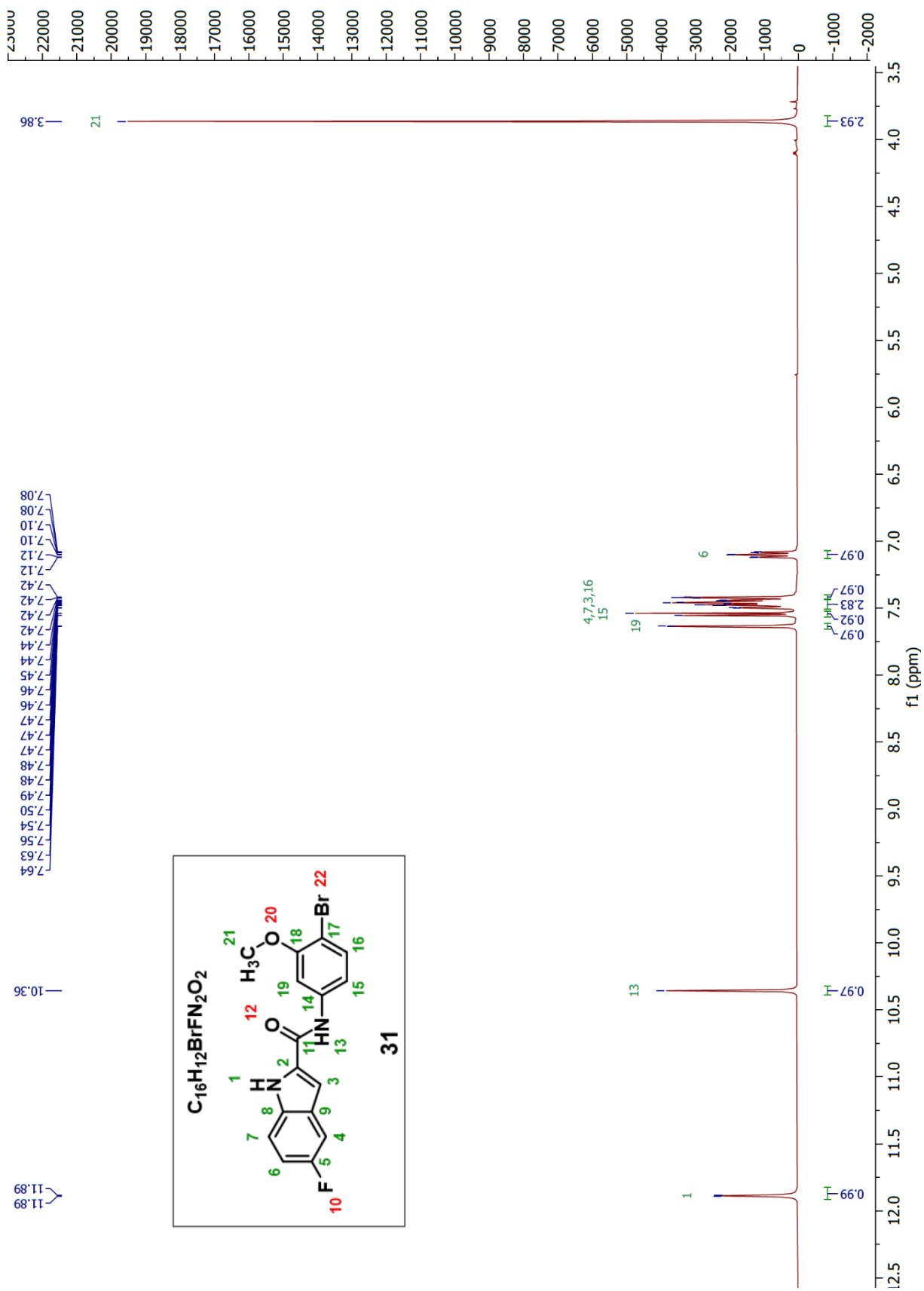


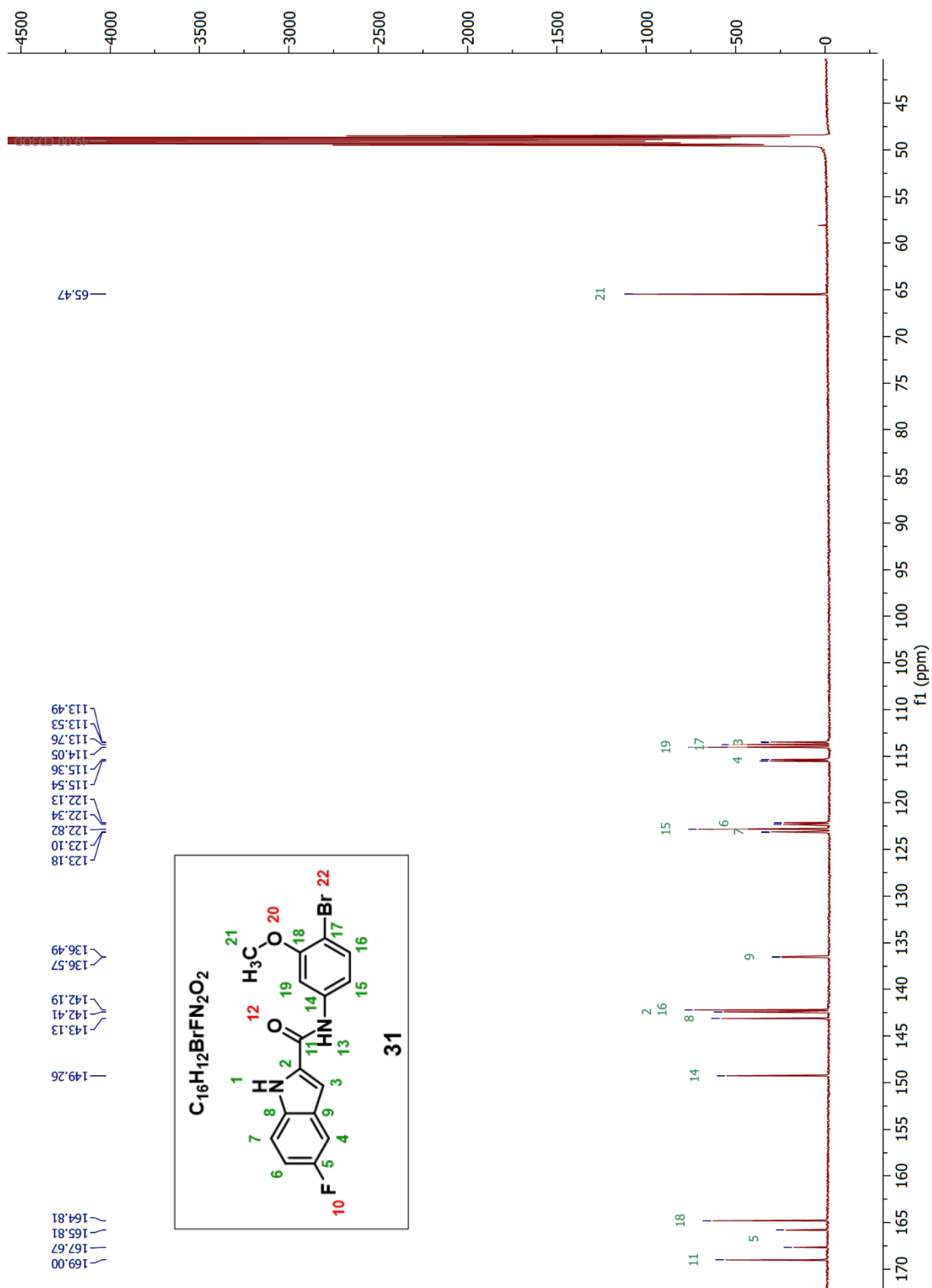


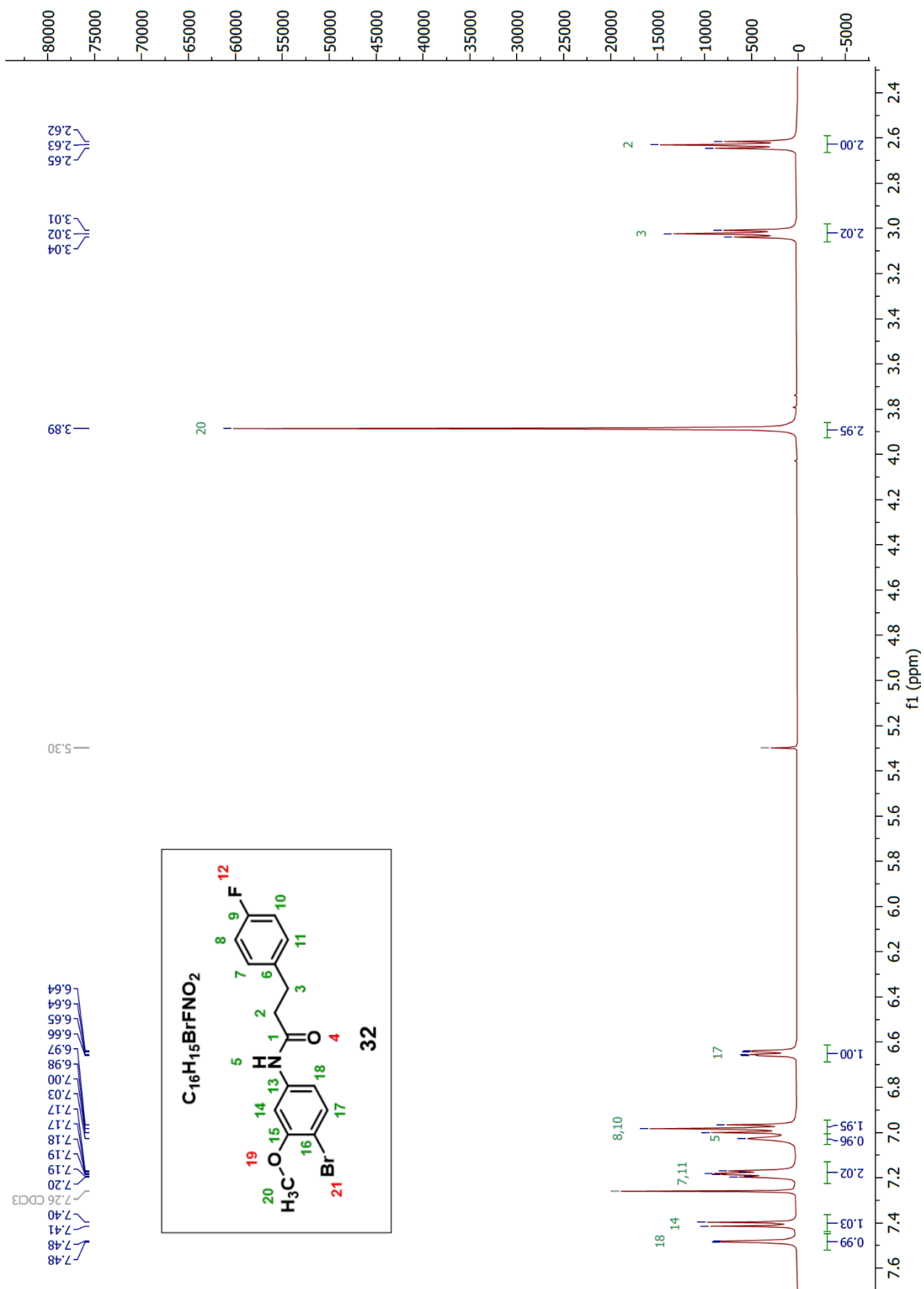


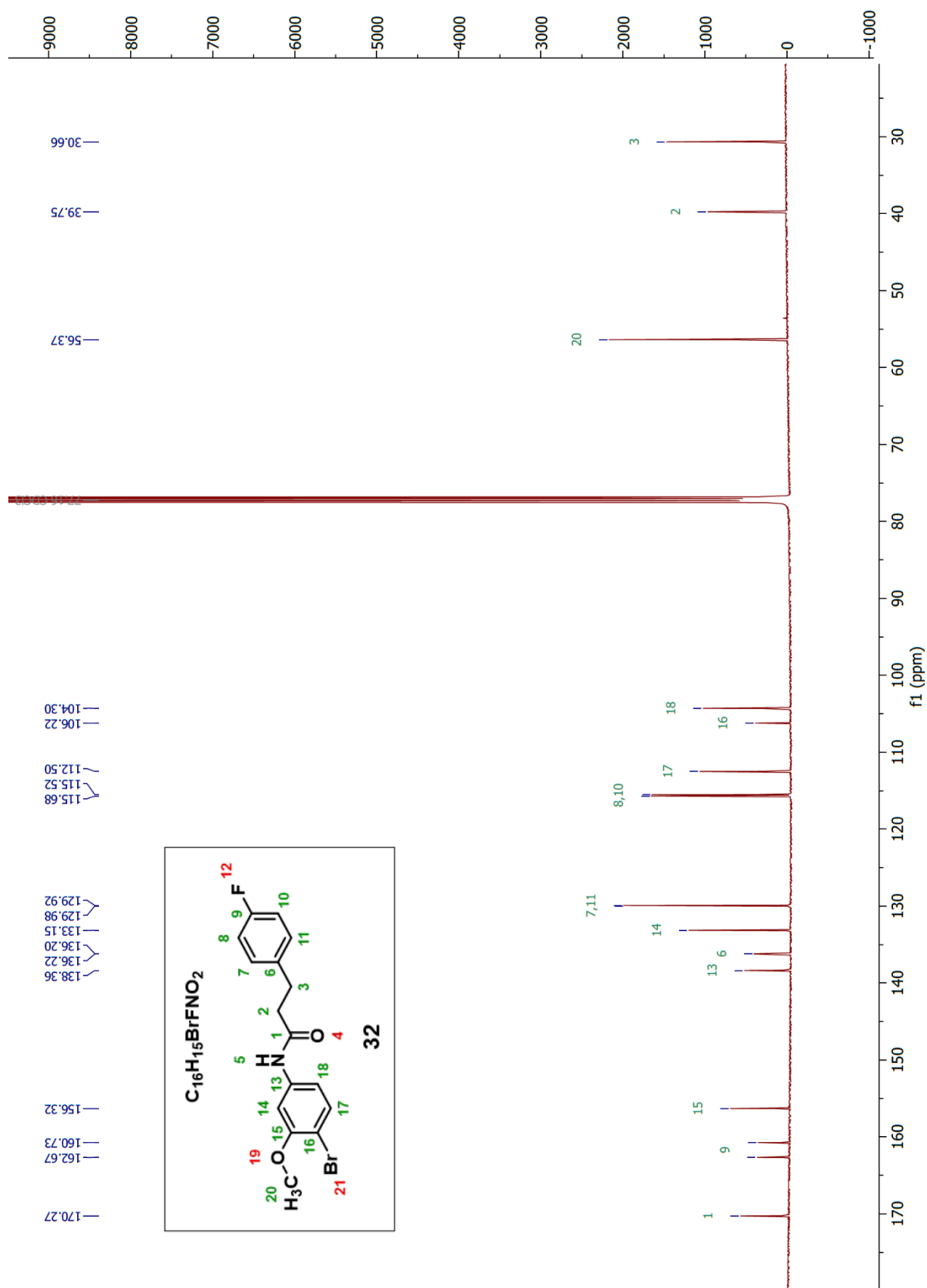












De nouveaux inhibiteurs de l'enzyme IspD comme solution contre *Bacillus anthracis*

Résumé

Les récentes épidémies (Zika, Ebola et Covid-19) ont montré notre vulnérabilité face aux maladies infectieuses. Dans ce contexte, l'emploi d'agents pathogènes (virus, bactéries et toxines) comme arme biologique est un fait inquiétant. L'un des agents les plus dangereux est la bactérie *Bacillus anthracis* qui est responsable de la maladie du charbon (anthrax). Des antibiotiques sont encore actifs sur ce microorganisme mais l'émergence de souches résistantes nécessite le développement d'antibiotiques avec de nouveaux modes d'actions. Les isoprénoïdes, essentiels à la survie de tous organismes vivants, sont synthétisés à partir de deux voies de biosynthèse : la voie du mévalonate (MVA) et la voie du méthylérythritol phosphate (MEP). Cette dernière voie, absente chez l'Homme, mais présente chez la plupart des bactéries constitue donc une cible pour le développement de nouveaux antibiotiques. Afin de développer des inhibiteurs d'IspD, la troisième enzyme de la voie du MEP, une approche par fragment a été développée. Un criblage par résonance plasmonique de surface (SPR) a permis d'identifier 23 fragments ayant une affinité pour IspD de *Bacillus anthracis* de l'ordre du micromolaire. Parmi ces fragments, 4 ont été sélectionnés à l'aide de différentes techniques telles que la RMN STD, le docking et les tests enzymatiques. Finalement, l'évolution de ces 4 fragments a conduit à la synthèse de 18 molécules dont le potentiel d'inhibition reste à déterminer.

Mots clés : *Bacillus anthracis*, Voie du méthylérythritol phosphate, IspD, Approche par fragment, Résonance plasmonique de surface, Inhibition enzymatique.

Summary

Recent epidemics (Zika, Ebola and Covid-19) have shown our vulnerability to infectious diseases. In this context, the use of pathogens (viruses, bacteria and toxins) as biological weapons is a worrying fact. One of the most dangerous is the bacterium *Bacillus anthracis*, which is responsible for anthrax disease. Antibiotics are still active this microorganism but the emergence of resistant strains requires the development of antibiotics with new different modes of action. Isoprenoids, essential for the survival of all living organisms, are synthesized from two biosynthetic pathways: the mevalonate pathway (MVA) and the methylerythritol phosphate pathway (MEP). The latter, absent in humans but present in most bacteria, is therefore a target for the development of new antibiotics. In order to develop inhibitors of IspD, the third enzyme of the MEP pathway, a fragment based drug design approach has been developed. Surface plasmon resonance screening (SPR) identified 23 fragments with an affinity for *Bacillus anthracis* IspD in the micromolar range. Among these fragments, 4 were selected using different techniques such as STD NMR, docking and enzymatic assays. Finally, the evolution of these 4 fragments led to the synthesis of 18 molecules whose inhibition potential remains to be determined.

Keywords : *Bacillus anthracis*, Methylerythritol phosphate pathway, IspD, Fragment-based lead discovery, Surface plasmon resonance, Enzyme inhibition.