



FUNDP

Faculté des Sciences

Département de Chimie

Conception, synthèse et étude d'inhibiteurs de la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO), une cible prometteuse pour le traitement du cancer

Dissertation présentée par

Moineaux Laurence

en vue de l'obtention du grade

de Docteur en Sciences

Composition du jury:

Prof. S. Lanners (Président du jury, FUNDP, Namur)

Prof. J. Wouters (Promoteur, FUNDP, Namur)

Prof. M. Galleni (ULg, Liège)

Prof. B. Masereel (FUNDP, Namur)

Dr. R. Frédérick (FUNDP, Namur)

© Presses universitaires de Namur & Moineaux Laurence
Rempart de la Vierge, 13
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre, hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner, est strictement interdite pour tous
pays.

Imprimé en Belgique
ISBN : 978-2-87037 - 791 - 8
Dépôt légal: D / 2013 / 1881 / 18

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

Faculté des Sciences

Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgique

Conception, synthèse et étude d'inhibiteurs de la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO), une cible prometteuse pour le traitement du cancer

Par Laurence Moineaux

Résumé

L'immunothérapie est une stratégie qui vise à stimuler le système immunitaire afin qu'il reconnaisse et détruise les cellules tumorales. Pourtant, *in vivo*, les cellules cancéreuses sont capables de développer des mécanismes permettant aux tumeurs de résister et d'échapper au système immunitaire. Parmi ceux-ci, deux enzymes représentent les acteurs essentiels : l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO). Ces enzymes catalysent la dégradation d'un acide aminé essentiel, le L-tryptophane (L-trp) en N-formyl-L-kynurénine pour former ensuite différentes molécules physiologiquement actives. Ceci résulte en une diminution locale en L-trp qui affecte de manière importante la prolifération des lymphocytes T. L'activité d'IDO et de TDO est donc particulièrement immunosuppressive ce qui en fait des cibles thérapeutiques de choix pour le traitement du cancer. Dans ce travail, nous nous intéresserons à TDO dont il existe, à ce jour, un seul inhibiteur de référence, le fluoroindole 680C91. Néanmoins, *in vivo*, celui-ci présente une faible biodisponibilité orale. Dès lors le but de cette thèse est de concevoir de nouveaux inhibiteurs spécifiques de TDO et de caractériser leur mode d'interaction avec l'enzyme en utilisant une approche théorique et expérimentale.

Une fois les composés synthétisés, un test cellulaire global a permis d'identifier les inhibiteurs prometteurs. La première série d'inhibiteurs a permis une étude plus fondamentale avec la caractérisation de trois isomères chlorés à savoir: 5 ; 6 ; 7-chloro-3-(2-pyridin-3-ylvinyle)-1H-indole afin de mieux comprendre l'influence de la position d'un halogène sur les propriétés structurales et physico-chimiques. Cette dernière a mis en évidence le packing cristallin et les interactions intermoléculaires entre les différentes molécules de la maille. D'autre part, une étude des propriétés électroniques a mis en évidence le moment dipolaire ainsi que le potentiel électrostatique. Enfin, l'étude du modèle d'inhibition a été corrélée avec les résultats biologiques, l'IC₅₀ sur *h*TDO. La seconde série d'inhibiteurs comporte deux dérivés acides en série vinyl-1H-indoles. La caractérisation *in vitro* de ces molécules a montré qu'ils ne sont pas substrats et de déterminer leur K_i sur l'enzyme *h*TDO et l'IC₅₀ de ces molécules sur cellules. Deuxièmement, la caractérisation structurale et physico-chimique a fourni différentes propriétés, à savoir, le pK_a, la solubilité, la sélectivité et la stabilité. Enfin, les essais de cristallogénèse ont été réalisés en présence d'enzyme (*rm*TDO) purifiée et active seule ou en complexe avec l'inhibiteur de manière à mieux comprendre les interactions au sein du site actif. L'ensemble de ces études ont permis de mettre en évidence la molécule la plus prometteuse du point de vue inhibition mais également du point de vue pharmaceutique. Cette dernière a pu être étudiée *in vivo* chez la souris et s'avère prometteuse.

Dissertation doctorale en Sciences Chimiques

30 Janvier 2013

Laboratoire de Chimie Biologique Structurale (Prof. Johan Wouters)

Promoteur : Prof. Johan Wouters

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

Faculté des Sciences

Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgique

Design, synthesis and study of inhibitors of tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), a promising target for cancer therapy

By Laurence Moineaux

Abstract

An immune system, enhanced by the immunotherapy, is able to recognize and destroy tumor cells. *In vivo*, cancer cells are able to develop mechanisms for tumors to resist and escape the immune system. Among these, two enzymes are the key players: indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO). These enzymes catalyze the breakdown of an essential amino acid, L-tryptophan (L-trp) in kynurenine, to form different physiologically active molecules. This results in a local decrease in L-trp, which is significantly affecting the proliferation of T lymphocytes. The activity of IDO and TDO is particularly immunosuppressive, justifying this choice of therapeutic targets for cancer therapy. In this work, we will focus on TDO, to date, the unique reference inhibitor, the fluoroindole 680C91. Nevertheless, *in vivo*, it has a poor oral bioavailability. Therefore, the aim of this thesis is to design new specific inhibitors of TDO and characterize their interactions with the enzyme using theoretical and experimental approaches.

Once the compounds synthesized, a global cellular assay has identified promising inhibitors. The first series has, throughout a fundamental study, led to the characterization of three chloride isomers namely: 5, 6, 7-chloro-3-(2-pyridin-3-ylvinyle)-1H-indole, resulting into a better understanding of the influence of the position of a halogen on the structural and physico-chemical properties. This study highlights the crystalline packing and intermolecular interactions between different molecules of the lattice. Moreover, a study of electronic properties exhibited the dipole moment and the electrostatic potential. Finally, the model study of inhibition was correlated with the biological results, the IC_{50} on *h*TDO. The second set of molecules has two acid derivatives of the vinyl-1H-indoles series. The characterization, *in vitro*, of these molecules has shown that they are not substrates of *h*TDO. It also permits to determine their K_i . Additionally, the IC_{50} of these molecules on cells was evaluated. Then, structural and physico-chemical characterization provided different properties, ie, pK_a , solubility, selectivity and stability. Finally, crystallographic assays were conducted in the presence of active and purified enzyme (*rm*TDO), alone or in complex with the inhibitor, in order to better understand the interactions within the active site. All these studies have highlighted the most promising molecules in terms of inhibition but also pharmaceutically. The latter has been studied *in vivo* with mices and shows promise.

Ph.D. thesis in Sciences

30 January 2013

Laboratoire de Chimie Biologique Structurale (Prof. Johan Wouters)

Advisor : Prof. Johan Wouters

Remerciements...

Au terme de ces quatre années passées au sein du laboratoire CBS, il me faut remercier certaines personnes pour leur précieux soutien et surtout le réconfort qu'elles ont su m'apporter, et sans lesquelles cette thèse de doctorat ne serait rien...

Premièrement, j'adresse ma gratitude au Professeur Johan Wouters pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir fait confiance et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse de doctorat. Je tiens aussi à le remercier pour ses conseils judicieux et l'attention qu'il m'a apportée lesquels m'ont permis d'acquérir de l'expérience et d'enrichir mes connaissances tout au long de ces quatre années.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers les Professeurs Lanners Steve, Galleni Moreno, Masereel Bernard ainsi qu'au Docteur Frédérick Raphaël pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Je remercie le Télévie-FNRS pour m'avoir donné la chance de pouvoir réaliser cette thèse et d'avoir financé les travaux de recherche.

Ce travail multidisciplinaire alliant biologie moléculaire, biochimie, chimie organique et chimie-physique n'aurait pu être réalisé sans l'aide précieuse de différents collaborateurs qui ont chacun apporté leur contribution et m'ont permis d'élargir mes connaissances et compétences scientifiques.

Je remercie les membres du Département de Pharmacie (Professeur Bernard Masereel) pour m'avoir accueillie chaleureusement ainsi que pour m'avoir permis d'utiliser leurs installations et matériels au cours de ces quatre années. Je remercie plus particulièrement Raphaël et Eddy qui m'ont encadré, formé et donné de leur temps précieux pour la réalisation des simulations docking et la synthèse des composés et bien d'autres conseils.

Je tiens à remercier vivement le Centre d'ingénierie des protéines (Professeur Moreno Galleni) pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire à plusieurs reprises et m'avoir fait profiter de son expérience en enzymologie. Merci aussi à Sophie et Frédéric pour leur aide.

Je remercie également les membres de l'institut Ludwig pour la recherche sur le cancer (Professeur Benoît Van den Eynde) pour leurs conseils et leur contribution à l'avancement de cette thèse. Un merci tout particulier à Pierre Larrieu pour la réalisation des tests cellulaires.

Je remercie également l'URBM et plus particulièrement Anne-Michèle, France, Fanélie et Isabelle pour leur disponibilité, leur bonne humeur et leurs conseils en biologie moléculaire.

Je tiens à remercier aussi Raphaël Herman du Laboratoire du Professeur Paulette Chalié pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir aidé à tenter de cristalliser ma protéine.

Je tiens à remercier également tous les membres du laboratoire CBS pour leur aide, leur soutien ainsi que pour leur bonne humeur tout au long de la réalisation de cette thèse. Merci à Bernadette pour son aide précieuse dans la résolution des structures cristallographiques ainsi que pour avoir partagé son bureau avec moi pendant les travaux. Merci à Caroline et Jenny pour m'avoir initiée à la surexpression et à la purification des protéines. Merci aussi à mes anciens (Pierre et Jérémie) et actuels collègues (Jean, Jérôme, Anaëlle, Céline, Kossay, Grégoire) de bureaux pour nos discussions scientifiques et amicales. Merci aussi à Pierre, Jérémie et Anaëlle pour les bons moments passés en congrès et autres activités...

Je tiens aussi à remercier ma mémorante, Noémie que j'ai eu la chance d'encadrer au cours de ma thèse. Merci pour la qualité du travail que tu as réalisé et pour les fous rires au labo...

Merci aux informaticiens Laurent et Frédéric pour leur aide et leurs conseils.

Des amitiés sont nées aussi sur les bancs des cours de chimie et au kot... Merci à Aurélie, Julie, Marie, Huyen Tran, Adèle, Caro, Timi, Emeric, Audrey, Aline, Steph, Marie B. et Cath... et tous ceux que j'aurais oubliés, Merci aussi.

Merci pour votre soutien indéfectible, vos petits mots échangés dans l'auditoire qui sont maintenant des mails☺, votre humour et les nombreux moments très agréables qu'on a passés et qu'on passera encore ensemble...

Merci à ma famille et en particulier, à mes parents. Vous m'avez permis d'entreprendre ces études et vous avez toujours cru en moi. Merci pour m'avoir épaulé et remonté le moral tout au long de mes études. Une petite pensée aussi à mon Parrain qui aurait été content de voir l'aboutissement de ce travail.

Enfin mes dernières pensées vont à Arnaud, ma moitié qui m'a toujours encouragée, réconfortée, motivée tout au long de ma thèse et notre petit Nathan qui a été à mes côtés (au propre comme au figuré☺) tout au long de la rédaction de cette thèse.

Merci à tous !

Abréviations

1-MT: 1-méthyl-L-tryptophane

5-HT: 5-hydroxy-tryptamine

ADN : acide désoxyribonucléique

ALAP: *alkaline phosphatase*

ALAT: *alanine aminotransferase*

APS: *ammonium persulfate*

ARN : acide ribonucléique

ASAT: *aspartate aminotransferase*

CD 8: cluster de différenciation 8

CIP: centre d'ingénierie des protéines

CSD: *cambridge structural database*

C-term : derniers acides aminés de la séquence protéique

CTL: *cytotoxic T Lymphocytes*

DA: dopamine

DBA/2: *dilute brown non-Agouti/2*

DIBAL: hydrure de diisobutyle aluminium

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DO: densité optique

DRX : diffraction de rayons X

DTT: dithiothréitol

E.coli : *Escherichia coli*

ECL: électro-chimiluminescence

EDTA: acide éthylène diamine tétra-acétique

ENDOR: *electron-nuclear double resonance*

FPLC: *fast protein liquid chromatography*

FT: *flow through*

GOLD: *genetic optimization for ligand docking*

His-tag: *hexa-histidine-tag*

HLA: *human leucocyte antigen*

HPLC: *high pressure liquid chromatography*

HRP: *horseradish peroxidase*

*h*TDO : tryptophane 2,3-dioxygénase humaine

IC₅₀: *half minimal inhibitory concentration*

IDO: indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN- γ : interféron- γ

IMAC: *immobilized metal affinity chromatography*

IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

K_a : constante d'acidité

Kan: kanamycine

kDa: kilodalton

K_i : constante d'inhibition

K_m : constante de Michaelis-Menten

LB: *lysogeny broth*

LB-Agar: *lysogeny broth-agar*

LC-MS: *liquid chromatography – mass spectroscopy*

LD₅₀: *lethal dose, 50 %*

LDA : diisopropylamidure de lithium

LICR : *ludwig insitut for cancer research*

L-Trp: L-tryptophane

MAGE: *melanoma antigen gene*

MAO: monoamine oxydase

MES : *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*

MM: masse molaire

MPD: 2-méthyl-2,4-pentanediol

NAD: nicotinamide adénine dinucléotide

NAMEDIC: namur medicinal chemistry

NE: norépinéphrine

NMP: N-méthyl-2-pyrrolidone

N-term : premiers acides aminés de la séquence protéique

O/N: *overnight*

OMS : organisation mondiale de la santé

Ori: origine de répllication de l'ADN

ORTEP: *oak ridge thermal-ellipsoid plot program*

PBS: *phosphate buffered saline*

PDB: *protein data bank*

p-DMAB: para-diméthylaminobenzaldéhyde

PEG 4000: polyéthylène glycol 4000

PEG: polyéthylène glycol

PEM : potentiel électrostatique moléculaire

PVDF : polyfluorure de vinylidène

TCR : *T cell receptor*

RMN: résonance magnétique nucléaire

rmTDO: tryptophane 2,3-dioxygénase de *Ralstonia metallidurans*

rpm: rotation par minute

RT-PCR: *real time polymerase chain reaction*

SCLC: *Small cell lung cancer*

SDS: *sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TB: *terrific broth*

TBS-T: *tris-buffered saline and tween 20*

TCA: acide trichloroacétique

TDO: tryptophane 2,3-dioxygénase

TEMED: *tetramethylethylenediamine*

THF: tétrahydrofurane

TMS : tétraméthylsilane

TMSCHN₂: triméthylsilyldiazométhane

U.A.: unité asymétrique

UV: ultra-violet

xcTDO: tryptophane 2,3-dioxygénase de *Xanthomonas campestris*

γ-GT: *γ-glutamyltransferase*

Chapitre 1. Introduction	1
1. Le cancer	3
1.1 <u>Introduction</u>	3
1.2 <u>Situation actuelle du cancer dans le monde</u>	4
1.3 <u>Traitements actuels</u>	6
1.4 <u>Une nouvelle stratégie thérapeutique: l'immunothérapie</u>	7
2. Métabolisme du tryptophane dans la voie de la kynurénine	14
3. Découverte de la tryptophane 2,3-dioxygénase et de l'indoleamine 2,3-dioxygénase	16
4. Structure et caractérisation de la tryptophane 2,3-dioxygénase	18
4.1 <u>Groupe prosthétique hème</u>	18
4.2 <u>Structure cristallographique de TDO</u>	19
4.2.1 <i>Caractérisation du site actif</i>	23
4.2.2 <i>Comparaison avec IDO</i>	24
4.3. <u>Complexe ternaire de TDO avec O₂ et le L-Trp</u>	25
5. Mécanisme catalytique des dioxygénases	26
5.1 <u>Introduction</u>	26
5.2 <u>Activation de l'oxygène via l'ion métallique</u>	27
5.3 <u>Mécanisme moléculaire</u>	29
6. Inhibition de TDO	33
Chapitre 2. Objectifs et stratégie	39
Chapitre 3. Résultats	45
1. Synthèses des composés indoliques	47
2. Activité biologique	58
2.1 <u>Relations structures-activités</u>	59

2.2	<u>Enzymologie</u>	66
2.2.1	<i>Evaluation des molécules synthétisées en tant que substrat</i>	68
2.2.2	<i>Détermination du K_i et de l'IC_{50} des molécules potentiellement inhibitrices sur hTDO</i>	68
2.3	<u>Propriétés physico-chimiques</u>	71
2.3.1	<i>Etude des pK_a</i>	71
2.3.2	<i>Etude de la solubilité</i>	76
2.3.3	<i>Etude de la stabilité</i>	79
2.4	<u>Evaluation de la sélectivité IDO/TDO</u>	81
3.	Etudes des interactions entre les inhibiteurs et l'enzyme TDO	82
3.1	<u>Cristallogénèse de rmTDO</u>	82
3.1.1	<i>Surexpression et purification de TDO de Ralstonia metallidurans (rmTDO)</i>	82
a)	<u><i>Surexpression de l'enzyme rmTDO</i></u>	82
b)	<u><i>Purification de l'enzyme rmTDO</i></u>	83
c)	<u><i>Electrophorèse sur gel SDS-PAGE</i></u>	84
d)	<u><i>Chromatographie d'exclusion de taille</i></u>	86
3.1.2	<i>Caractérisation de l'enzyme</i>	88
a)	<u><i>Détermination de la concentration de l'enzyme</i></u>	88
b)	<u><i>Activité enzymatique de rmTDO</i></u>	89
c)	<u><i>Détermination du K_m</i></u>	90
d)	<u><i>Etude de stabilité de l'enzyme</i></u>	92
e)	<u><i>Essais de cristallogénèse sur rmTDO en présence d'inhibiteur</i></u>	94
3.2	<u>Cristallographie des inhibiteurs</u>	96
a)	<u><i>Cristallographie des trois isomères chlorés</i></u>	97
b)	<u><i>Composé 58</i></u>	102
c)	<u><i>Composé 61</i></u>	105
3.3	<u>Modèle d'inhibition: docking</u>	108
4.	Evaluation <i>in vivo</i>	113
4.1	<u>Etude de biodisponibilité</u>	113

4.2 <u>Evaluation de la sélectivité du composé 58</u>	114
4.3 <u>Etude <i>in vivo</i> du composé 58</u>	117
4.4 <u>Toxicité <i>in vivo</i> du composé 58</u>	120
Chapitre 4. Conclusions et perspectives	123
Chapitre 5. Section expérimentale	141
1. Chimie	143
1.1 <u>Techniques analytiques</u>	143
a) <u>Résonance magnétique nucléaire (RMN)</u>	143
b) <u>Synthèse au micro-ondes</u>	143
c) <u>Analyses élémentaires</u>	143
d) <u>Analyses LC-MS</u>	143
e) <u>Les points de fusion</u>	144
f) <u>Chromatographies sur couche mince</u>	144
1.2 <u>Technique de purification</u>	144
<u>Chromatographie</u>	144
1.3 <u>Solvants et réactifs</u>	144
1.4 <u>Procédure générale de synthèse</u>	144
1.5 <u>Synthèses des composés indoliques</u>	146
2. Activité biologique	149
2.1 <u>Test cellulaire</u>	149
2.2 <u>Test de toxicité</u>	149
2.3 <u>Détermination de la solubilité des composés indoliques</u>	150
2.4 <u>Test colorimétrique discontinu</u>	151
2.5 <u>Détermination des pK_a par spectroscopie UV-visible</u>	154
2.6 <u>Détermination de la stabilité</u>	154
3. Etudes des interactions entre les inhibiteurs et l'enzyme TDO	154
3.1 <u>Production de l'enzyme <i>rmTDO</i></u>	154

3.1.1 Surexpression de l'enzyme rmTDO	155
3.1.2 Purification de l'enzyme rmTDO	156
3.1.3 Western Blot de l'enzyme rmTDO	158
a) <u>Blocage</u>	158
b) <u>Anticorps primaire</u>	159
c) <u>Anticorps secondaire</u>	159
d) <u>Détection</u>	159
3.1.4 Caractérisation de l'enzyme rmTDO	160
3.1.5 Essais de cristallogenèse sur l'enzyme rmTDO	161
3.2 <u>Cristallographie des inhibiteurs</u>	164
a) <u>Composé 22</u>	165
b) <u>Composé 31</u>	165
c) <u>Composé 38</u>	166
d) <u>Composé 58</u>	166
e) <u>Composé 61</u>	167
3.3 <u>Modèle d'inhibition: docking</u>	167
4. Evaluation <i>in vivo</i>	168
Chapitre 6. Bibliographies	169
Annexes	189

INTRODUCTION

I. Introduction

1. Le cancer

1.1 Introduction

Le développement d'un cancer est un processus en plusieurs étapes. En effet, ce sont principalement des altérations génétiques qui vont progressivement transformer certaines cellules de l'organisme et leur procurer un comportement anormal. Il y a trois catégories de gènes associés aux pathologies cancéreuses :

- Un **oncogène** est une version altérée d'un gène (proto-oncogène) qui est normalement impliqué dans la prolifération ou la croissance cellulaire. Les oncogènes agissent d'une façon dominante (une seule copie est nécessaire à leur activité) et affranchissent la cellule de contraintes qui régulent sa prolifération. De concert, avec des gènes suppresseurs de tumeurs, ils participent à la transformation maligne des cellules.
- Les **gènes suppresseurs de tumeurs** désignent les gènes dont l'absence favorise l'oncogenèse et dont le remplacement dans les cellules tumorales permet de diminuer le phénotype malin de la cellule. Ils sont généralement impliqués dans l'apoptose, la réparation des lésions de l'ADN, le cycle cellulaire, la différenciation, etc.
- Les **gènes liés aux systèmes de réparation** permettent la détection des dommages causés à l'ADN, engendrent l'élimination de ceux-ci et restituent fidèlement l'information génétique. Lorsque ces systèmes sont déficients ou saturés, des mécanismes de tolérance du dommage permettent à la réplication de se faire malgré la présence de dommages (Degen A., 2008 ; Michiels C., 2007).

Il est généralement admis que le processus de transformation maligne nécessite plusieurs mutations indépendantes dans des gènes clés. Au cours de la vie, le génome accumule des mutations qui activent les proto-oncogènes et inactivent les gènes suppresseurs de tumeurs. Comme le taux de mutations spontanées est trop faible pour expliquer le développement d'un cancer au cours d'une vie, il a été suggéré qu'une étape précoce dans le développement d'une tumeur était l'apparition d'un phénotype mutateur au niveau d'une cellule. Celui-ci provient de l'instabilité génétique continuellement

alimentée par les nombreuses attaques endogènes et exogènes que subit l'ADN et par les erreurs introduites par la machinerie de réplication de l'ADN. Par l'acquisition de ces altérations génétiques, les cellules deviennent progressivement tumorales ce qui leur procure des nouvelles propriétés. Ces différentes propriétés acquises par les cellules tumorales, résumées à la figure I.1, vont permettre la tumorigenèse : indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération, insensibilité aux signaux antiprolifératifs, acquisition d'une résistance à l'apoptose, potentiel illimité de réplication, stimulation de l'angiogenèse, pouvoir d'invasion et de dissémination (métastases), instabilité génomique (Lacave R., 2005).

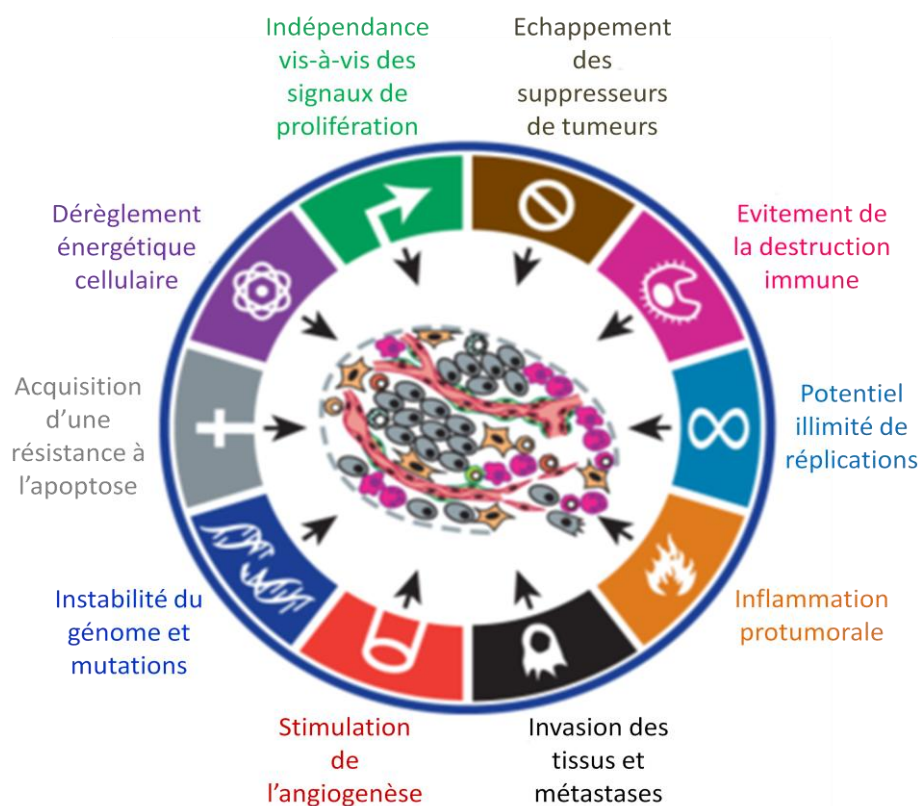


Figure I.1: Représentation des principales propriétés moléculaires acquises par la cellule tumorale (adapté de Hanahan D., 2011)

1.2 Situation actuelle du cancer dans le monde

Les cas de cancer sont une cause majeure de décès dans le monde (Figure I.2), à l'origine de 7.6 millions de décès en 2008, soit environ 13 % de la mortalité mondiale. En 2008, 56 % des 12.7 millions de nouveaux cas de cancer et 63 % des 7.6 millions de décès associés à un cancer dans le monde sont survenus dans les pays en développement selon une étude basée sur 27 formes de cancer. Il existe différents facteurs de risque :

l'environnement tel que le rayonnement ultra-violet, les radiations ionisantes et de nombreux agents génotoxiques, naturels ou de synthèse, ainsi que certains médicaments, une alimentation déséquilibrée et la sédentarité.

Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde sont ceux du poumon (12.7 %), du sein (10.9 %) et le cancer colorectal (9.7 %). Les décès recensés le plus souvent font suite au cancer du poumon (18.2 %), de l'estomac (9.7 %) et le cancer du foie (9.2 %). Les régions en développement sont plus souvent touchées par les cancers du col utérin et du foie tandis que ceux de la prostate et du côlon-rectum sont plus localisés dans les régions développées. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le nombre de décès par cancer devrait poursuivre sa progression et dépasser 11 millions de personnes par an en 2030 (Ferlay J., 2006 ; Ferlay J., 2010). En 2010, sur une population totale de 10.712.066 personnes en Belgique, le cancer est la deuxième cause de mortalité avec 26 % derrière les maladies cardiovasculaires avec 35 % (<http://www.who.int/nmh/countries/en/>, 2011).

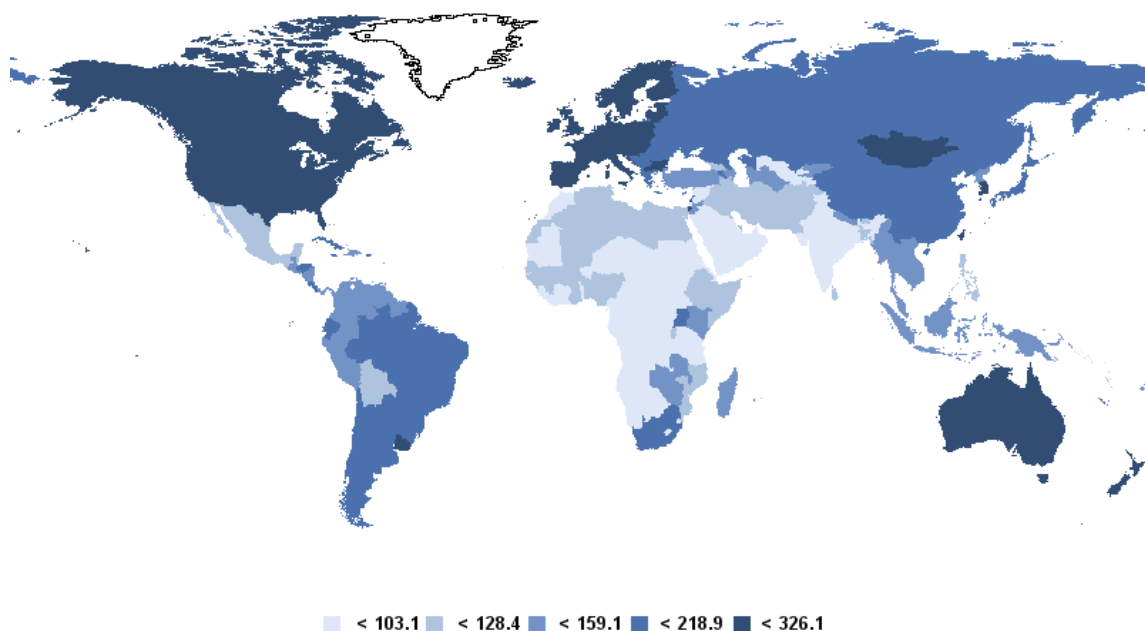


Figure I.2 : Estimation du taux de mortalité (par 100.000 habitants) dans le monde reprenant tous les cancers excepté le cancer de la peau de type non-mélanome (pour les deux sexes et tous les âges) (Ferlay J., 2010).

1.3 Traitements actuels

Une fois le diagnostic du cancer posé, l'état du patient peut nécessiter un traitement médical et des soins spécialisés pendant des mois. La chirurgie reste le traitement de première intention pour guérir de nombreux cancers (Feig B.W., 1998 ; Vetto J., 1999). Cependant, il est quelquefois impossible de réaliser une résection curative ou bien d'améliorer le pronostic au moyen d'une résection. Pour combler ces déficiences, des thérapies adjuvantes associant la chimiothérapie et la radiothérapie ont été mises au point. Cette dernière est définie comme l'utilisation de radiations ionisantes sur une pathologie maligne à des fins thérapeutiques. Elle est utilisée chez plus de la moitié des patients ayant un cancer. Elle est, avec la chirurgie, le traitement le plus fréquent des cancers et peut entraîner une guérison à elle seule. Elle peut être utilisée seule ou associée à la chirurgie et à la chimiothérapie. Ses indications sont liées au type de tumeur, à sa localisation, à son stade et à l'état général du patient. Les séances sont de courte durée et les effets indésirables moindres que lors d'une chimiothérapie. Les effets indésirables proviennent essentiellement de la sensibilité intrinsèque du tissu normal inévitablement présent dans le champ de traitement. Les membranes muqueuses deviennent œdémateuses et douloureuses, et, dans certains cas extrêmes, la réaction cutanée aboutit à une ulcération. L'irradiation abdominale entraîne une entérite et des diarrhées. Faiblesse générale et vomissements constituent les effets indésirables aigus de la radiothérapie (Price P., 2000).

Dans les tumeurs plus avancées, la radiothérapie est souvent couplée à la chimiothérapie. La majorité des substances chimiothérapeutiques fonctionnent par arrêt de la mitose en ciblant efficacement les cellules se divisant rapidement. La plupart des antinéoplasiques utilisés aujourd'hui ne sont pas des médicaments récents ni à effet spécifique sur les cellules néoplasiques si bien qu'ils touchent également les cellules saines. Il n'existe pas une chimiothérapie efficace pour l'ensemble des tumeurs humaines de plus il existe une sensibilité variable au sein d'une même tumeur. Dans le cadre d'une chimiothérapie, deux types de résistance peuvent apparaître : la résistance naturelle et la résistance acquise.

Depuis des décennies, les cancers ont donc principalement été traités par chirurgie, radiothérapie combinée ou non à la chimiothérapie ainsi que d'autres traitements tels que la

thérapie génique, etc. Bien que ces traitements offrent des bénéfices importants et parfois même la guérison, de nombreuses rechutes sont recensées et sont pour la plupart le résultat d'une résistance aux médicaments de la part d'une partie des cellules tumorales. Une stratégie alternative serait d'utiliser le système immunitaire afin d'induire une réponse anti-tumorale puissante.

1.4 Une nouvelle stratégie thérapeutique: l'immunothérapie

Historiquement, le premier succès en immunothérapie pour traiter le cancer impliquait l'utilisation de toxines provenant de *Streptococcus erysipelatis* et *Bacillus prodigious* par William Coley en 1890 (Coley W.B., 1991). Plus récemment, le développement d'un vaccin dirigé contre le virus de l'hépatite B et le papillomavirus a contribué à réduire l'incidence du cancer du foie et du col de l'utérus respectivement (Blumberg B.S., 1997 ; Rogers L.J., 2008). Depuis, notre compréhension des mécanismes immunitaires de base a évolué, une large gamme de voies immunes ont été identifiées comme cibles attractives pour promouvoir une réponse anti-tumorale spécifique chez les patients atteints du cancer.

On sait aujourd'hui que beaucoup de cellules tumorales humaines portent à leur surface des antigènes qui peuvent être reconnus par les lymphocytes T, en particulier des lymphocytes T cytolytiques (CTL), qui expriment les molécules (CD8). Ces antigènes sont constitués d'un peptide, en général d'une dizaine d'acides aminés, issu de la dégradation intracellulaire d'une protéine cytoplasmique. Ce peptide antigénique doit passer du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique pour y être chargé dans une fente qui se trouve sur les molécules d'histocompatibilité (HLA) de la classe I. Ce complexe HLA-peptide migre vers la surface de la cellule où il peut être reconnu par les récepteurs d'un CTL spécifique de cet antigène. Le CTL activé suite à cette reconnaissance va lyser la cellule qui lui présente l'antigène (Borghaei H., 2009) (Figure I.3).

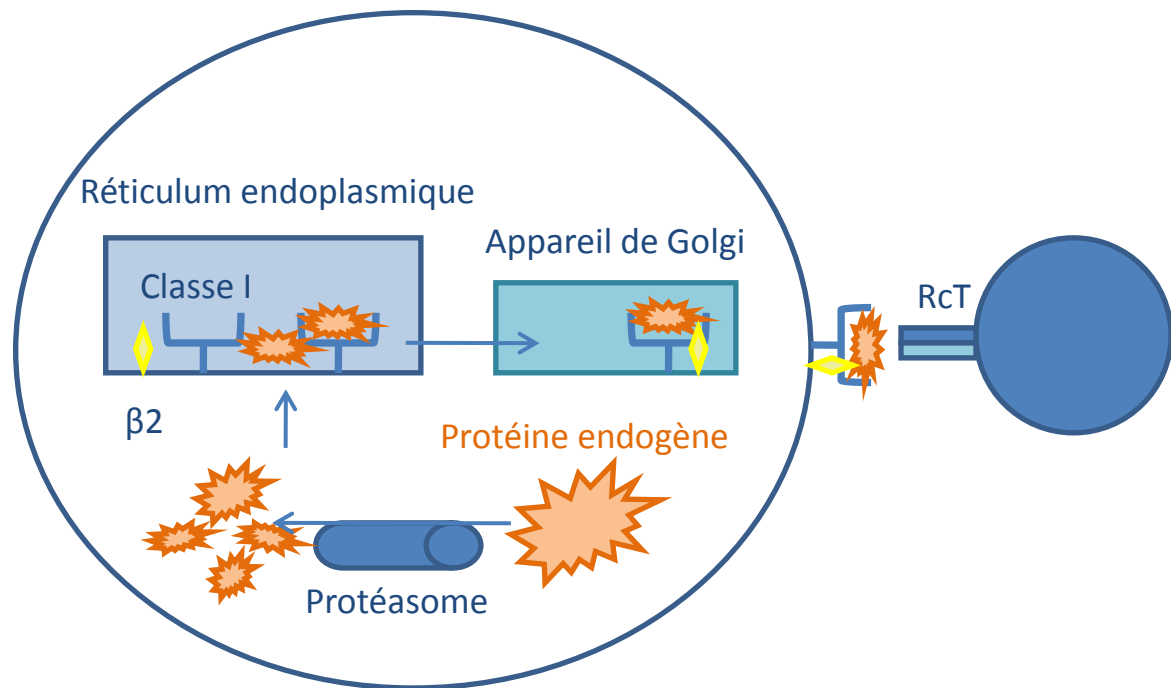


Figure I.3 : Présentation de l'antigène (Andrieu J-M., 1997). Pour être présentées au système immunitaire, les protéines endogènes doivent être hydrolysées en petits peptides à travers le protéasome. Ces peptides sont ensuite transportés par des mécanismes actifs dans le réticulum endoplasmique où ils s'associent aux molécules d'histocompatibilité de classe I (composées d'une chaîne lourde et d'une molécule de $\beta 2$ -microglobuline). Les molécules HLA de classe I migrent ensuite à la surface des cellules présentatrices d'antigènes où elles présentent le peptide aux lymphocytes T CD8.

Certains antigènes présentent un intérêt particulier dans le contexte du développement de vaccins anti-tumoraux : ils sont codés par des familles de gènes telles que MAGE (*melanoma antigen gene*) qui ne sont pas exprimés dans les tissus normaux. Les cellules de la lignée germinale mâle sont la seule exception documentée, mais elles ne portent pas de molécules HLA et ne peuvent donc pas présenter d'antigènes aux CTL (Rescigno M., 2007). Le caractère strictement spécifique des antigènes tumoraux codés par les gènes MAGE prévient tout effet indésirable sur les cellules normales. Par ailleurs, le fait qu'ils soient présents sur de nombreuses tumeurs permet d'appliquer le même vaccin à de nombreux patients, ce qui facilite les études et permet d'envisager un développement industriel.

Sur base de cela un programme clinique de vaccination anti-tumorale a été mis en place en Belgique et en Europe parmi lequel divers vaccins contenant des antigènes spécifiques

des tumeurs, en particulier des antigènes MAGE. Il s'agit de vaccins thérapeutiques, c'est-à-dire administrés après le début de la maladie. Le but de ces vaccinations est de stimuler le système immunitaire du patient, et plus particulièrement ses CTL, contre des antigènes tumoraux exprimés par la tumeur, en espérant que ces CTL activés par le vaccin détruisent les cellules tumorales sans altérer les tissus sains (Chomez P., 2001).

Suite à cette étude, on peut conclure que ces vaccins induisent des régressions tumorales chez seulement 5 à 20 % des malades vaccinés. Afin d'améliorer ces résultats cliniques, il est crucial de comprendre les mécanismes anti-tumoraux associés aux vaccinations de manière à comprendre les régressions tumorales complètes. Au vu des premiers résultats, il existe deux types de régression tumorale. Premièrement, les réponses mixtes aux vaccins, certaines métastases régressent alors que d'autres progressent irrémédiablement. Cela suggère que la régression tumorale peut varier non seulement d'un patient à l'autre mais également d'une métastase à l'autre chez un même patient. Deuxièmement, la régression tumorale est plus importante chez les patients qui sont à un stade métastatique peu avancé et donc cela sous entend que la résistance tumorale s'acquiert et s'accroît au fur et à mesure de la progression tumorale (Baurain J-F., 2008).

Il y a, *a priori*, beaucoup de raisons pour lesquelles des cellules cancéreuses pourraient éviter d'être détruites par les CTL. Par exemple, la perte d'expression de l'antigène par les cellules tumorales, la perte d'expression des molécules HLA ou d'autres molécules impliquées dans la présentation des antigènes, la résistance des cellules tumorales à l'apoptose ou encore la production de facteurs pouvant interférer avec la réponse immunitaire, tels que certaines cytokines aux propriétés immunosuppressives. Une piste envisagée serait le mécanisme de résistance tumorale basé sur le catabolisme local du tryptophane par les cellules cancéreuses. Le contrôle de ce catabolisme enzymatique pourrait être utilisé en association avec les vaccins pour accroître leur efficacité. Certaines de ces enzymes sont des dioxygénases : l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) qui sont essentielles à la dégradation du tryptophane. En diminuant localement le tryptophane présent dans le milieu extracellulaire, ces dioxygénases bloquent la prolifération des lymphocytes T (Uyttenhove C., 2003 ; Pilotte L., 2012). Les lymphocytes T sont en effet très sensibles au manque de tryptophane ce qui

provoque l'arrêt de leur cycle cellulaire (Figure I.4). Ces résultats suggèrent donc que l'efficacité des vaccinations anticancéreuses pourrait être améliorée en traitant simultanément les patients avec des inhibiteurs de ces enzymes (Prendergast G.C., 2007).

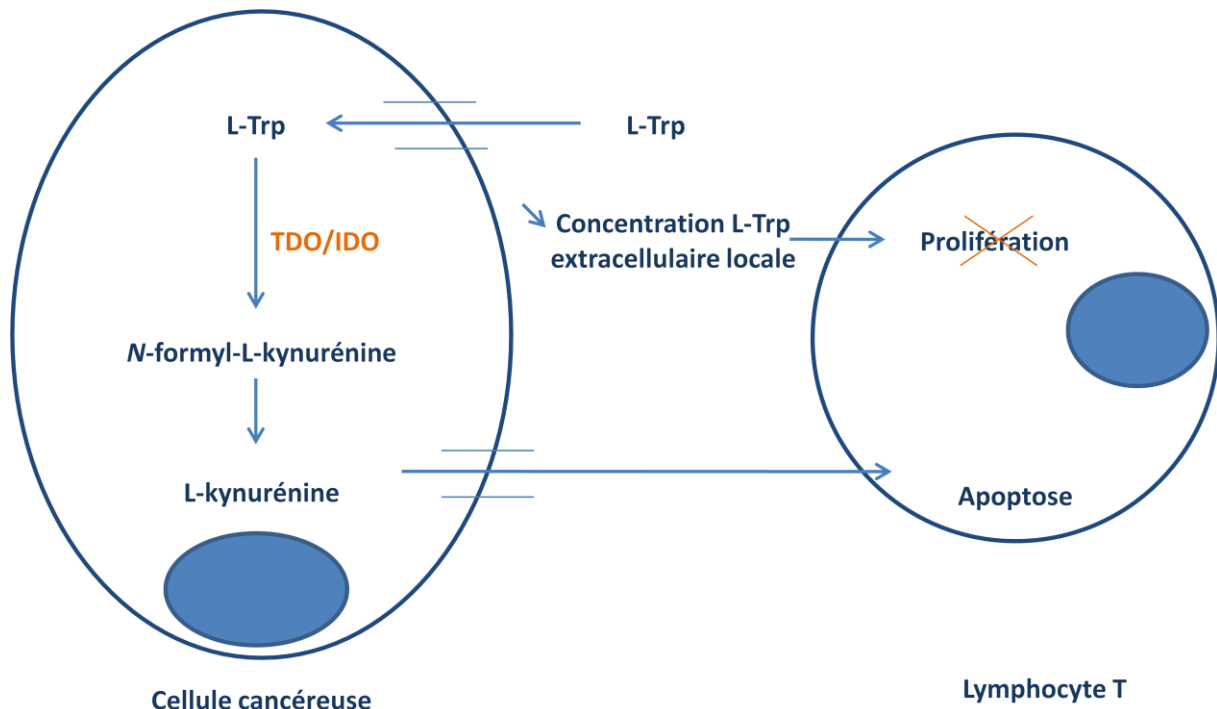


Figure I.4 : Mécanisme de l'immunosuppression par les enzymes TDO/IDO (adapté de Baurain J-F., 2008).

Certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron- γ (IFN- γ) induisent la production de l'enzyme IDO dans une grande variété de cellules (Wirleitner B., 2003). L'activation d'IDO limite alors la concentration locale en L-tryptophane (L-Trp). En effet, le L-Trp est requis pour la synthèse des protéines et le retrait de cet acide aminé essentiel provoque l'arrêt de la biosynthèse des protéines et donc de la prolifération cellulaire. En d'autres termes, la baisse de L-Trp est considérée comme un mécanisme de défense induit par l'IFN- γ dans les cellules immunocompétentes durant la réponse immunitaire. Ce phénomène agit comme antimicrobien ou anti-tumoral et limite la croissance des pathogènes intracellulaires ou des cellules malignes (Pfefferkom E.R., 1984 ; de la Maza L.M., 1988 ; Ozaki Y., 1988). L'activation d'IDO peut également inhiber la réponse des lymphocytes T lors d'une stimulation mitogénique *in vitro* et *in vivo* (Grohmann U., 2003 ; Hwu P., 2000 ; Munn D.H., 1999 ; Munn D.H., 2002). Ceci est d'autant plus vrai quand l'enzyme est activée

via l'IFN- γ des cellules dendritiques ou macrophages. En plus de la privation de L-Trp, l'effet pro-apoptotique de certains catabolites du L-Trp telle que la kynurénine est aussi important (Frumento G., 2002 ; Terness P., 2002). Néanmoins, ce phénomène peut aussi réduire la stimulation des lymphocytes T et donc contribuer au développement de l'immunodéficience (Figure I.5) (Fuchs D., 1989).

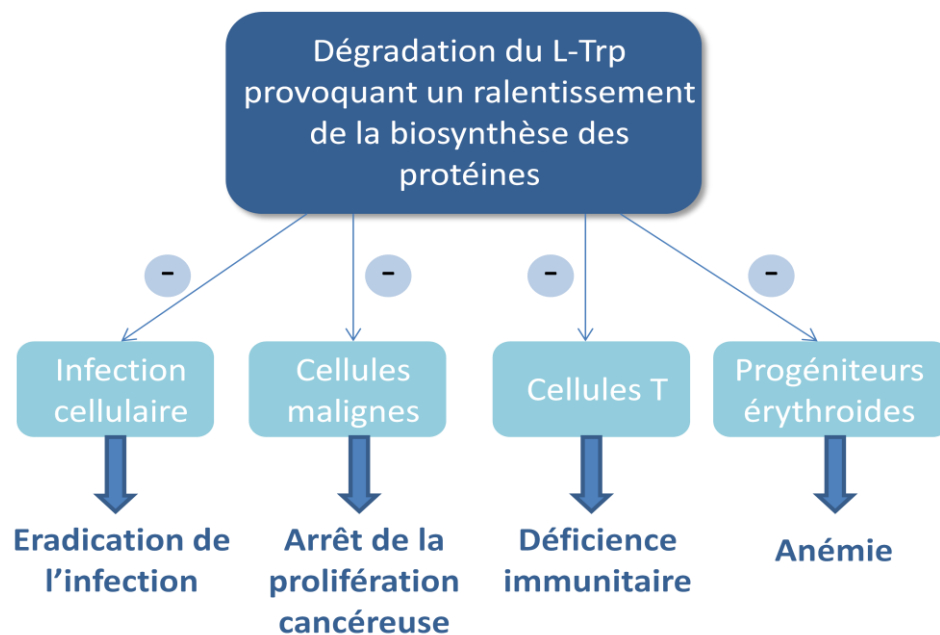


Figure I.5 : Représentation de l'influence de la dégradation locale en L-Trp (adapté de Schröcksnadel K., 2006).

Par opposition, peu de chose était connue sur l'effet de l'expression de TDO sur la réponse immunitaire quand cette thèse a débuté. Un rapport récent indique que les cellules humaines transfectées avec TDO réduisent localement la production de L-Trp prévenant à la fois la croissance des pathogènes et la prolifération de lymphocytes T allogéniques (Schmidt S.K., 2009). Il est important de connaître dans quel type de tumeur est exprimé le gène TDO. Pour ce faire, des mesures par RT-PCR ont été effectuées par l'équipe du Professeur Benoît Van den Eynde (Pilotte L, 2012 ; Van den Eynde B., 2010). Le tableau I.1 reprend les différentes lignées tumorales humaines surexprimant TDO.

Tableau I.1 : Expression de TDO dans les échantillons humains (adapté de Pilotte L., 2012).

Type d'échantillon	Échantillons positifs à TDO (Positifs/testés)
Tumeurs	
Carcinome de la vessie	7/20
Hépatocarcinome	7/7
Mélanome	10/20
Mésothéliome	2/4
Neuroblastome	2/3
Sarcome	1/5
Carcinome du sein	2/16
Leucémie	1/25
Carcinome des cellules rénales	1/7
Carcinome colorectal	2/7
Carcinome de la tête et du cou	1/9
Tissus normaux	
Foie	3/3
Peau	0/2
Vessie	0/2
Sein	0/3
Sang	0/2

Ce tableau I.1 met en évidence la surexpression de l'enzyme dans les lignées tumorales et plus particulièrement dans le carcinome de la vessie (35 %), le mélanome, le mésothéliome (50 %), le neuroblastome (66 %) ou encore l'hépatocarcinome (100 %).

Ces résultats suggèrent que TDO doit jouer un rôle dans les effets immunosuppresseurs de la même manière qu'IDO. C'est pourquoi, nous allons au cours de ce travail, étudier plus amplement cette cible prometteuse ainsi que ces inhibiteurs. Une seconde étude récente de Opitz, en 2011, montre que jusqu'à présent le mécanisme d'immunosuppression associé au cancer par le catabolisme du L-Trp a été attribuée uniquement à l'activité enzymatique d'IDO dans les cellules cancéreuses et les tumeurs des ganglions lymphatiques drainant. Or cette étude met en évidence la forte expression de TDO dans le cancer. De plus, dans les gliomes, IDO n'est pas exprimé par conséquent TDO semble être le seul facteur déterminant dans la dégradation du L-Trp constitutif, ce qui indique que

TDO représente une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du gliome (Optiz C., 2011).

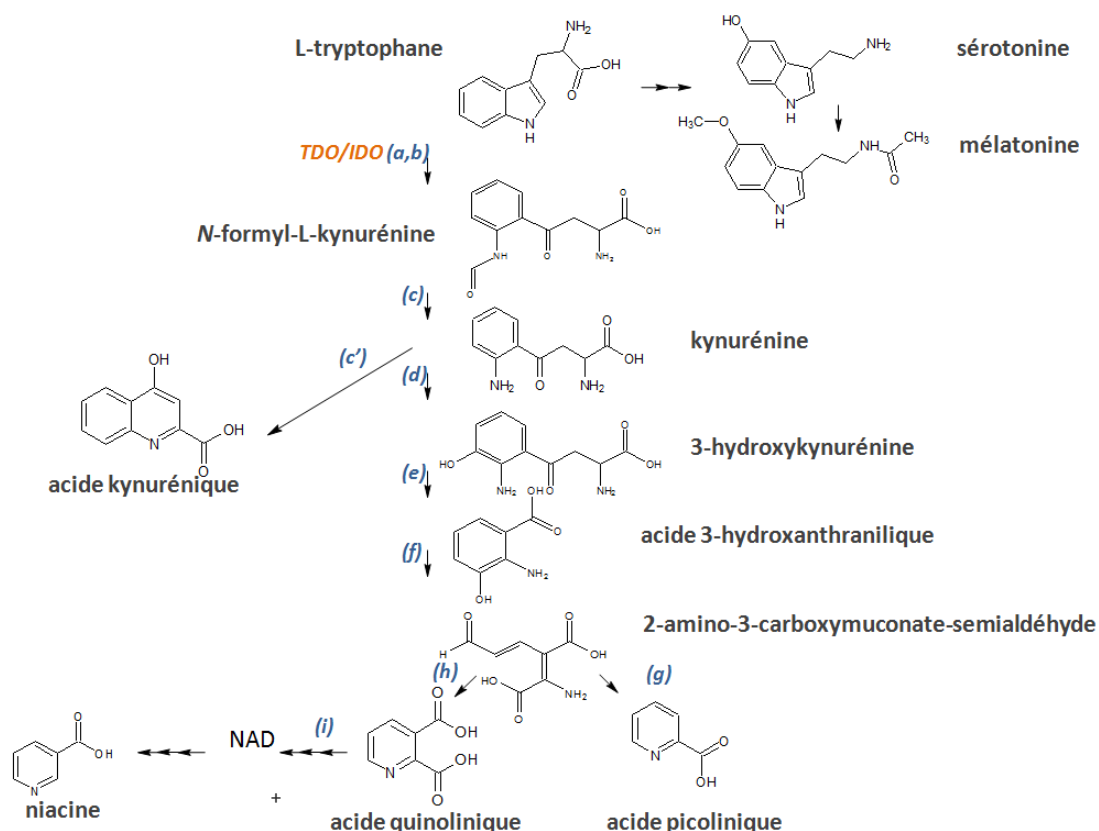
De plus, ces auteurs ont montré que l'activation des récepteurs AHR (*aryl hydrocarbon receptor*) par la génération de kynurénine en réponse à un stimulus inflammatoire peut constituer une connexion entre l'inflammation et la cancérogenèse. En effet, un nombre important de cancers proviennent la plupart du temps de zones d'infection chronique et d'inflammation (Coussens L., 2002), où le catabolisme du L-Trp dans le microenvironnement tumoral est activé et permet la suppression immunitaire locale (Muller A., 2008).

En plus de ce rôle, une étude récente (Van Der Groot A., 2012) suggère que l'enzyme TDO joue un rôle dans la régulation générale de l'homéostasie des protéines au cours du vieillissement en augmentant la synthèse du tryptophane. Auparavant, il a été démontré que l'inhibition de la voie de kynurénine supprime la toxicité des protéines issues des maladies neurodégénératives en modifiant l'abondance relative des métabolites avec la 3-hydroxykynurénine, qui est neurotoxique, et l'acide kynurénique qui est neuroprotecteur (Campesan S., 2011 ; Giorgini F., 2005 ; Zwilling D., 2011). L'étude de Van Der Groot suggère un autre rôle pour la voie de la kynurénine dans la neurodégénérescence, à savoir un rôle régulateur de la toxicité des protéines liées à l'âge. En effet, ce rôle est indépendant de métabolites en aval. Le fait que l'effet protecteur de l'inhibition de TDO est en amont de la voie de la kynurénine est soutenu par plusieurs preuves. La première est que la suppression des enzymes individuelles en aval de TDO dans la voie de la kynurénine n'a jamais abouti à une suppression similaire de la toxicité de l' α -synucléine (composant de l'amyloïde dans la maladie d'Alzheimer) tel qu'observé lorsqu'on diminue le taux de TDO. Deuxièmement, pour les souches *C.elegans* dans lesquelles les enzymes en aval ont été supprimées, la diminution de l'enzyme TDO supprime toujours la protéotoxicité de manière similaire à la déplétion de TDO dans les animaux wild-type, indépendamment des changements relatifs dans les niveaux des métabolites. Enfin, des vers *C.elegans* ont été nourris avec du tryptophane et la toxicité α -synucléine a également été supprimée. Bien que ces résultats suggèrent que TDO régule la toxicité par le tryptophane, celui-ci ne semble pas agir directement sur l'agrégation d' α -synucléine. Une possibilité est que le tryptophane ou les dérivés du tryptophane jouent

un rôle en agissant sur d'autres molécules de signalisation qui influencent la protéotoxicité. Chez les mammifères, TDO ou son homologue fonctionnel l'IDO peut être induite par différents stimuli internes et externes, ce qui conduit à la dégradation du tryptophane. Le fait que TDO jouerait un rôle dans les effets immunosuppresseurs et ces résultats impliquent que celui-ci soit un régulateur du métabolisme général des pathologies liées à l'âge et à la durée de vie. Il s'avère que l'expression de TDO augmente naturellement au cours du vieillissement (Dupuy D., 2007). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de TDO peut retarder ce procédé dépendant de l'âge. TDO pourrait donc également être une cible intéressante pour une intervention thérapeutique dans les événements moléculaires toxiques liés au vieillissement associés à des maladies neurodégénératives (Van Der Groot A., 2012).

2. Métabolisme du tryptophane dans la voie de la kynurénine

Le L-tryptophane est un acide aminé essentiel ayant différentes fonctions biologiques importantes. En plus de participer à la biosynthèse des protéines, le tryptophane est métabolisé chez les mammifères selon diverses voies à savoir celles de la sérotonine et de la kynurénine. Dans cette dernière, le tryptophane est catabolisé en différents produits finaux tels que l'acide nicotinique, la niacine (vitamine B3) et le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺). Bien que les enzymes TDO et IDO ne possèdent pas la même localisation cellulaire et ne sont pas induites par les mêmes partenaires, elles catalysent toutes deux de manière similaire la première étape de la dégradation du tryptophane. La réaction convertit le L-Trp en *N*-formyl-L-kynurénine par le clivage de la liaison C₂-C₃ du L-Trp et incorporation de deux atomes d'une molécule d'oxygène (Schröcksnadel K., 2006 ; Viola A., 2007) (Figure I.6).



(a) tryptophane 2,3-dioxygénase ; (b) indoleamine 2,3-dioxygénase ; (c) kynurénine aminotransférase I,II,III ; (c') formamidase (d) kynurénine 3-hydroxylase ; (e) kynuréninase ; (f) 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase ; (g) 2-amino-3-carboxymuconate-semialdéhyde décarboxylase ; (h) non enzymatique ; (i) quinolinate phosphoribosyl transférase.

Figure I.6 : Diagramme simplifié de la voie de la kynurénine (adapté de Guillemin G.J., 2007).

La voie de la kynurénine qui implique TDO et IDO n'est pas seulement importante comme source de métabolites incluant la niacine comme mentionné ci-dessus mais également à cause de l'effet qu'ont TDO et IDO sur la concentration locale en L-Trp. Cette voie de la kynurénine est composée de deux sous-branches où le principal métabolite est la L-kynurénine. Découverte par Kotake, il a démontré plus tard qu'elle était formée comme produit primaire de la réaction de TDO et IDO avec le tryptophane. Ensuite, une seconde enzyme, la formamidase, hydrolyse le groupement formyle de la *N*-formyl-L-kynurénine pour former la kynurénine et l'acide formique (Knox W.E., 1955 ; Kotake Y., 1936). La kynurénine est ensuite transformée en métabolite neurotoxique tel que l'acide quinolique (quinolate) ou en métabolite neuro-protecteur, l'acide kynurénique (Kotake Y., 1936 ; Stone T.W., 2002).

La diminution locale en L-Trp suite à l'action enzymatique est principalement associée à une réponse anti-microbienne par TDO ou IDO, ou une régulation immunitaire par IDO (MacKenzie C.R., 2007).

Le métabolisme du L-Trp consiste donc en une cascade enzymatique comprenant un nombre intéressant de composés physiologiquement et pharmacologiquement actifs tels que la sérotonine, la mélatonine, la niacine et d'autres métabolites qui jouent de multiples rôles dans le contrôle de la plupart des organismes vivants et peuvent intervenir également dans la biosynthèse du NAD⁺ (Pogson C.I., 1989 ; Monori F., 1999 ; Ruddick J.P., 2006).

La sérotonine (5-hydroxy-tryptamine, 5-HT) est un neurotransmetteur qui est localisé au sein de l'intestin afin d'assurer les mouvements de ce dernier. La sérotonine se trouve également au niveau du système nerveux central où elle contrôle différentes fonctions dont l'humeur, le sommeil et certaines fonctions cognitives telles que la mémoire et l'apprentissage (Berger M., 2009). La sérotonine joue également un rôle important dans la dépression, l'anxiété et le désordre bipolaire (Larsen R.J., 2002).

La mélatonine est une neurohormone trouvée chez l'animal et d'autres organismes vivants comme l'algue (dinoflagellé, algue verte) (Caniato R., 2003). La mélatonine est impliquée dans la régulation du rythme cardiaque. Elle est également un antioxydant fort et joue un rôle dans la protection de l'ADN nucléaire et mitochondrial (Altun A., 2007 ; Hardeland R., 2005 ; Reiter R.J., 2001).

La niacine, aussi appelée la vitamine B3, est un précurseur du NAD⁺ dans la voie de la kynurénine qui joue un rôle important dans la survie cellulaire. La niacine est impliquée dans la réparation de l'ADN et dans la production d'hormones stéroïdiennes (Lehninger A.L., 2000). Une carence en niacine conduit à une maladie appelée la pellagre (Pitche P.T., 2005).

3. Découverte de la tryptophane 2,3-dioxygénase et de l'indoleamine 2,3-dioxygénase

En 1936, Kotake et Masayama ont décrit la conversion du L-Trp en L-kynurénine *in vitro* à partir d'extraits bruts de foie de lapin (Kotake Y., 1936). Cette réaction implique le clivage du noyau pyrrole du tryptophane par l'enzyme TDO qui s'appelait alors « tryptophane pyrrolase ». A peu près 15 ans plus tard, Knox et Mehler purifièrent ce système enzymatique et isolèrent l'enzyme catalysant la conversion du tryptophane en *N*-formyl-L-kynurénine et une seconde enzyme catalysant l'hydrolyse formant comme produits

finaux la kynurénine et l'acide formique (Knox W.E., 1955). Ils montrèrent également que cette enzyme TDO était une hémoprotéine contenant un groupement protoporphyrine IX. L'enzyme a ensuite été renommée « tryptophane 2,3-dioxygénase ». Par après, cette enzyme a uniquement été trouvée dans le foie de mammifères et dans certains micro-organismes. IDO, quant à elle, a été découverte plus tard, dans l'intestin de lapin par l'équipe d'Hayaishi en 1967 (Higuchi K., 1967 ; Shimizu T., 1978). Le tableau I.2 reprend les différentes espèces et systèmes d'expression de TDO.

Tableau I.2 : Différentes espèces et systèmes d'expression de TDO.

Enzymes	Espèces	Systèmes d'expression	Références
TDO	<i>H. sapiens</i>	<i>E. coli</i> pET28a hexa-histidyl tag	(Basran J., 2008)
TDO	<i>H. sapiens</i>	<i>E.coli</i> pET14b hexa-histidyl tag	(Batabyal D., 2007)
TDO	<i>H. sapiens</i>	<i>E.coli</i> pET15b hexa-histidyl tag	(Fukumura E., 2009)
TDO bactérienne	<i>X. campestris</i>	<i>E.coli</i> pET21d hexa-histidyl tag	(Forouhar F., 2007)
TDO bactérienne	<i>R. metallidurans</i>	<i>E.coli</i> pET28a hexa-histidyl tag	(Zhang Y., 2007)
TDO de moustique	<i>Ae. aegypti</i>	Baculovirus pBlueBac4.5 hexa-histidyl tag	(Li J.S., 2007)
TDO de moustique	<i>A. gambiae</i>	<i>E.coli</i> pET16b hexa-histidyl tag	(Paglino A., 2008)
TDO de Saint-Jacques	<i>C. farreri</i>	<i>E.coli</i> pGEX 4T-3 GST-tag	(Hu X., 2006)
TDO de rat	<i>R. rattus</i>	<i>E. coli</i> pUC18 hexa-histidyl tag	(Ren S., 1996)
TDO de rat	<i>R. rattus</i>	<i>E.coli</i> pTrc99A	(Dick R., 2001)
TDO de rat	<i>R. norvegicus</i>	<i>E.coli</i> pTrc99A	(Manandhar S.P., 2002)

H = homo, X = xanthomonas, R = ralstonia, Ae = aedes, A = anopheles, C = chlamys, R = rattus.

On retrouve actuellement dans la littérature 79 séquences d'acides aminés correspondant à l'enzyme TDO et réparties en trois groupes. Un groupe contient 26 séquences eucaryotes et une séquence bactérienne, un autre est formé par des séquences bactériennes dont celles de *Ralstonia metallidurans* et *Xanthomonas campestris* et le dernier est formé de 6 séquences bactériennes qui ont une grande divergence entre leurs séquences comparées à celles des deux premiers groupes. Les membres des groupes partagent

approximativement 20 à 30 % d'identité et présentent une plus grande identité de séquence dans la moitié *N*-terminale. Parmi les 79 séquences, 10 acides aminés sont conservés et situés autour du site de liaison de l'hème (Zhang Y., 2007).

4. Structure et caractérisation de la tryptophane 2,3-dioxygénase

4.1 Groupement prosthétique hème

Les porphyrines sont des pigments rouges de structure tétrapyrrolique, chaque noyau pyrrole étant lié à deux homologues par un pont méthine (-CH=). Des substituants variables permettent de définir différents types de porphyrines : URO = acétyle et propionyle ; COPRO = méthyle et propionyle ; PROTO = méthyle et vinyle, etc.

La liaison d'un atome de fer à un noyau protoporphyrinique donne naissance à un noyau « hème », groupement prosthétique de l'hémoglobine ainsi que de nombreuses protéines (hémoprotéines) telles la myoglobine, les cytochromes, la catalase, la peroxydase, etc (English A.M., 1995).

Nous allons nous intéresser plus particulièrement à la protoporphyrine IX liée au fer. Ce complexe métallique est présent dans une grande variété de protéines chez les procaryotes et les eucaryotes. Il s'agit d'un macrocycle contenant un ion fer qui a une structure de tétrapyrrole grâce à des ponts méthine (aux positions : α , β , γ et δ) produisant une structure plane et contenant huit chaînes latérales: quatre méthyles (positions 1, 3, 5 et 8), deux vinyles (positions 2 et 4) et deux propionates (positions 6 et 7) (Figure I.7).

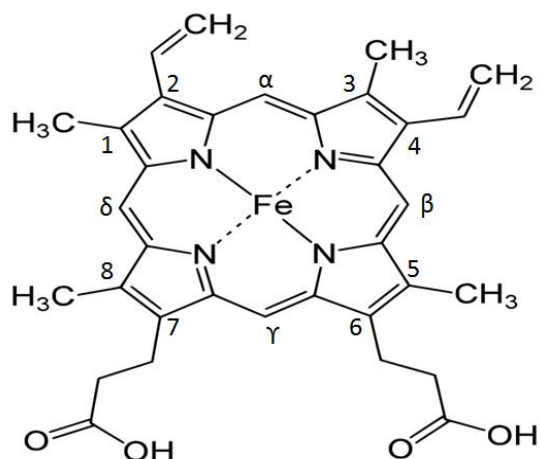


Figure I.7 : Une protoporphyrine IX contient 8 chaînes latérales (nommées de 1 à 8) et 4 ponts méthine (nommés α , β , γ et δ).

La porphyrine IX liée au fer possède en son centre un atome de Fe^{3+} qui dispose de 6 sites de coordination. Les cinquième et sixième sites de liaison axiale sont appelés, coordination proximale et distale. Dans les hémoprotéines, il existe des variations entre les ligands axiaux, cependant, dans la plupart des cas, le ligand proximal est une histidine. Il y a également une variation de l'étage d'oxydation du fer, dans les protéines contenant de l'hème, le fer peut soit se trouver sous la forme ferreuse (Fe^{2+}) soit sous la forme ferrique (Fe^{3+}). Dans certains cas particuliers, telles que les peroxydases ou les enzymes du cytochrome P450, le fer peut se trouver également sous forme ferryle (Fe^{4+}) (Groves J.T., 2005 ; Makris T.M., 2006 ; Sono M., 1996 ; Wong L.L., 1998).

4.2 Structure cristallographique de TDO

Il existe à ce jour sept structures cristallographiques de TDO dans la PDB (Protein data bank). Celles-ci proviennent de souches bactériennes à savoir *Xanthomonas campestris* (xcTDO) et *Ralstonia metallidurans* (rmTDO). Actuellement, il n'y a pas encore de structure 3D de la TDO humaine. Les deux TDO bactériennes partagent une identité de séquence de 34 % pour xcTDO et 28 % rmTDO avec htDO, néanmoins, l'identité est élevée au niveau de leur site actif (Tabelau I.3).

Tableau I.3 : Différentes structures cristallographiques de TDO répertoriées à ce jour.

Enzymes	Code PDB	Description	Références
xcTDO	1YW0	L'apoenzyme	(Forouhar F., 2007)
xcTDO	2NW7	Complexe avec l'hème ferrique	(Forouhar F., 2007)
xcTDO	2NW8	Complexe avec l'hème ferreux et le L-Trp	(Forouhar F., 2007)
xcTDO	2NW9	Complexe avec l'hème ferreux et le 6-fluorotryptophane	(Forouhar F., 2007)
xcTDO H55A	3BK9	Complexe avec l'hème ferrique	(Thackray S.J., 2008)
xcTDO H55S	3E08	Complexe avec l'hème ferrique	(Thackray S.J., 2008)
rmTDO	2N0X	Complexe avec l'hème ferrique	(Zhang Y., 2007)

En ce qui concerne *xcTDO*, plusieurs structures cristallines ont été résolues incluant la forme ferrique et ferreuse avec différents substrats (L-Trp et 6-fluorotryptophane) et deux mutants histidine de TDO (Forouhar F., 2007; Thackray S.J., 2008). Les structures cristallines ferriques de TDO de *rmTDO* et *xcTDO* partagent 47 % d'identité de séquence et les régions essentiellement identiques sont localisées proches du site actif (Zhang Y., 2007).

La structure cristallographique d'un monomère de *xcTDO* contient 12 hélices α et aucun feuillet β . Le L-Trp est localisé dans une poche sur la face distale du groupement hème et interagit avec les résidus des hélices α B- α E et α J- α K (Figure I.8a). Le groupement carboxylate est lié par un pont hydrogène à la chaîne latérale de la Tyr113 (dans l'hélice α D) et à la chaîne principale amide de la Thr254 (boucle α J- α K). L'azote de l'amine du L-Trp est reconnu par la chaîne latérale du propionate de l'hème et est également lié par pont hydrogène à la chaîne latérale hydroxyle de la Thr254. Le noyau indolique se situe perpendiculairement au dessus de l'hème et est maintenu dans cette position à l'aide d'interactions de van der Waals avec la chaîne latérale du Phe51 (hélice α B) et de plusieurs résidus hydrophobes (Tyr24, Tyr27 et la Leu28). De plus, le N1 du noyau indolique est lié par pont hydrogène à la chaîne latérale de l'His55 (hélice α B) (Figure I.8a). Une molécule d'eau présente dans ce complexe interagit avec l'amine protonnée du L-Trp et avec la chaîne principale de l'amide du résidu Gly125 grâce à un pont hydrogène. L'extrémité *N*-terminale

de chaque monomère fait partie du site de liaison du substrat dans le monomère adjacent. Ces protéines sont souvent sous forme de dimère de dimères. De ce fait, un dimère contient deux groupements hème et deux cavités distales pour lier le substrat et l'ensemble du tétramère contient quatre sites actifs (Forouhar F., 2007) (Figure I.8b).

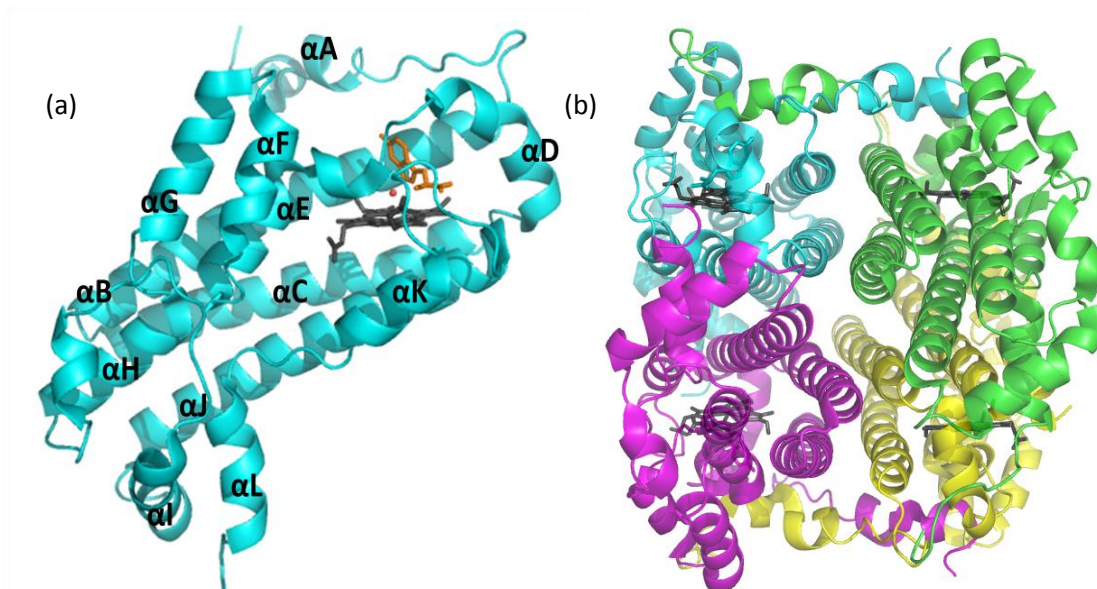


Figure I.8 : (a) Représentation en ruban d'un monomère de xcTDO (PDB : 1YW0). Les hélices α sont représentées en bleus, l'hème est représenté en gris, le 6-fluoro-tryptophane est montré en orange et enfin la molécule d'eau est montrée par une sphère rouge. (b) Représentation en ruban de la structure cristallographique de xcTDO (PDB : 1YW0). Les quatre monomères sont représentés en jaune, vert, bleu et mauve. Le groupement hème est en gris (adapté de Forouhar F., 2007).

Chaque site actif de *rmTDO* où le tryptophane est supposé résider est partiellement formé du monomère adjacent. Le tétramère est donc également vu comme un dimère de dimère. Un monomère de TDO est formé de 13 hélices α et de 4 hélices 3^{10} (pont hydrogène entre le C=O du résidu i et le N-H du résidu $i+3$, i étant le numéro d'un résidu). Le groupement hème est localisé à la fin d'un groupement d'hélices formé par 6 hélices α , 2 hélices 3^{10} , 2 boucles riches en glycine et une hélice α d'une sous-unité adjacente (Zhang Y., 2007) (Figure I.9).

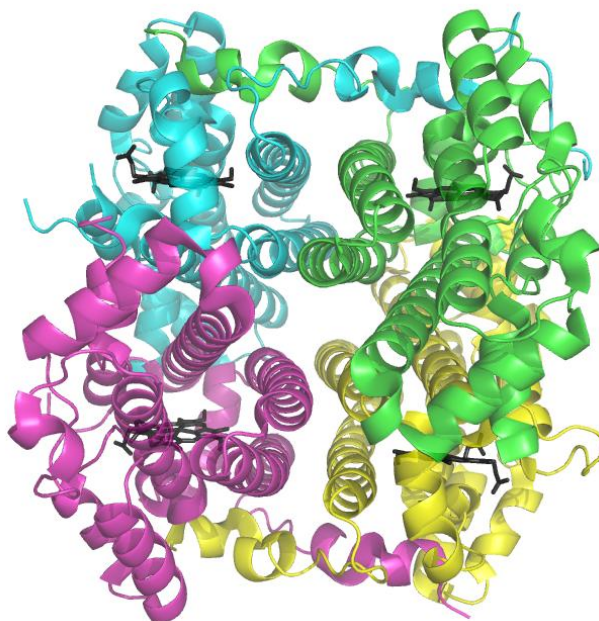


Figure I.9 : Représentation en ruban de la structure cristallographique de *rmTDO* (PDB : 2NOX). Les quatre monomères sont représentés en jaune, vert, bleu et mauve. Le groupement hème est en noir (adapté de Zhang Y., 2007).

Dans les deux structures, TDO est sous forme tétramérique avec un groupement hème dans chacun de ses 4 monomères. L'hème est coordiné à l'aide d'une His240 (numérotation basée sur la séquence de *xcTDO*), qui est conservée dans tous les systèmes d'expression de TDO (Batabyal D., 2009). Dans la structure de *xcTDO* sous forme ferreuse, l'amine du L-Trp forment des ponts hydrogène avec différents résidus du site actif ainsi qu'avec le propionate de l'hème et une molécule d'eau (voir § 4.2.1). Le noyau indolique se positionne de manière perpendiculaire au plan formé par le groupement hème, cette position est permise grâce aux différents contacts de type Van der Waals avec plusieurs résidus hydrophobes voisins incluant ceux de la même sous unité ainsi que ceux provenant de la partie *N*-terminale de la sous unité adjacente du tétramère. De plus, le noyau indolique occuperait le 6^{ème} site de coordination du fer de l'hème afin de permettre l'équilibre chimique de la dioxygénase (voir § 4.3).

4.2.1 Caractérisation du site actif

L'analyse du mode d'interaction du 6-fluorotryptophane, un analogue de substrat cristallisé en présence de xcTDO met en évidence, pour la première fois, différentes interactions stabilisantes (Figure I.10). En effet, le noyau indolique du ligand est stabilisé *via* un pont H entre le groupement NH de l'indole et de l'azote de l'imidazole de l'His55. Une étude de mutagenèse montre que l'His55 n'est pas une base essentielle vu que l'activité catalytique est conservée en présence des mutants H55A et H55S (l'His55 est l'équivalent de la Ser167 dans la forme humaine d'IDO et correspond à l'His72 dans la structure de *rm*TDO et à l'His76 dans *ht*TDO). Néanmoins, l'His55 joue un rôle important dans la prévention de la formation d'un complexe ferrique enzyme-ligand non-productif. De plus, cette base régit les molécules d'eau au sein du site actif en l'absence de substrat (Thackray S.J., 2008). Enfin, la partie carboxylate du substrat interagit avec le guanidinium de l'Arg117 et l'ossature de la Thr254. L'interaction avec l'Arg117 s'avère importante pour l'activité catalytique de l'enzyme si l'on en croit les données obtenues pour IDO. En effet, lorsque l'Arg231 du site actif d'IDO est remplacée par une Ala par mutagenèse, l'activité de l'enzyme est drastiquement réduite (Sugimoto H., 2006).

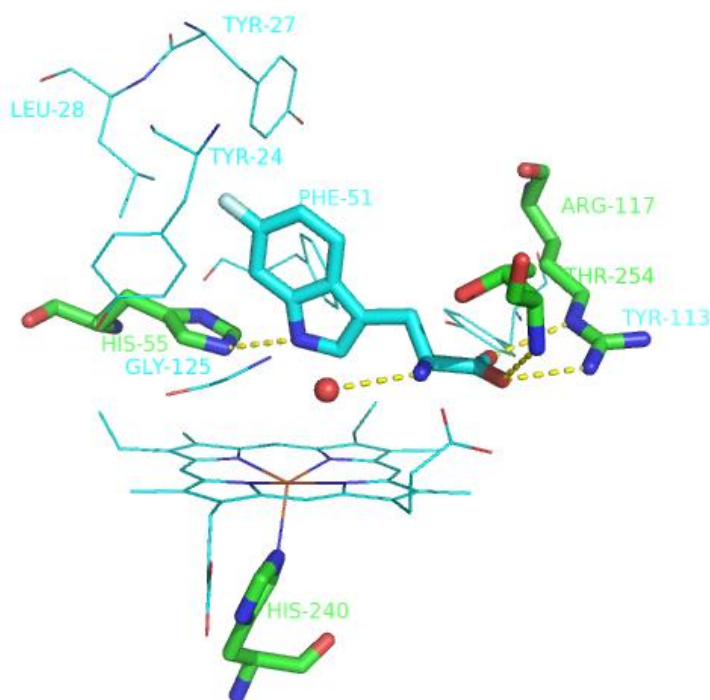


Figure I.10 : Vue du 6-fluorotryptophane au sein du site actif de xcTDO (coordonnées extraites du fichier PDB : 2NW9 (image réalisée avec le programme Pymol Delano W.L., 2008)).

Dans cette structure du site actif de *rmTDO* (Figure I.11), Phe68, Ser141, Gly142 et His257 sont impliqués dans des liaisons avec le groupement hème. Le résidu Phe68 interagit avec le côté hydrophobe de ce dernier. La Ser141 et la Gly142 font partie de boucles riches en glycine et entourent le cofacteur. La Ser141 intervient également dans un pont hydrogène avec l'hème. Le résidu His257, coordonne le fer du cofacteur et pour finir, le résidu Arg134 se situe trop loin du fer que pour interagir d'une quelconque façon avec le cofacteur (Zhang Y., 2007).

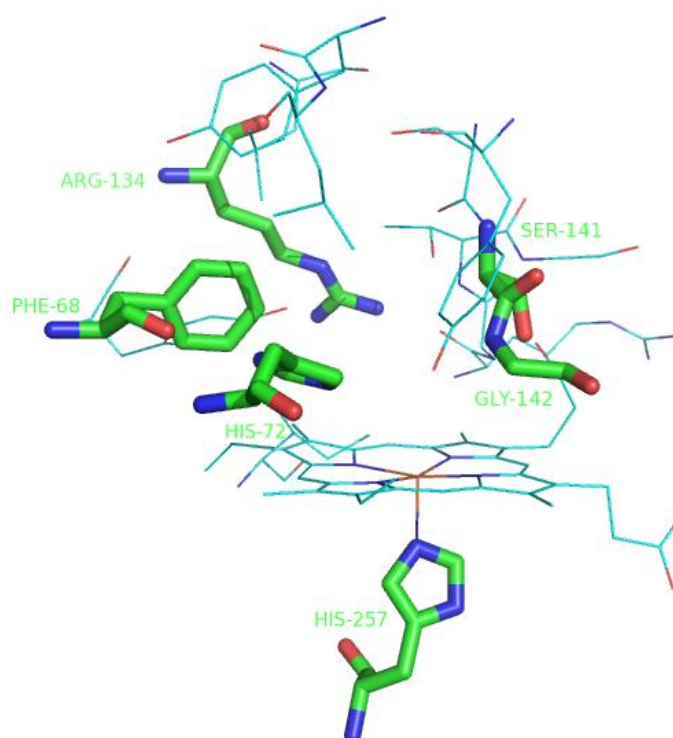


Figure I.11 : Vue du site actif de *rmTDO* (coordonnées extraites du fichier PDB : 2NOX (image réalisée avec le programme Pymol Delano W.L., 2008)).

4.2.2 Comparaison avec IDO

Comme décrit dans le paragraphe précédent, une seconde enzyme catalyse le clivage enzymatique du L-Trp, l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Elle présente de nombreuses différences comparée à TDO. En effet, malgré le fait qu'elles catalysent la même réaction dans la voie de la kynurénine, elles ne possèdent entre elles qu'un faible pourcentage (10 %) d'identité. Autres particularités, IDO est une enzyme monomérique (MM $\approx$ 45 kDa) alors que TDO sous forme tétramérique a une MM $\approx$ 167 kDa. IDO possède de nombreux substrats tels que le L-Trp, D-Trp, 5-hydroxy-L- et -D-tryptophane, la tryptamine et la sérotonine

contrairement à TDO qui est spécifique de certains substrats à savoir : le L-Trp et le 5- et 6-fluorotryptophane (Figure I.12) (Capece L., 2010 ; Leeds J.M., 1993). IDO est distribué dans tous les tissus mis à part le foie. TDO quant à elle n'est exprimée que dans le foie, néanmoins, il a été récemment montré que TDO est exprimée dans le cytoplasme des neurones, dans les astrocytes et dans la microglie (Guillemin G.J., 2007 ; Miller C.L., 2004 ; Miller C.L., 2006). Enfin, l'expression d'IDO est préférentiellement induite par IFN- γ , tandis que celle de TDO est régulée de manière positive par les glucocorticoïdes et est contrôlée par la disponibilité physiologique de son substrat.

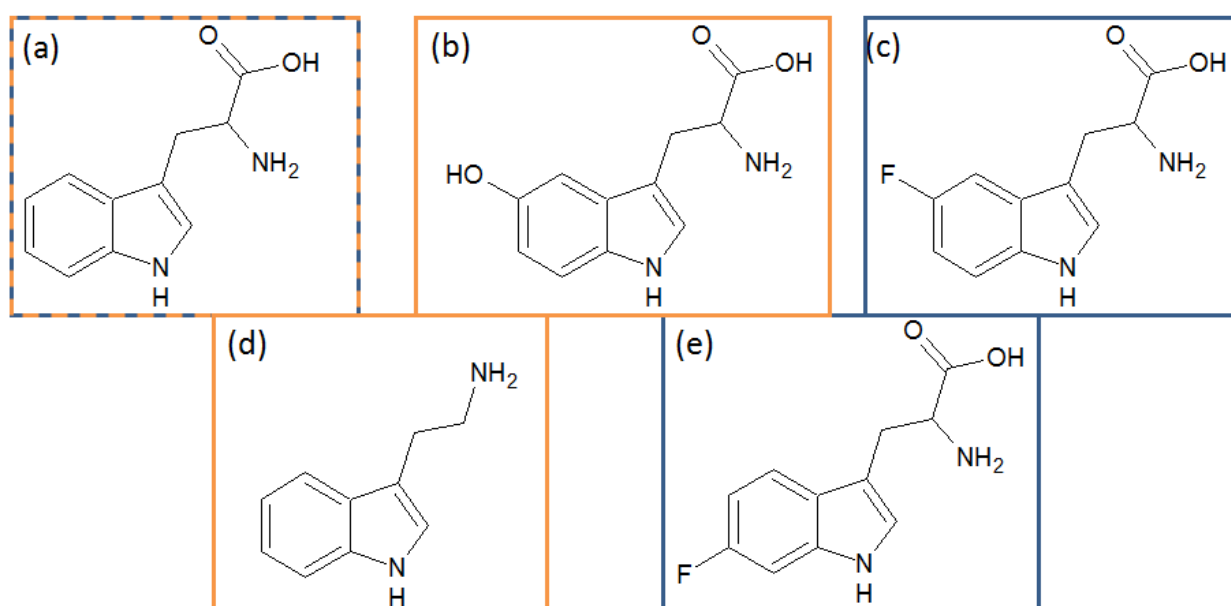


Figure I.12 : Structure des substrats des dioxygénases : (a) L- et D-tryptophane, (b) 5-hydroxy-L et – D-tryptophane, (c) 5-fluoro-tryptophane, (d) tryptamine et (e) 6-fluoro-L-tryptophane. (Les substrats de IDO sont représentés par un encadrement orange et ceux de TDO en bleu).

4.3 Complexe ternaire de TDO/IDO avec O₂ et le L-Trp

Les propriétés oxydo-réductrices (redox) de l'hème sont un facteur clef dans la détermination de la réactivité. Selon les données de la littérature, le potentiel réducteur de l'IDO humaine (-63 mV (Chauhan N., 2008)), de la TDO humaine (-92 mV (Basran J., 2008)) et enfin de xcTDO (+8 mV (Forouhar F., 2007 ; Thackray S.J., 2008)) varie considérablement. A l'exception de xcTDO, ces valeurs de potentiel réducteur sont assez faibles que pour contraindre le dioxygène à se lier à la protéine. Il est utile de rappeler qu'IDO et TDO fonctionnent grâce à la forme ferreuse liée à l'O₂ : cela se produit très probablement avec au moins une oxydation partielle du superoxyde ferrique, ce qui requiert à nouveau une

réduction à l'état ferreux lors de l'achèvement du cycle catalytique. Par conséquent, on peut imaginer que le potentiel réducteur de l'hème ne devrait jamais être aussi élevé et qu'il devrait diminuer la conversion du superoxyde ferrique dès que l'O₂ se lie. Certaines enzymes sont discriminantes quant à la liaison du substrat à l'enzyme sous forme ferrique et cela se reflète dans le potentiel réducteur, c'est le cas d'IDO. La liaison avec l'enzyme sous forme ferreuse est plus favorable qu'avec la forme ferrique et l'augmentation du potentiel réducteur correspond à la liaison au substrat (Papadopoulou N.D., 2005). C'est le cas également de xcTDO mais pas celui de hTDO. En effet, le potentiel réducteur du substrat libre ou lié à la protéine sont similaires (Basran J., 2008). Il n'est pas encore connu si ces différences ont des implications catalytiques ou fonctionnelles.

5. Mécanisme catalytique des dioxygénases

5.1 Introduction

Les enzymes capables d'activer le dioxygène de l'atmosphère sont divisées en plusieurs familles. Tout d'abord, les oxydases qui utilisent l'oxygène comme un oxydant et réduisent le dioxygène en peroxyde ou en eau. Ensuite, les oxygénases, qui incorporent les atomes d'oxygène du dioxygène dans le ou les produit(s). Parmi celles-ci, la famille des mono-oxygénases catalyse l'incorporation d'un atome d'oxygène dans le produit tandis que les dioxygénases incorporent les deux atomes d'oxygène dans le ou les produit(s) formé(s) (Sono M., 1996).

La plupart des enzymes de type dioxygénase requièrent un cofacteur métallique qui le plus souvent est le Fe (II) ou Fe (III) stabilisé par un hème. Cette famille de dioxygénases contenant un hème comprend les prostaglandines synthétases H, les linoléate-diols synthétases et les α -dioxygénases des acides gras des plantes ainsi que les enzymes impliquées dans l'oxydation du tryptophane (Figure I.13) (Garscha U., 2008 ; Koeduka T., 2002).

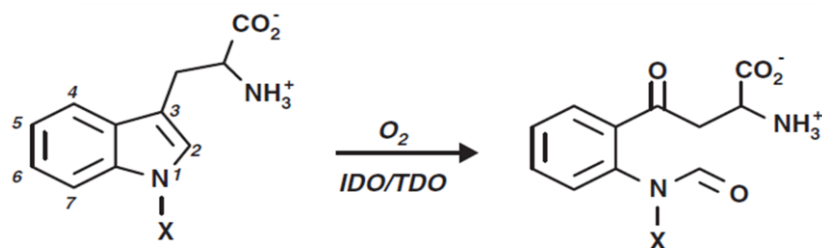


Figure I.13 : Exemple de réaction catalysée par des dioxygénases qui permet la formation de la *N*-formyl-L-kynurénine à partir du L-Trp (X=H). Me-Trp (X=Me est aussi un substrat) (Chauhan N., 2009).

5.2 Activation de l'oxygène via l'ion métallique

Les réactions impliquant l'oxydation des hydrocarbures par le dioxygène sont exothermiques. En effet, la somme des énergies de liaison des liaisons formées (C-O du CO₂ et O-H de la molécule H₂O) est plus élevée que la somme des énergies de liaisons brisées (C-C, C-H provenant de l'alcane et O-O issu de l'oxygène moléculaire) (Hamilton G., 1974). Malgré ce caractère exothermique, le dioxygène est chimiquement peu réactif en l'absence d'un catalyseur adéquat (Figure I.14). La raison réside dans le fait qu'à l'état fondamental, le dioxygène (³O₂) contient deux électrons non appariés dans la plus haute orbitale π* occupée et donc ne peut pas réagir avec les espèces singulets appariées. Par opposition, l'état excité singulet du dioxygène (¹O₂) qui contient une paire d'électrons de valence est très réactif vis-à-vis des alcènes ou des diènes (Kaim W., 1994).

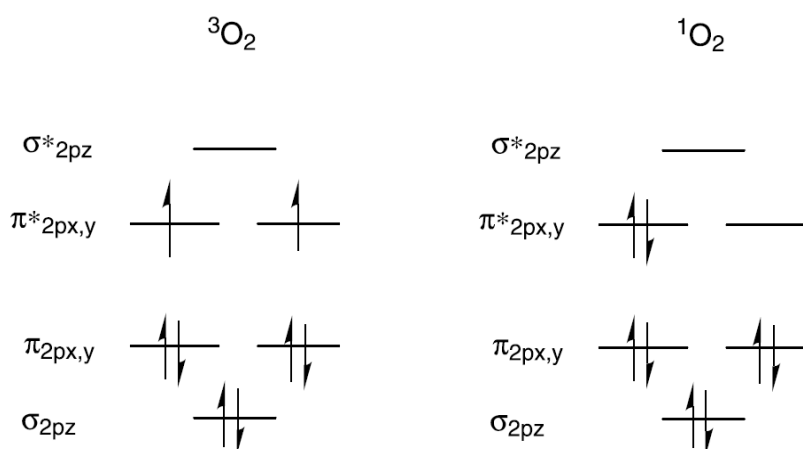


Figure I.14 : Diagrammes des orbitales moléculaires pour ³O₂ et ¹O₂.

Cependant, $^1\text{O}_2$ est 22 kcal/mol plus élevé en énergie que $^3\text{O}_2$ et donc il n'est pas possible pour les oxygénases d'atteindre cet état excité en absence d'ion métallique.

Les ions métalliques de transition contenant les électrons non appariés peuvent utiliser trois stratégies pour activer le dioxygène.

- **Recouvrement de l'orbitale π^* avec un ion métallique** : dès que la complexation du dioxygène se fait avec l'ion métallique de transition contenant des électrons 3d non appariés, les électrons des orbitales π^* du dioxygène sont capables de se recouvrir avec ceux de l'ion métallique. La réaction du complexe métal de transition-dioxygène avec un singulet de réactif organique est dès lors permise, pourvu que l'ensemble du nombre des électrons appariés dans ce complexe reste constant (Jones R.D., 1979).
- **Transfert d'électrons libres** : les métaux de transition issus des métallo-enzymes qui activent le dioxygène ont deux états d'oxydation consécutifs disponibles (ex : Fe(II)/Fe(III), Cu(I)/Cu(II)), donc le centre métallique est capable d'effectuer le transfert d'un seul électron avec le dioxygène. L'état fondamental de l'oxygène $^3\text{O}_2$ peut accepter un seul électron pour former un superoxyde radical anion ($\text{O}_2^{\cdot -}$), ceci étant une possibilité d'activation de l'oxygène (Lee-Ruff E., 1977 ; Sawyer D.T., 1981). Cette voie est néanmoins de premier abord défavorable énergétiquement. Cependant, si l'enzyme forme des interactions stabilisantes avec le superoxyde mais pas le dioxygène (ex : interactions électrostatiques ou ponts hydrogène), alors la réaction peut être favorable. L'activation du dioxygène par le superoxyde a été observée dans le cas de l'hémoglobine et dans les complexes EDTA-Fe(III) (Martinez-Torres C., 1979).
- **Réaction avec un substrat radicalaire** : la réaction du dioxygène *via* un mécanisme radicalaire étant un processus spin permis, la réaction radicalaire avec le substrat est une alternative possible comme mécanisme. En effet, ce mécanisme d'activation de ce type de substrat dans les dioxygénases intradiols catécholes propose que la semi-quinone liée au catéchol intermédiaire attaque le dioxygène pour former un hydroperoxyde radicalaire (Figure I.15) (Brigelius R., 1974).

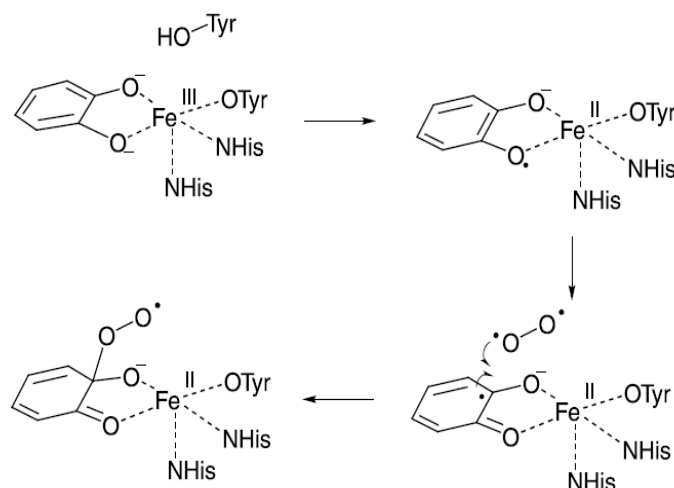


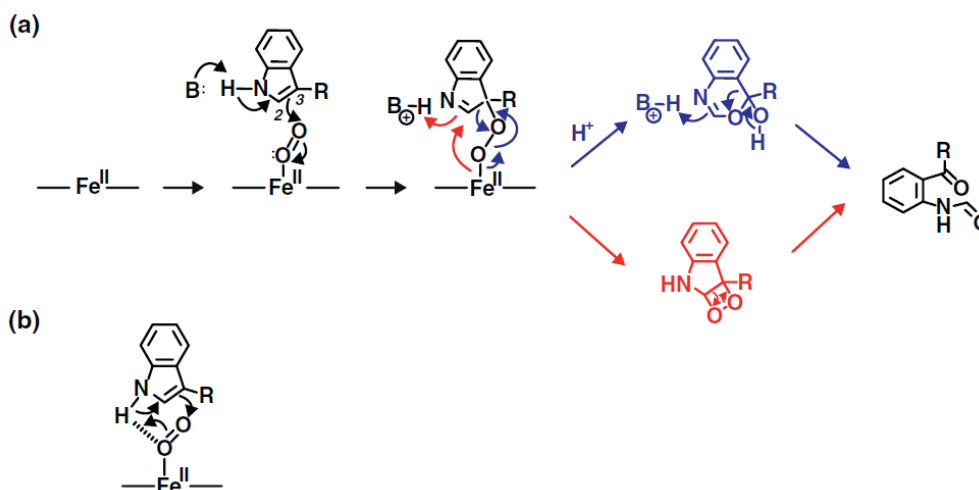
Figure I.15 : Mécanisme d'activation du substrat proposé pour l'intradiol catéchole (Brigelius R., 1974).

5.3 Mécanisme moléculaire

Contrairement aux autres hémoprotéines telles que les oxygénases, les peroxydases, les globines et le cytochrome P450, le mécanisme réactionnel des dioxygénases est encore peu connu (Denisov I.G., 2005 ; Raven E.L., 2001 Sono ; M., 1996). En effet, les structures cristallographiques ne sont résolues que depuis quelques années, les intermédiaires catalytiques n'ont pas encore été identifiés et enfin, le mécanisme réactionnel des dioxygénases est unique et ne ressemble à aucun autre mécanisme de catalyse par des enzymes contenant un hème. Le mécanisme de l'activation de l'oxygène implique inévitablement la liaison d'O₂ au fer de l'hème et la réduction du fer de l'hème est donc requise. Cependant, les dioxygénases sont plus fortement exposées aux auto-oxydations des espèces oxy-ferreuses que leurs homologues globines, ce qui peut signifier que la poursuite de la réduction *in vivo* est nécessaire. La réductase physiologique n'est pas encore totalement élucidée. Dans le cas d'IDO, il a été suggéré que le cytochrome b5 (Maghzal G.T., 2008) remplisse ce rôle *in vivo*, ce qui maintient l'hème réduit de la même manière que dans les hémoglobines. A côté du cytochrome b5, la cytochrome b5 réductase pourrait également être impliquée dans le maintien d'IDO à l'état réduit (Vottero E., 2006). *In vitro*, la plupart des travaux (Littlejohn J.R., 2000 ; Lu C., 2009 ; Sugimoto H., 2006 ; Terentis A.C., 2002) utilisent un mélange réactionnel de bleu de méthylène / ascorbate afin de fournir des équivalents réducteurs, d'autres travaux pour TDO ont utilisé une combinaison NADPH-cytochrome P450 réductase / cytochrome b5 (Pearson J.T., 2010).

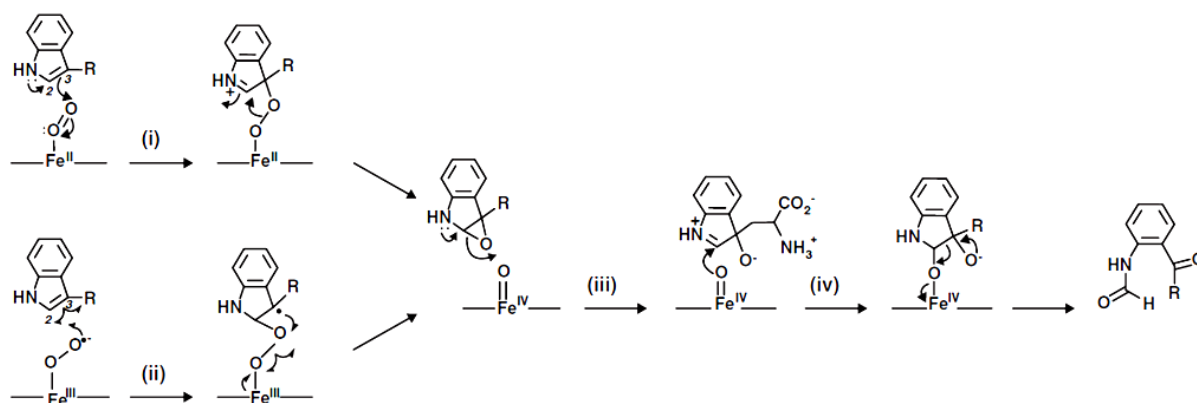
Au départ, la littérature a convergé sur un mécanisme concernant une base catalytique déprotonnant le noyau indole (Schéma I.1a) (Sono M., 1996). Il y avait plusieurs raisons pour croire cela. La présence supposée d'une base dans le site actif (histidine), telle que décrite ci-dessus, était l'une d'elles. Une autre, peut-être plus convaincante, a été l'identification (Cady S.G., 1991) du Me-Trp comme inhibiteur de l'enzyme. Mais l'absence d'un résidu histidine convenablement situé dans l'*hIDO* (Sugimoto H, 2006) a remis en cause ce mécanisme. Un autre mécanisme a donc été envisagé (Forouhar F., 2007 ; Terentis A.C., 2002) qui ne dépend pas d'une base du site actif (Schéma I.1b). En fait, il a été montré (Chauhan N., 2009) que les indoles ne réagissent généralement pas par la perte d'un proton indolique (Joule J.A., 2000), étant donné que le pK_a du proton indolique est très élevé (~ 17 (Yagil G., 1967 ; Weast R.C., 1987)), ce qui rend les deux mécanismes (Schéma 1.1 a et b) problématiques. Ensuite, une étude théorique a apporté une véritable contribution : Chung et ses collègues (Chung L.W., 2008) ont relevé, sur la base de calculs DFT (*Density Functional Theory*), qu'une base catalytique ne peut réaliser une déprotonation du proton indolique car énergiquement, ce n'est pas possible (une conclusion confirmée plus tard dans d'autres calculs) (Capece L., 2010 ; Lewis-Ballester A., 2009). Néanmoins, il a été prouvé que Me-Trp est un substrat qui réagit de la même manière que le L-Trp et donc le schéma I.1 a et b ne sont pas possibles.

Schéma I.1 : (a) Le mécanisme initialement proposé (Hamilton G.A., 1969 ; Sono M., 1996) pour la catalyse par des dioxygénases, montrant une base catalytique déprotonnant l'indole soit par le mécanisme de Criegee (bleu) soit par la voie du dioxétane (rouge). (b) Une proposition d'intermédiaire au cours d'un mécanisme plus récent n'impliquant pas de base (Forouhar F., 2007 ; Sugimoto H., 2006 ; Terentis A.C., 2002).



Des données ENDOR (*Electron-Nuclear Double Resonance*) (Davydov R.M., 2010) soutiennent cette hypothèse parce qu'il est peu probable que le proton indolique se lie à l'O₂ dans le complexe ternaire (enzyme-O₂-Trp), donnant une preuve supplémentaire contre la proposition suggérée dans le schéma I.1 b. L'implication ou non d'une base du site actif, n'a pas encore été entièrement résolue mais les preuves expérimentales (Chauhan N., 2009) et théoriques (Capece L., 2010 ; Chung L.W., 2008 ; Chung L.W., 2010 ; Lewis-Ballester A., 2009) semblent jusqu'à présent plutôt écarter cette possibilité. Le schéma 2.I fait part de mécanismes alternatifs, comme on le verra ci-dessous.

Schéma I.2 : Un mécanisme alternatif qui inclut les plus récentes propositions. La première étape se produit *via* une addition électrophile (i) ou une addition radicalaire (ii). Les suggestions les plus récentes supportent l'addition radicalaire. L'intermédiaire Fe(IV)=O est suivi par la formation d'un époxyde. Ensuite, l'ouverture du cycle (iii) se produit par une réaction hétérolytique formant la *N*-formyl-L-kynurénine (iv) (Millett E.S., 2012).



Après la formation du complexe ternaire, Sono décrit soit un réarrangement de Criegee ou un intermédiaire dioxétane, schéma I.1 a. Les suggestions proviennent de propositions mises en avant en 1969 (Hamilton G.A., 1969), mais la preuve expérimentale de ces deux mécanismes n'a jamais été publiée. A ce jour, le mécanisme proposé, schéma 1.1 a, dicte que les deux atomes d'oxygène sont incorporés au substrat de manière concertée or d'autres études mettent en doute ce mécanisme. En effet, Yeh et ses collègues (Lewis-Ballester A., 2009) ont utilisé la spectroscopie Raman afin d'observer la formation transitoire de l'intermédiaire (Fe(IV)=O) au cours de la réaction de l'*h*IDO avec O_2 , une observation qui a été confirmée récemment encore (Yanagisawa S., 2010a ; Yanagisawa S., 2010b). Cela signifie que le lien O-O est clivé (activé) dans une étape distincte et que l'insertion de l'atome d'oxygène se produit séquentiellement. Des données théoriques (Lewis-Ballester A., 2009) ont à nouveau étayé ces conclusions. Curieusement, l'intermédiaire (Fe(IV)=O) n'a pas été observé avec *h*TDO.

Pour finir, la formation d'un intermédiaire époxyde a été suggérée (Lewis-Ballester A., 2009) (Schéma I.2) pour être concomitante avec la formation de l'intermédiaire (Fe(IV)=O), mais jusqu'à présent la preuve est limitée. Deux études théoriques indépendantes ont été publiées, elles suggèrent la formation d'un époxyde (Chung L.W., 2008 ; Chung L.W., 2010), et il y a des preuves indirectes de sa formation à partir de données de spectrométrie de masse (Basran J., 2011). En effet, cette étude montre l'insertion d'un

seul atome d'oxygène au sein du substrat. Que ce soit pour l'enzyme *hTDO*, *hIDO* ou encore *xcTDO*, la formation de la *N*-formyl-L-kynurénine fournit un pic ($m/z = 237$) mais avant la formation de celle-ci un pic est identifié ($m/z = 221$) qui correspond à la structure d'un amino-acétal cyclique. Si la formation d'époxyde se produit, il n'a pas encore été établi comment la conversion finale en *N*-formyl-L-kynurénine est atteinte. Un mécanisme hétérolytique a été proposé et est montré dans le schéma I.2.

Des similitudes mécanistiques ont été constatées (Efimov I., 2011) avec l'hémoenzyme PrnB O₂-dépendante, la seconde du groupe de quatre enzymes impliquées dans la synthèse du pyrrolnitrine, qui se lie à son substrat d'une manière similaire.

En conclusion, il n'existe pas encore à l'heure actuelle de preuves concernant le mécanisme électrophile ou radicalaire afin d'obtenir l'époxyde. Ensuite, l'ouverture du cycle époxyde (iii) (Schéma I.2) se produit par une réaction hétérolytique formant la *N*-formyl-L-kynurénine (iv) mais le mécanisme de cette réaction n'est pas encore connu.

6. Inhibition de TDO

Avant 1984, peu de choses étaient connues sur l'inhibition des dioxygénases. Une étude de Frieden montrait que la tryptophane 2,3-dioxygénase était inhibée par différents analogues du tryptophane et dérivés phényle (Frieden E., 1961). Ainsi la 2,5-dihydro-L-phénylalanine inhibe IDO (extrait hépatique de rat) ($K_i = 0.23$ mM) et TDO (extrait hépatique de rat) ($K_i = 0.70$ mM) (Watanabe Y., 1978). Par la suite, Eguchi a montré que les premiers inhibiteurs naturels de TDO et IDO sont des dérivés β -carboline extraits de plantes ou d'animaux mais aussi des dérivés indoliques (Tableau I.4).

Tableau I.4 : Inhibition de la tryptophane 2,3-dioxygénase par des dérivés β -carboline, indole et phényl.

Composé (2 mM)		Pourcentage d'inhibition de TDO(%)		
		<i>Pseudomonas</i>	Extrait hépatique de souris	Extrait hépatique de rat
norharmane		29	75	73
tétrahydronorharmane		38 ^b	19 ^b	7 ^b
N-oxyde d'harmine		32 ^b	51 ^b	6 ^b
acide de méthylester d'harmine		61	52	8
Harmine ^a		25	54	47
Harmaline ^a		9	16	8
Harmole ^a		20	26	36
Harmalole ^a		16	34	33
harmane		-29	14	-36
cétotétrahydronorharmine		-21 ^b	-4 ^b	-4 ^b
benzaldéhyde		92	77	77
benzylamine		61	70	77
β-méthylphénéthylamine		61	66	61
L- α -méthylphénéthylamine		-12	-	-
D- α -méthylphénéthylamine		-29	-	-
3-méthylindole	-CH ₃	-21	-	-
indol-3-aldéhyde	-CHO	41	37	66
indol-3-éthanol	-(CH ₂) ₂ -OH	35	77	86
indol-3-acétone	-CH ₂ -CO-CH ₃	43	87	65
indol-3-acétamide	-NH-CO-CH ₃	41	94	92
indol-3-acétonitrile	-CH ₂ -C=N	32	94	91
acide indol-3-acrylique	-CH=CH-COOH	43	98	87
acide indol-3-glyoxylique	-CO-COOH	31	-	-
acide indol-3-acétique	-CH ₂ -COOH	24	10	21

acide indol-3-propionique	$-(\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$	6	34	53
acide indol-3-butylque	$-(\text{CH}_2)_3\text{-COOH}$	5	42	42
acide indol-3-lactique	$-\text{CH}_2\text{-CH(OH)-COOH}$	25	-	-
<i>N</i> - ω -méthyltryptamine	$-(\text{CH}_2)_2\text{-NH-CH}_3$	19	27	53
<i>N,N'</i> -diméthyltryptamine	$-(\text{CH}_2)_2\text{-N(CH}_3)_2$	35	35	29
DL- α -méthyltryptamine	$-\text{CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-NH}_2$	3	-	-

^a Solution aqueuse. Les composés, excepté ceux marqué par ^a, sont dissous dans le méthanol.

^b Concentration en inhibiteur (1 mM).

L'un des dérivés β -carboline, le norharmane est un ligand volumineux qui se lie directement au fer de l'hème des dioxygénases et permet une liaison au sein du site actif *via* son azote sur le cycle à 6. De plus, c'est un inhibiteur potentiellement intéressant car il entre en compétition avec l'oxygène (Figure I.16) (Eguchi N., 1984). On remarque que ce soit de la TDO hépatique ou provenant de *pseudomonas*, les dérivés indoliques sont plus favorables à une inhibition que les β -carboline mis à part le norharmane. Quant aux dérivés phényl, le benzaldéhyde, le banzylamine et le β -méthylphénétylamine présentent une inhibition que ce soit pour l'enzyme hépatique que pour TDO de *pseudomonas*.

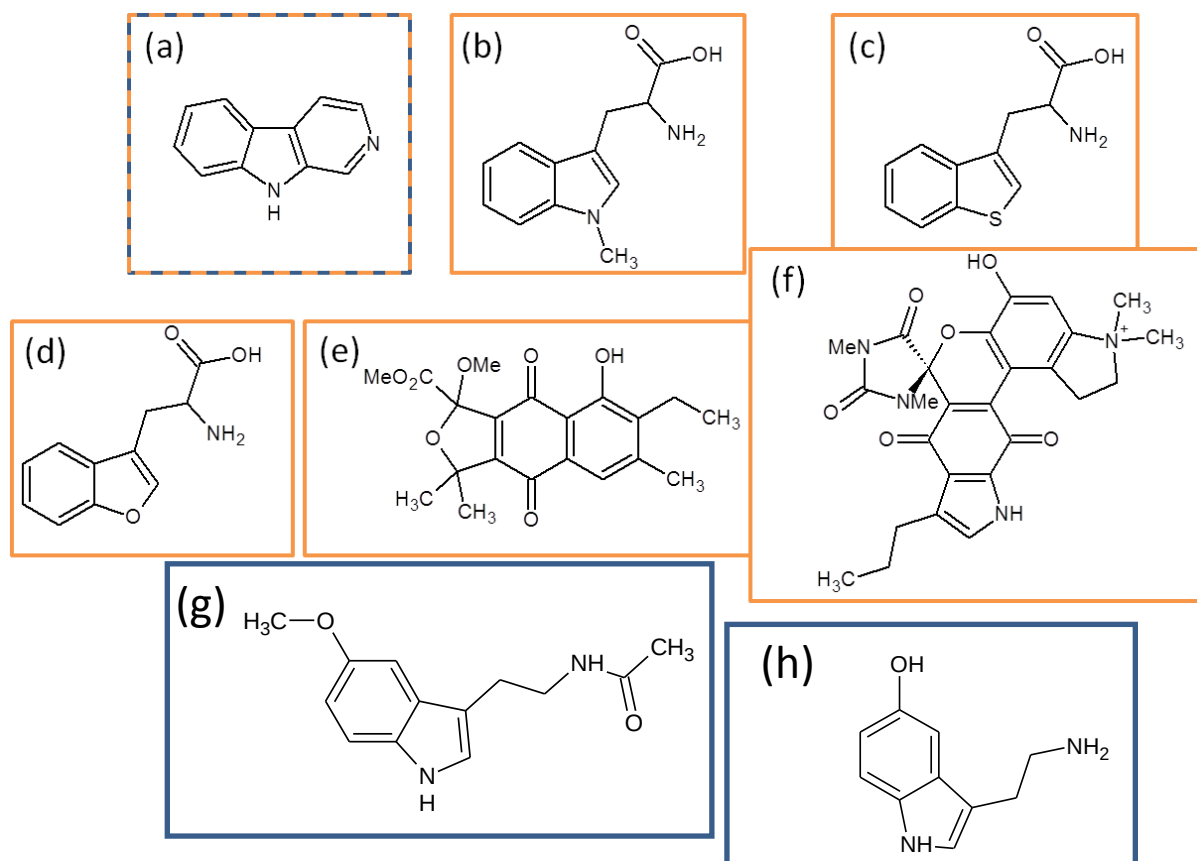


Figure I.16 : Structures de différents inhibiteurs de TDO/IDO : (a) norharmane (Sono M., 1996), (b) 1-méthyl-DL-tryptophane, (c) β -[3-benzo(b)thiényle]-DL-alanine, (d) β -[3-benzofuranyle]-DL-alanine, (e) annuline C, (f) exiguamine A (Eguchi N., 1984) (g) mélatonine et (h) sérotonine (Walsh A., 1997). (Les inhibiteurs d'IDO sont représentés par un encadrement orange et ceux de TDO par un bleu).

Par après, Salter a mis à jour différents inhibiteurs de type indolique dans le cadre de la dépression à savoir : 3-(2-pyridin-2-vinyle)-1H-indole, 3-(2-pyridin-3-vinyle)-1H-indole, 3-(2-pyridin-4-vinyle)-1H-indole, 5-fluoro-3-(2-pyridin-3-vinyle)-1H-indole, 5-fluoro-3-(2-pyridin-4-vinyle)-1H-indole, 6-fluoro-3-(2-pyridin-3-vinyle)-1H-indole et 6-fluoro-3-(2-pyridin-4-vinyle)-1H-indole. De ces études *in vitro*, il ressort un inhibiteur potentiel qui est le fluoroindole 680C91 (Figure I.17) avec un $K_i = 42$ nM pour TDO hépatique de rat (Madge D.J., 1996 ; Salter M., 1995a ; Salter M., 1995b). Cette molécule reste à ce jour le seul inhibiteur de référence de la TDO. Elle a révélé un effet antidépresseur grâce à l'augmentation de la synthèse de la sérotonine. Effectivement, cet inhibiteur réduit le métabolisme du L-Trp et augmente sa concentration dans le sang et dans le cerveau.

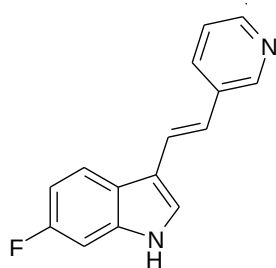


Figure I.17 : Structure de l'inhibiteur de référence, 680C91.

A partir des données ci-dessus et celles représentées au § 1.4, il s'avère que l'inhibition pharmacologique de TDO pourrait combattre la résistance tumorale et promouvoir le rejet immunitaire tumoral. L'inhibiteur de référence, le 680C91, représente donc un composé très intéressant, sélectif de TDO et avec un bon potentiel inhibiteur. À l'origine du projet, nos collaborateurs de l'UCL ont tout d'abord testé la biodisponibilité de cette molécule par voie orale sur souris. Néanmoins, ce composé présentait une faible biodisponibilité orale probablement due en partie à une faible solubilité (Van den Eynde B., 2010 ; Pilotte L., 2012 ; Young S.N., 1986).

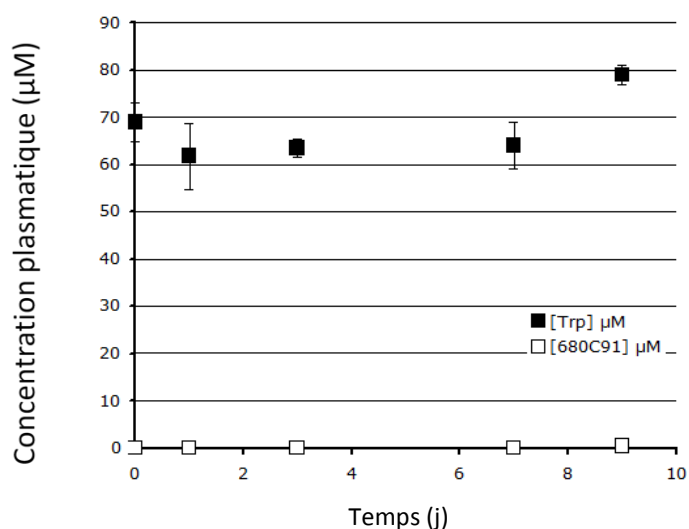


Figure I.18 : Dosage plasmatique du L-Trp et du 680C91 (0.5 mg dans l'eau de boisson des souris).

À partir de ces données, de nouvelles synthèses sur base de ce composé ont été envisagées lors de cette thèse afin d'améliorer la solubilité et la biodisponibilité, tout en maintenant l'activité inhibitrice de TDO.

Au vu de ces différents paragraphes, on constate qu'il reste encore pas mal d'inconnues au niveau de notre cible, TDO. En effet, il existe un faible nombre d'inhibiteurs

connus ainsi que peu de structures cristallographiques disponibles et pour finir, l'imprécision sur son mécanisme de réaction renforce l'intérêt d'étudier cette protéine.

OBJECTIFS ET STRATEGIE

II. Objectifs et stratégie

L'immunothérapie est une stratégie prometteuse dans le traitement du cancer. Cette méthode vise à stimuler le système immunitaire afin qu'il reconnaisse et détruise spécifiquement les cellules tumorales. Pourtant, *in vivo*, les cellules cancéreuses sont capables de développer des mécanismes permettant aux tumeurs de résister et d'échapper au système immunitaire. Parmi ces mécanismes, deux enzymes en sont des acteurs essentiels : l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) (Batabayal D., 2007 ; Uyttenhove C., 2003 ; Van den Eynde B., 2010). Ces enzymes catalysent la dégradation d'un acide aminé essentiel, le L-tryptophane (L-Trp) en *N*-formyl-L-kynurénine pour former ensuite différentes molécules physiologiquement actives (Figure II.1). Ceci résulte en une diminution locale de la concentration en L-Trp qui affecte de manière importante la prolifération des lymphocytes T. L'activité d'IDO et de TDO est donc particulièrement immunosuppressive ce qui en fait des cibles thérapeutiques de choix pour le traitement du cancer. A ce jour, seul un petit nombre de composés que ce soit de type indole ou β -carboline possèdent une activité inhibitrice sur TDO (Eguchi N., 1984 ; Kanai M., 2009 ; Yue E.W., 2009). Parmi eux, le fluoroindole 680C91 (Salter M., 1995) a été mis en évidence dans le cadre de la thérapie contre la dépression pour son activité inhibitrice sur TDO. Il est caractérisé par un squelette de type 3-(2-pyridin-3-yl)vinyl-indole et présente une forte affinité pour TDO ($K_i \sim 42$ nM sur extrait brut de TDO hépatique de rat) (Salter M., 1995 ; Madge D.G., 1996). Il est un des seuls composés de référence connu jusqu'à présent. Par contre, *in vivo*, il présente une faible biodisponibilité orale probablement due en partie à une faible solubilité (Pilotte L., 2012 ; Van den Eynde B., 2010 ; Young S.N., 1986).

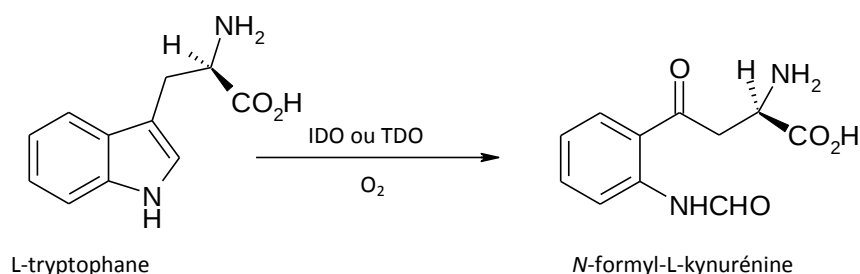


Figure II.1 : Oxydation du substrat, le L-Trp, pour former le produit, *N*-formyl-L-kynurénine, catalysée par IDO ou TDO.

Ce projet, financé par le Télévie (FNRS grant 7.4.543.07) et mené en collaboration avec les équipes des Professeurs Benoît Van Den Eynde (LICR, UCL), Jean-Marie Frère et Moreno Galleni (CIP, ULg), a pour but de concevoir de nouveaux inhibiteurs spécifiques de TDO et de caractériser leur mode d'interaction avec l'enzyme en utilisant une approche théorique et expérimentale (Figure II.2).

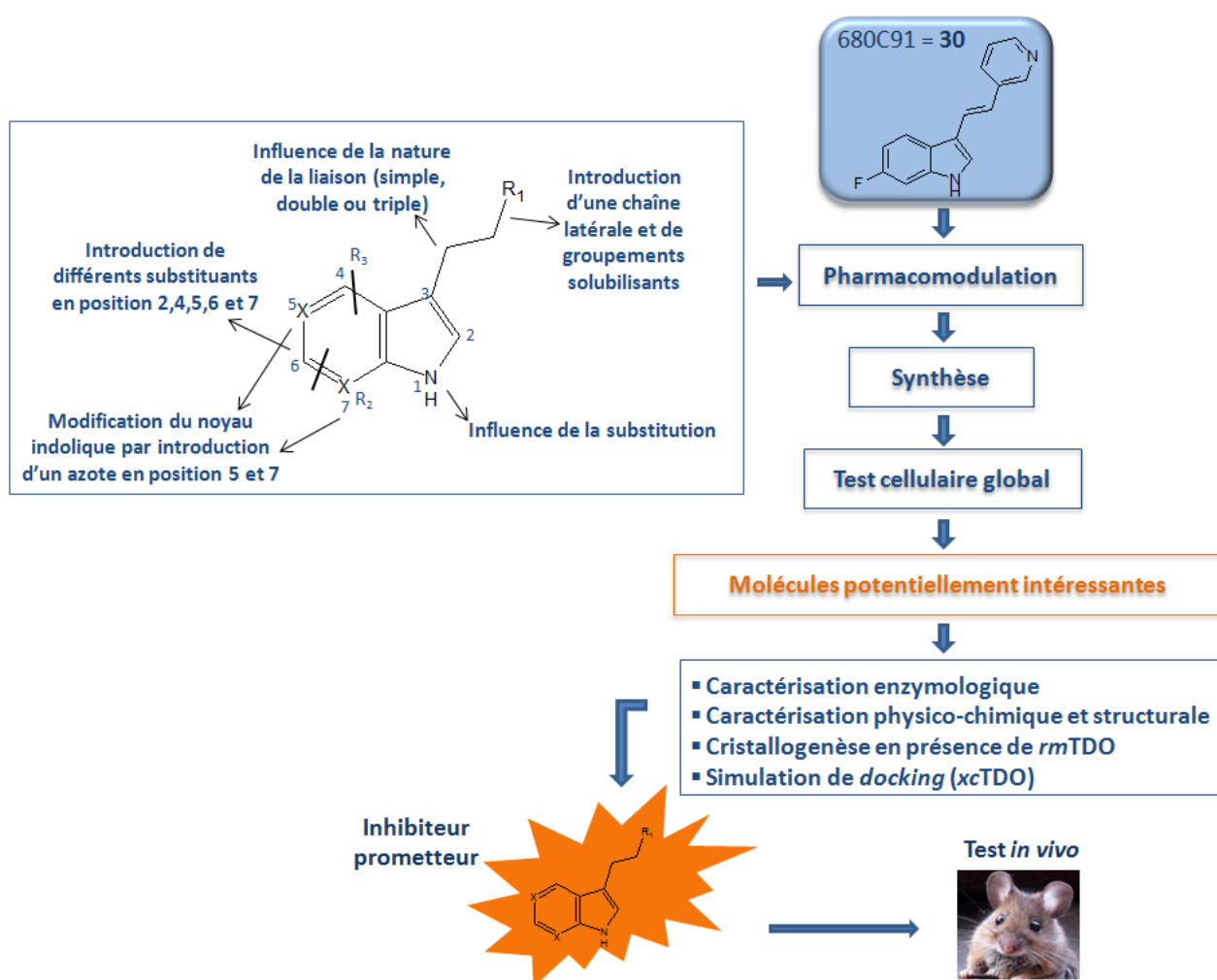


Figure II.2 : Représentation schématique de la stratégie abordée lors de ce travail.

Pour ce faire, la conception de nouveaux inhibiteurs plus hydrosolubles a été envisagée à partir du composé de référence, le 680C91. Ces molécules ont été synthétisées avec la participation de nos collaborateurs du NAMEDIC (Namur Medicine and Drug Innovation Center). L'enzyme n'étant pas encore disponible, les composés synthétisés ont d'abord été testés *via* un test cellulaire global (réalisé par l'UCL) qui a permis d'identifier les molécules prometteuses et d'établir des relations structures-activités.

Une fois ces molécules identifiées et l'enzyme *hTDO* purifiée (fournie par l'ULg) et disponible, les molécules les plus actives dans le test cellulaire ont été testées sur enzyme isolée pour vérifier leur comportement éventuel en tant que substrat. En effet, ces composés possèdent une structure similaire au L-Trp, il est donc intéressant de savoir si elles ne sont pas substrat de l'enzyme. Dans un second temps, le K_i et le mode d'inhibition de ces molécules ont été évalués. Par après, la caractérisation physico-chimique a fourni différentes propriétés à savoir le pK_a , la solubilité et la stabilité. Enfin, l'étude enzymatique sur *hIDO* a pu mettre en évidence la sélectivité de ces inhibiteurs.

Une fois les inhibiteurs caractérisés, il s'est avéré intéressant de les cristalliser en présence de l'enzyme afin de mieux comprendre les interactions qui se produisent au sein du site actif de cette dernière. L'enzyme humaine a été étudiée à l'ULg donc nous n'allions pas l'étudier également et nous n'avons pas pu obtenir le plasmide de *xcTDO*. Par contre, nous avons à notre disposition le plasmide codant pour la protéine *rmTDO* qui a déjà cristallisé seule (Zhang Y., 2007). Nous avons donc produit et purifié cette enzyme afin d'atteindre une pureté suffisante de manière à réaliser des essais de cristallogénèse. Lorsque l'enzyme fut suffisamment pure, sa caractérisation nous a permis de mieux appréhender ses propriétés telles que son activité, son K_m et sa stabilité. Enfin, les tests de cristallogénèses ont été réalisés en présence d'enzyme seule (de manière à réaliser du soaking) ou en complexe avec l'inhibiteur de manière à mieux comprendre les interactions au sein du site actif. La cristallisation des composés seuls a également été envisagée de manière à mieux comprendre leur agencement dans l'espace ainsi que leurs interactions au sein du packing en vue de comparer ces dernières à celles qui se trouvent dans le site catalytique de l'enzyme. En parallèle, une étude théorique de modélisation moléculaire a été réalisée sur *xcTDO* étant donné que cette dernière possède le plus d'identité avec l'enzyme humaine. Cette étude a permis de comprendre les différentes interactions entre l'inhibiteur et le site actif de l'enzyme. Ces résultats pourront être mis en relation avec de potentiels cristaux d'enzyme en complexe avec l'inhibiteur.

L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence l'inhibiteur le plus prometteur d'un point de vue inhibition mais également d'un point de vue pharmacologique. Ce dernier a été quant à lui étudié *in vivo* avec la collaboration de l'équipe du professeur Benoît Van Den Eynde.

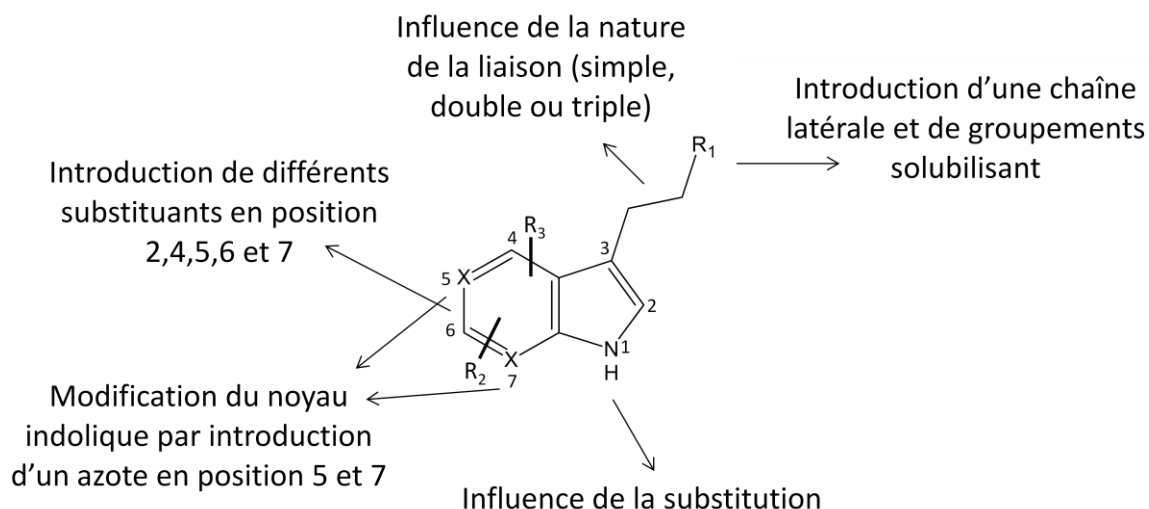
RESULTATS

III. Résultats

1. Synthèses des composés indoliques

Notre point de départ est le 680C91=**30** qui a montré son efficacité *in vitro* sur l'enzyme TDO mais qui par contre possède une faible biodisponibilité *in vivo* ce qui est probablement dû à une faible solubilité (voir chapitre I. § 6). Sur base de l'étude cristallographique (voir chapitre I. § 4.2.1) et l'étude de docking (voir chapitre III. § 3.3), différentes pharmacomodulations sont envisagées telles que la modification du noyau indolique par l'introduction d'un azote en position 5 et 7, l'introduction de divers substituants en position 2, 4, 5, 6 et 7 (R_2, R_3), l'étude de l'influence de la substitution en NH, l'influence de la nature de la liaison de la chaîne latérale et enfin l'introduction d'une chaîne latérale et de groupements solubilisant en R_1 (Schéma III.1). Bien que la région du site actif de l'hème soit exposée au solvant lorsque l'enzyme est seule, celle-ci est complètement protégée du solvant lorsque l'enzyme forme un complexe avec le substrat suggérant que le ligand potentiel pourrait masquer l'effet du solvant lors de la liaison. Etant donné qu'un des objectifs de ce travail est l'amélioration de la biodisponibilité du composé de référence 680C91 (**30**), il est envisagé d'introduire un groupement solubilisant qui puisse à la fois être reconnu par TDO et permette une meilleure solubilisation tout en étant enfoncé dans la poche catalytique de l'enzyme.

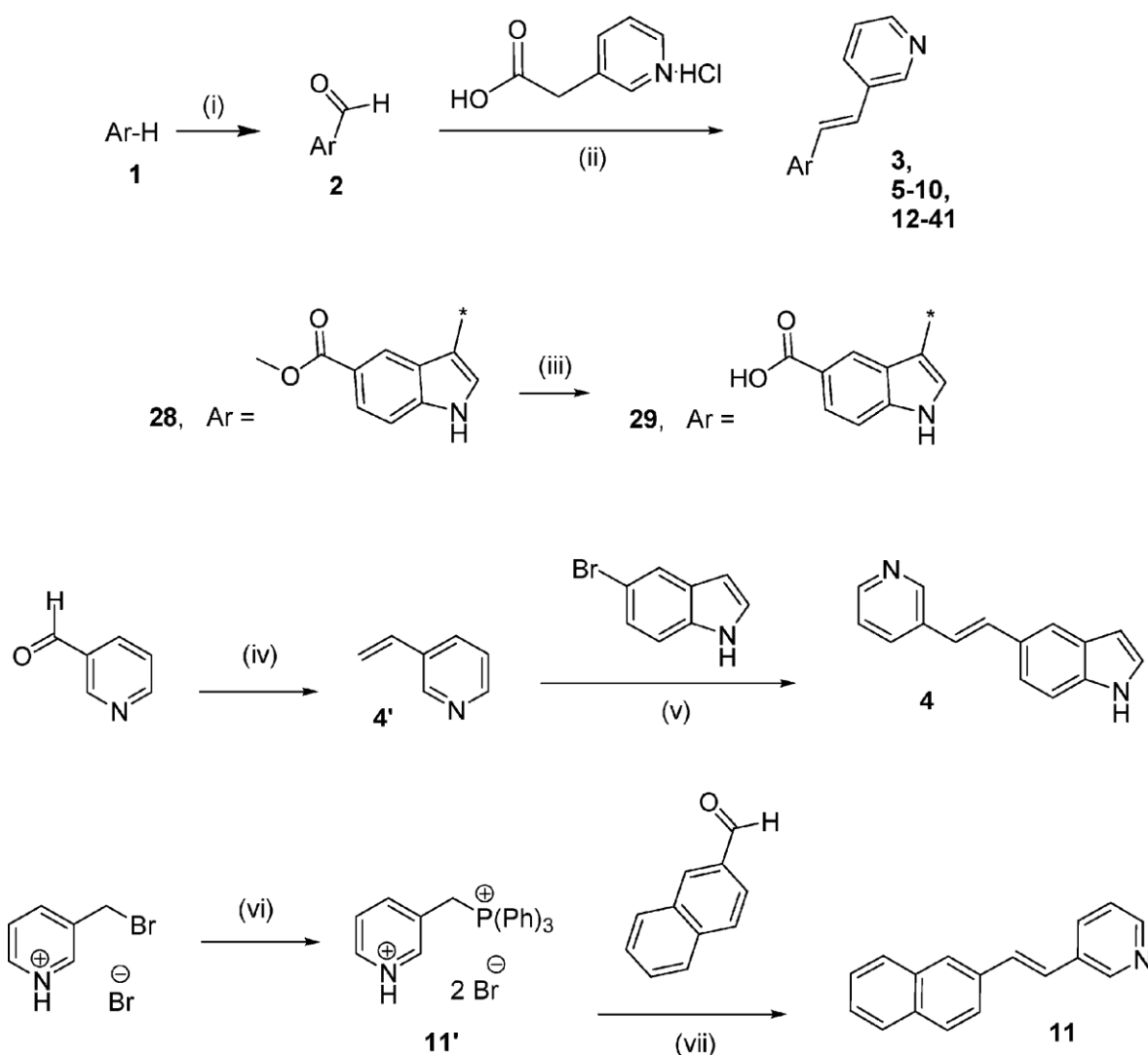
Schéma III.1 : Représentation schématique des différentes pharmacomodulations effectuées autour de l'inhibiteur de référence.



La synthèse de ces composés est le résultat d'un effort collaboratif au sein du NAMEDIC (Dolušić E., 2011c). Dans ce contexte, je me suis principalement concentrée sur la synthèse d'analogues du composé de référence (680C91) tels que les composés (**4**, **5**, **6** et **7**) mais également à différents composés dont la chaîne latérale a été modifiée en position 2 et 3 de l'indole (**52**, **53**, **54**, **55**, **56**, **58**, **65** et **66**). Pour l'étude biologique et structurale de certains composés, de grandes quantités d'inhibiteurs (~10-15 g) ont été préparées. J'ai ainsi synthétisé en grande quantité le composé **58** et en partie le composé **61**.

Tout d'abord, les pharmacomodulations ont porté sur le remplacement du noyau indolique du composé **30** tout en gardant la chaîne latérale vinylpyridin-3-yle. De plus, afin de préserver le pont H formé entre le groupement NH de l'indole et l'His55 (Dolušić E., 2011c), des hétéroatomes ont été introduit pour permettre l'élaboration de ponts H. Des composés tels que le 5- ou le 7-azaindole, l'indazole, 1H benzo[g]indole, l'imidazole ou le phénylpyrazole ont été choisis. La plupart des analogues (**3-41**) du composé de référence (680C91=**30**) sont préparés par la même voie de synthèse générale (Schéma III.2) (Madge D.G., 1996).

Schéma III.2: Schéma de synthèse des 2-(pyridin-3-yl) vinyl arènes^a.

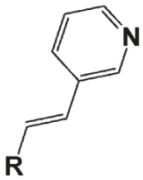


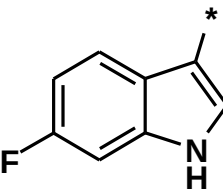
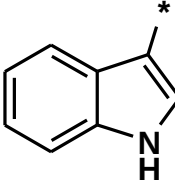
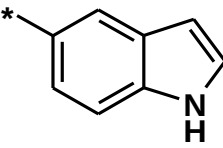
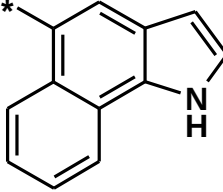
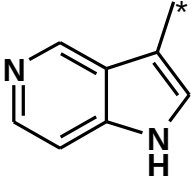
^a Réactifs et conditions: (i) POCl₃/DMF, 0°C à T° amb, 18 h, ensuite ajout de NaOH 2 M aq, 0°C à T° amb, 2 h ; (ii) pipéridine, Et₃N, 1,4-dioxane, à reflux (18 h - 5 jours) (Frieden E., 1961) ou pipéridine, Et₃N, MeOH ou 1,4-dioxane, micro-onde (1-12h), 8-96 % ; (iii) NaOH 2 M aq, MeOH/THF, 60°C, 3 h, 65 % ; (iv) TMSCHN₂, i-PrOH, Ph₃P, (1,3-diméthyl-2,3-dihydro-1H-imidazol-2-yl)chlorure de cuivre (II), 60°C, 24 h, 30 % ; (v) Pd(OAc)₂, Ph₃P, (i-Pr)₂NH, NMP, 140°C, 18 h, 17 % ; (vi) Ph₃P, CH₃CN, à reflux 7 h, quantitative ; (vii) NaH, THF, T° amb, 30 min., 69 % d'un mélange 1:1 E/Z.

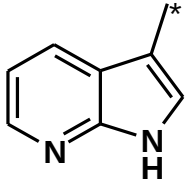
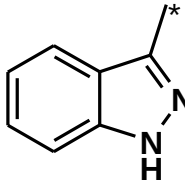
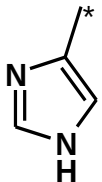
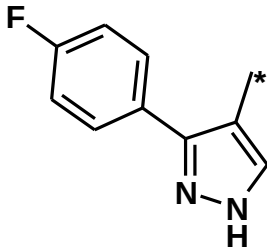
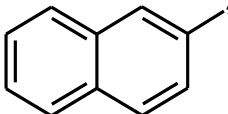
Le chlorure de l'acide 2-(pyridin-3-yl) acétique est condensé avec un carbaldéhyde aromatique approprié **2** dans les conditions de décarboxylation de Knoevenagel que ce soit par chauffage conventionnel ou par micro-ondes. Dans tous les cas, seul le *E*-alcène est isolé comme produit final. Si le carbaldéhyde nécessaire à la réaction n'est pas disponible commercialement, ce dernier est préparé par une formylation de Vilsmeier-Haack à partir d'un hétérocycle similaire **1**. Seul le 5-azaindole carbaldéhyde utilisé dans la synthèse du composé **6** fait exception. Ce réactif a été produit à partir du 5-azaindole commercial

utilisant la synthèse décrite dans la littérature (Lefoix M., 2005). L'acide indolique **29** a été préparé par saponification de l'ester **28**. Le régioisomère indolique **4** provient d'une réaction de Heck-Mizoroki du 5-bromoindole avec la 3-vinylpyridine **4'**, cette dernière étant synthétisée à partir du nicotinaldéhyde selon la littérature (Lebel H., 2007). L'analogue naphtalénique **11** a été préparé avec une quantité équimolaire d'isomère Z, selon le protocole de Wittig à partir du bromure de 3-(bromométhyl)-pyridine (Gromov S.P., 2005) et de 2-naphtaldéhyde. Les différentes molécules obtenues ainsi que leurs rendements sont repris dans le tableau III.1 suivant.

Tableau III.1 : Structure et rendement des molécules synthétisées apparentées au 680C91.

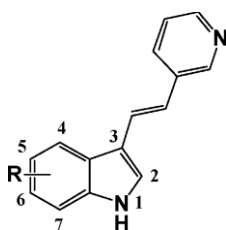


Composé	R	Rendement
680C91 = 30		88 %
3		86 %
4		17 %
5		76 %
6		99 %

7		45 %
8		33 %
9		29 %
10		40 %
11		35 %

La substitution autour du noyau indolique a alors été envisagée sur les positions 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7. Ces modifications ont pour but d'identifier le groupement le plus affiné et sa position optimale sur le noyau indolique. Les composés 13 et 14 ont été synthétisés selon le schéma III.2. Les structures et les rendements obtenus sont repris dans le tableau III.2 ci-dessous.

Tableau III.2 : Structures et rendements des 3-(pyridin-3-yl vinyl) indoles synthétisés.

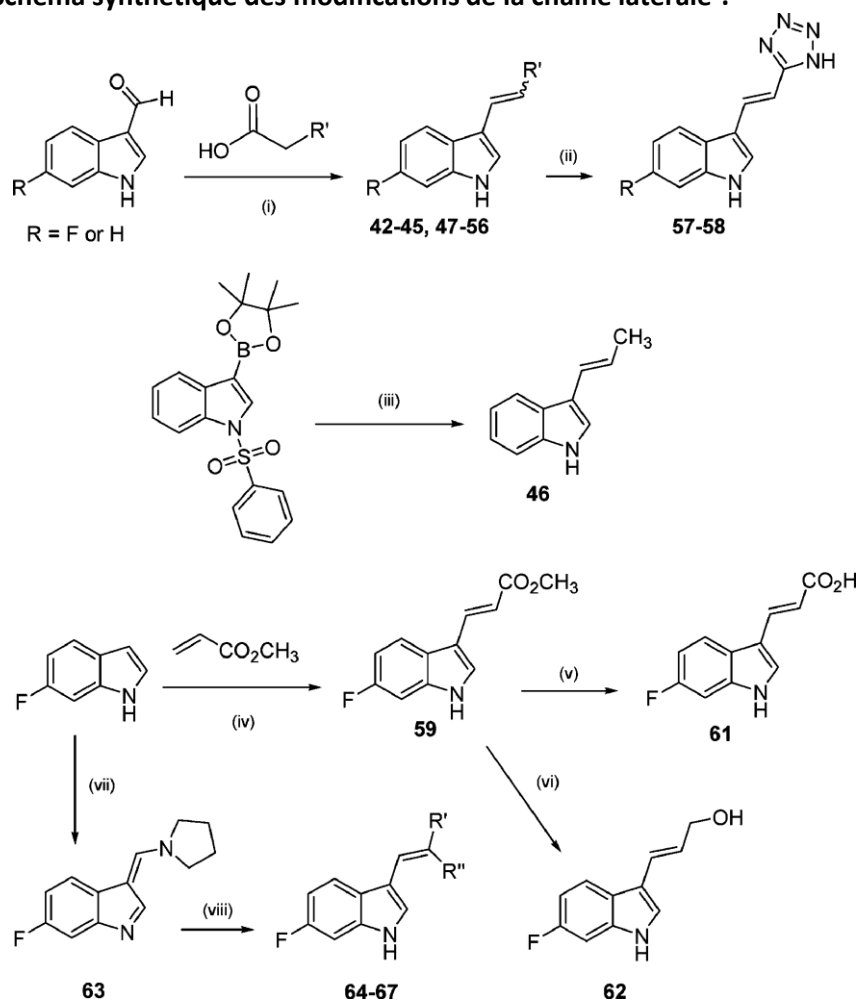


Composé	R	Rendement
12	1- <i>N</i> -Me,6-F	41 %
13	2-Me	87 %
14	2-Phényl	58 %
15	4-F	24 %
16	4-Cl	63 %
17	4-Br	41 %
18	4-CN	78 %
19	4-NO ₂	8 %
20	4-COOMe	70 %
21	5-F	43 %
22	5-Cl	44 %
23	5-Br	94 %
24	5-Me	93 %
25	5-OMe	95 %
26	5-CN	72 %
27	5-NO ₂	50 %
28	5-COOMe	21 %
29	5-COOH	65 %
30	6-F	96 %
31	6-Cl	31 %
32	6-Br	61 %
33	6-Me	94 %
34	6-OMe	9 %
35	6-OH	8 %
36	6-COOMe	76 %
37	7-F	56 %
38	7-Cl	28 %
39	7-Br	63 %
40	7-Me	97 %
41	7-MeO	80%

Ensuite, le remplacement du noyau pyridyle latéral a été envisagé. Cette pharmacomodulation a pour but, d'une part, d'évaluer l'importance de la chaîne latérale pyridin-3-yle et d'autre part, de tenter d'améliorer la solubilité du composé tout en conservant les interactions avec le site actif de TDO.

Les composés **42-45** et **47-56**, possèdent une chaîne latérale modifiée. Ils sont synthétisés à partir de l'indol-3-carbaldéhyde substitué de manière appropriée en suivant la même stratégie que pour la synthèse des analogues du pyridin-3-yle ci-dessus. Et ce en utilisant l'aldéhyde commercialement disponible et l'acide acétique correctement substitué (Schéma III.3).

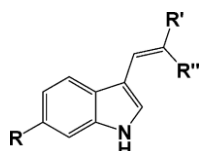
Schéma III.3: Schéma synthétique des modifications de la chaîne latérale^a.



^a Réactifs et conditions: (i) pipéridine, Et₃N, 1,4-dioxane, à reflux (24-48 h) ou pipéridine, Et₃N, MeOH, micro-onde, 150°C (4-12h), 25-94 % ; (ii) AlCl₃/NaN₃, THF, à reflux, 2 h, ensuite ajout du composé *E*-**55** ou *E*-**56**, à reflux, 18 h, 54 % ; (iii) (E)-1-bromoprop-1-ène, Pd(PPh₃), Na₂CO₃ aq., toluène, micro-onde (120°C), 30 min., ensuite ajout de KOH, H₂O/MeOH, à reflux, 18h, 54 % ; (iv) Pd(OAc)₂, Cu(OAc)₂, DMF/DMSO 9/1, 70°C, 18 h, 79 % ; (v) H₂O/MeOH, à reflux, 1h, 82 % ; (vi) DIBAL, toluène, -78°C, 30 min., 37 % ; (vii) POCl₃/DMF, 0°C à T° amb, 18 h, ensuite ajout de 2 M NaOH aq, 0°C à T° amb, 2 h, ensuite ajout de pyrrolidine, toluène, à reflux, 2.5 h, 98 % ; (viii) RCH₂R', Et₃N, EtOH, T° amb, 19 h, 81 %.

L'ensemble de ces dérivés synthétisés est repris dans le tableau III.3, ci-dessous.

Tableau III.3 : Dérivés indoliques potentiellement inhibiteurs de TDO avec différentes chaînes latérales en position 3.



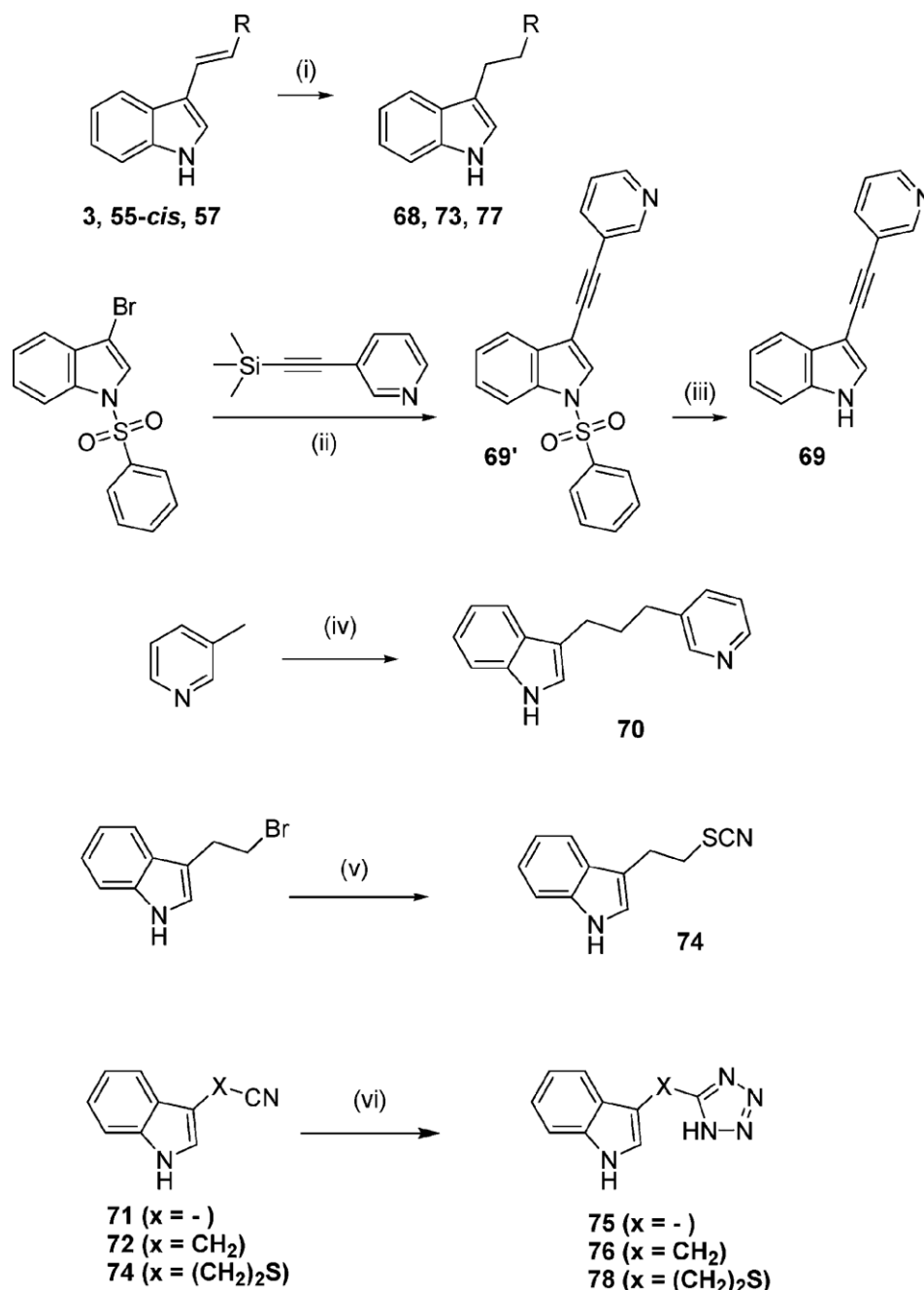
Composé	R	R'	R''	Rendement
30	6-F	pyridin-3-yle	H	96 %
42	H	pyridin-2-yle	H	41 %
43	6-F	pyridin-2-yle	H	70 %
44	H	pyridin-4-yle	H	29 %
45	6-F	pyridin-4-yle	H	25 %
46	H	CH ₃	H	54 %
47	6-F	phényle	H	53 %
48	6-F	naphth-2-yle	H	88 %
49	6-F	3-F-phényle	H	94 %
50	6-F	3-Cl-phényle	H	82 %
51	6-F	3-Br-phényle	H	84 %
52	6-F	3-OMe-phényle	H	32 %
53	6-F	3-CN-phényle	H	59 %
54	6-F	3-NO ₂ -phényle	H	88 %
E-55	H	CN	H	24 %
E-56	6-F	CN	H	37 %
57	H	tétrazole	H	14 %
58	6-F	tétrazole	H	25 %
59	6-F	COOMe	H	64 %
60	H	COOH	H	79 %
61	6-F	COOH	H	82 %
62	6-F	CH ₂ OH	H	37 %
64	6-F	phényle	CN	3 %
65	6-F	COOEt	CN	96 %
66	6-F	COOH	CN	81 %
67	6-F	COOH	COOH	18 %

Lors des synthèses des acrylonitriles **55** et **56**, les deux isomères majoritaires sont de type *E* tandis que les deux minoritaires de type *Z*. Ils peuvent être isolés dans un ratio

moléculaire variant de 2:1 à 3:1. Dans le cas du dérivé phényle **47**, la synthèse au four à micro-ondes, requiert une réaction dans le dioxane, sinon, le produit est obtenu dans un mélange inséparable avec une quantité significative (approximativement 1/3 moléculaire) de méthyl-3-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)-2-phénylacrylate. Les tétrazoles **57** et **58** sont obtenus par des cycloadditions [3+2] des acrylonitriles indoliques *E*-**55** et *E*-**56** avec l'azoture d'aluminium préparé *in situ* comme décrit dans la littérature (Juby P.F, 1969; Vereschagin L.I., 2006). Le propényle indolique **46** a été réalisé par un rapide couplage de Suzuki suivi d'une déprotection de l'azote. L'ester acrylique indolique **59** a été obtenu par une alcénylation régiosélective directe de Gaunt (Grimster N.P., 2005) du 6-fluoro-1H-indole avec l'acrylate de méthyle. La saponification de l'ester **59** donne l'acide **61**, tandis que le traitement du même composé de départ avec de l'hydrure de diisobutyle d'aluminium (DIBAL) produit un alcool allylique **62**. L'intermédiaire **63**, le pyrrolidinylméthylène-3H-indole, est préparé à partir du 6-fluoroindole par une formylation de Vilsmeier-Haack suivie par une condensation de la fonction aldéhyde. Cet intermédiaire est converti en éthylène tri-substitués (**64-67**) *via* le protocole décrit dans la littérature (Moriya T., 1980).

Finalement, la nature du lien entre l'indole et la chaîne latérale a été modifiée. Cette analyse a été réalisée en présence d'un indole non substitué et de groupements s'avérant intéressant en bout de chaîne latérale, à savoir le pyridin-3-yle, le tétrazole et le nitrile. La liaison simple des composés **68**, **73** et **77** est préparée au départ de l'alcène correspondant par hydrogénation catalytique en présence de Pd/C (Schéma III.3).

Schéma III.3: Schéma de synthèse des indoles avec un lien variable en position 3^a.



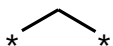
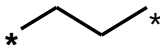
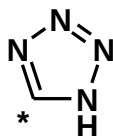
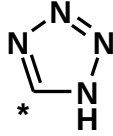
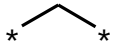
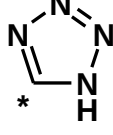
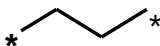
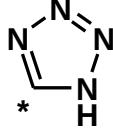
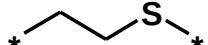
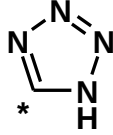
^aRéactifs et conditions : (i) H₂ (1 atm), 3 % Pd/C, EtOH/THF, T°amb, 24 h à 3 jours, 36-92 % ; (ii) Pd(OAc)₂, NaOAc, PPh₃, (n-Hex)₄NCl, DMF, micro-onde, 100°C, 15 min., 62 % ; (iii) sat. NaHCO₃ aq., MeOH, 60°C, 72 h, 93 % ; (iv) LDA, THF/hexanes, -78°C à 0°C, 1 h, ensuite ajout de 3-(2-bromoéthyle)-1H-indole, THF/hexanes, 0°C à T°amb, 20 h, 75 % ; (v) KSCN, (n-Bu)₄NBr, THF, à reflux, 24 h, quantitative ; (vi) AlCl₃, NaN₃, THF, à reflux, 2 h, ensuite ajout du composé **71** ou **72**, à reflux, 21 h, 66-67 % ou NaN₃/ZnBr₂, i-PrOH/H₂O, à reflux, 6 h, 70 %, en 2 étapes.

L'alcyne **69** est obtenu à partir du 3-bromoindole ayant son azote protégé réagissant avec la 3-(triméthylsilyl)éthynylpyridine *via* un couplage de type Sonogashira sans cuivre (Sørensen U.S, 2005). Cette réaction fut réalisée en présence de chlorure de tétrahexyle d'ammonium agissant comme agent clivant le groupe triméthylsilyle, pour donner l'alcyne *N*-protégé **69'** en une seule opération. La déprotection de l'azote du noyau indolique en condition basique fournit le produit final attendu avec un rendement satisfaisant. Le dérivé **70** contenant un « *spacer* » de type propyle est synthétisé par une substitution nucléophile d'un carbène préparé *in situ* à partir de la 3-picolidine (Dolušić E., 2011a; Dolušić E., 2011b; Sundberg R.G., 1978) sur un bromure d'alkyle. Le thiocyanate **74** est obtenu par une autre attaque nucléophile sur ce même bromure d'alkyle et est successivement converti (Sureshbabu V.V., 2011) en sulfure de tétrazole **78**. Deux tétrazoles supplémentaires **75** et **76** avec une chaîne carbonée de longueur variable et qui sont les analogues respectifs des composés **57** et **58**, ont été réalisés à partir des nitriles commerciaux, les composés **71** et **72**.

L'ensemble de ces dérivés synthétisés est repris dans le tableau III.4, ci-dessous.

Tableau III.4 : Structures et rendements d'indoles avec différents liens en position 3.

Composé	X	R	Rendement
68			92 %
69			62 %
70			75 %
E-55		CN	47 %
Z-55		CN	24 %

71		CN	/ ^a
72		CN	/ ^a
73		CN	91 %
74		CN	huile
57			25 %
75			79 %
76			67 %
77			36 %
78			73 %

^a Produits commerciaux.

L'ensemble de ces composés a été obtenus en quantité suffisante afin de les tester dans un test cellulaire de manière à identifier les molécules les plus actives.

2. Activité biologique

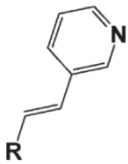
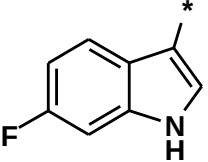
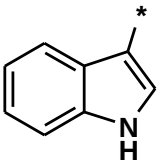
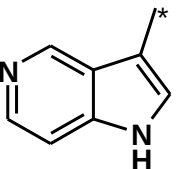
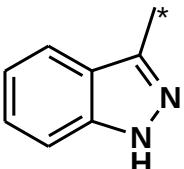
Les inhibiteurs vont être testés sur leur capacité à inhiber la dégradation du L-Trp et la production de kynurénine va être évaluée dans les cellules murines de TDO (*mTDO*). Le test est réalisé dans des plaques multi-puits où 2×10^5 cellules sontensemencées. Tout d'abord, les composés indoliques sont évalués après une nuit d'incubation avec des cellules à 37°C dans une solution de HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) avec 80 μ M en L-Trp et 2, 20 ou 200 μ M du composé étudié. Les plaques sont ensuite centrifugées et le surnageant est analysé par HPLC pour mesurer la concentration résiduelle en L-Trp et en kynurénine

produite. Ces données sont exprimées en pourcentage de valeurs obtenues en l'absence d'inhibiteur (Dolušić E., 2011c).

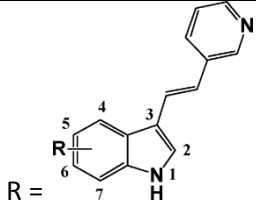
2.1 Relations structures-activités

Les premières pharmacomodulations consistaient à remplacer le noyau indole du composé 680C91=**30** tout en gardant la chaîne latérale 3-vinylpyridine. De plus, afin de préserver le pont H potentiellement formé entre le groupement NH de l'indole et l'His55 pour les raisons évoquées (voir chapitre I. § 4.2.1), des groupements hétérotamiques donneurs de pont H sont privilégiés. En particulier, le 5- ou le 7-azaïndole, l'indazole, 1H benzo[*g*]indole, l'imidazole ou le phénylpyrazole ont été choisis. La première observation indique que si l'on remplace le fluor en position 6 du composé **30** par un hydrogène, on obtient un IC₅₀ identique, de 1 µM. Ensuite, mis à part 7-azaïndole **7** qui possède un IC₅₀ de 18 µM, les autres tentatives de remplacement n'aboutissent pas à une inhibition intéressante. De façon surprenante, même le remplacement de l'indole par le 5-azaïndole **6** ou l'indazole **8** supprime l'activité (Tableau III.5), ce qui met en évidence l'importance de la présence du noyau indolique.

Tableau III.5 : Données biologiques et physico-chimiques de quelques inhibiteurs potentiels de *mTDO*.

Composé	* = 	<i>mTDO</i> ¹ IC ₅₀ (μM)	LD ₅₀ ¹ (μM)	Donnée calculée ²	
				Log D _{7.4}	Solubilité (mg/mL)
30		1	>80	3.73	0.065
3		1	>80	3.53	0.21
6		>200	>80	1.42	13.7
7		18	>80	1.92	1.74
8		>200	>80	2.82	0.20

¹ Valeurs obtenues sur cellules transfectées avec *mTDO*, ²ACD/Designer, 2010

Composé	 R =	<i>m</i> TDO ¹ IC ₅₀ (μM)	LD ₅₀ ¹ (μM)	Donnée calculée ²	
				Log D _{7.4}	Solubilité (mg/mL)
13	2-Me	>200	>200	3.57	0.14
14	2-phényle	>200	>200	4.27	0.014
16	4-Cl	>40	40-80	4.2	0.042
17	4-Br	>200	>200	4.29	0.053
19	4-NO ₂	>200	>200	3.27	0.071
20	4-COOMe	>200	>200	3.48	0.13
22	5-Cl	20	>80	4.03	0.048
23	5-Br	40	20-40	3.73	0.083
27	5- NO ₂	>200	>200	3.46	0.061
28	5-COOMe	>200	>200	3.52	0.13
29	5-COOH	>200	>200	0.13	21.3
30	6-F	1	>80	3.73	0.065
31	6-Cl	20	>40	4.35	0.037
32	6-Br	>200	>200	4.36	0.049
34	6-MeO	>200	>200	3.02	0.25
35	6-OH	>200	>200	2.89	0.54
36	6-COOMe	>200	>200	3.48	0.13
38	7-Cl	>200	>200	3.71	0.064
39	7-Br	>20	>20	4.29	0.052
41	7-MeO	>200	>200	3.52	0.16

¹ Valeurs obtenues sur cellules transfectées avec *m*TDO, ²ACD/Designer, 2010

Deuxièmement, la substitution autour du noyau indolique a été investiguée. Comme décrit ci-dessus, le fait de remplacer le fluor en position 6 par un hydrogène ne modifie pas l'activité inhibitrice du composé **30**. Par contre, la méthylation de l'azote de l'indole (**12**) supprime complètement le pouvoir inhibiteur du composé. Cette observation confirme l'importance d'un pont H entre l'His55 et le NH de l'indole. De plus, lorsque l'on introduit en position 2, un méthyle (**13**) ou un phényle (**14**), il y a perte d'activité inhibitrice. Cette étude a permis de faire ressortir que quelque soit la position autour du cycle indolique, l'introduction d'un fluor fournit un meilleur potentiel inhibiteur que l'introduction d'un chlore (**16**, **22**, **31**, **38**) ou d'un brome (**17**, **23**, **32**, **39**). D'autre part, des substituants tels que le groupement nitro (**19**, **27**), hydroxy (**35**), methoxy (**34**, **41**), carboxylate (**29**) et les esters de méthyle (**20**, **28**, **36**) conduisent à une perte d'inhibition sur *m*TDO. Ceci est

probablement lié au caractère lipophile du voisinage du cofacteur hème présent dans le site actif de la protéine (Tableau III.5).

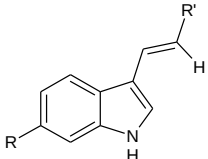
Une troisième pharmacomodulation qui consiste à modifier la chaîne latérale vinyle a pour but, d'une part, de mettre en évidence l'importance de la chaîne latérale de l'inhibiteur de référence à savoir: la pyridin-3-yle (Tableau III.6). D'autre part, de mettre en évidence d'autres groupements permettant de garder un bon potentiel inhibiteur tout en améliorant la solubilité du composé. La première modification envisagée a été de déplacer l'azote de la pyridine en position 2 (**42**, **43**) et 4 (**44**, **45**). Il en résulte une perte importante d'inhibition de *m*TDO dans les deux cas et particulièrement avec les composés dont les indoles sont non substitués (**42**, **44**). De plus, l'introduction d'un méthyle (**46**), d'un phényle (**47**) ou encore d'un naphth-2-yle (**48**) à la place du groupement pyridyle décroît fortement le potentiel inhibiteur des composés.

Ces constatations suggèrent que l'interaction pont H effectuée entre l'azote du groupement pyridyle de **30** et le squelette de la Thr254 suggérée par la modélisation est importante pour une bonne inhibition de l'enzyme. Ceci est confirmé par la présence d'un accepteur de pont H: fluor (**49**), méthoxy (**52**), nitrile (**53**), nitro (**54**) en position 3 du groupement phényle ou en remplaçant ce groupe par un ester méthylique (**59**). Ces modifications mènent à des composés ayant un potentiel inhibiteur similaire à l'inhibiteur de référence **30** mais n'améliorant pas sa solubilité.

Les acrylonitriles *E*-**55** et *E*-**56**, précurseurs des tétrazoles **57** et **58**, révèlent un potentiel inhibiteur intéressant avec des valeurs d'IC₅₀ de 3 et de 13 µM respectivement pour le *E*-**56** substitué par un fluor en position 6 et le dérivé non substitué *E*-**55**. De plus, ces composés ont une faible lipophilie et améliorent la solubilité par rapport aux composés **3** et **30**. Néanmoins, les composés disposant d'un groupement tétrazoles (**57**, **58**) ou d'un acide carboxylique (**60**, **61**) à la place du groupement pyridyle sont de très bons inhibiteurs de *m*TDO particulièrement lorsqu'ils sont substitués en position 6 par un fluor (**58**, **61**). L'IC₅₀ de ces composés est respectivement de 2.0 et 3.2 µM pour **58** et **61**. En plus de cet atout, ces composés possèdent une faible lipophilie (avec un Log D_{7.4} calculé respectif de 0.2 et de -0.6) et une grande solubilité calculée (2.88 et 130.6 mg/mL). Un avantage de plus est qu'ils ne présentent aucune toxicité cellulaire jusqu'à 400 µM (LD₅₀>400 µM).

D'autres stratégies qui avaient pour but d'améliorer la solubilité de cette série, tels que le remplacement du groupement pyridin-3-yle par un ester méthylique (**59**) ou un hydroxyméthyle (**62**) ou encore *via* une disubstitution de la chaîne latérale vinyle (**64-67**), sont infructueuses et fournissent des composés faiblement actifs voire inactifs.

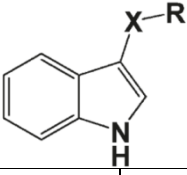
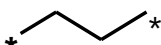
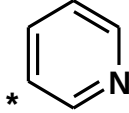
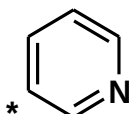
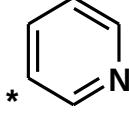
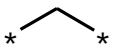
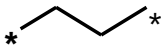
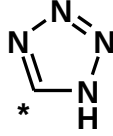
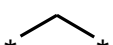
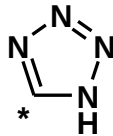
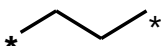
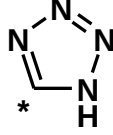
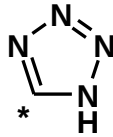
Tableau III.6 : Récapitulatif des composés indoliques potentiellement inhibiteur par modification de la chaîne latérale en position 3.

Composé			$mTDO^1$ IC_{50} (μM)	LD_{50}^1 (μM)	Donnée calculée ²	
	R	R'			Log $D_{7.4}$	Solubilité (mg/mL)
42	H	pyridin-2-yle	20	>100	3.39	0.23
43	6-F	pyridin-2-yle	3	100-200	3.59	0.072
44	H	pyridin-4-yle	20	>100	3.44	0.23
45	6-F	pyridin-4-yle	3	200-400	3.65	0.069
46	H	CH ₃	>80	>80	3.9	0.25
47	6-F	phényle	40	40-80	4.65	0.0081
48	6-F	naphth-2-yle	>200	>200	5.84	0.0031
49	6-F	3-F-phényle	10	40-80	4.73	0.0028
52	6-F	3-OMe-phényle	10	40-80	4.80	0.0058
53	6-F	3-CN-phényle	1	20-40	4.15	0.0027
54	6-F	3-NO ₂ -phényle	3	40-80	4.24	0.0031
E-55	H	CN	13	>80	2.76	0.44
E-56	6-F	CN	3	>80	2.96	0.14
57	H	tétrazole	10	>80	-0.04	4.11
58	6-F	tétrazole	2	>400	0.15	2.88
59	6-F	COOMe	2	40-80	3.42	0.13
60	H	COOH	18	>400	-0.59	279.30
61	6-F	COOH	3	>400	-0.56	130.6

¹ Valeurs obtenues sur cellules transfectées avec *mTDO*, ²ACD/Designer, 2010

Les dernières modifications (Tableau III.7) consistaient à faire varier la nature de la liaison reliant le cycle indolique non substitué au groupement pyridin-3-yle, nitrile ou encore tétrazole. La première observation est que, quelque soit la nature de la chaîne latérale, le remplacement de la liaison *E*-vinyle par un éthyle mène à des dérivés inactifs (**68**, **73**, **77**). L'introduction d'un lien acétylène mène au composé **69** qui présente un IC₅₀ de 6 µM intéressant mais une très faible solubilité (0.0084 mg/mL). Une autre observation met en évidence l'importance de la configuration de la double liaison. En effet, le dérivé *Z*-nitrile (**Z-55**) est complètement inactif comparé à son isomère *E* (**E-55**). Si l'on s'intéresse à la longueur de liaison, on remarque que lorsqu'elle est plus longue, par exemple, dans le cas d'un propyle (**70**) ou d'un sulfanyle d'éthyle (**74**, **78**), les dérivés obtenus sont faiblement actifs ou inactifs. Si au contraire on supprime ce lien (**71**, **75**) ou si on le remplace par un lien méthylène (**72**, **76**), les dérivés sont également inactifs.

Tableau III.7 : Récapitulatif des composés indoliques potentiellement inhibiteur en modifiant le lien en position 3.

Composés			$mTDO^1$ IC_{50} (μM)	LD_{50}^1 (μM)	Données calculées ²	
	X	R			Log $D_{7,4}$	Solubilité (mg/mL)
68			80	>80	3.13	0.22
69			6	200-400	3.88	0.0084
70			>200	>200	3.56	0.11
71		CN	>80	>80	2.76	0.44
72		CN	>80	>80	2.63	0.51
73		CN	>80	>80	1.86	0.61
74		CN	44	>80	2.6	0.38
75			>80	>80	-0.37	12.0
76			>80	>80	-0.26	10.0
77			>80	>80	0.2	3.63
78			>80	>80	0.2	3.63

¹ Valeurs testées sur cellules transfectées avec *mTDO*, ²ACD/Designer, 2010

Suite à cette étude, deux composés (**58** et **61**) se sont avérés très intéressants d'une part pour leur inhibition prometteuse de la dégradation du tryptophane avec des IC_{50} respectifs de 2 et 3 μM semblables à l'inhibiteur de référence (IC_{50} de **30** = 1 μM). D'autre part, ils ont une solubilité calculée bien plus élevée que le composé **30** (0.065 mg/mL) à savoir respectivement de 2.88 et 130.6 mg/mL pour **58** et **61**. C'est pourquoi ces derniers vont être étudiés de manière plus approfondie dans la suite de cette thèse.

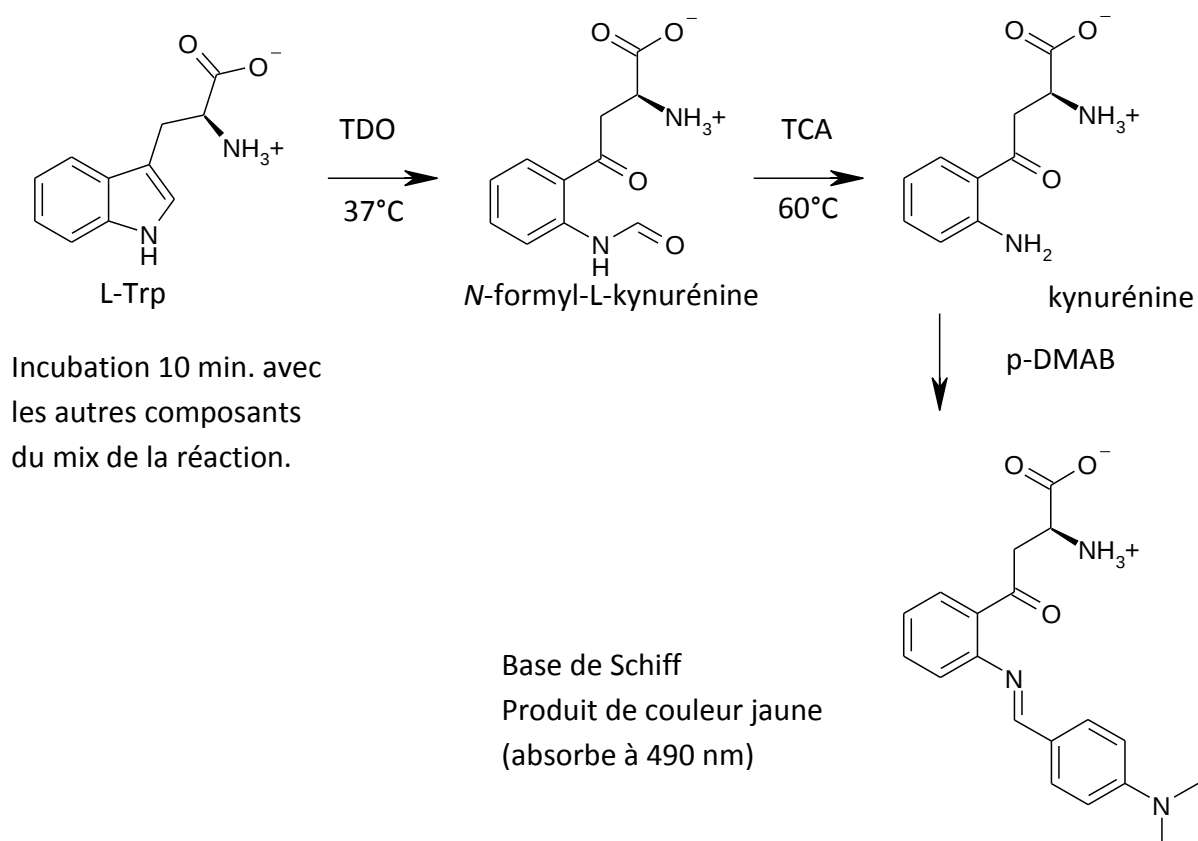
2.2 Enzymologie

Les dérivés indoliques ont montré leur capacité à réduire la production cellulaire de tryptophane. Au niveau cellulaire, il est nécessaire à présent de les tester au niveau enzymatique afin d'estimer leur capacité à inhiber notre enzyme d'intérêt, TDO.

Dans cette section, l'enzyme utilisée est la hTDO purifiée qui nous a été fournie par l'ULg. Nous n'étudierons pas l'ensemble des composés mais les plus prometteurs à savoir les composés **58** et **61**. Trois isomères de position (**22**, **31** et **38**) seront également étudiés de manière à comprendre l'influence de la position du Cl en position ortho (**22**), méta (**31**) et para (**38**) sur l'activité de l'enzyme.

Le principe du test enzymatique et les réactions mises en jeu sont représentées par le schéma III.4.

Schéma III.4 : Principe du test colorimétrique.



Le test colorimétrique discontinu a été mis en place sur base du protocole de (Matin A., 2006 ; Takikawa O., 1988) et a permis de déterminer si les inhibiteurs potentiels n'étaient pas substrat de notre enzyme (*hTDO*). Il a également donné accès au K_i et par la même occasion au mode d'inhibition. L'enzyme est ajoutée après 10 min. d'incubation du mélange dans un bain à 37°C. Après 10 min. de réaction, celle-ci est stoppée par l'ajout de d'acide trichloroacétique (TCA) 30 %. Les échantillons sont ensuite placés dans un incubateur à 60°C pendant 30 min. afin que l'hydrolyse de la *N*-formyl-L-kynurénine en kynurénine soit complète. Lorsque ce temps est écoulé, les cuvettes sont centrifugées. Finalement, 120 μ L du mélange réactionnel sont ajoutés à 120 μ L d'une solution de para-diméthyle aminobenzaldéhyde (p-DMAB) 20 %. Ceci conduit à la formation d'une base de Schiff dont l'absorbance est mesurée à 490 nm.

2.2.1 Evaluation des molécules synthétisées en tant que substrat

Puisque, les molécules synthétisées possèdent une structure similaire au substrat, le L-Trp, il est donc intéressant d'évaluer ces molécules comme substrat de la réaction. La variation d'absorbance au cours du temps (10 min. de réaction) engendrée par l'ajout d'enzyme à ces composés s'est avérée être nulle comparée à l'absorbance engendrée par le contrôle. Ce dernier étant la réaction proprement dite en présence du substrat, L-Trp. La figure III.1 permet de visualiser que les molécules **58** et **61** ne sont pas substrat. Cette variation d'absorbance en 10 min. correspond à la quantité de substrat consommé et donc à la quantité de base de Schiff produite à partir de la kynurénine et du p-DMAB. Les détails expérimentaux sont repris dans le chapitre V. § 2.4.

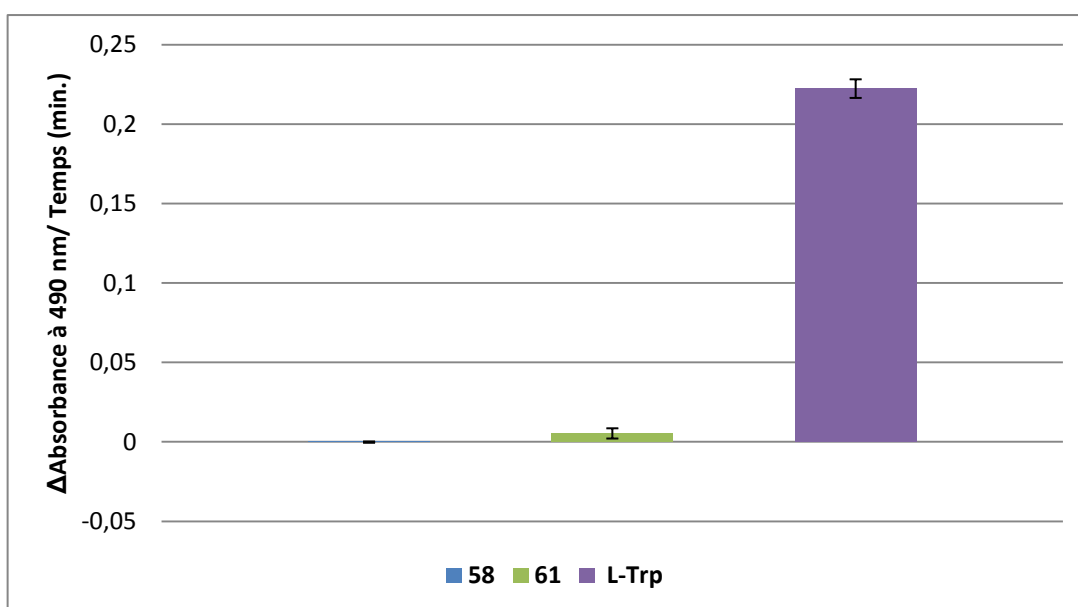


Figure III.1 : Etude des molécules en tant que substrat (temps de réaction: 10 min.), concentration finale pour les trois molécules 1 mM.

2.2.2 Détermination du K_i et de l' IC_{50} des molécules potentiellement inhibitrices sur hTDO

A présent, on sait que ces inhibiteurs ne sont pas substrat de hTDO, leur pouvoir inhibiteur va donc pouvoir être évalué. Cette expérience se base également sur la formation d'une base de Schiff à partir de p-DMAB qui absorbe à 490 nm. L'activité enzymatique est évaluée pour différentes concentrations en substrat (L-Trp) et en inhibiteur. Pour chaque concentration en inhibiteur [I] et en substrat [S], une variation d'absorbance à 490 nm est exprimée pour 10 min. de réaction et représente la vitesse de cette réaction (V). L'inverse de la vitesse (1/V) peut être portée sur un graphe en fonction de l'inverse de la concentration

en substrat ($1/[S]$). Le graphique de Lineweaver-Burk droite représentant $1/V$ en fonction de $1/[S]$ fournit une équation. La résolution de cette dernière permet de calculer K_m , V_{max} et K_i . En présence de différentes concentrations en inhibiteurs, les droites expérimentales sont toutes sécantes en un point correspondant à $1/V_{max}$ (Figure III.2). Ceci est caractéristique de l'allure attendue dans le cas d'une inhibition compétitive selon le modèle de Lineweaver-Burk (le composé **61** affiche la même allure). Dans ce cas, le substrat et l'inhibiteur sont en compétition pour le même site de liaison. En augmentant la concentration en substrat $[S]$, l'inhibiteur va finir par être déplacé et la vitesse maximale (V_{max}) va pouvoir être atteinte et sera donc inchangée. Le K_m , quant à lui, est plus élevé en présence d'inhibiteur ce qui indique une affinité plus faible de l'enzyme pour son substrat (Voet D., 2005).

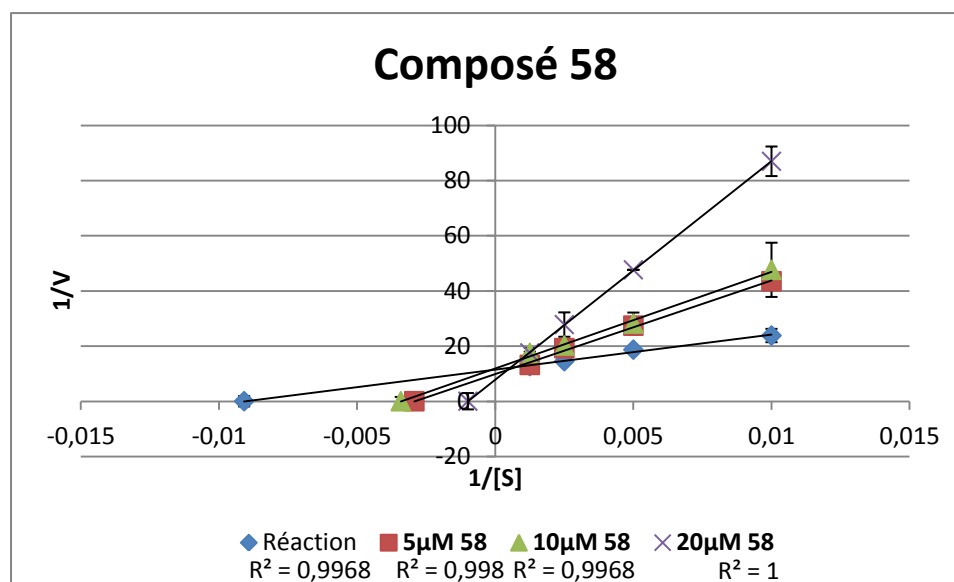


Figure III.2 : Détermination du K_i et du mode d'inhibition de la molécule inhibitrice 58 sur l'enzyme hTDO (méthode de Lineweaver-Burk).

Avant de déterminer la valeur de la constante d'inhibition (K_i), l'équation III.1 va être utilisée pour déterminer la constante d'affinité (K_m) grâce aux valeurs de l'expérience réalisée ci-dessus lorsque la concentration en inhibiteur est nulle (Chauhan B.S., 2008).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Equation III.1}$$

Lorsque la valeur du K_m est connue, la formule du double inverse (Equation III.2) donnera accès à la valeur de K_i par une simple réécriture de cette équation.

$$\frac{1}{[S]} = \frac{-1}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Equation III.2}$$

Le tableau III.8 reprend les valeurs de K_m et K_i pour ces six inhibiteurs. L'expérience a été réalisée en duplicat.

Tableau III.8 : Valeurs expérimentales de K_i et IC_{50} pour les molécules inhibitrices.

Inhibiteurs	$K_i(hTDO)$ (μM)	IC_{50} (μM)
22^a	ND	10 ± 0.5
31^a	ND	5 ± 0.4
38^a	ND	32 ± 0.02
30^b	$0.88 [0.76-0.99]$	$1.3 [0.90-1.83]$
58^a	5.0 ± 2	ND
61^a	41.0 ± 12	ND

^a Sur *hTDO* purifiée. ^b L'évaluation du composé 30 est réalisée sur extrait brut d'*hTDO*.

Intervalle de confiance à 95 % entre parenthèses (Dolušić E., 2011c). ND = Non déterminé.

Avant chacune des mesures de K_i , l'enzyme *hTDO* a été évaluée en présence de son substrat, le L-Trp. Ces valeurs de K_m sont de l'ordre de $180 \pm 1.4 \mu M$, ce qui est cohérent avec la littérature où le K_m a une valeur de $222 \pm 15 \mu M$ (Basran J., 2008). Selon la méthode de Lineweaver-Burk, les K_i obtenus expérimentalement présentent relativement peu d'erreurs et montrent que **58** à un meilleur potentiel inhibiteur que **61**. Quant aux isomères, la position de l'atome de Cl a apparemment une influence sur l'activité enzymatique vu que les composés **22** et **31** inhibent l'enzyme plus fortement que le composé **38**. A titre d'exemple, la figure III.3 illustre l' IC_{50} du composé **22**.

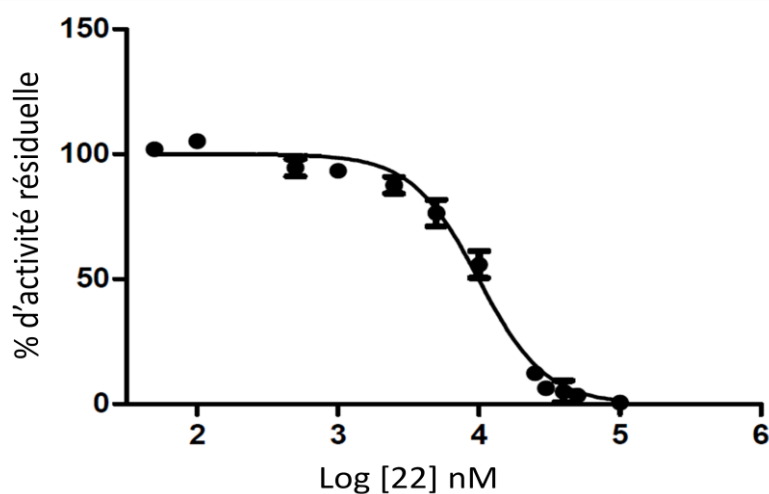


Figure III.3 : % d'activité résiduelle de *hTDO* purifiée en présence de l'isomère 22.

Cette évaluation enzymatique a permis de montrer que les deux composés (**58** et **61**) prometteurs au niveau cellulaire sont tout aussi intéressants au niveau enzymatique ($K_i = 5$ et $41 \mu\text{M}$ pour **58** et **61** respectivement). Ils possèdent tous deux un profil d'inhibiteur compétitif. D'autre part, les isomères de positions se sont montrés de bons inhibiteurs et on remarque que la position du Cl aurait une influence sur le pouvoir inhibiteur de ces derniers. Cette hypothèse pourra être confirmée lors des études de *docking*.

Jusqu'à présent, nous avons pu mettre en évidence des inhibiteurs ayant des K_i proches de l'inhibiteur de référence (**30**), maintenant nous allons voir si leurs propriétés physico-chimiques sont supérieures à celles du composé **30**.

2.3 Propriétés physico-chimiques

2.3.1 *Etude des pK_a*

La constante d'acidité (K_a) définit la capacité de dissociation d'un acide dans l'eau. Habituellement, le pK_a est plus fréquemment utilisé par rapport au K_a pour définir la force d'un acide (Atkins P.W., 1996 ; Kerns E.H., 2008).

Les spectres UV des composés **58** et **61** dans différentes solutions tamponnées à différents pH ont été enregistrés et rassemblés sur les figures III.4 et III.5. Ces deux composés absorbent à des longueurs d'onde différentes selon qu'ils soient sous forme acide ou basique. Les courbes ainsi obtenues se croisent donc en un point, appelé point isobestique, ce qui prouve la présence de deux espèces en équilibre en solution.

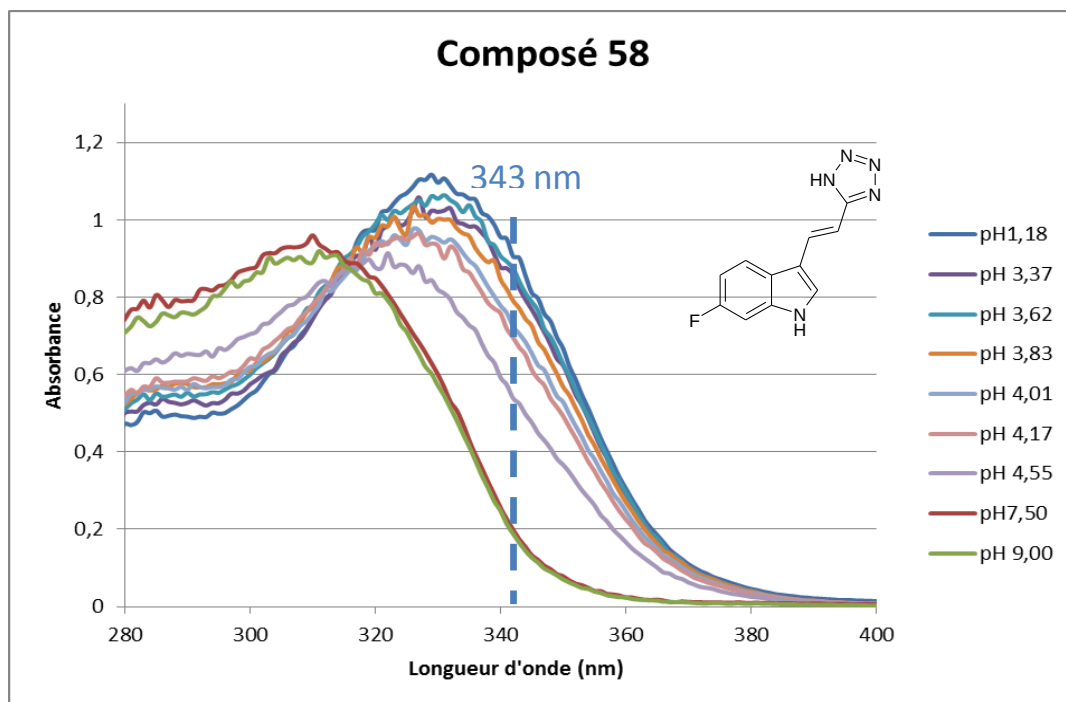


Figure III.4 : Spectre UV du composé 58 (300 μ M) dans des solutions à pH différents en vue de déterminer le pK_a de ce composé.

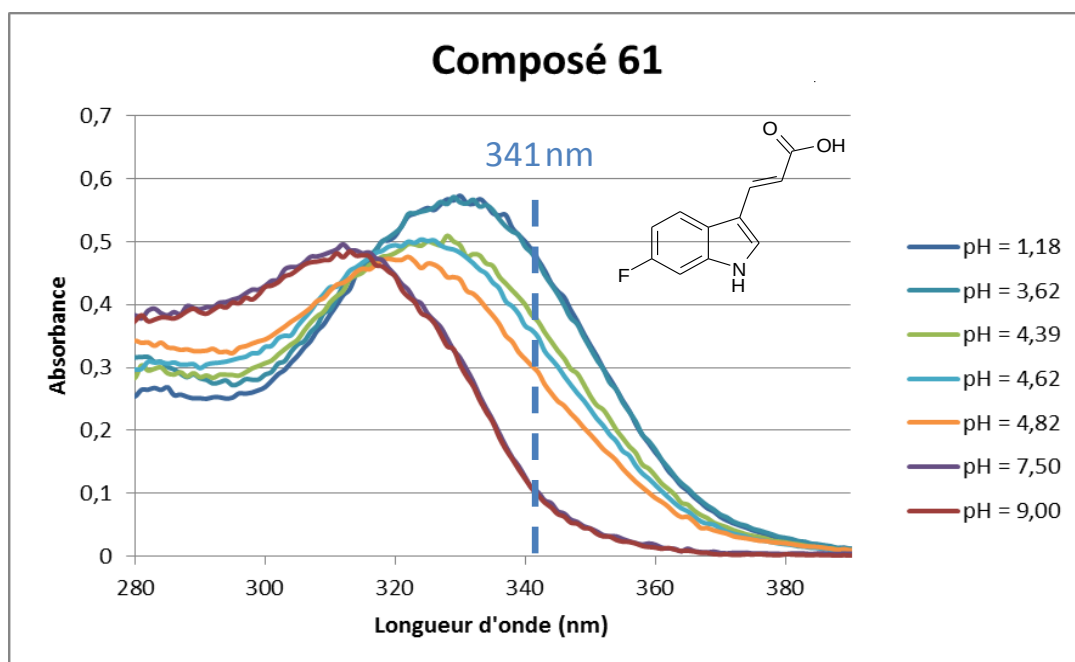


Figure III.5 : Spectre UV du composé 61 (300 μ M) dans des solutions à pH différents en vue de déterminer le pK_a de ce composé.

Les figures III.4 et III.5 mettent en évidence que les formes acide et basique des composés absorbent le rayonnement UV-visible à des longueurs d'onde différentes. En effet, lorsque le pH varie, la proportion en composés de forme acide et basique va également varier et la longueur d'onde à laquelle l'absorbance est maximale va donc être modifiée.

La composition des solutions tampons et les conditions opératoires se trouvent dans le chapitre V. § 2.5.

A partir des courbes à pH 1.18 et 9.00, la longueur d'onde analytique peut être obtenue pour déterminer le pK_a des composés. Celle-ci correspond à la longueur d'onde marquée par la plus grande différence d'absorbance entre les deux courbes, à savoir 343 nm et 341 nm pour **58** et **61** respectivement. Connaissant cette valeur, le pK_a va pouvoir être déduit à l'aide de l'équation III.3.

$$pK_a = pH - \log \left(\frac{A_{BH}^\lambda - A_{pH}^\lambda}{A_{pH}^\lambda - A_{B^-}^\lambda} \right) \quad \text{Equation III.3}$$

A_{BH}^λ Absorbance de la forme acide du composé à la longueur d'onde analytique.

A_{pH}^λ Absorbance du composé à un pH donné à la longueur d'onde analytique.

$A_{B^-}^\lambda$ Absorbance de la forme basique du composé à la longueur d'onde analytique.

A_{BH}^λ (pH = 1.18) et $A_{B^-}^\lambda$ (pH = 9.00) ont respectivement une valeur d'absorbance de 0.9 et 0.2 à la longueur d'onde analytique de 343 nm pour le composé **58**.

A_{BH}^λ (pH = 1.18) et $A_{B^-}^\lambda$ (pH = 9.00) ont respectivement une valeur d'absorbance de 0.1 et 0.5 à la longueur d'onde analytique de 341 nm pour le composé **61**.

Le tableau III.9 reprend les valeurs de pK_a pour les différentes solutions de pH pour les composés **58** et **61**.

Tableau III.9 : Détermination du pK_a calculé pour chaque solution de pH.

Composé 58			Composé 61		
pH	A_{pH}^{343}	pK_a calculé	pH	A_{pH}^{341}	pK_a calculé
3.37	0.823	4.29	3.62	0.482	5.51
3.62	0.841	4.66	4.39	0.384	4.82
3.83	0.771	4.50	4.62	0.360	4.92
4.01	0.705	4.45	4.82	0.303	4.84
4.17	0.670	4.51	7.50	0.109	4.72
4.55	0.647	4.83	/	/	/
7.50	0.174	5.59	/	/	/
pK_a moyen= 4.69 ± 0.40			pK_a moyen= 4.96 ± 0.30		

De plus, on observe sur les courbes un déplacement bathochrome avec l'augmentation du pH. C'est pourquoi, une seconde méthode de détermination du pK_a a été mise en place, nous avons donc représenté le λ_{max} de chacune des courbes en fonction du pH. Nous avons ainsi obtenu les sigmoïdes présentées dans les figures III.6 et III.7.

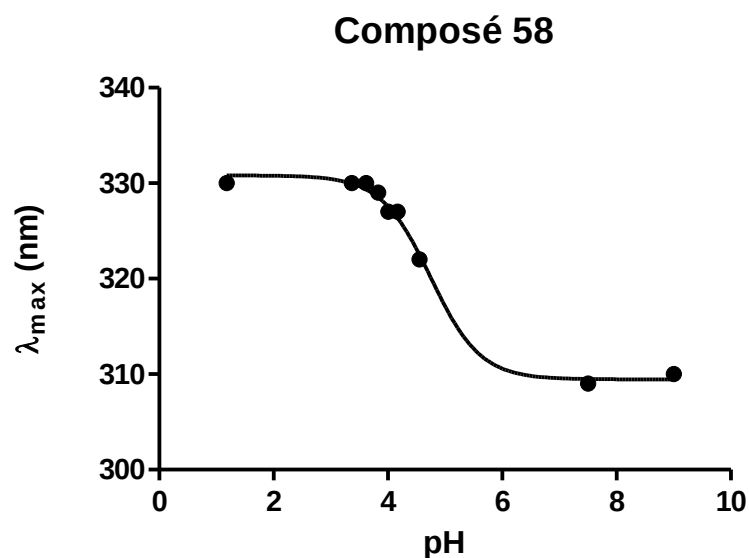


Figure III.6 : Variation du λ_{max} du composé 58 (300 μ M) dans des solutions à pH différents en vue de déterminer le pK_a de ce composé.

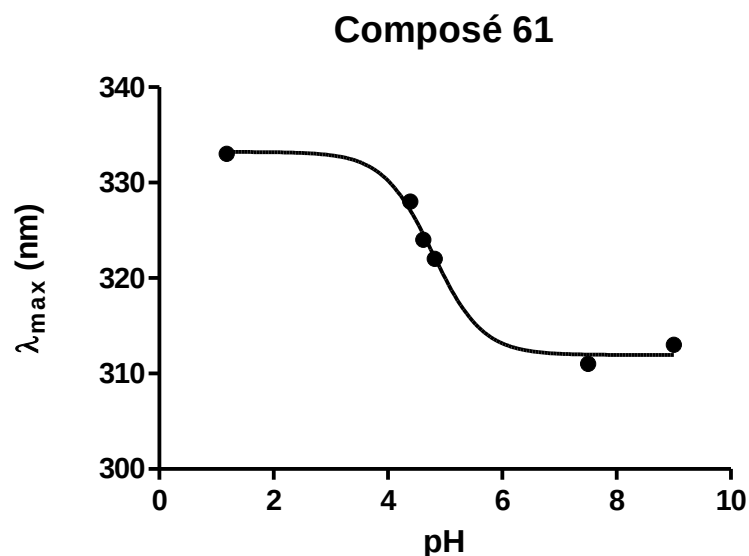


Figure III.7 : Variation du $\lambda_{\max}$ du composé 61 (300 μ M) dans des solutions à pH différents en vue de déterminer le pK_a de ce composé.

Les valeurs moyennes de pK_a mesurées expérimentalement ainsi que les valeurs déduites du point d'inflexion des sigmoïdes (pK_a **58** = 4.68 et pK_a **61** = 4.94) (voir chapitre V. § 2.5) concordent avec les valeurs théoriques calculées *via* le programme Pallas (« Pallas Net 2.0 » CompuDrug <http://www.compudrug.com>) qui sont respectivement de 4.57 et 4.52 pour **58** et **61**. En effet, le seul hydrogène acide provient du groupement acide carboxylique dans le composé **61**. Ce groupement est également présent dans une molécule de référence, l'acide acétique dont le pK_a est égal à 4.76 (Weast R.C., 1987). En ce qui concerne le tétrazole du **58**, il y a également un seul hydrogène acide et si l'on compare les valeurs de pK_a de **58** et celle du noyau tétrazole dont le pK_a est de 4.89 (Koldobskii G.I., 1981), on remarque qu'elles sont relativement proches. Si on compare l'acide carboxylique de **61** au tétrazole de **51**, sachant que l'atome d'hydrogène peut être localisé sur deux positions du tétrazole et mimer l'acide carboxylique, le tétrazole est considéré comme l'isostère de l'acide carboxylique. Il est donc normal qu'ils aient des valeurs de pK_a proches l'une de l'autre.

De manière intéressante, cette étude met en évidence que le pK_a de l'acide carboxylique ainsi que celui du tétrazole ne sont pas fortement influencés par la présence du noyau indolique qui leur est conjugué par le biais d'un lien éthylénique.

La connaissance des pK_a de ces composés permet également de préciser la forme de la molécule qui interagit au niveau de l'enzyme, au pH physiologique. En toute vraisemblance, il s'agit de la forme déprotonnée aussi bien pour **58** que pour **61**. Cette information nous sera utile par la suite lors des simulations de *docking*.

Les valeurs de pK_a obtenues pour nos inhibiteurs sont importantes étant donné que ces derniers sont faiblement solubles en milieu aqueux. Il serait donc intéressant d'évaluer la solubilité de ces molécules à différents pH.

2.3.2 Etude de la solubilité

La solubilité d'une espèce ionique ou moléculaire, appelé soluté, est la concentration maximale (mol/L) de ce composé que l'on peut dissoudre ou dissocier dans un solvant, à une température donnée. La solution ainsi obtenue est alors saturée.

Il est important de faire la distinction entre la solubilité cinétique et thermodynamique. Cette dernière possède deux caractéristiques à savoir : le composé est directement solubilisé dans un tampon aqueux et l'équilibre est atteint entre le soluté et le composé solide non dissous. L'excès de composé solide est agité pendant plusieurs heures avant d'être séparé par centrifugation et le surnageant est analysé par HPLC. La détermination de la solubilité thermodynamique nécessite une quantité de composé plus importante que pour estimer la solubilité cinétique. Elle est plus fréquemment utilisée en phase de développement alors que la solubilité cinétique sera utilisée pour faire un criblage et elle se rapproche plus des conditions des tests biologiques *in vitro*.

La solubilité étudiée dans cette thèse est la solubilité cinétique qui a été déterminée d'une part par la dissolution du composé d'intérêt dans un solvant organique tel que le DMSO, additionné à un tampon aqueux. D'autre part, elle se caractérise par le non-équilibre entre le composé dissous et le composé solide (Kerns E.H., 2008). La solution est filtrée et analysée par HPLC. La composition des solutions tampons et les conditions opératoires se trouvent dans le chapitre V. § 2.3.

Notre but était de cribler ces inhibiteurs, nous avons donc utilisé la solubilité cinétique. La quantification du soluté s'est faite par LC-MS. Les chromatogrammes (Figure

III.8) obtenus pour un composé à différentes concentrations ont permis de fournir les données nécessaires afin d'obtenir les points de la droite de calibration (Annexe 3). Effectivement, le chromatogramme représente l'absorbance du composé à 220 nm en fonction du temps de rétention. L'aire sous la courbe est donc obtenue par intégration *via* le programme Agilent technology.

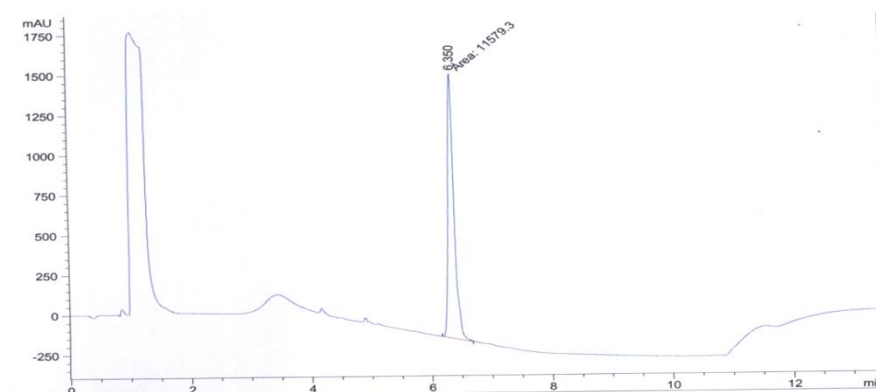


Figure III.8 : Exemple de chromatogramme obtenu pour le composé 38 à pH = 7.4.

Le tableau III.10 reprend les valeurs de solubilité pour les composés **22**, **31**, **38**, **30**, **58** et **61** à différents pH. Ces pH ont été choisis afin de simuler le pH de l'estomac (pH = 1.0), physiologique (pH = 7.4) et de l'intestin (pH = 9.0) (Van de Waterbeemd H., 2009). L'étude de la solubilité dans ces conditions permettra de mieux connaître les différents sites du corps où le composé se solubilise de manière à atteindre sa cible.

Tableau III.10 : Solubilité des composés 22, 31, 38, 30, 58 et 61 à différents pH.

Composé	pH	Solubilité (μM)			Solubilité moyenne (μM)
22	1.0	>500	>500	>500	>500
	7.4	35.4	20.5	25.1	27.0 ± 8.0
	9.0	77.4	63.6	75.5	72.2 ± 7.0
31	1.0	476.0	470.7	473.2	473.3 ± 3.0
	7.4	22.7	22.1	24.0	22.9 ± 1.0
	9.0	32.9	31.2	30.1	31.4 ± 1.0
38	1.0	>500	>500	>500	>500
	7.4	1.5	2.2	3.3	2.3 ± 1.0
	9.0	3.1	8.3	5.7	5.7 ± 3.0
30	1.0	486.4	489.8	488.6	488.2 ± 2.0
	7.4	21.8	22.0	23.3	22.4 ± 1.0
	9.0	26.8	27.6	27.2	27.2 ± 1.0
58	1.0	416.9	409.6	411.0	412.5 ± 4.0
	7.4	>500	490.3	489.9	493.7 ± 6.0
	9.0	>500	>500	>500	>500
61	1.0	279.4	274.8	272.5	257.6 ± 4.0
	7.4	332.2	337.6	330.4	333.4 ± 4.0
	9.0	322.6	330.4	328.3	327.1 ± 4.0

Le pK_a d'un ion pyridinium, groupement présent au sein de l'inhibiteur de référence **30** a une valeur de 5.25 (Weast R.C., 1987). A pH = 1.0, cet inhibiteur se trouvera sous sa forme protonnée et présentera donc une meilleure solubilité. Par ailleurs, sous sa forme protonnée, il ne sera pas facilement absorbé au niveau des membranes de l'estomac malgré sa bonne solubilité à ce pH. Néanmoins, lorsque le 680C91 atteindra l'intestin à pH = 9.0, sa solubilité sera beaucoup plus faible même si il sera mieux absorbé vu son caractère neutre. Ce même phénomène est observé pour les isomères chlorés et encore plus marqué dans le cas du composé **38**.

Les composés **58** et **61** présentent un pK_a inférieur à 5. La valeur du pK_a de la molécule **58** est 4.69 et la molécule est déprotonnée à pH supérieur à 4.69 et est donc plus soluble à pH élevé. Par contre, à pH = 1.0, la molécule **58** se trouve sous la forme neutre et est donc moins soluble mais possède encore néanmoins une solubilité relativement élevée.

De même pour **61** dont le pK_a est de 4.96, la molécule est déprotonnée au-delà de cette valeur et est donc plus soluble à pH élevé. Les molécules **58** et **61** ont respectivement une solubilité moyenne de 14 et 20 fois plus élevée par rapport à la molécule de référence 680C91.

Ces inhibiteurs s'avèrent donc être des molécules particulièrement intéressantes de ce point de vue par rapport à l'inhibiteur de référence. Effectivement, un composé à intérêt pharmaceutique présente une grande solubilité lorsque celle-ci est supérieure à 60 $\mu\text{g/mL}$ (Kerns E.H., 2008), ce qui correspond respectivement pour **58** et **61** à 262 μM et 292 μM . Ces valeurs sont de l'ordre de grandeur des valeurs de solubilité déterminées pour ces inhibiteurs à différents pH (Tableau III.10), ce qui fait des inhibiteurs **58** et **61** des molécules pouvant présenter une très bonne biodisponibilité. La modification que ce soit avec un acide carboxylique ou un tétrazole du 680C91 au niveau de l'extrémité pyridine a permis d'améliorer la solubilité tout en conservant un bon potentiel inhibiteur. En plus de cet atout, ces composés possèdent une faible lipophilie. En effet, les valeurs $\text{Log } D_{7.4}$ sont relativement basses (voir § 2.1). Reste à savoir si ces composés sont stables à ces pH et au cours du temps.

2.3.3 Etude de la stabilité

La stabilité a été évaluée expérimentalement (voir chapitre V. § 2.6) dans les mêmes conditions que celles mises en œuvre pour les tests de solubilité mais cette fois dans un tampon PBS, pH = 7.4. L'expérience a été réalisée en triplicat (Tableau III.11).

Tableau III.11 : Stabilité des composés 30, 58 et 61 après 90 min. dans le PBS à pH 7.4.

Inhibiteur	Stabilité (% de composé restant après 90 min. dans le PBS, pH 7.4)
30	67.6 $\pm$ 1.4
58	93.3 $\pm$ 1.9
61	92.9 $\pm$ 0.6

Cette évaluation renforce une fois de plus l'intérêt des deux molécules (**58** et **61**). En effet, ces inhibiteurs restent stables au cours du temps puisque 93 % de ces molécules sont retrouvées en solution après 90 min. à température ambiante et pH 7.4. Par opposition, le

composé **30** de référence ne se retrouve plus qu'à 63 % en solution dans des conditions similaires.

A titre d'exemple, la figure III.9 représente la stabilité des composés **30** et **58**. Après 90 min. d'incubation à température ambiante.

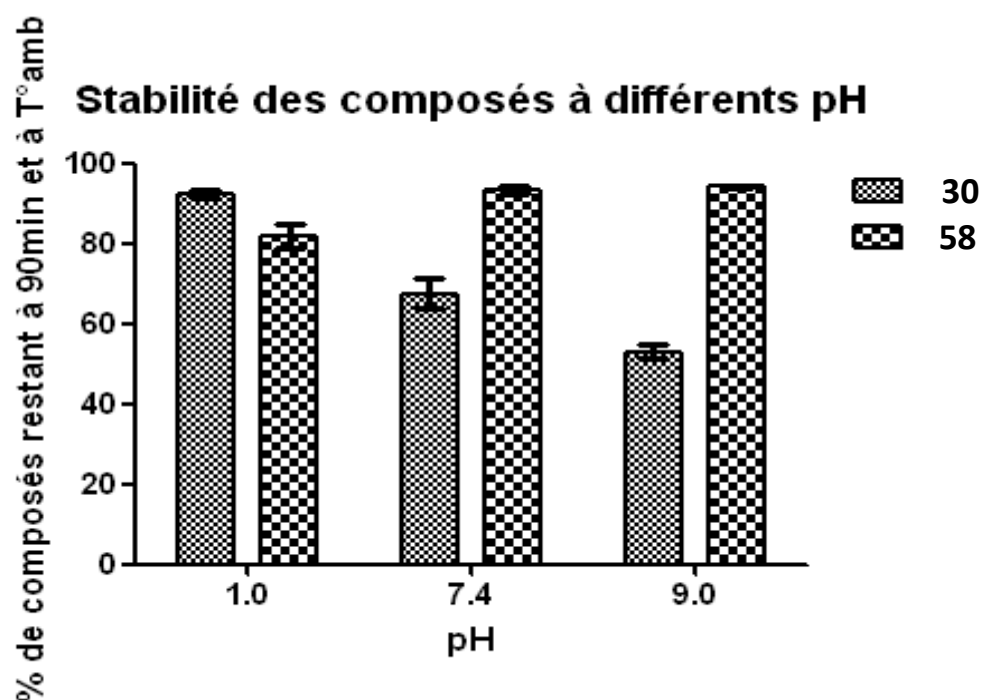


Figure III.9 : Evaluation de la stabilité des composés 30 et 58 à différents pH durant 90 min. à 20°C.

Le composé s'avérant plus stable que le composé de référence, il a été testé à pH physiologique à 20°C afin de voir s'il reste stable au cours du temps (Figure III.10).

Stabilité du composé **58** à pH=7.4

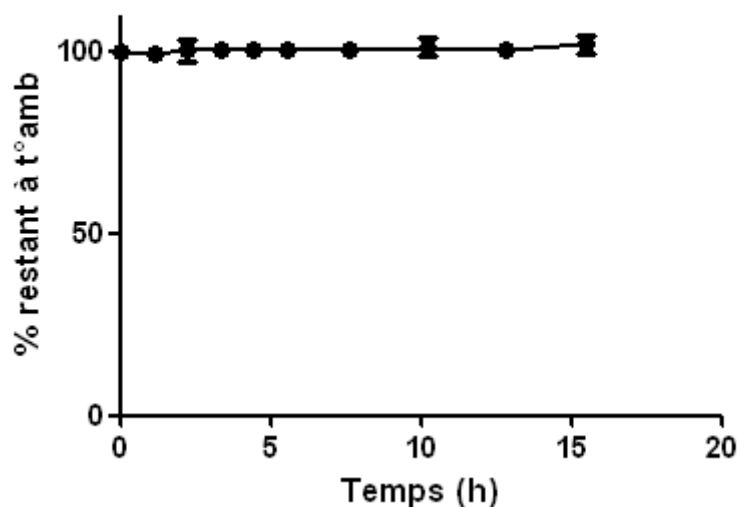


Figure III.10 : Evaluation de la stabilité du composé **58 au cours du temps à pH 7.4 et à 20°C.**

Effectivement, après 16 h, 100 % du composé **58** sont retrouvés, ce qui montre qu'il est bien stable au cours du temps à pH 7.4. En plus, d'apporter une solubilité améliorée, le composé **58** présente une meilleure stabilité que le composé de référence. Il reste à savoir s'il est tout aussi sélectif que le composé **30**.

2.4 Evaluation de la sélectivité IDO/TDO

L'évaluation de la sélectivité s'effectue sur l'enzyme *h*IDO avec comme composé de référence le 1-méthyl-tryptophane (1-MT). Les résultats du test se trouvent dans le tableau III.12 et les détails expérimentaux sont décrits au chapitre V. § 2.4.

Tableau III.12 : Sélectivité des inhibiteurs **30, **58** et **61**.**

Inhibiteur	Enzyme	Composé de référence (K_i , nM)	% d'inhibition ^a à 10 μ M
30	IDO	1-MT (40,000)	<10
58			<10
61			<10

^a % d'inhibition relatif par rapport au % d'inhibition de l'enzyme pour IDO et au % d'inhibition d'un contrôle spécifique lié au récepteur étudié.

Le composé **58** tout comme le composé **61** ne sont pas des inhibiteurs d'IDO avec une inhibition inférieure à 10 % à 10 μ M bien que TDO et IDO catalysent de façon similaire la première étape de la voie de la kynurénine.

3. Etudes des interactions entre les inhibiteurs et l'enzyme TDO

3.1 Cristallogénèse de *rmTDO*

3.1.1 *Surexpression et purification de TDO de Ralstonia metallidurans (rmTDO)*

Il existe à ce jour sept structures cristallographiques de la tryptophane 2,3-dioxygénase dans la PDB, celles-ci proviennent de souches bactériennes à savoir *Xanthomonas campestris* et *Ralstonia metallidurans*. Actuellement, il n'y a pas encore de structure 3D de la TDO humaine.

Cette dernière est étudiée à l'ULg par nos collaborateurs. De notre côté, nous disposons au sein du laboratoire du plasmide codant pour l'enzyme bactérienne *rmTDO*. Ce plasmide nous a été fourni par l'équipe du professeur Steven E. Ealick de l'université de Cornell aux Etats-Unis. A partir de là, il nous est apparu intéressant de tenter de cristalliser *rmTDO* en complexe avec un inhibiteur afin de mieux comprendre les interactions au sein du site actif de l'enzyme. Ce co-cristal nous permettra de confirmer les résultats obtenus lors de l'étude de *docking*. Il est donc nécessaire de surexprimer puis de purifier cette enzyme afin d'obtenir des lots suffisamment purs et concentrés pour réaliser la cristallogénèse. Les conditions expérimentales et les modes opératoires sont repris au chapitre V. § 3.1.1 et § 3.1.2.

a) *Surexpression de l'enzyme rmTDO*

Avant de surexprimer l'enzyme, il est nécessaire de réaliser une thermotransformation afin d'introduire le plasmide codant pour la protéine d'intérêt (*rmTDO*) dans des cellules BL21 (DE3). Les étapes suivantes sont la préculture et la culture qui a pour but la croissance cellulaire jusqu'à ce que la densité optique (D.O.) à 600 nm soit comprise entre 0.8 et 1.0. Classiquement, nous sommes partis de précultures de 5 mL et de cultures d'1 L (réparties en deux erlenmeyers de 500 mL). Dans ces conditions, la D.O. à 600 nm a atteint une valeur comprise entre 0.8 et 1.0 après environ 4-5 h selon les cultures. Ensuite, l'induction à l'isopropyle- β -D-galactoside (IPTG) permet de surexprimer la protéine

d'intérêt. Enfin, la lyse cellulaire est réalisée à l'aide d'une sonde à ultra-sons de manière à provoquer l'éclatement des parois cellulaires. La protéine *rmTDO* et les protéines solubles contaminantes sont ensuite séparées des débris cellulaires par centrifugation et récupérées dans le surnageant.

b) Purification de l'enzyme *rmTDO*.

La chromatographie d'affinité pour un métal (IMAC - *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) nous intéresse plus particulièrement étant donné que la protéine d'intérêt que nous voulons purifier possède une queue poly-histidine. Cette colonne fait appel à l'immobilisation, sur un gel d'agarose, d'un cation métallique pouvant établir des liens de coordination avec certains polypeptides. Le nickel (Ni^{2+}), en l'occurrence, retiendra spécifiquement les protéines présentant un segment riche en résidus histidine, telle une étiquette de six histidines (H_6). En effet, cette étiquette de poly-histidine (His-tag) de la protéine va chélater les ions Ni^{2+} (GE Healthcare, 2007a) reliés à la phase solide par des molécules d'acide nitriloacétique (Figure III.11).

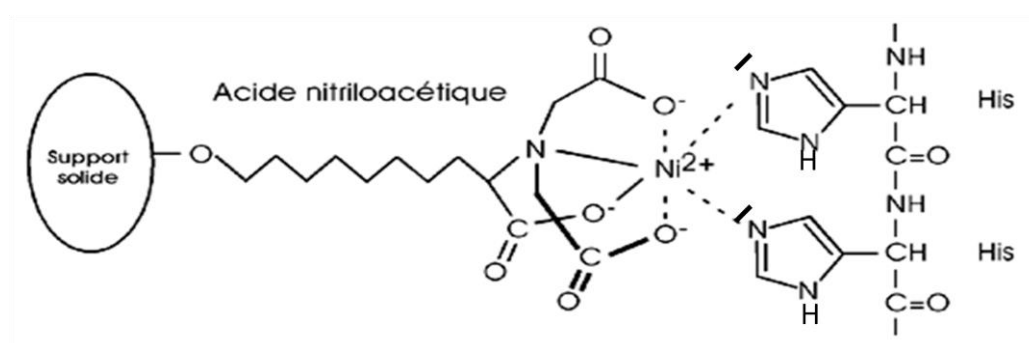


Figure III.11 : Chélation des ions Ni^{2+} liés au support solide de la colonne par la protéine.

Tout autre substituant n'ayant pas d'affinité pour ces ions va être élué et constituer ce qu'on appelle le *Flow Through* (FT). A cette étape, la colonne est donc lavée de toutes impuretés n'ayant pas d'affinité pour les ions Ni^{2+} . Ensuite, la protéine va pouvoir être éluee en faisant passer un gradient en imidazole sur la colonne. En effet, cette molécule va entrer en compétition avec l'His-tag de la protéine *rmTDO* pour les sites de chélation des ions Ni^{2+} , ce qui permettra l'élution de cette dernière (GE Healthcare, 2007a).

La figure III.12 représente un exemple de chromatogramme obtenu lors de l'une de nos nombreuses purifications de *rmTDO* à l'aide d'une colonne IMAC sur un dispositif FPLC.

Celui-ci décrit la variation de conductivité ainsi que la variation d'absorbance à 280 nm en fonction du temps. Pendant les 14 premières minutes (1 mL/min.), le *Flow Through* contenant les protéines n'ayant aucune affinité pour la colonne est récupéré sous élution du tampon A. Lorsque l'entièreté de ce dernier a été collectée, le gradient en imidazole allant de 0 à 50 % et augmentant d'1 % chaque minute débute afin de décrocher la protéine d'intérêt.

Le chromatogramme fait part de deux pics dont un serait susceptible de correspondre à la protéine *rmTDO*. Le même profil a été obtenu lors de chaque purification. Les différentes fractions correspondant à ces pics ont été analysées par gel SDS-PAGE afin de déterminer quelles fractions contiennent la protéine *rmTDO*. Néanmoins, certaines fractions sont de couleur rougeâtre et donc on peut déjà supposer que ces dernières contiennent la protéine *rmTDO* étant donné que celle-ci est une hémoprotéine.

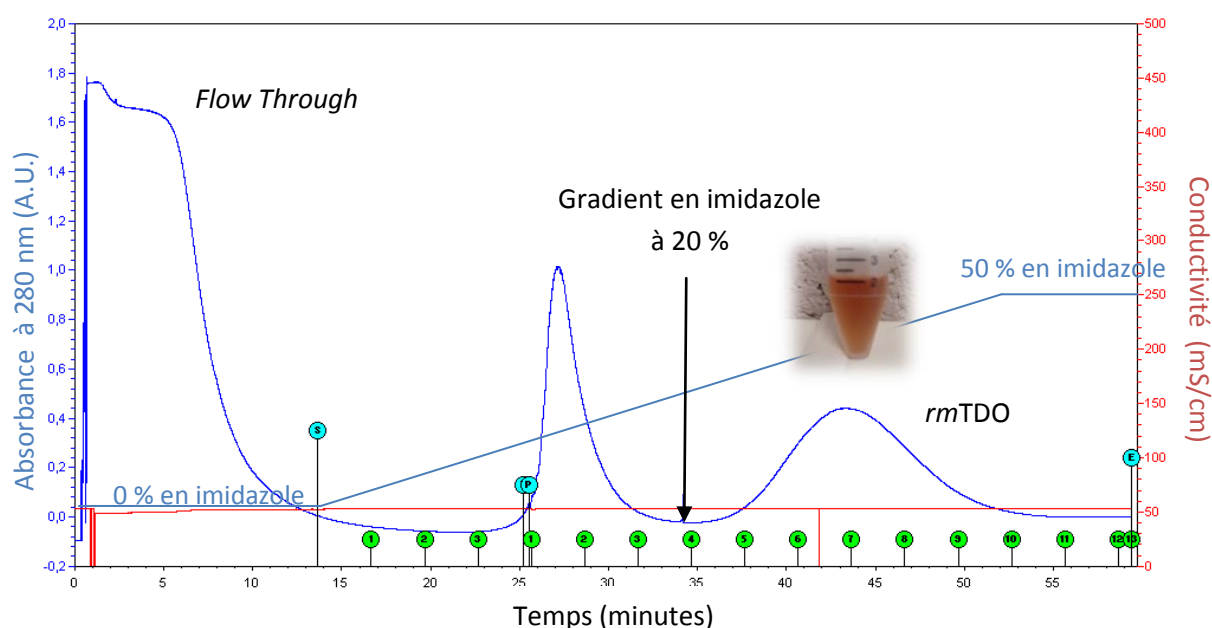
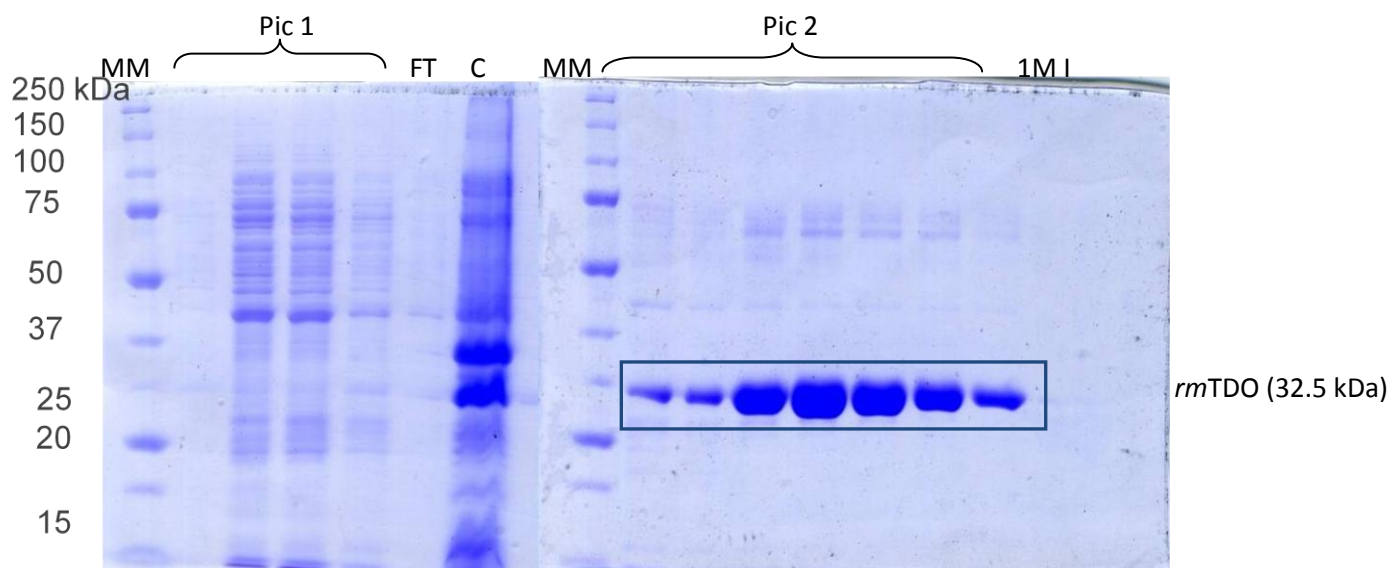


Figure III.12 : Exemple de chromatogramme de la purification de *rmTDO* par une colonne IMAC sur un dispositif FPLC.

c) Electrophorèse sur gel SDS-PAGE

Après avoir récupéré les fractions de protéines purifiées (4-10), il est important de vérifier la pureté de ces dernières par le principe SDS-PAGE afin de déterminer quelles fractions seront dialysées lors de l'étape suivante.

La figure III.13 représente un exemple de gel SDS-PAGE où l'on remarque que notre protéine *rmTDO* correspond au deuxième pic étant donné que la masse moléculaire de celle-ci correspond à 32.5 kDa, masse d'un monomère de la protéine *rmTDO*.



MM : Marqueurs de masse moléculaire.

FT : Flow Through.

C : Culot.

1M I : Fraction correspondant à 1M en imidazole.

Pic 1 : Fractions éluées représentant le premier pic (ensemble de protéines se liant avec une faible affinité à la résine IMAC).

Pic 2 : Fractions éluées représentant le deuxième pic (protéine d'intérêt à savoir *rmTDO*).

Figure III.13 : Exemple de gel SDS-PAGE des fractions obtenues lors d'une purification sur la colonne IMAC (voir chromatogramme : Figure III.12) par un dispositif FPLC.

Cependant, le gel SDS-PAGE issu de cette première purification présente des bandes de faible intensité ne correspondant pas à la masse moléculaire de notre protéine, à savoir 32.5 kDa. C'est pourquoi une seconde purification a été mise en place : le tamis moléculaire.

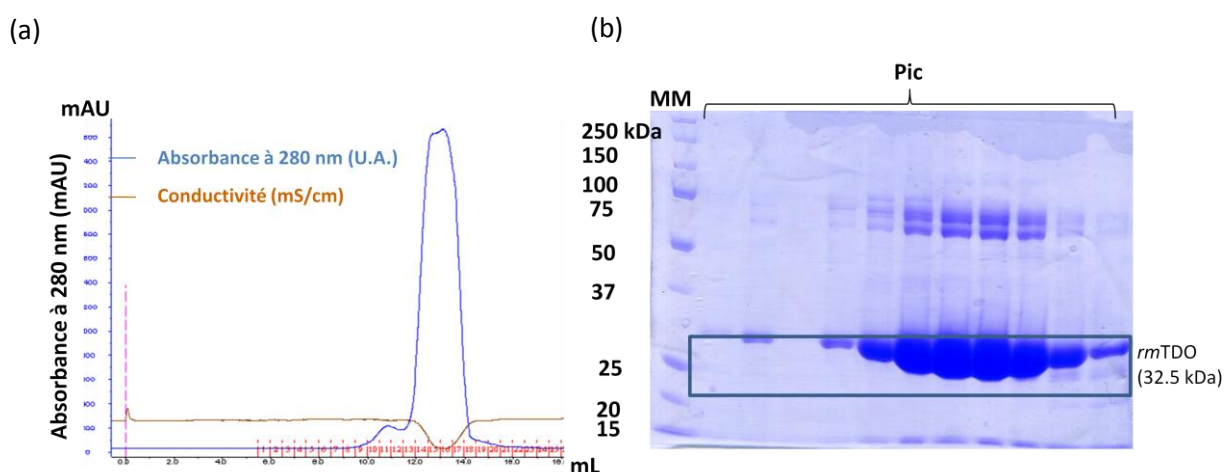
Avant de réaliser le tamis moléculaire, la dialyse de la protéine est nécessaire. Celle-ci consiste à modifier la solution dans laquelle se trouve la protéine, une solution tampon contenant de l'imidazole. Ceci se fait à l'aide d'une membrane de dialyse semi-perméable contenant la solution protéique. Une alternative à la dialyse a été d'utiliser une colonne de

déssalage. En effet, comme on le verra par la suite notre protéine n'est pas très stable au cours du temps et donc afin d'en gagner, cette technique a été mise en place régulièrement. Par cette technique, le même résultat est obtenu à savoir l'élimination de l'imidazole de la solution dans laquelle la protéine se trouve mais dans un plus bref délai (~1-2 h selon les cas). Les détails expérimentaux se trouvent dans le chapitre V. § 3.1.2.

d) Chromatographie d'exclusion de taille

Cette seconde purification est nécessaire pour obtenir une pureté d'au moins 95 % afin de mener à bien les tests de cristallogénèse. La chromatographie d'exclusion de taille, connue également sous le nom de tamis moléculaire, permet de séparer suivant leur masse moléculaire la protéine *rmTDO* d'autres constituants encore présents après une première purification suivant leur masse moléculaire.

La figure III.14 correspond à l'un des chromatogrammes obtenus lors de l'une de nos purifications par exclusion de taille ainsi que le gel SDS-PAGE des fractions récoltées lors de cette manipulation. Les fractions allant de 9 à 19 sur le chromatogramme représentent le pic de la protéine *rmTDO*.



MM : Marqueurs de masse moléculaire.

Pic : Fractions éluées (de la fraction 9 à la fraction 19) représentant le pic (correspondant à *rmTDO*).

Figure III.14 : (a) Exemple de chromatogramme et (b) exemple de gel SDS-PAGE des fractions obtenues lors de l'une des purifications de *rmTDO* par tamis moléculaire sur un dispositif FPLC.

Après cette seconde purification, le gel met en évidence une quantité importante de *rmTDO*. Néanmoins, malgré la présence d'un seul pic principal sur le chromatogramme, 3 bandes se retrouvent sur le gel SDS-PAGE (une vers 32.5 kDa et deux autres aux environs de 65 kDa). Afin de vérifier si ces bandes correspondent également à de la protéine His-tagagée et donc à la *rmTDO*, un western blot a été envisagé (Figure III.15). Les détails expérimentaux sont repris dans le chapitre V. § 3.1.3.

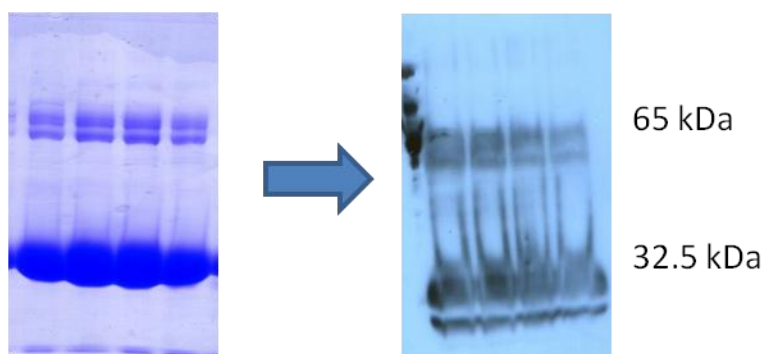


Figure III.15 : Transfert des protéines sur le film photographique après la seconde purification (exposition 1min.).

Grâce à cette expérience, on a pu montrer que la protéine *rmTDO* était pure vu que les bandes situées à environ 65 kDa ont également été reconnues par l'anticorps anti His-tag. Elles correspondent donc également à *rmTDO*. Ces bandes de masse moléculaire supérieures sont probablement dues à la dimérisation de la protéine (un monomère pèse 32.5 kDa). Cette dimérisation résisterait aux conditions dénaturantes vu la nature de la protéine dont le site actif se compose de deux monomères imbriqués l'un dans l'autre. D'autre part, la présence de deux bandes à des poids moléculaires différents signifierait que l'on est en présence d'un dimère replié et d'un autre partiellement dénaturé (Burgess N.K., 2008 ; Inouye M., 1972).

Suite à cette deuxième purification, une quantité importante de *rmTDO* suffisamment pure pour les essais de cristallogénèse a pu être obtenue (généralement ~7 mL soit 4.3 mg). Avant d'effectuer ces essais, la concentration, l'activité et la stabilité de cette enzyme ont été déterminées.

3.1.2 Caractérisation de l'enzyme

a) Détermination de la concentration de l'enzyme

Après purification, ~10 mL de solution protéique dont la concentration reste à déterminer ont été obtenus. Le coefficient d'extinction molaire de *rmTDO* étant de 59600 L.mol⁻¹.cm⁻¹ (Wilkins M.R., 1999) et sa masse moléculaire de 32500 Da (Zhang Y., 2007), la concentration à 280 nm était de 0.60 mg.mL⁻¹ (absorbance de 1.09).

Le spectre UV-visible de la protéine a été enregistré et représenté à la figure III.16. Les deux pics d'absorbance sur ce graphique situés à 287 et 406 nm représentent respectivement l'absorbance de la protéine (due aux résidus aromatiques) et la bande de Soret qui est caractéristique de l'hème.

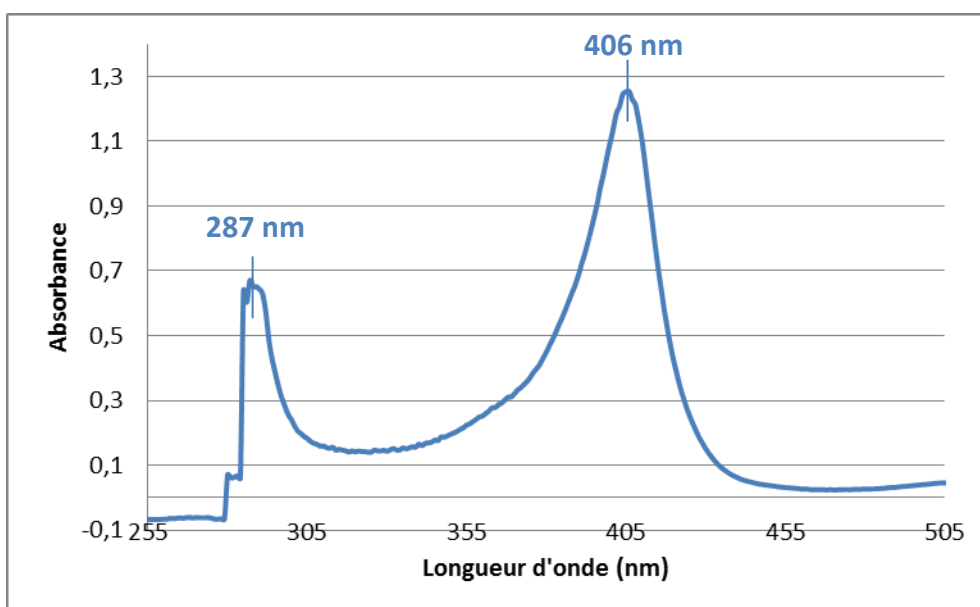


Figure III.16 : Exemple d'un spectre UV-Visible de la protéine *rmTDO*.

Le coefficient d'extinction molaire du groupement hème étant de 120.000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ (Lafont P., <http://www.biologie.upmc.fr/>), soit deux fois plus que celui de la protéine *rmTDO*, le rapport des deux pics d'absorbance devrait également être égal à deux. Si 100 % de cofacteur est lié à la protéine. Expérimentalement, le rapport des absorbances de ces deux pics nous donne une valeur de 1.87, ce qui équivaut à 93 % d'hème incorporé, ce qui concorde avec la théorie.

b) Activité enzymatique de rmTDO

Après avoir déterminé la concentration de la protéine *rmTDO*, l'activité de celle-ci a été mesurée pour trois concentrations finales (3200, 1600 et 800 ng/mL). Cette manipulation fait appel à un test colorimétrique discontinu. Comme pour le test précédent, § 3.1, l'enzyme est activée grâce à un agent réducteur capable de convertir l'ion ferrique du cofacteur hème en ion ferreux. Le mélange réactionnel incube 10 min. à 37°C avant que l'enzyme ne soit ajoutée. Après 15 min. de réaction, celle-ci est stoppée par ajout d'acide trichloroacétique (TCA) qui inactive l'enzyme et amorce l'hydrolyse chimique de la *N*-formyl-L-kynurénine en kynurénine pendant 30 min. à 60°C. Ensuite l'ajout de para-diméthyl aminobenzaldéhyde (p-DMAB), convertit la kynurénine en base de Schiff qui absorbe à 490 nm.

Le résultat de ce test est représenté par la figure III.17. Cette dernière met en évidence que plus la concentration en enzyme est élevée plus l'absorbance augmente. Ceci est cohérent avec le fait que plus la quantité d'enzyme est élevée, plus celle-ci convertit le L-Trp en *N*-formyl-L-kynurénine qui est par la suite hydrolysée en kynurénine pour enfin produire la base de Schiff. L'expérience a été réalisée en triplicat. Les valeurs de différences d'absorbance en fonction du temps devraient doubler proportionnellement à la concentration en enzyme, ce n'est pas tout à fait ce que l'on observe. Ceci est probablement lié à l'instabilité de l'enzyme comme on le verra ultérieurement.

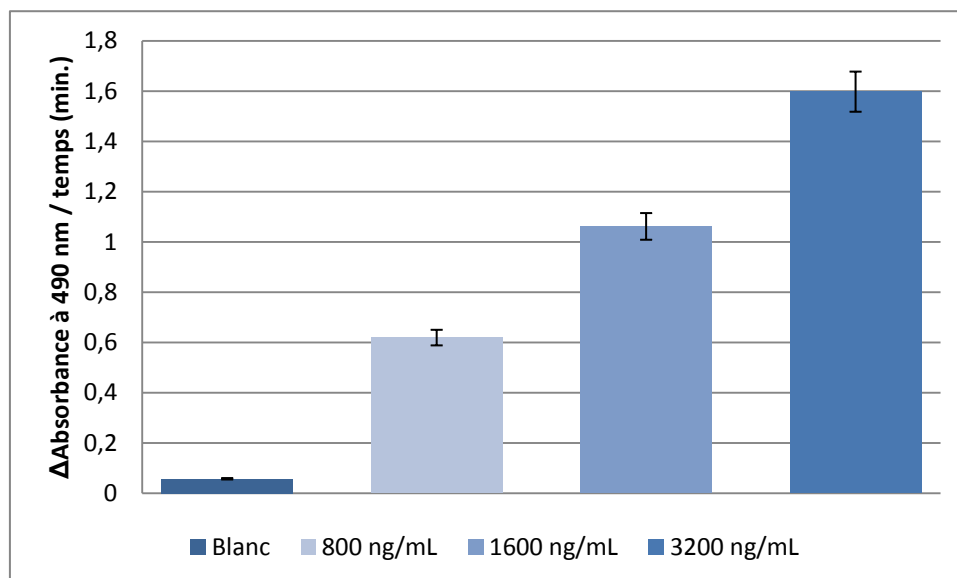


Figure III.17 : Résultat d'un test d'activité après purification pour trois concentrations en enzyme (3200, 1600 et 800 ng/mL).

c) Détermination du K_m

L'enzyme se caractérise également par sa réaction enzymatique qui est définie par deux constantes : l'une thermodynamique et l'autre cinétique. La constante thermodynamique encore appelée constante de Michaelis-Menten est symbolisée par K_m et reflète l'affinité de l'enzyme pour son substrat. La seconde constante, à savoir la vitesse initiale maximale symbolisée par V_{max} représente le taux de conversion maximum de substrat (S) en produit à une concentration de saturation. La relation entre ces variables et la vitesse initiale V_i est donnée par l'équation de Michaelis-Menten décrivant la vitesse de réaction enzymatique (Equation III.4) (Cornish-Bowden A., 2005).

$$V_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equation III.4}$$

V_i : Vitesse initiale de la réaction enzymatique pour une concentration de substrat [S] (mol/min).

V_{max} : Vitesse initiale maximale mesurée pour une concentration saturante de substrat (mol/min).

[S] : Concentration en substrat (mol/L).

K_m : Constante de Michaelis-Menten spécifique de l'enzyme. C'est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale (mol/L).

Afin de déterminer le K_m le test colorimétrique a été utilisé tel que décrit au § 2.2, à l'exception de sept concentrations finales différentes en L-Trp de 1 μM à 2 mM par pas de demi log et une concentration finale en enzyme (50 ng/mL) ont été choisies. Grâce à cette manipulation, on a pu obtenir graphiquement une branche d'hyperbole caractéristique de l'équation de Michaelis-Menten (Figure III.18).

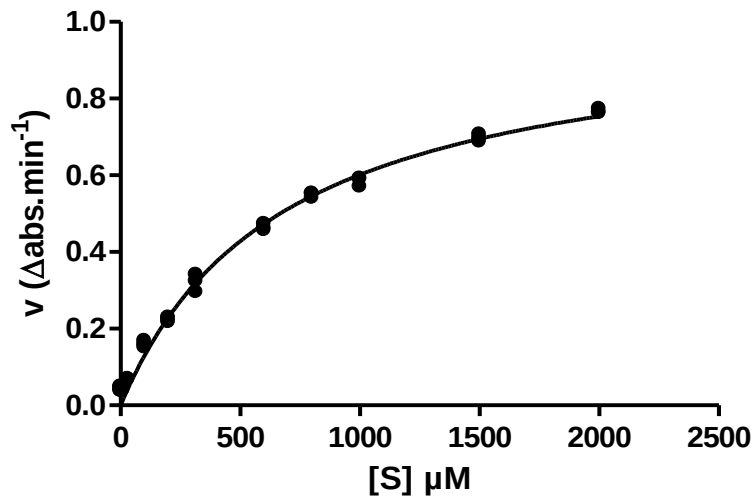


Figure III.18 : Détermination du K_m et $V_{\max}$ de la protéine *rmTDO*.

Néanmoins, l'absence d'un plateau ne permet pas de calculer le K_m . Les valeurs ont alors été représentées selon le graphique de Lineweaver-Burk afin d'en déduire le K_m et le $V_{\max}$ de manière plus précise (Figure III.19).

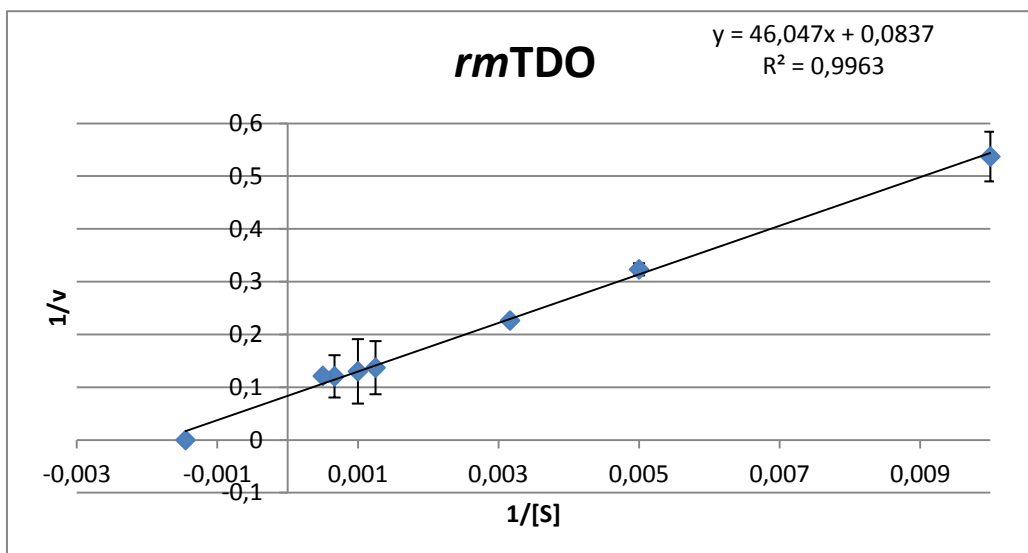


Figure III.19 : Détermination du K_m et V_{max} de la protéine *rmTDO*.

Le K_m et le V_{max} ont pu être déduits de l'équation et leurs valeurs sont respectivement de $688 \pm 14 \mu M$ et $12.5 \pm 2.3 \mu M/min$. La valeur de K_m est assez élevée contrairement à ce que l'on avait obtenu pour l'enzyme humaine, cela vient probablement de la spécificité de l'espèce.

d) Etude de stabilité de l'enzyme

Après avoir vérifié l'activité de *rmTDO*, il est intéressant de déterminer sous quelles conditions celle-ci doit être conservée. Un test colorimétrique discontinu similaire à celui réalisé précédemment au § 2.2 a été réalisé avec de l'enzyme stockée une nuit à $4^\circ C$, $-20^\circ C$, $-80^\circ C$ et $-80^\circ C$ en présence de 20 % glycérol et ce pour trois concentrations finales (3200, 1600 et 800 ng/mL).

Les résultats de cette expérience (Figure III.20) montrent que l'activité n'est maintenue qu'à $4^\circ C$. En effet, une absence de variation d'absorbance à 490 nm pour les trois autres conditions signifie qu'il n'y a pas formation de base de Schiff à partir de kynurénine dans le milieu réactionnel et donc aucune réaction enzymatique ne s'est produite.

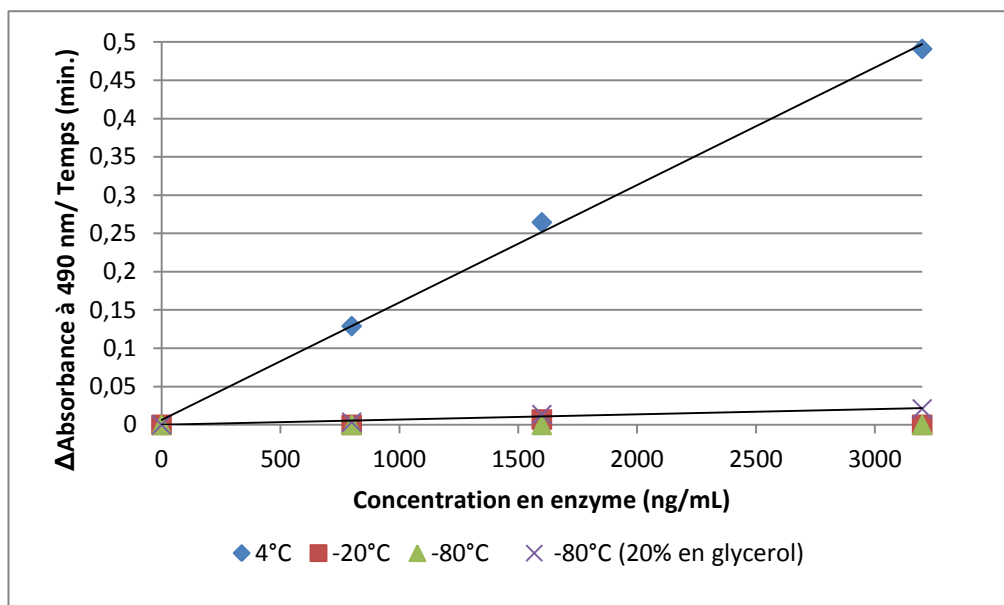


Figure III.20 : Résultat du test d'activité de l'enzyme stockée à 4°C, -20°C, -80°C et -80°C (20 % glycérol).

Sachant que l'enzyme n'est active qu'en la conservant à 4°C, un test d'activité va être réalisé après 0, 2, 5 et 8 jours pour évaluer la stabilité de cette dernière afin de connaître la durée de vie de l'enzyme. Cette information nous sera utile lors de la cristallogénèse.

Les résultats de ces tests d'activité réalisés au fil des jours (Figure III.18) montrent une décroissance de cette activité enzymatique au cours du temps.

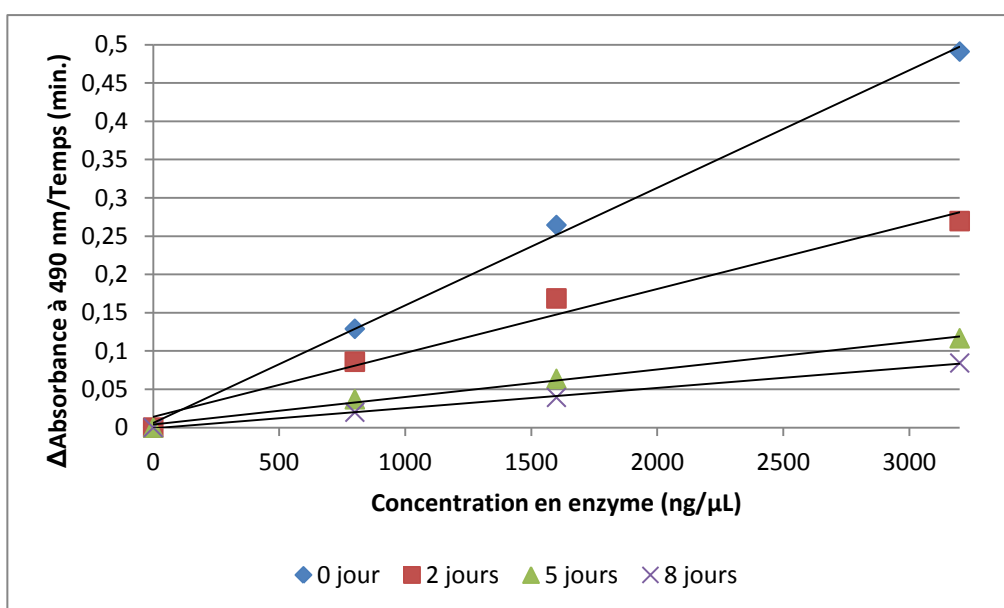


Figure III.21 : Résultat du test d'activité de l'enzyme stockée à 4°C après 0, 2, 5 et 8 jours.

Cette expérience a permis de mettre en évidence les soucis de conservation de l'enzyme car elle ne garde son activité qu'à 4°C et ce pour une courte durée. En effet, dans ce cas, le temps de demi vie est ~2 jours, après quoi, l'activité a chuté de moitié. Dans d'autres lots où l'activité de départ était plus élevée, soit pour une concentration de 1600 ng/mL en protéine, une variation d'absorbance à 490 nm de 1.4. Alors dans cette situation, l'enzyme conservée à 4°C restait active environ 5 à 6 jours après purification.

e) Essais de cristallogenèse sur rmTDO en présence d'inhibiteur

Le but de cette manipulation est d'obtenir un cristal de rmTDO en complexe avec un inhibiteur afin de comprendre le mode d'interaction de l'inhibiteur au sein du site actif. Pour que la cristallisation de la protéine suffisamment pure et concentrée ait lieu, la solubilité de celle-ci doit diminuer. En effet, cette solubilité dépend de divers facteurs environnementaux tels que la température, le pH et la présence d'agents de précipitation.

Deux méthodes vont être utilisées lors des manipulations afin d'obtenir des cristaux de protéines, la méthode de la goutte pendante et la méthode de la goutte assise représentées (Figure III.22).

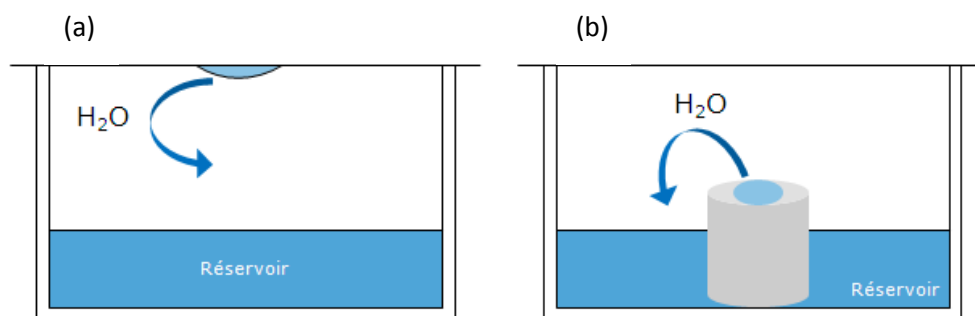


Figure III.22 : Représentation de la méthode de la goutte pendante (a) et de la goutte assise (b).

Le principe des deux méthodes est similaire. Dans les deux cas, le système est fermé hermétiquement. La goutte contient la protéine, un agent précipitant et une solution tampon, tandis que le réservoir contient tout sauf la protéine, c'est-à-dire un agent précipitant et une solution tampon. La solution dans le réservoir étant plus concentrée que celle dans la goutte, la vapeur d'eau diffuse de la goutte vers le réservoir pour ainsi atteindre un équilibre entre les deux solutions. Dans la goutte, la concentration en protéine et en

agent précipitant augmente et entraîne la cristallisation (Myerson A.S., 2002 ; Santarsiero B.D., 2002).

Dans la littérature, des cristaux de *rmTDO* ont déjà été obtenus (Zhang Y., 2007). Dans notre cas, le but de cette expérience est d'obtenir des cristaux de cette protéine en complexe avec les inhibiteurs (**58** et **61**) afin de pouvoir étudier leurs interactions avec les résidus du site actif de cette enzyme. Pour ce faire, la méthode utilisée est la co-cristallisation consistant à faire cristalliser l'enzyme en présence du ligand.

Premièrement, les conditions testées ont été celles proposées dans la publication de Zhang pour lesquelles un cristal de *rmTDO* a été obtenu.

Après avoir déterminé la concentration de la protéine (0.60 mg/mL), il s'avère que celle-ci est bien active et a incorporé l'hème correctement (ratio $A_{287/406} = 1.87$). Au niveau de sa stabilité, l'expérience a mis en évidence qu'elle n'était stable qu'à 4°C pour une durée de moins de six jours maximum selon les lots.

Une fois ces données à notre disposition, les essais de cristallogenèses en présence des inhibiteurs **58** et **61** ainsi que du substrat (L-Trp) ont été envisagés tout d'abord dans les conditions de la publication de Zhang. De ces conditions, aucune ne s'est montrée favorable à la cristallisation de *rmTDO*. Afin de voir si les inhibiteurs n'interféraient pas avec ces conditions, la cristallisation de la protéine seule a été testée de façon similaire. Si tel avait été le cas, la technique du soaking aurait pu être envisagée. Mais encore une fois aucun cristal n'a pu être obtenu de cette manière. Vu que les conditions de la littérature (Zhang Y., 2007) n'ont pas abouti à une cristallisation de la protéine, des kits commerciaux ont été utilisés de manière à étendre les conditions. Là encore aucun cristal ne s'est formé. Le détail des différentes conditions envisagées est repris dans le chapitre V. consacré aux méthodes expérimentales § 3.1.5.

De façon à remédier à ce problème, deux lots de la protéine *rmTDO* ayant une concentration de 22.5 mg/mL ont été envoyés à l'ULg (laboratoire du professeur Charlier) afin que de nombreuses conditions soient envisagées avec le robot Mosquito. Effectivement, ce dernier permet de vérifier en peu de temps un grand nombre de conditions de cristallisation, ce qui semble intéressant étant donné le manque de stabilité de la protéine.

De ces essais, une condition MPD (2-méthyl-2,4-pentanediol) 30 %, cacodylate de sodium 0.1 M pH = 6.5, acétate de magnésium 0.2 M) en présence de **58** a donné des sphérulites et des amas d'aiguilles de couleur rougeâtre et de taille d'environ 0.47 mm (Figure III.23).

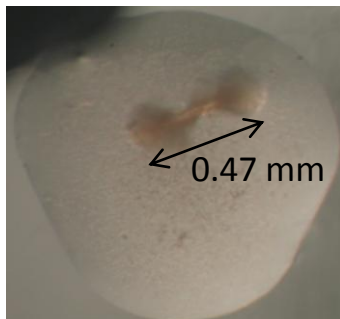


Figure III.23 : Goutte contenant *rmTDO* en présence du **58 dans MPD 30 %, cacodylate de sodium 0.1 M pH = 6.5, acétate de magnésium 0.2 M.**

Ces dernières conditions ont été améliorées par des additifs sans mener à des résultats exploitables. Malgré ce grand nombre de conditions étudiées aucun cristal de la protéine seule ou en complexe avec un inhibiteur ou son substrat n'est exploitable. Il s'avère donc essentiel de rendre l'enzyme plus stable afin d'espérer la cristalliser. Pour ce faire, une piste qui pourra être étudiée à l'avenir est celle du clivage de la queue poly-histidine présente à l'extrémité N-terminale de l'enzyme. Ce clivage s'est montré efficace sur l'enzyme humaine qui a vu sa stabilité augmenter. En effet, elle peut être conservée maintenant plusieurs mois à -80°C en présence de glycérol 20 %.

3.2 Cristallographie des inhibiteurs

N'ayant pas pu obtenir de cristaux de *rmTDO*, la cristallisation des inhibiteurs permettra de connaître la conformation de ces molécules ainsi que les ponts hydrogènes qu'ils seraient amené à faire au sein du site actif de l'enzyme. Ces informations pourront être mises en relation avec les études de *docking*.

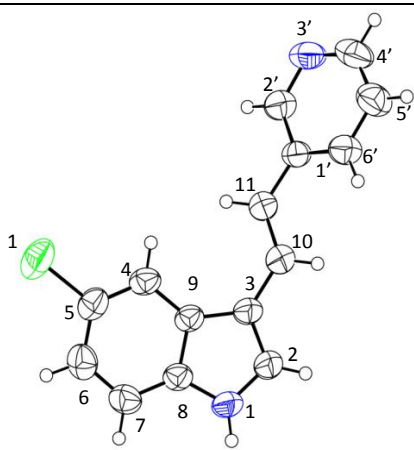
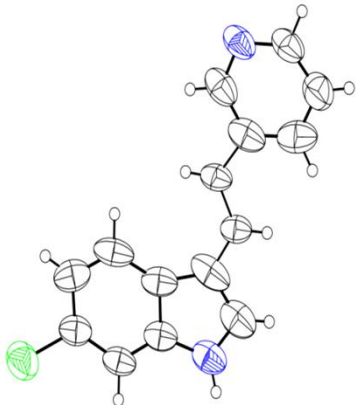
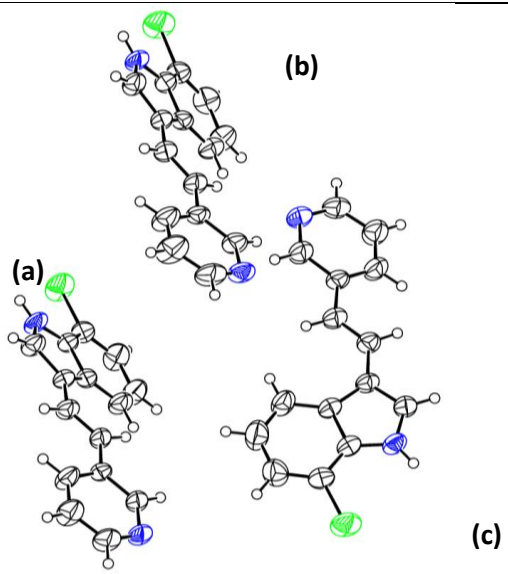
Les cristaux des trois isomères de position du ((*E*)-chloro-3-(2-pyridin-3-ylvinyl)-1*H*-indole (**22**, **31**, **38**) ont été obtenus. Ces composés ne sont certes pas les plus affins mais il faut savoir que seul un nombre très limité de structures cristallines de vinyl-1*H*-indoles substitués (exemples : 3-(2'-nitrovinyl) indole (code CSD : GOJDUE), 3-(1*H*-indol-3-yl) acrylate (code CSD : GUGLEA), 3-(3-indolyl) acrylamide (code CSD : SUVYIR) ou (*E*)-4-(3-indolylvinyl)-*N*-méthylpyridinium (code CSD : TIKBEU et TIKBIY)) ont été déterminées à ce jour par

cristallographie. Les efforts visant à obtenir des cristaux de différents fluoro-3-(2-pyridin-3-indolyl)-1H-indole substitués, y compris les isomères du 680C91 se sont avérés infructueux. En revanche, les cristaux des trois isomères chlorés (**22**, **31**, **38**), nous ont permis d'obtenir des informations structurales intéressantes concernant les conformations moléculaires ainsi que le packing cristallin. De plus, ils pourront être mis en relation avec les composés **58** et **61** qui ont également pu être cristallisé.

a) Cristallographie des trois isomères chlorés

Les cristaux des trois isomères: ((*E*)-chloro-3-(2-pyridin-3-ylvinyl)-1*H*-indoles ont été obtenus. Le tableau III.13 ci dessous reprend les différentes conformations cristallines pour les inhibiteurs **22**, **31** et **38**.

Tableau III.13 : Vues des conformations cristallines (ORTEP) pour les inhibiteurs 22 [haut], 31 [milieu] et 38 [bas] (la numérotation est la même pour toutes les molécules). L'unité asymétrique de l'isomère 38 présente 3 molécules (a, b, c).

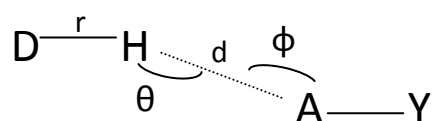
Inhibiteur	ORTEP
22	
31	
38 (3 molécules présentent dans l'u.a.)	

Ces trois composés possèdent une configuration de type *E* au niveau de la double liaison C(10)=C(11). De manière surprenante, cette étude révèle une déviation significative de la coplanarité. En effet, les valeurs des angles dièdres entre le plan formé par la pyridine et celui de l'indole sont : **22** = 46.49 (7)° ; **31** = -179.10 (6)° ; **38(a)** = 22.23 (7)° ; **38(b)** = 19.01 (5)° ; **38(c)** = 17.17 (5)°. Le tableau 1 de l'annexe 4 présente les valeurs des longueurs de liaisons des trois isomères. L'influence de la position de l'atome de Cl dans les trois isomères est essentiellement limitée aux longueurs de liaison C(4)-C(5), C(5)-C(6) et C(6)-C(7).

Quant au packing cristallin de **22**, **31** et de **38(a, b, c)**, il est essentiellement déterminé par deux facteurs à savoir : le π -stacking et les liaisons hydrogène.

Un pont hydrogène est généralement constitué par un donneur D-H et un accepteur A. Dans ce travail, ils seront représentés de la sorte : D-H...A. La liaison peut être décrite selon différents paramètres *d*, *r*, θ et ϕ définis (Tableau III.14).

Tableau III.14 : Les interactions hydrogène observées dans les structures cristallines de 22, 31 et 38. La définition des paramètres utilisés proviennent de (Desiraju G. R., 2001).

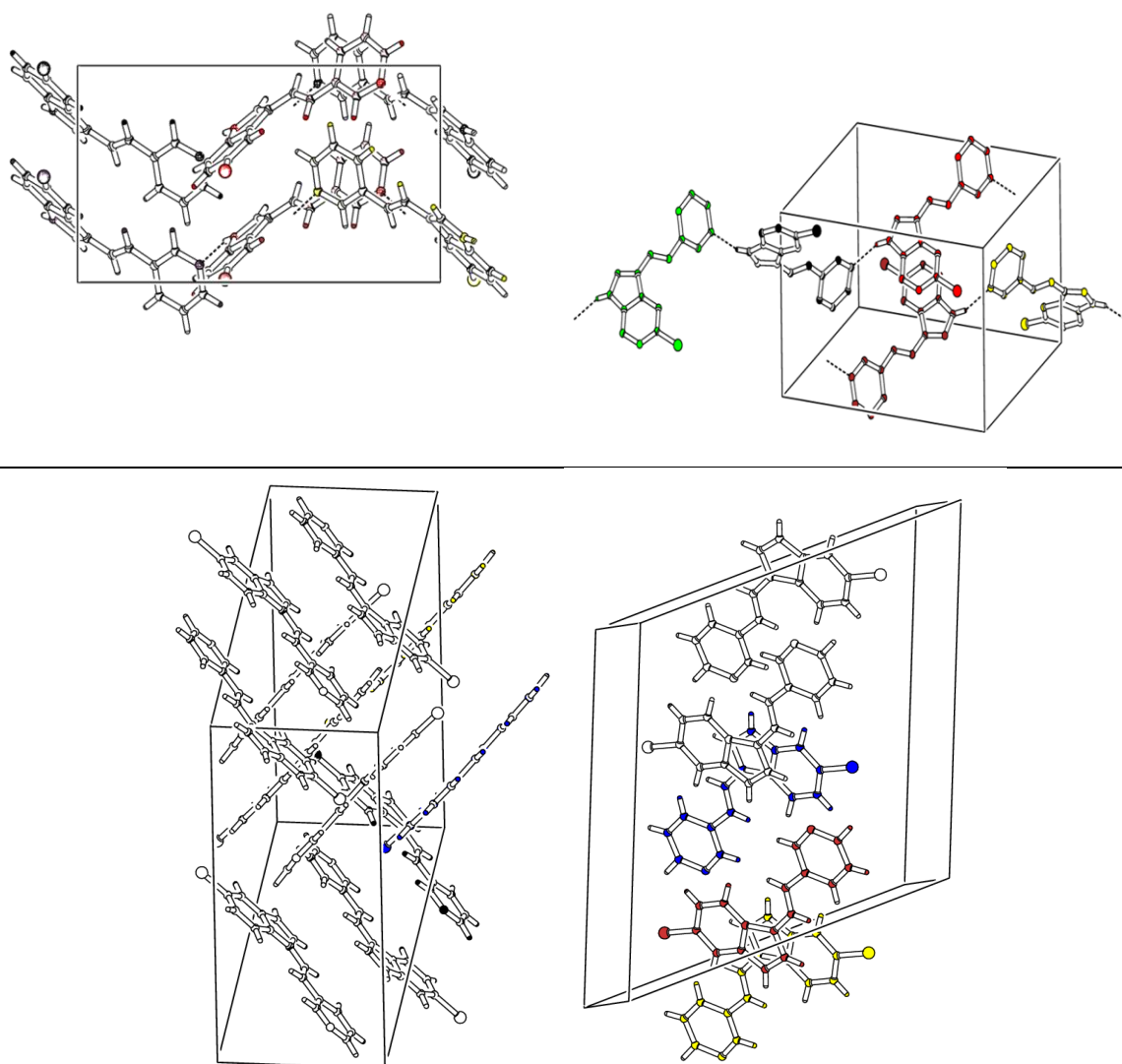


D --- H	...A	<i>r</i> (Å)	<i>d</i> (Å)	D...A (Å)	θ (°)	Symétrie
22 N(1) --- H(1)	---N(3')	0.86	2.12	2.942(2)	160	-1/2+x, 1/2-y, -1/2+z
31 N(1) --- H(1)	---N(3')	0.87	2.03	2.844(6)	155	-x, y, 1/2-z
31 C(7) --- H(7)	---Cl(1)	0.99	2.82	3.738(7)	171	-1/2+x, -1/2+y, -z
38(a) N(1) --- H(1)	---N(3')	0.86	2.06	2.902(3)	165	-1+x, y, z
38(b) C(1) --- H(1)	---N(3')	0.86	2.07	2.898(4)	162	-1+x, y, z
38(c) C(1) --- H(1)	---N(3')	0.86	2.05	2.895(4)	169	1+x, y, z

Pour ces trois isomères **22**, **31** et **38**, il existe un pont hydrogène relativement fort entre l'azote (N3') de la pyridine (accepteur de pont hydrogène, A) et le (N1-H1) du noyau indolique (donneur de pont H, DH) (Tableau III.14). Le composé **31** possède également un autre pont hydrogène intramoléculaire important formé entre le (Cl1) et le (C7) de l'indole. Les isomères **38(b)** et **38(c)** possèdent des ponts hydrogène faibles entre l'azote (N3') de la pyridine et le (C1-H1) du noyau indole. Le nombre total (un D-H et un A par molécule) et la force (paramètre *d*) de ces ponts hydrogène est similaire pour les trois isomères. Les

paramètres géométriques utilisés pour décrire les interactions π stacking sont définis dans le tableau 2 repris en annexe 4 (Gallivan J.P., 1999 ; McGaughey B.J., 1998).

Les différents packing cristallins des composés **22**, **31** et **38** sont repris à la figure III.24. Dans le packing du composé **22**, le cycle benzénique du noyau indole interagit avec le pyrrole d'un autre noyau indolique par interactions de type « π - π stacking ». Il existe également une autre interaction π - π entre la pyridine et le noyau indole. En ce qui concerne la molécule **31**, seul les cycles pyrroles interagissent entre eux. Enfin, pour le composé **38**, seuls les cycles benzéniques des noyaux indoles interagissent ensemble.



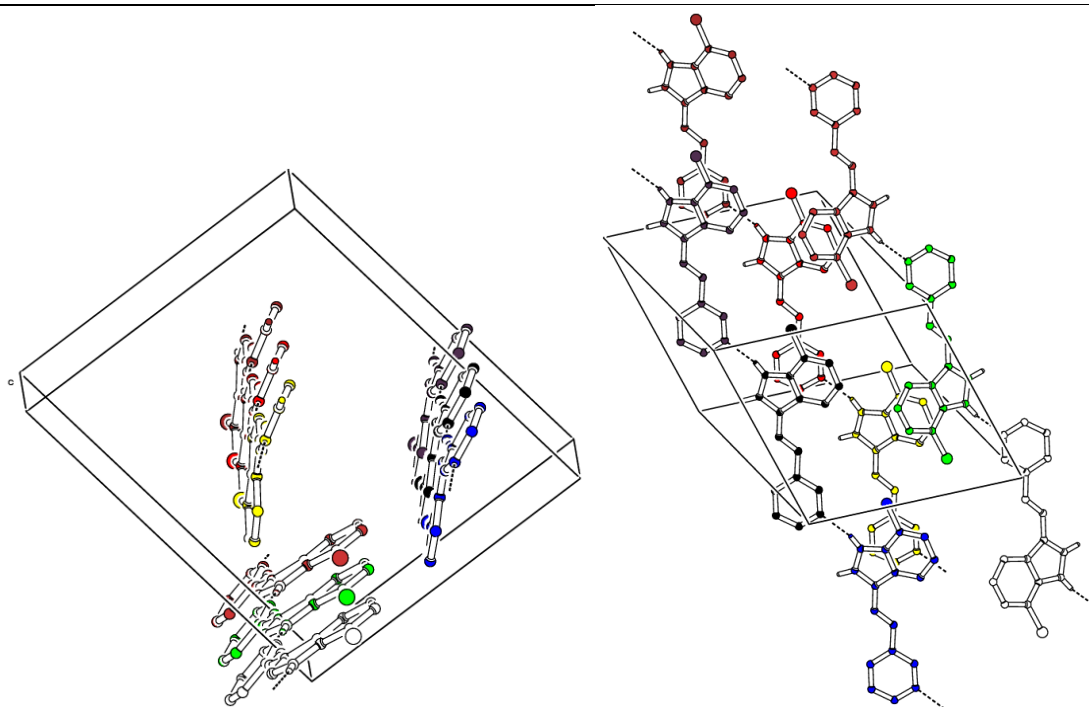


Figure III.24 : Arrangement des packing cristallins de 22 [haut], 31 [milieu] et 38 [bas]. Deux orientations ont été sélectionnées pour chaque composé afin de mieux visualiser les ponts hydrogènes et les interactions π -stacking.

Il est tentant de comparer les effets stabilisants du packing cristallin avec certains paramètres physico-chimiques expérimentaux des composés, en particulier le point de fusion (Pf) et la solubilité. En effet, **38** est engagé dans différentes interactions de type ponts hydrogène contrairement au composé **22** mais l'analyse du packing cristallin suggère que les interactions π - π sont plus fortes pour **22**. Ceci est en accord avec les valeurs de points de fusion des composés. En effet, le composé **22**, dans lequel il y a une meilleure stabilisation par π -stacking possède un point de fusion plus élevé (222-223°C) que le composé **38** (204-205°C) engagé dans des interactions de stacking faibles et des ponts hydrogène similaires. Quant au packing cristallin du composé **31**, son point de fusion (204-208°C) se rapproche plus de **38** pour des raisons similaires à celles évoquées ci-dessus. En effet, les interactions de stacking sont faibles pour cette molécule, cela vient sans doute du fait qu'il établit un pont hydrogène avec le (Cl1), ce qui provoque un déplacement en quinconce des indoles et donc moins d'interactions de stacking.

La solubilité aqueuse de ces composés (Tableau III.15) est corrélée non seulement à la stabilité du packing à l'état solide mais également aux effets de solvation. Comme attendu,

la solubilité de cette série de composés est plus élevée en milieu acide (pH = 1.0). Ceci s'explique par la protonation de la pyridine à faible pH tout comme le composé **30** de référence § 2.3.2.

Tableau III.15 : Point de fusion et solubilité de 22, 31 et 38.

Composé	22	31	38
Point de fusion (°C)	222-223	204-208	204-205
pH	Solubilité moyenne (μM)		
1.0	>500	473.3 ± 3.0	>500
7.4	27.0 ± 8.0	22.9 ± 1.0	2.30 ± 1.0
9.0	72.2 ± 7.0	31.4 ± 1.0	5.70 ± 3.0

Si on se réfère à la stabilité des solutés solides (les ponts hydrogène sont similaires et les interactions de stacking différentes) comme expliqué ci-dessus pour les points de fusion expérimentaux, les différences de solubilités ne s'expliquent pas facilement. En effet, le composé **22**, avec un packing plus fort (et un point de fusion plus élevé), est aussi plus soluble que **31** et **38** (27 μM pour **22** comparé à 22.9 μM pour **31** et 2.3 μM pour **38** à pH 7.4). Les solubilités plus faibles (à pH 7.4 et 9.0) sont expliquées par des effets de solvation. Effectivement, comme le montre l'étude des PEM (potentiel électrostatique moléculaire) (Moineaux L., 2012), la position de l'atome de chlore limite l'accès au groupement NH de l'indole et donc diminue significativement les interactions stabilisantes dont notamment celles avec les molécules d'eau. Cet effet stérique de l'atome de Cl qui affecte la solubilité aqueuse (médié par le pont hydrogène avec le NH de l'indole) pourrait aussi expliquer en partie la faible affinité que le composé **38** ($IC_{50} = 32 \pm 0.02$) a par rapport à l'enzyme TDO § 2.2.2.

b) Composé 58

Ce composé possède une configuration de type *E* au niveau de la double liaison C(10)=C(11). Contrairement aux dérivés chlorés, le composé **58** est coplanaire car il possède un angle dièdre entre le plan formé par la pyridine et celui de l'indole de 179.07 (19)°. La maille cristalline de l'inhibiteur **58** est constituée de quatre molécules assemblées en feuillet

qui n'interagissent pas entre eux à l'aide de ponts hydrogène ou liaison π -stacking. Les molécules sont planes et reliées entre elles par un pont hydrogène entre le NH(4') d'une molécule et le N(2') d'une molécule voisine. L'interstice entre les feuillets est occupé par le solvant, en l'occurrence, le dioxane qui forme également deux ponts H (Figure III.25 et III.26).

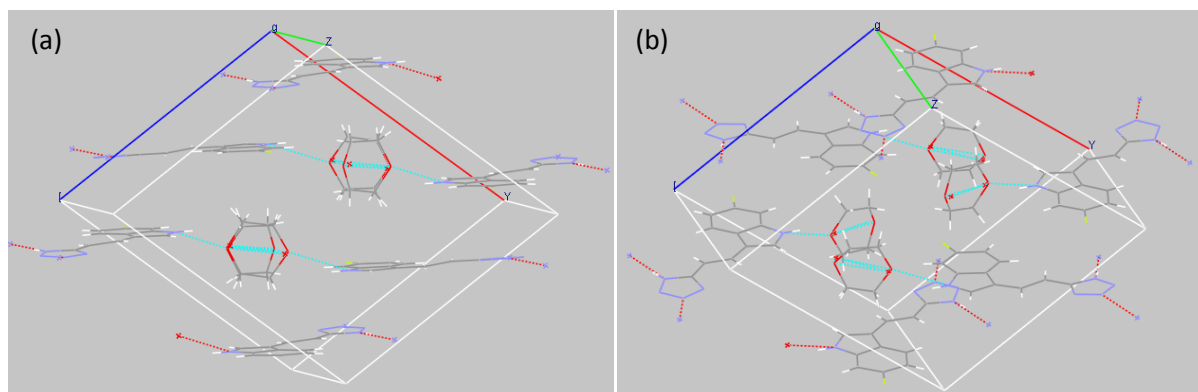


Figure III.25 : Maille cristalline du composé 58 en présence de dioxane (a) et rotation à 90° (b).

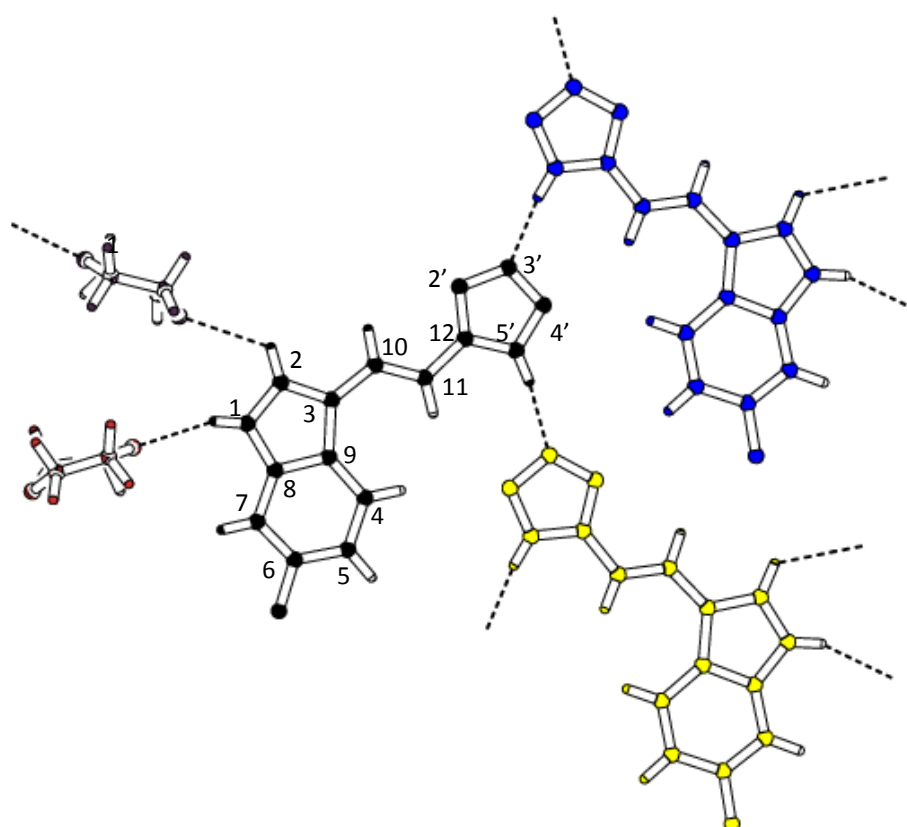


Figure III.26 : Représentation schématique de molécules de 58 formant un feuillet en présence de dioxane.

Les différents ponts hydrogène qui stabilisent les molécules **58** dans le cristal sont repris dans le tableau III.16.

Tableau III.16 : Interactions hydrogène entre les molécules 58 et le dioxane dans la structure cristalline.

Donneur---H	Accepteur	D-H (Å)	H---A (Å)	D---A (Å)	D-H---A (°)	Symétrie
<i>Interactions intermoléculaires</i>						
N(1)---H(1)	O(1)	0.86	2.21	2.95(7)	144	x, 1/2-y, 1/2+z
N(1)---H(1)	O(1')	0.86	2.31	3.07(7)	148	x, 1/2-y, 1/2+z
C(2)---H(2)	O(2)	0.93	2.43	3.09(5)	127	1-x, 1-y, -z
C(2)---H(2)	O(2')	0.93	2.54	3.10(5)	119	1-x, 1-y, -z
N(2')---H(2')	N(4')	0.86	1.95	2.81(2)	172	-x, -1/2+y, 1/2-z

Les feuillets du composé **58** présentent trois ponts H intermoléculaires spécifiques de **58** en tenant compte de l'agitation du dioxane. Il n'y a pas non plus d'interaction π -stacking. Néanmoins, le feuillet présente une coplanarité confirmée par l'angle de torsion qui est de 179.07 (19)°. Cette dernière est sans doute renforcée par le fait que la molécule se compose essentiellement de trois cycles aromatiques.

Le tableau III.17 nous permet d'évaluer la délocalisation électronique au sein de la molécule. En effet, la longueur de liaison C(10)-C(11) est plus courte que les longueurs des liaisons C(11)-C(12) et C(3)-C(10). Cependant, la double liaison C(10)-C(11) est plus longue qu'une liaison $C_{sp^2}-C_{sp^2}$ tabulée (Allen F.H., 1987) vu que cette liaison est délocalisable et possède donc un certain caractère de liaison simple, plus longue. Par contre, les simples liaisons C(11)-C(12) et C(3)-C(10) sont plus courtes que les valeurs tabulées étant donné qu'elles possèdent quant à elles un certain caractère de liaison double vu la délocalisation. On remarque également que la liaison N(5')-C(12) est plus longue que C(12)-N(2') ce qui confirme que l'hydrogène se trouve lié au N(5').

Tableau III.17: Longueurs de liaisons au sein de la molécule 58.

Type de liaison	Longueur de liaison (Å)	Longueur de liaison tabulée (Allen F.H., 1987) (Å)
C(12)-N(2')	1.323(2)	C_{sp2}-N 1.360 (15)
N(2')-N(3')	1.348(3)	N(3)-N(2) 1.366(19)
N(3')-N(4')	1.300(3)	N(2)-N(2) 1.304(19)
N(4')-N(5')	1.336(2)	N(2)-N(2) 1.304(19)
N(5')-C(12)	1.338(3)	C_{Ar}-N(2) 1.355 (14)
C(12)-C(11)	1.446(3)	C_{Ar}-C_{sp2} 1.483(15)
C(11)-C(10)	1.331(3)	C_{sp2}-C_{sp2} 1.316(15)
C(3)-C(10)	1.438(3)	C_{Ar}-C_{sp2} 1.483(15)

c) Composé 61

Le composé **61** possède une configuration de type *E* au niveau de la double liaison C(10)=C(11). Contrairement aux dérivés chlorés, le composé **61** est coplanaire car il possède un angle dièdre entre le plan formé par la pyridine et celui de l'indole de -175.9 (4)°, tout comme pour la molécule **58**.

Quant à sa maille cristalline, elle est constituée de quatre molécules du composé **61** assemblées en feuillets distinct l'un de l'autre. Aucune interaction de type pont H ou π -stacking n'est observée. Deux molécules d'un feuillet forment des dimères stabilisés par ponts H au moyen de leur extrémité acide carboxylique (Figure III.27). Le groupement NH de l'indole complète la stabilisation au sein du feuillet par le biais d'un pont H avec l'oxygène de la fonction acide d'une molécule voisine.

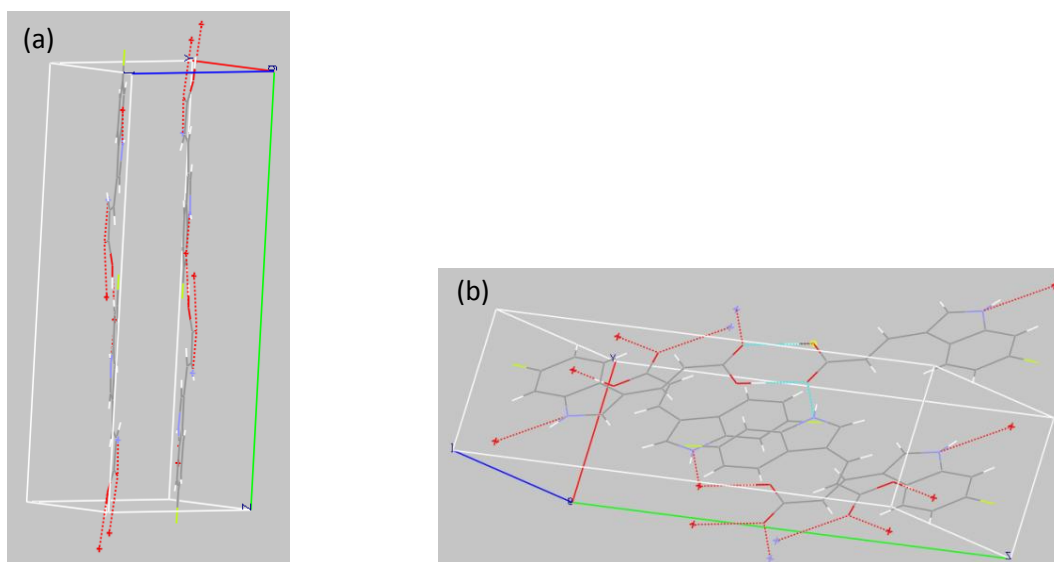


Figure III.27 : Maille cristalline du composé **61 (a) et rotation à 90° (b).**

Grâce à cette stabilisation en dimère et aux interactions intermoléculaires au sein de l'empilement cristallin de la molécule **61**, les extrémités acides carboxyliques sont coplanaires au cycle indolique (Figure III.28).

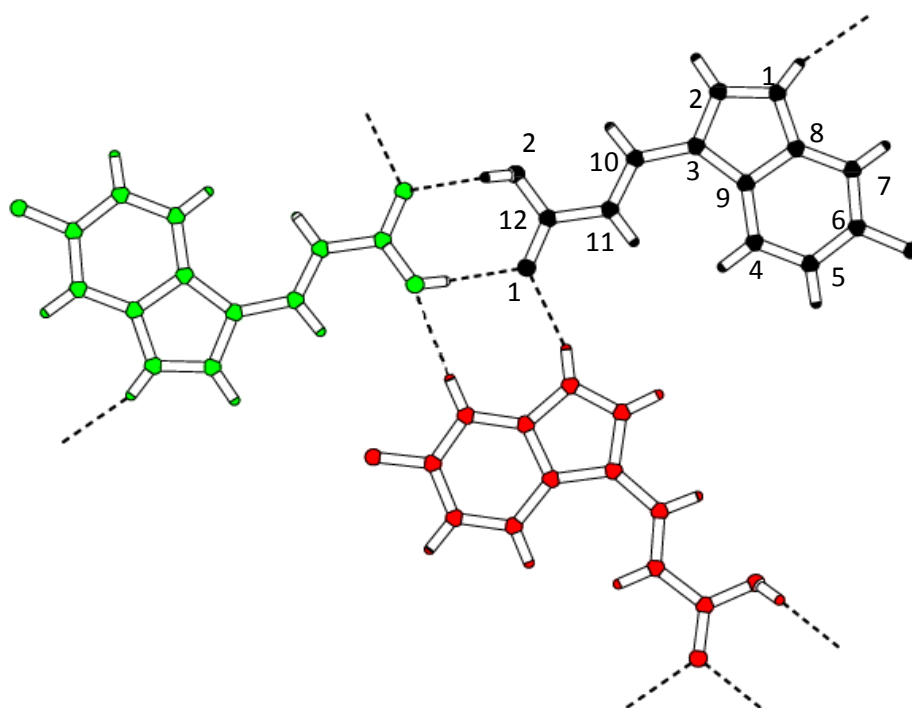


Figure III.28 : Schéma de trois molécules du composé **61 formant un feuillet.**

Les différents ponts hydrogène qui stabilisent les molécules **61** dans le cristal sont repris dans le tableau III.18.

Tableau III.18 : Interactions entre les molécules 61 dans la structure cristalline.

Donneur---H	Accepteur	D-H (Å)	H---A (Å)	D---A (Å)	D-H---A (°)	Symétrie
<i>Interactions intermoléculaires</i>						
N (1)---H(1)	O(1)	0.86	2.14	2.960(4)	160	-1+x,1/2-y,1/2+z
O (2)---H(2)	O(1)	0.82	2.06	2.615(3)	124	2-x,-y,-z
C(7)---H(7)	O(2)	0.93	2.38	3.304(4)	176	1-x, 1/2+y,1/2-z
<i>Interactions intramoléculaires</i>						
C (10)---H(10)	O(2)	0.93	2.44	2.777(4)	101	

La coplanarité de la molécule **61** est expliquée par les interactions inter- et intramoléculaires du tableau III.19 et confirmée par la valeur de l'angle de torsion de -175.9 (4)°.

Tableau III.19 : Longueurs de liaisons au sein de la molécule 61.

Type de liaison	Longueur de liaison (Å)	Longueur de liaison tabulée (Allen F.H., 1987) (Å)
O(1) - C(12)	1.254(4)	C _{sp2} -O 1.229(17)
O(2) - C(12)	1.290(4)	C _{sp2} -OH 1.293(19)
C(10) - C(11)	1.339(5)	C _{sp2} -C _{sp2} 1.316(15)
C(11) - C(12)	1.432(5)	C _{sp2} -COOH 1.475(15)
C(3) - C(10)	1.425(5)	C _{Ar} -C _{sp2} 1.483(15)

Le tableau III.19 nous permet de confirmer que notre molécule possède un groupement carboxylique et non carboxylate étant donné que la liaison O(1)-C(12) est plus courte que la liaison O(2)-C(12). Ensuite, on remarque également la présence d'un lien éthylène entre le cycle indolique et le groupement carboxylique. En effet, la longueur de liaison C(10)-C(11) est plus courte que les longueurs des liaisons C(11)-C(12) et C(3)-C(10). Cependant, la double liaison C(10)-C(11) est plus longue qu'une liaison C_{sp2}-C_{sp2} tabulée (Allen F.H., 1987) vu que cette liaison est délocalisable et possède donc un certain caractère de liaison simple, plus longue. Par contre, les simples liaisons C(11)-C(12) et C(3)-C(10) sont

plus courtes que les valeurs tabulées ($C_{sp2-COOH}$) et ($C_{Ar-C_{sp2}}$) étant donné qu'elles possèdent quant à elles un certain caractère de liaison double vu la délocalisation.

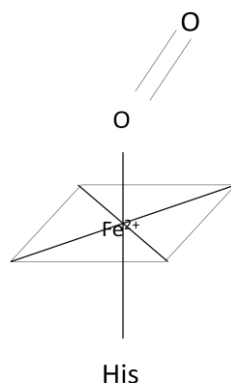
Dans ce cas, le packing cristallin peut-être mis en relation avec la solubilité. En effet, le composé **58** présente moins d'interactions, un seul pont H, par rapport au composé **61** qui est stabilisé par un dimère de dimère et possède une solubilité inférieure à **58**.

D'autre part, la cristallogenèse de sels de **61** ou du **58** s'avérerait intéressante afin de comparer les différences entre la forme protonnée et déprotonnée de ces composés. De plus, la connaissance des pK_a de ces composés avait permis de préciser que la forme de la molécule qui interagit au niveau de l'enzyme, à pH physiologique, est la forme déprotonnée aussi bien pour **58** que pour **61**. Des essais ont déjà été effectués en présence de dicyclohexylamine et guanidine à différentes concentrations à 20°C et 4°C mais aucun cristal ne s'est formé dans ces conditions. Néanmoins, les simulations de *docking* ont été réalisées sur les formes déprotonnées de ces inhibiteurs.

3.3 Modèle d'inhibition : *docking*

La structure cristallographique de l'enzyme TDO humaine n'a pas encore pu être obtenue à ce jour. De plus, nos essais de cristallogenèse sur *rmTDO* en complexe avec un inhibiteur n'ont pas abouti à une structure 3D exploitable. Nous avons donc choisis parmi les deux enzymes bactériennes cristallisées, celle qui présente le plus d'identité avec l'enzyme humaine, à savoir, *xcTDO* (34 %) (Forouhar F., 2007). Cette identité de séquence, particulièrement au sein du site actif, en fait un bon outil pour étudier le mode de liaison des inhibiteurs. L'analyse du mode d'interaction du 6-fluorotryptophane, un analogue du substrat cristallisé en présence de *xcTDO* met en évidence différentes interactions stabilisantes (Figure III.29). En effet, le noyau indolique est stabilisé *via* un pont H entre le groupement NH de l'indole et le groupement imidazole de l'His55. Une étude de mutagenèse montre que l'His55 n'est pas une base essentielle vu que l'activité catalytique est conservée avec les mutants H55A et H55S. Néanmoins, l'His55 joue un rôle important dans la prévention de la formation d'un complexe ferrique enzyme-ligand non productif. De plus, cette base participe à la stabilisation des molécules d'eau au sein du site actif en l'absence de substrat (Thackray S.J., 2008).

Schéma III.5 : Représentation schématique de l'hème coordonnant un résidu His et une molécule de dioxygène.



A présent, l'inhibiteur de référence ainsi que les composés **22**, **31**, **38**, **58** et **61** vont être étudiés par simulation de *docking* avec les mêmes paramètres en utilisant le programme GOLD (Jones G., 1997) dans le site actif de xcTDO (voir chapitre V. § 3.3). Les résultats de nos simulations de *docking* sont repris aux figures III.30-32.

Il en ressort que le composé 680C91 s'oriente de façon similaire au substrat (L-Trp) et conserve le pont H avec l'His55 (Figure III.30).

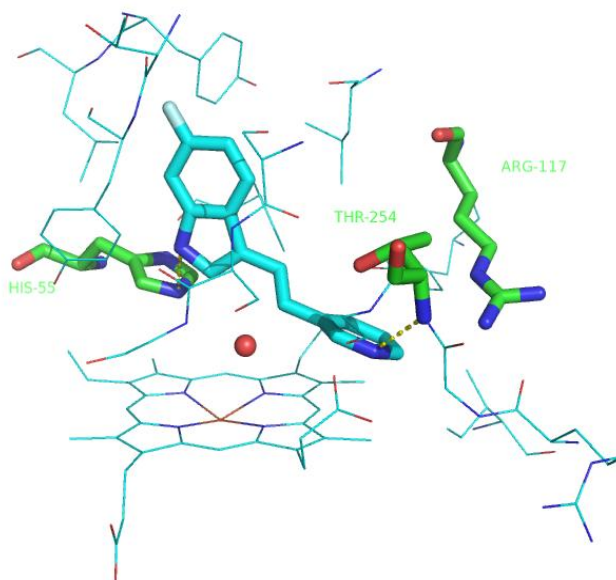


Figure III.30 : Vue du composé 30 au sein du site actif de xcTDO (image réalisée avec le programme Pymol Delano W. L., 2008).

Dans cette orientation le groupement 3-pyridyle de l'inhibiteur se trouve à l'entrée du site actif et interagit avec le NH du squelette de la Thr254 par un pont H.

Les deux molécules inhibitrices **58** et **61** se placent dans le site actif de la même manière que le composé **30**. De plus, le cycle indolique de l'inhibiteur de référence n'est pas coplanaire avec l'extrémité pyridyle tout comme pour les autres inhibiteurs. Néanmoins, ce n'est pas ce que nous avons obtenu précédemment lors de l'étude cristallographique. En perspective, il serait donc intéressant de réaliser d'autres tests de cristallogenèse de sels de ces molécules afin de déterminer si la structure fournie et utilisée pour le *docking* (déprotonnée) sera la même ou non que celle obtenue lors de la cristallogenèse des composés (protonnés).

L'oxygène de la molécule d'eau présente dans le site actif interagit avec l'hydrogène lié à l'azote du cycle indolique pour chacun des inhibiteurs. Ces derniers sont insérés profondément dans la cavité du site actif. Le fragment indole est stabilisé perpendiculairement au plan formé par l'hème *via* une liaison hydrogène entre son NH et l'imidazole de l'His72. A l'autre extrémité, les fragments aussi bien tétrazole qu'acide carboxylique pointent vers l'entrée du site actif et interagissent avec la chaîne guanidinium de l'Arg117. L'analyse par simulation de *docking* de ces composés confirme que l'introduction de groupements chargés négativement en position 3 autour du noyau indole permet une interaction avec le guanidinium de la chaîne latérale de l'Arg117 tout en améliorant sa solubilité ne perturbant pas la stabilisation du composé dans sa configuration inhibitrice.

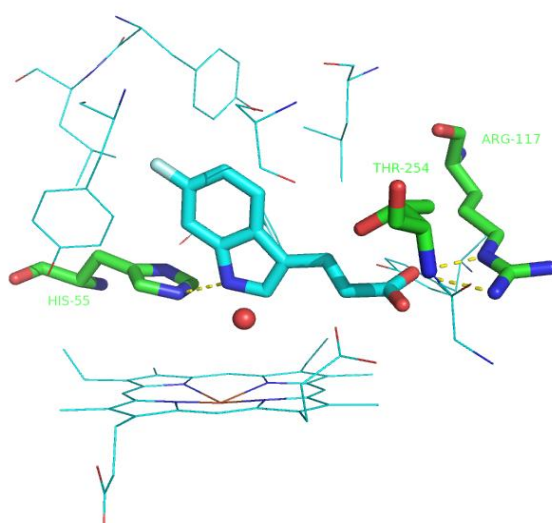


Figure III.31 : Vue du composé 61 au sein du site actif de xcTDO. La molécule d'eau est représentée par la sphère rouge. (Image réalisée avec le programme Pymol, Delano W.L., 2008)

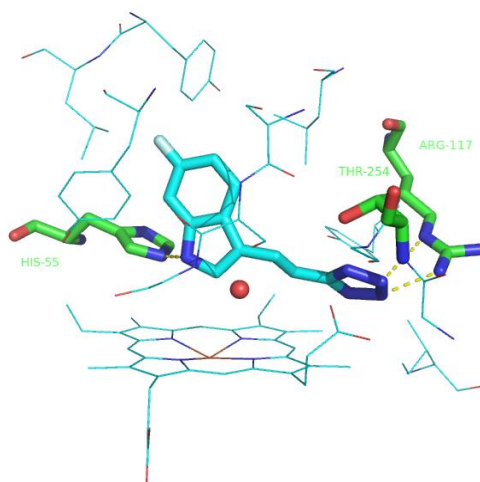


Figure III.32 : Vue du composé 58 au sein du site actif de xcTDO. La molécule d'eau est représentée par la sphère rouge. (Image réalisée avec le programme Pymol Delano W.L., 2008)

Les simulations de *docking* mettent également en évidence l'accepteur de pont H (N3') et le donneur de pont H (N1-H1) avec les interactions qu'ils réalisent avec l'His55 et la Thr254 (Figure III.32).

Quant aux trois isomères, la géométrie obtenue dans les solutions de *docking* est cohérente avec la structure cristallographique. En effet, la non-coplanarité et la configuration *E* observées toutes deux dans l'étude cristallographique de ces composés sont conservées dans le *docking*. De plus, il existe également des liaisons essentielles (ponts hydrogène et π -stacking) présentes entre les inhibiteurs et les résidus du site actif de xcTDO. Par exemple, la formation de ponts hydrogène entre le NH de l'indole et l'His55 et entre l'azote de la pyridine et la Thr254. Ces liaisons hydrogène sont similaires à celles observées dans l'étude cristallographique réalisée sur ces isomères de chloro-3-(2-pyridin-3-ylvinyl)-1H-indole. Ces molécules interagissent de la même manière que l'inhibiteur de référence (680C91).

De plus, sur base des simulations de *docking*, il est tentant de suggérer que l'inhibition plus faible de TDO tant au niveau enzymatique que cellulaire du composé **38** est due à un déplacement significatif de cet inhibiteur, comparé aux molécules **22** et **31** qui se superposent (Figure III.33). Ce déplacement induit par des effets stériques causés par l'atome de Cl pourrait mener à une interaction pont hydrogène moins favorable avec l'His55. De plus, la réduction significative de la valeur du moment dipolaire de **38** par rapport à **22** et

31 pourrait aussi expliquer de plus faibles interactions π - π avec le site actif de TDO et donc réduire l'affinité pour l'enzyme (Moineaux L., 2012).

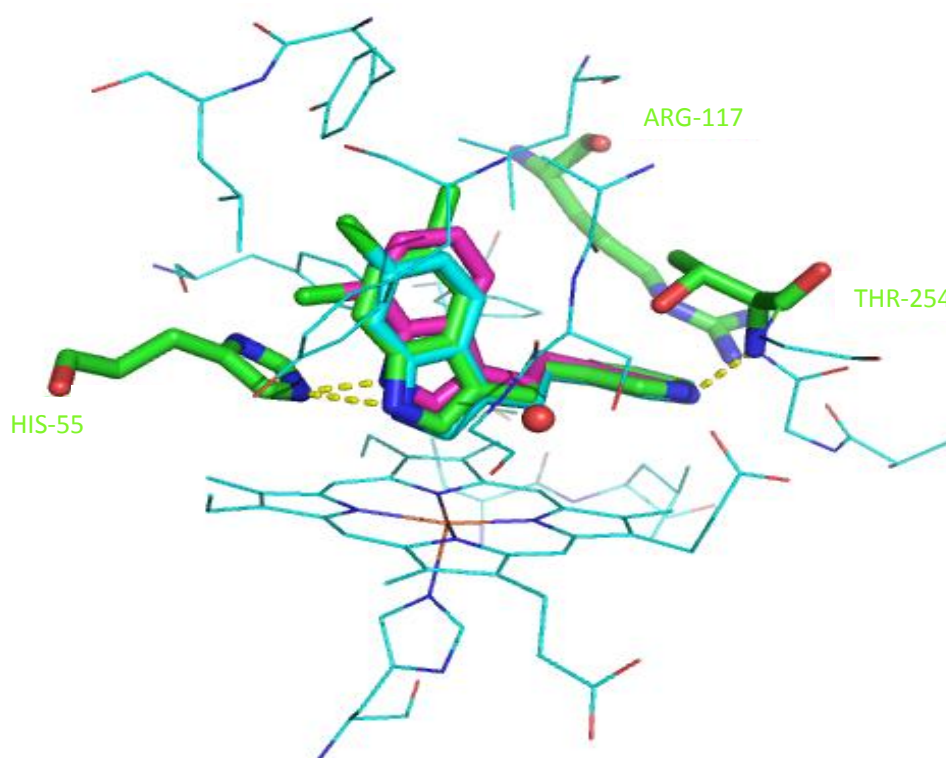


Figure III.33 : Vue des composés (22 (vert), 31 (bleu), 38 (rose)) au sein du site actif de xcTDO (image réalisée avec le programme Pymol, Delano W.L., 2008).

4. Evaluation *in vivo*

4.1 Etude de biodisponibilité

Etant donné les résultats encourageant sur les composés **58** et **61**, une étude de biodisponibilité chez la souris a été réalisée à l'UCL sur ces composés en comparaison à l'inhibiteur de référence.

La biodisponibilité est la fraction de composé capable d'atteindre la circulation systémique sans être dégradée. La biodisponibilité orale est rarement de 100 %. Cela provient soit d'une absorption incomplète, soit d'une dégradation au sein du système digestif (pH, enzymes,...).

Les composés sont dissous dans l'eau de boisson et administrés *ad libitum* à raison de 1 mg/mL à des souris de type DBA/2. La consommation moyenne en eau par jour pour une

souris est de 4 mL, soit une dose journalière de 160 mg/kg. La concentration plasmatique de chaque inhibiteur ainsi que celle du L-Trp et de la kynurénine est mesurée 0, 1, 2 et 7 jours (Tableau III.20) après le début de l'expérimentation. Les conditions expérimentales sont reprises en annexe (Pilotte L., 2012).

Tableau III.20 : Biodisponibilité des composés potentiellement intéressants.

Inhibiteur	Concentration plasmatique (μM)			
	Jour 0	Jour 1	Jour 2	Jour 7
30	0	0.72	0.34	0.55
61	0	18.4	1.42	4.24
58	0	84.5	145.3	180.2

Au vu des résultats, on peut conclure que l'inhibiteur de référence (**30**) a une très faible biodisponibilité puisqu'après administration de 160 mg/kg/j, une concentration plasmatique de seulement 0.1 μM est détectée après 7 jours. En ce qui concerne le composé **61**, les concentrations plasmatiques se situent entre 1.4 et 18 μM (soit 0.29-3.7 μg/mL). Cela sous-entend qu'il est soumis à une élimination et/ou une métabolisation rapide. Contrairement aux inhibiteurs **30** et **61**, la molécule **58** se distingue avec une concentration plasmatique élevée décelée entre 84 et 180 μM (soit 19-41 μg/mL), suggérant une très bonne biodisponibilité orale chez la souris. Mais avant de pouvoir l'étudier *in vivo*, il était important de connaître sa sélectivité face à la cible pour laquelle nous l'avons développée, à savoir TDO.

4.2 Evaluation de la sélectivité du composé 58

Cette étude a été réalisée par le centre CEREP (France). Ces tests compétitifs mettent en évidence la liaison spécifique entre le ligand et une série de récepteurs. Elle est définie par la différence entre l'ensemble des liaisons et les liaisons non spécifiques déterminées en présence d'un excès de ligand. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du contrôle spécifique de liaison ($100 - (\text{mesure spécifique de la liaison} / \text{contrôle spécifique de liaison}) \times 100$) obtenu en présence du composé **58**.

Le tableau III.21 reprend l'ensemble des résultats de la sélectivité de **58** par rapport à d'autres enzymes : les monoamines oxydases A et B (MAO) (Reniers J., 2011) ainsi que son

habilité à se lier à différents récepteurs : adrénergique (α_1 - α_2 et β_1 - β_2), dopamine (D_1 - D_{2s}), mélatonine (hMT_1) et sérotonine ($h5-HT_{1A}$, $h5-HT_{1B}$, $h5-HT_{2A}$, $h5-HT_{2B}$, $h5-HT_3$, $h5-HT_{5A}$, $h5-HT_6$, $h5-HT_7$) aussi bien qu'à différents transporteurs (norepinephrine (NE), dopamine (DA) et sérotonine (5-HT)) (Dolušić E., 2011c).

Tableau III.21 : Sélectivité du composé 58.

Enzyme, récepteur et transporteur	Radioligand	Composé de référence (K _i , nM)	% d'inhibition ^a à 10 μM
MAO-A (Reniers J., 2011)		harmine (17)	<10
MAO-B (Reniers J., 2011)		isatine (33)	<10
α ₁ (Non sélectif)	[³ H] prazosine	prazosine(0.071)	<10
α ₂ (Non sélectif)	[³ H] RX821002	yohimbine (33)	<10
hβ ₁	[³ H] (-)-CGP12177	aténolol (170)	14
hβ ₂	[³ H] (-)-CGP12177	ICI 118551 (0.13)	<10
hD ₁	[³ H] SCH23390	(+)-butaclamol (0.50)	<10
hD _{2s}	[³ H] méthylspipérone	mélatonine (0.37)	<10
hMT ₁	[¹²⁵ I] 2-iodomélatonine	8-OH-DPAT (0.17)	<10
h5-HT _{1A}	[³ H] 8-OH-DPAT	sérotonine (14)	<10
h5-HT _{1B}	[¹²⁵ I] CYP	kétansérine (0.28)	<10
h5-HT _{2A}	[³ H] kétansérine	(±)-DOI (2.0)	<10
h5-HT _{2B}	[¹²⁵ I] (±)-DOI	MDL72222 (3.9)	<10
h5-HT ₃	[³ H] BRL43694	sérotonine (170)	<10
h5-HT _{5A}	[³ H] LSD	sérotonine (84)	<10
h5-HT ₆	[³ H] LSD	sérotonine (0.13)	<10
h5-HT ₇	[³ H] LSD	protriptyline (2.3)	<10
(h) NE transporteur	[³ H] nisoxtéine	BTCP (2.2)	<10
(h) DA transporteur	[³ H] BTCP	imipramine (0.77)	<10
(h) 5-HT transporteur	[³ H] imipramine		26

^a % d'inhibition relatif par rapport au % d'inhibition de l'enzyme pour MAO (monoamine oxydase) et au % d'inhibition d'un contrôle spécifique lié au récepteur étudié.

Il ressort de cette étude que le composé **58** à 10 μM est très sélectif et n'interagit avec aucun site de liaison des radioligands utilisés. La seule liaison faiblement inhibée (26 %

d'inhibition à 10 μ M) est la liaison de la ^3H imipramine pour le transporteur 5-HT. Ce dernier est un modulateur clef des neurotransmetteurs. En effet, le niveau extracellulaire de sérotonine est en premier lieu régulé par le transporteur 5-HT qui recapture la sérotonine de l'espace extracellulaire jusqu'aux neurones présynaptiques où elle peut être dégradée ou libérée par la suite. Une inhibition de ce transporteur permet donc de traiter des troubles de l'humeur et/ou de l'anxiété. Cependant, dans notre cas l'inhibition est faible (26 % à 10 μ M en **58**) et la concentration plasmatique en L-Trp est élevée vu qu'il n'est pas dégradé *via* la voie de la kynurénine. Il ne devrait donc pas y avoir d'effet secondaire à ce niveau là. A partir de ces résultats encourageants, le profil de **58** s'avère très intéressant et son étude *in vivo* est envisagée afin de mieux cerner le rôle exact de la protéine TDO dans l'immunosuppression cancéreuse.

4.3 Etude *in vivo* du composé 58

Afin de confirmer l'activité de TDO dans les cellules tumorales, des cellules HEK-293 ont été transfectées ou non avec la TDO humaine. De plus, certaines d'entre elles surexpriment IDO. L'inhibiteur de référence de TDO, le 680C91 (Salter M., 1995) et celui d'IDO, le 1-méthyl-L-tryptophane (1-MT) (Uytthenhove C., 2003) ont donc été utilisés de manière à distinguer l'activité des deux enzymes au sein du test. Dans les lignées cellulaires exprimant TDO et non IDO, la dégradation du tryptophane est entièrement bloquée par le 680C91 et non par le 1-MT. L'activité de l'enzyme TDO dans ces lignées et l'inhibition directe de l'inhibiteur de référence sont confirmées par un test enzymatique sur un extrait brut de cellule, qui ne dépend pas du transport du substrat et de l'inhibiteur à travers la membrane. Les détails expérimentaux de cette expérience se trouvent dans la publication Pilotte L., 2012 en annexe.

Désormais, il est intéressant de savoir si l'expression de TDO permet aux cellules tumorales implantées chez l'animal de résister à l'élimination immunitaire par les lymphocytes T. Pour ce faire, le modèle P815 (Pilotte L., 2012 ; Van den Eynde B., 1991) de tumeur chez la souris est utilisé (Figure III.34).

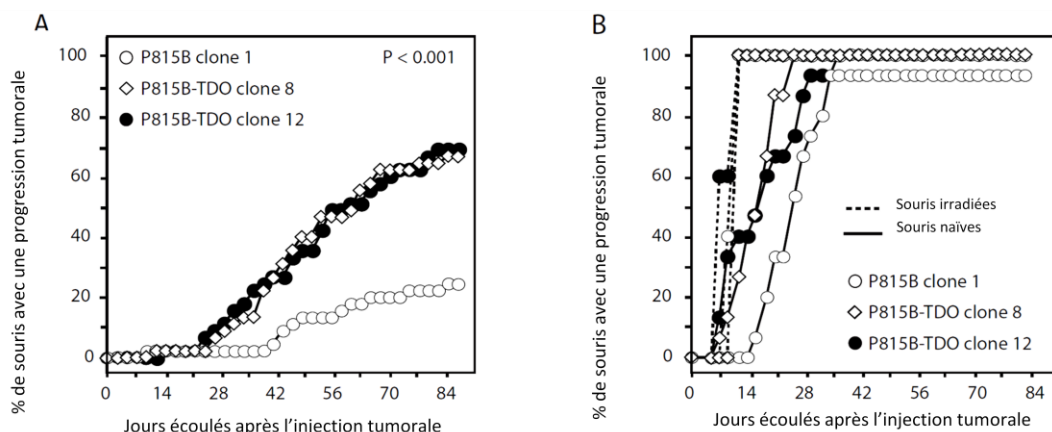


Figure III.34 : Résistance immunitaire des tumeurs exprimant TDO.

La figure III.34A a été réalisée à partir de trois groupes constitués chacun de 45 souris qui ont été immunisées par injection intrapéritonéale (ip) de lignées cellulaires L1210 (lignée cellulaire lymphoblastique) exprimant P1A (antigène de surface) et B7-1 (molécule costimulante), et sont ensuite entrées dans l'étude de progression tumorale trois semaines plus tard avec l'injection en ip de 4×10^5 cellules pour chaque clone à savoir : P815B clone 1 (contrôle), P815B-TDO clone 8 et P815B-TDO clone 12. L'expérience a été réalisée en triplicat et l'évolution tumorale a été suivie tout au long de ces quatre semaines.

La figure III.34B quant à elle fait référence aux deux groupes de souris naïves ($n = 15$ par groupe) et irradiées ($n = 5$ par groupe) qui ont été injectées comme pour les groupes précédant.

Ces figures nous informent sur le fait que les souris irradiées n'ayant plus de système immunitaire développe après seulement quatre jours des tumeurs et ce très rapidement car après 7 jours, 100 % de progression tumorale sont enregistrés. Tandis que les souris naïves de ses clones, possèdent une progression tumorale plus lente. En effet, 28 jours après l'injection tumorale, les clones 1 et 12 atteignent ~95 % et le clone 8, 100 % de progression tumorale.

Ces résultats indiquent que l'inhibition de TDO pourrait combattre la résistance tumorale et promouvoir le rejet immunitaire tumoral. C'est pourquoi, l'inhibiteur **58** a été testé par la suite. Les souris ont reçu l'inhibiteur **58** dans l'eau de boisson. L'expérience a également montré que le traitement systémique des souris immunisées avec le composé **58**

(160 mg/kg/J) prévient la croissance des cellules tumorales P815 exprimant TDO (Pilotte L., 2012) (Figure III.35).

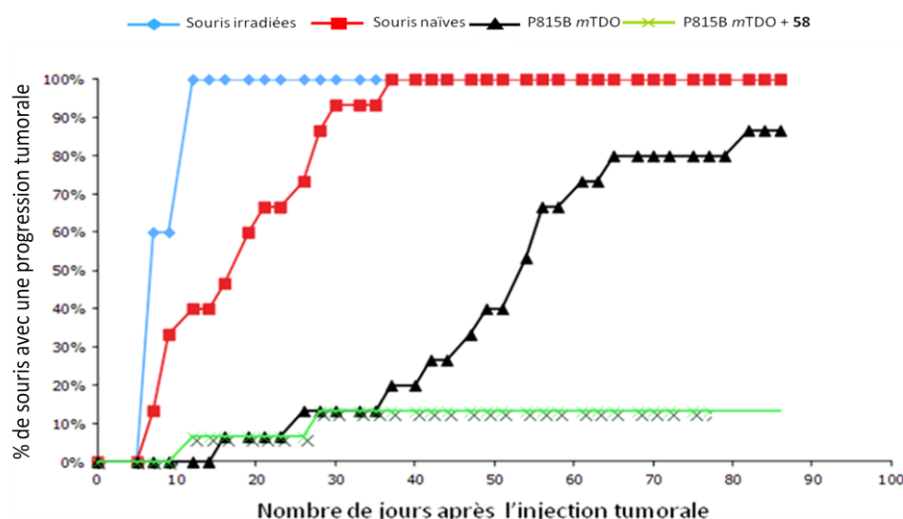


Figure III.35 : Utilisation du composé 58 dans un modèle murin. Les souris naïves (n = 15 par groupe) sont représentées en rouge et les souris irradiées (n = 5 par groupe) en bleu. La progression tumorale chez les souris immunisées (n = 45 par groupe) qui ont subi une injection par ip de 4×10^5 cellules de chaque clone P815B-mTDO traitées (vert) ou non (noir) avec 160 mg/kg/J du composé 58 dans l'eau de boisson, l'expérience commence un jour avant l'injection des cellules tumorales. L'expérience a été réalisée en triplicat.

On remarque clairement que l'immunisation couplée à l'inhibiteur **58** permet un rejet immunitaire important qui empêche la prolifération tumorale. Seulement ~15% de progression tumorale sont rapportés après traitement.

Pour déterminer si l'effet anti-tumoral de **58** résulte seulement de la promotion du rejet cellulaire, ou si **58** a aussi un effet direct sur les cellules tumorales, des cellules P815 exprimant TDO et traitées avec **58** comme ci-dessus ont été injectées dans des souris KO immunodéficientes du gène *RAG2* (à savoir, un activateur de la recombinaison génétique (DeFranco A.L., 2009)). La croissance tumorale n'a pas été affectée par le traitement par **58** dans les souris KO de *RAG2*, indiquant que l'effet de l'inhibiteur est dépendant du système immunitaire dans ce modèle. Les détails expérimentaux de cette expérience se trouvent dans la publication Pilotte L., 2012 en annexe.

4.4 Toxicité *in vivo* du composé **58**

Maintenant que notre inhibiteur est efficace *in vivo*, il est important de tester sa toxicité chez l'animal. Les souris traitées avec **58** ne montrent pas de signes évidents de toxicité (Pilotte L., 2012). En effet, TDO est majoritairement exprimé dans le foie, la fonction hépatique de la souris a donc été évaluée à la fin de l'expérience comme première tentative pour évaluer la sûreté du traitement avec ce composé. Les détails expérimentaux de cette expérience se trouvent dans la publication Pilotte L., 2012 en annexe. Après plus de 100 jours d'administration systémique de **58**, aucune différence n'a été observée entre les souris traitées ou non du point de vue de leur niveau plasmatique en phosphatase alcaline hépatique (ALAP), en γ -glutamyl-transférase (γ -GT), en alanine aminotransférase (ALAT) et en aspartate aminotransférase (ASAT). Les niveaux de ces enzymes sont compris dans les valeurs physiologiques, suggérant l'absence de toxicité hépatique lors d'un traitement prolongé par **58** (Tableau III.22) (Pilotte L., 2012).

Tableau III.22 : Evaluation de la cytolyse hépatique chez les souris traitées avec **58.**

Enzymes hépatiques ^a	ALAT (UI/mL $\pm$ sem)	ALAP (UI/mL $\pm$ sem)	ASAT (UI/mL $\pm$ sem)	γ -GT (UI/mL $\pm$ sem)
Souris contrôles ^b	34.8 $\pm$ 2.4	74.4 $\pm$ 2.3	106.7 $\pm$ 8.8	3.0 $\pm$ 0.2
Souris traitées avec 58 ^c	47.5 $\pm$ 3.3	92.7 $\pm$ 3.0	156.9 $\pm$ 8.1	2.8 $\pm$ 0.2
Taux normal ^d	21-83	68-89	70-215	1-4

^aLes activités enzymatiques sont mesurées dans le plasma. ^bGroupe de 43 souris abreuvent avec de l'eau normale et testée 107 jours après l'expérience tumorale avec le composé **58**. L'expérience a été réalisée en triplicat. ^cGroupe de 87 souris abreuvent avec une solution de **58** (1 mg/mL, pH 9.0 ; 160 mg/kg/jour) et testée 107 jours après l'expérience tumorale. L'expérience a été réalisée en triplicat.

^dGroupe de 7 souris DBA/2 normale non traitée.

De plus, une étude récente (Kanai M., 2009) a montré que des souris génétiquement modifiées et déficientes du gène codant pour la TDO sont viables et en bonne santé. Donc l'inhibition prolongée de TDO par **58** ne devrait en principe pas poser de problèmes. L'expérience a permis aussi de montrer que les souris testées durant 100 jours avec **58**

présentaient moins de stress, ce qui est logique vu que le L-Trp n'étant plus dégradé par l'enzyme TDO, peut être utilisé dans la voie de synthèse de la sérotonine. Il avait déjà été montré que les inhibiteurs de TDO pouvaient jouer le rôle d'antidépresseurs (Salter M., 1995).

Suite à l'étude *in vivo* des inhibiteurs, le composé 58 s'est montré plus biodisponible que les composés 30 et 61 et donc plus à même à participer à une étude chez la souris. Après avoir réalisé un test de sélectivité sur ce composé et montré qu'il était sélectif de l'enzyme TDO, il a pu être étudié à raison de 160 mg/kg/jour dans un traitement systémique sur des souris immunisées. Il en ressort que ce composé 58 est très prometteur vu qu'il prévient la croissance des cellules tumorales P815B exprimant TDO. De plus, il ne présente pas de toxicité chez l'animal et contribuerait également à diminuer l'anxiété de celui-ci. Ce travail a permis de mettre à jour un inhibiteur présentant une inhibition semblable à l'inhibiteur de référence mais ayant des avantages pharmacologiques supérieurs, ce qui permettra peut-être à l'avenir de traiter le cancer de façon plus efficace et ciblée par la promotion du rejet immunitaire tumoral.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVE

IV. Conclusions et perspectives

L'objectif principal de cette thèse était de concevoir de nouveaux inhibiteurs spécifiques de TDO et de caractériser leur mode d'interaction avec l'enzyme en combinant une approche théorique et expérimentale.

Pour ce faire, la conception de nouveaux inhibiteurs plus solubles en milieux aqueux ont été envisagés. Ces inhibiteurs ont été synthétisés avec la participation de nos collaborateurs du NAMEDIC (Namur Medicine and Drug Innovation Center). L'enzyme n'étant pas encore disponible, les composés synthétisés ont, d'abord, été testé *via* un test cellulaire global qui a permis d'identifier les molécules capables d'inhiber le catabolisme du L-Trp et d'établir des relations structures-activités.

Suite à cette étude, cinq composés (**22**, **31**, **38**, **58** et **61**) en sont ressortis. Les composés **58** et **61** se sont avérés intéressants d'une part pour leur inhibition prometteuse de TDO avec des IC₅₀ respectifs de 2 et 3 µM semblables à l'inhibiteur de référence 680C91 (IC₅₀ de **30** = 1 µM). D'autre part, ils ont une solubilité calculée bien plus élevée que le composé **30** (0.065 mg/mL) à savoir respectivement de 2.88 et 130.6 mg/mL pour **58** et **61** ainsi qu'une faible toxicité cellulaire. Ils ont donc été étudiés plus amplement au cours de ce travail. Quant aux trois isomères chlorés analogues de l'inhibiteur de référence (**30**) à savoir: 5 ; 6 ; 7-chloro-3-(2-pyridin-3-ylvinyle)-1H-indole (**22**, **31** et **38**), ils ont été choisis afin d'étudier l'influence de la position d'un halogène sur les propriétés biologiques, structurales et physico-chimiques de cette série.

Une fois ces molécules identifiées et l'enzyme *h*TDO purifiée disponible, les molécules intéressantes ont été testées au niveau enzymatique dans un premier temps en tant que substrat. En effet, ces composés possèdent une structure similaire au substrat, le L-Trp, il est donc intéressant de savoir si elles ne sont pas substrat de l'enzyme. Vu la faible absorbance produite comparé à la situation où le L-Trp est substrat, il a été conclu que ces deux molécules (**58** et **61**) ne sont pas substrat de TDO. De ce fait, l'étape suivante fut d'établir le potentiel inhibiteur de ces molécules. Cette étude nous a permis de déterminer le K_i de ces dernières. Les valeurs de 5.0 ± 2 µM (**58**) et 41.0 ± 12 µM (**61**) ont été déterminées, ce qui concorde bien avec les valeurs des tests cellulaires. De plus, notre étude

a permis de déterminer une mode d'inhibition de type compétitif pour ces inhibiteurs. La légère différence d'inhibition entre ces deux inhibiteurs peut s'expliquer par la lipophilie. Effectivement, *via* le programme (ACD/Designer, 2010) le Log D_{7.4} de ces composés a pu être déterminé théoriquement : le Log D_{7.4} de 0.15 (**58**) et -0.56 (**61**). On remarque que les valeurs de Log D_{7.4} calculées suggèrent que ces composés soient plus hydrophiles que le composé **30**. Quant aux isomères, les IC₅₀ sont de 10 ± 0.5 (**22**), 5 ± 0.4 (**31**) et 32 ± 0.02 (**38**). On retrouve cette même tendance au niveau cellulaire avec le composé **38** qui est moins actif. En ce qui concerne la lipophilie calculée, les valeurs sont semblables au composé de référence puisqu'on a affaire à trois analogues.

Par après, la caractérisation physico-chimique a fourni différentes propriétés à savoir le pK_a, la solubilité et la stabilité.

Les valeurs moyennes de pK_a mesurées expérimentalement, à savoir 4.69 ± 0.4 (**58**) et 4.96 ± 0.3 (**61**) concordent avec les valeurs théoriques calculées *via* le programme Pallas (« Pallas Net 2.0 » CompuDrug <http://www.compudrug.com>) qui sont respectivement de 4.57 et 4.52 pour **58** et **61**.

Si on compare l'acide carboxylique de **61** au tétrazole de **51**, sachant que l'atome d'hydrogène peut se placer sur 2 positions du tétrazole et mimer l'acide carboxylique, le tétrazole est considéré comme l'isostère de l'acide carboxylique. Il est donc normal qu'ils aient des valeurs de pK_a proches l'une de l'autre. De manière intéressante, cette étude met en évidence que le pK_a de l'acide carboxylique ainsi que celui du tétrazole ne sont pas fortement influencés par la présence du noyau indolique qui leur est conjugué par le biais d'un lien éthylénique. La connaissance des pK_a de ces composés permet également de préciser la forme de la molécule qui interagit au niveau de l'enzyme, à pH physiologique. En toute vraisemblance, il s'agit de la forme déprotonnée aussi bien pour **58** que pour **61**.

Les valeurs de pK_a obtenues pour nos inhibiteurs sont importantes étant donné que ces derniers sont difficilement solubles en milieu aqueux. Il serait donc intéressant de déterminer à partir de quelle valeur de pH les inhibiteurs seraient sous forme déprotonnées et donc plus solubles. Pour ce faire, la solubilité des composés a été évaluée à différents pH.

Le pK_a d'un ion pyridinium, groupement présent au sein de l'inhibiteur de référence a une valeur de 5.25 (Weast R.C., 1987). A $pH = 1.0$, cet inhibiteur se trouvera sous sa forme protonnée et présentera donc une meilleure solubilité. Par ailleurs, sous sa forme protonnée, il ne sera pas facilement absorbé au niveau des membranes de l'estomac malgré sa bonne solubilité à ce pH . Néanmoins, lorsque le 680C91 atteindra l'intestin à $pH = 9.0$, sa solubilité sera beaucoup plus faible même si il sera mieux absorbé vu son caractère neutre. Ce même phénomène est observé pour les isomères chlorés et encore plus marqué dans le cas du composé **38**. Ces différences de solubilité aqueuse mesurées sont mieux expliquées par les changements subtils de pont-H résultant de différentes accessibilités du groupement NH de l'indole dus à des effets stériques de l'atome de Cl. Tandis que pour les composés **58** et **61**, sachant la valeur du pK_a de la molécule **58** (4.69), elle est donc déprotonnée à pH supérieur à 4.69 et est donc plus soluble à pH élevé. Par contre, à $pH = 1.0$, la molécule **58** se trouve sous la forme neutre et est donc moins soluble mais possède encore néanmoins une solubilité relativement élevée. De même pour **61** dont le pK_a est de 4.96, la molécule est déprotonnée au-delà de cette valeur et est donc plus soluble à pH élevé. Les molécules **58** et **61** ont respectivement une solubilité moyenne de 14 et 20 fois plus élevée par rapport à la molécule de référence 680C91.

Ces inhibiteurs s'avèrent donc être des molécules particulièrement intéressantes de ce point de vue par rapport à l'inhibiteur de référence. Effectivement, un composé à intérêt pharmaceutique présente une grande solubilité lorsque celle-ci est supérieure à 60 $\mu g/mL$ (Kerns E.H., 2008), ce qui correspond respectivement pour **58** et **61** à 262 μM et 292 μM . Ces valeurs sont de l'ordre de grandeur des valeurs de solubilité déterminées pour ces inhibiteurs à différents pH , ce qui fait des inhibiteurs **58** et **61** des molécules potentiellement pharmaceutiques en termes de solubilité. La modification que ce soit avec un acide carboxylique ou un tétrazole du 680C91 au niveau de l'extrémité pyridine a permis, d'améliorer la solubilité tout en conservant un bon potentiel inhibiteur. En plus de cet atout, ces composés possèdent une faible lipophilie. Reste à savoir si ces composés sont stables à ces pH et au cours du temps. Cette évaluation renforce une fois de plus l'intérêt de ces deux composés. En effet, les composés **58** et **61** restent stables au cours du temps puisque 93 % de ces molécules sont retrouvées en solution après 90 min. à température ambiante et pH

7.4. Par opposition, le composé **30** de référence ne se retrouve plus qu'à 63 % en solution dans des conditions similaires.

Enfin, l'étude enzymatique sur *hIDO* a pu mettre en évidence la sélectivité de ces inhibiteurs. Le composé **58** tout comme le composé **61** ne sont pas des inhibiteurs de *hIDO* avec une inhibition inférieure à 10 % à 10 μ M bien que TDO et IDO catalysent de façon similaire la première étape de la voie de la kynurénine.

A partir de là, il nous est apparu intéressant de cristalliser l'enzyme TDO en complexe avec un inhibiteur afin de mieux comprendre les interactions au sein du site actif de l'enzyme. Ce co-cristal nous permettra également de confirmer les résultats obtenus lors de l'étude de *docking*. Il existe à ce jour sept structures cristallographiques de la tryptophane 2,3-dioxygénase dans la PDB, celles-ci proviennent de souches bactériennes à savoir *Xanthomonas campestris* et *Ralstonia metallidurans*. Actuellement, il n'y a pas encore de structure 3D de la TDO humaine. Cette dernière est étudiée à l'ULg par nos collaborateurs. De notre côté, nous disposons au sein du laboratoire du plasmide codant pour l'enzyme bactérienne *rmTDO*.

Il a été nécessaire de surexprimer et purifier cette enzyme afin d'obtenir des lots suffisamment purs et concentrés pour réaliser la cristallogénèse. La protéine *rmTDO* a été surexprimée et purifiée par une colonne IMAC Hitrap FF sur un dispositif FPLC dans un premier temps. Une seconde étape de purification grâce à un tamis moléculaire (S200) était requise pour obtenir une pureté de >95 % en vue de la réalisation des essais de cristallogénèse. Avec le protocole utilisé, pour 500 mL de culture, on a obtenu de façon générale ~10 mL de solution protéique à ~0.6 mg/mL. En ce qui concerne les tests enzymatiques effectués sur cette enzyme, ceux-ci ont prouvé son activité toujours présente après les deux étapes de purification. Une étude de stabilité a ensuite été réalisée et les résultats ont laissés percevoir que l'activité n'était maintenue qu'à 4°C et montrait une décroissance au fil des jours. En effet, la congélation de la protéine est néfaste à son activité enzymatique. L'enzyme conservée à 4°C perd totalement son activité en 5-6 jours après la seconde purification selon les lots.

Etant donné que dans la littérature, des cristaux de la protéine *rmTDO* avaient déjà été obtenus (Zhang, 2007), notre objectif était d'obtenir des cristaux de cette protéine en

complexe avec l'inhibiteur afin de pouvoir étudier les interactions entre ce dernier et les résidus du site actif de cette enzyme. Premièrement, les conditions testées ont été celles adaptées de la publication de Zhang. De ces conditions, aucune n'est ressortie favorable à la cristallisation de la protéine *rmTDO*. Effectivement, les gouttes étaient soit claires, contenaient de la protéine précipitée ou encore des cristaux de sel. Vu que les conditions de la publication de Zhang n'ont pas mené à la cristallisation de la protéine, la méthode de la goutte assise a été utilisée avec chacune des conditions de kits commerciaux (248 conditions). Etant donné qu'aucun cristal n'est apparu dans ces conditions, deux lots de la protéine *rmTDO* ont été testés avec le robot Mosquito permettant de tester en peu de temps un grand nombre de kits de screening (480 conditions). Ceci s'est avéré intéressant étant donné le manque de stabilité de la protéine. De ces essais, une condition (30 % MPD, 0.1 M cacodylate de sodium pH = 6.5, 0.2 M acétate de magnésium) en présence de **58** ($C_{fin} = 0.66$ mM) et *rmTDO* ($C_{fin} = 7.5$ mg/mL) a donné des sphérulites et amas d'aiguilles de couleur rougeâtre et de taille d'environ 0.47 mm. Ces sphérulites ont été testées au Synchrotron, l'analyse confirme que l'on est bien en présence de protéine. Néanmoins, les cristaux étant trop petits, ils n'ont pas diffractés suffisamment pour en retirer une structure 3D.

En perspective, il serait intéressant de cliver l'His-tag de la protéine afin de la rendre potentiellement plus stable au cours du temps et ainsi espérer pouvoir la cristalliser plus facilement. Un premier protocole qui reste à optimiser a déjà permis de cliver l'His-tag. Pour ce faire, le gène codant de la protéine d'intérêt (*rmTDO*) est introduit dans des cellules DH10B. Ensuite, la surexpression et la purification se déroule comme décrit au chapitre V. § 3.1.1. Une fois purifiée sur IMAC, la protéine est clivée à l'aide de thrombine car le plasmide codant pour *rmTDO* possède un site de clivage à la thrombine en N-terminal. Après différents essais, il semblerait que le clivage se produit efficacement avec 50 U¹ de thrombine commerciale (Amersham Biosciences) à 4°C O/N (*overnight*) sous agitation. Ensuite, il faudra séparer l'His-tag du reste de la protéine. Pour ce faire, une colonne Hitrap benzamidine FF (GE Healthcare, 2007) était envisageable mais la protéine est restée accrochée à cette colonne. Dès lors, il serait judicieux de procéder à une ou deux purification(s) d'affilée sur colonne IMAC. Il faudra ensuite vérifier que l'on est bien en

¹ Une unité clive ≥ 90 % de 100 μ g de protéine.

présence de la protéine clivée, tester son activité et sa stabilité avant de lancer de nouveaux essais de cristallogénèse.

Une fois l'enzyme stabilisée, il serait également intéressant d'effectuer des tests de cristallogénèse en anaérobie (avec une concentration en O₂ maintenue inférieure à 2 ppm) et en présence de dithionite de sodium de manière à réduire l'enzyme afin d'obtenir des cristaux sous sa forme active.

En parallèle de la cristallogénèse, l'approfondissement de l'analyse spectroscopique sera intéressant sur l'enzyme sous forme active et inactive ainsi que sur l'enzyme seule ou en complexe avec le substrat ou un inhibiteur. Les déplacements de la bande de Soret, nous renseigneront sur les interactions qui se produisent au sein du site actif. Des études préliminaires ont été réalisées sur base d'une adaptation du protocole utilisé pour IDO (Lu C., 2010) en utilisant le dithionite de sodium et en faisant buller de l'argon dans les solutions. La figure IV.1 reprend certains résultats obtenus. Un déplacement se produit lorsque l'on est en présence de L-Trp seul ou en complexe avec l'ion cyanure. Cette expérience doit être répétée et réalisée sous boîte à gants afin d'éviter des interférences provenant de l'air ambiant. Grâce aux résultats que cette expérience pourrait fournir, il serait probablement possible de confirmer les simulations de *docking* réalisées en présence d'une molécule d'eau.

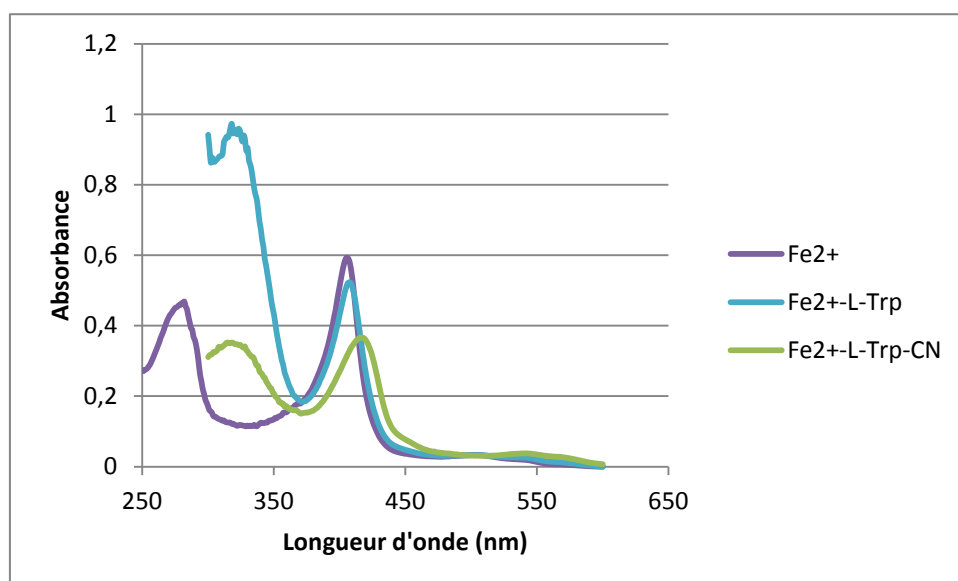


Figure IV.1: Spectre UV-visible de la forme active de la protéine *rmTDO* seule ou en présence de son substrat et/ou du cyanure. Tous les échantillons sont obtenus avec une concentration de 5 μ M en enzyme dans un tampon Tris à 100 mM (pH 7.4) à 20°C. La concentration en cyanure est de 1 mM et en L-Trp 25 mM.

N'ayant pas pu obtenir de cristaux de l'enzyme *rmTDO*, la cristallisation des inhibiteurs permettra de connaître la conformation de ces molécules ainsi que les ponts hydrogènes qu'ils seraient amenés à faire au sein du site actif de l'enzyme. Ces informations pourront être mises en relation avec les études de *docking* réalisées par la suite.

Les cristaux des trois isomères: (*E*)-chloro-3-(2-pyridin-3-ylvinyl)-1*H*-indoles ont été obtenus. Ces composés ne sont certes pas les plus affins mais il faut savoir que seul un nombre très limité de structures cristallines de vinyl-1*H*-indoles substitués (exemples : 3-(2'-nitrovinyl) indole (code CSD : GOJDUE), 3-(1*H*-indole-3-yl) acrylate (code CSD : GUGLEA), 3-(3-indolyl) acrylamide (code CSD : SUVYIR) ou (*E*)-4-(3-indolylvinyl)-*N*-méthylpyridinium (code CSD : TIKBEU et TIKBIY)) ont été déterminées par cristallographie et publiés. Les efforts visant à obtenir des cristaux de fluoro-3-(2-pyridin-3-indolyl)-1*H*-indole substitués, y compris les isomères 680C91 se sont avérés infructueux. En revanche, les cristaux des trois isomères chlorés, nous ont permis d'obtenir des informations structurales intéressantes concernant les conformations moléculaires ainsi que le packing cristallin. De plus, ils pourront être mis en relation avec composés **58** et **61** qui ont également pu être cristallisé.

L'analyse par DRX de monocristaux de deux d'entre eux (**22** et **38**) révèle des structures non planaires. Quant au composé **31**, il est lui planaire mais ce résultat reste à confirmer étant donné le désordre important au niveau du lien éthylénique entre l'indole et le

pyridyle. Cette non-coplanarité observée dans les structures cristallines de **22** et **38** est retrouvée dans les études de simulation de *docking* de ces composés au sein du site actif de TDO. La position de l'atome de Cl n'affecte pas de manière significative la délocalisation électronique dans la molécule mais permet des variations locales de longueur de liaison et des différences au niveau du moment dipolaire (voir annexe (Moineaux L., 2012)).

Les variations dans les moments dipolaires sont compatibles avec les différents points de fusion mesurés des solides et le packing cristallin. En effet, **38** est engagé dans différentes interactions de type pont hydrogène contrairement au composé **22**, mais l'analyse du packing cristallin suggère que les interactions π - π sont plus fortes pour **22**. Ceci est en accord avec les points de fusion des composés. Le composé **22**, dans lequel il y a une meilleure stabilisation par π -stacking possède un point de fusion plus élevé (222-223°C) par rapport au composé **38** (204-205°C) engagé dans des interactions de stacking faibles et des ponts hydrogène similaires. Quant au composé **31**, son point de fusion (204-208°C) se rapproche plus de **38** pour des raisons similaires à celles évoquées ci-dessus. En effet, les interactions de stacking sont faibles pour ce composé. Cela vient sans doute du fait qu'il établit un pont hydrogène avec le Cl (1), ce qui provoque un déplacement en quinconce des indoles et donc moins d'interactions de stacking. Par opposition, la maille cristalline de l'inhibiteur **58** est constituée de quatre molécules assemblées en feuillets qui n'interagissent pas entre eux à l'aide de ponts hydrogène ou liaison π -stacking. Les molécules sont planes et reliées entre elles par un pont hydrogène entre le NH(4') d'une molécule et le N(2') d'une molécule voisine. L'interstice entre les feuillets est occupé par le solvant, en l'occurrence, le dioxane qui forme également 2 ponts H. En ce qui concerne le deuxième inhibiteur, la maille cristalline est constituée de quatre molécules du composé **61** assemblées en feuillet distinct l'un de l'autre (Figure IV.2).

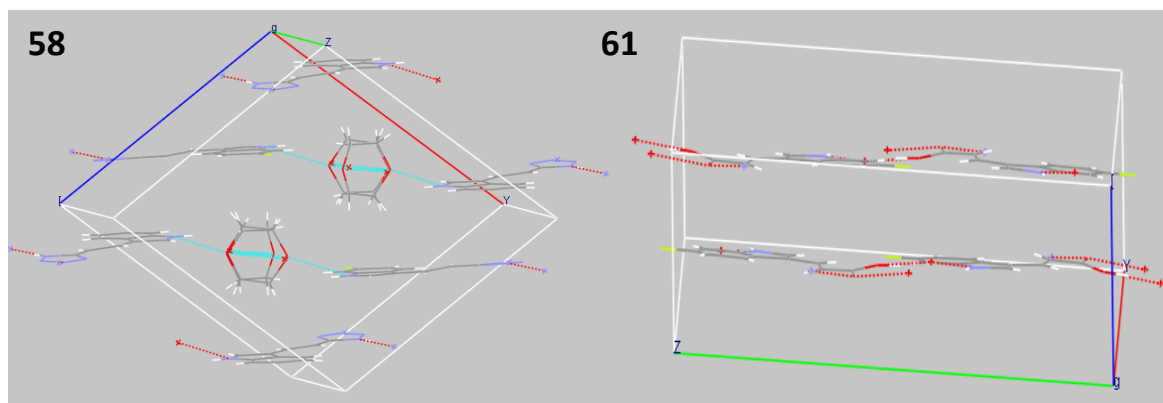


Figure IV.2 : Maille cristalline du composé 58 en présence de dioxane et du composé 61.

Aucune interaction de type pont H ou π -stacking n'est observée entre feuillets. Deux molécules d'un feuillet forment des dimères stabilisés par ponts H au moyen de leurs extrémités acides carboxyliques. Le groupement NH de l'indole complète la stabilisation au sein du feuillet par le biais d'un pont H avec l'oxygène de la fonction acide d'une molécule voisine. De plus, les ponts hydrogènes observés dans l'étude cristallographique réalisée sur les inhibiteurs se retrouvent lors des simulations de *docking* (Figure IV.3).

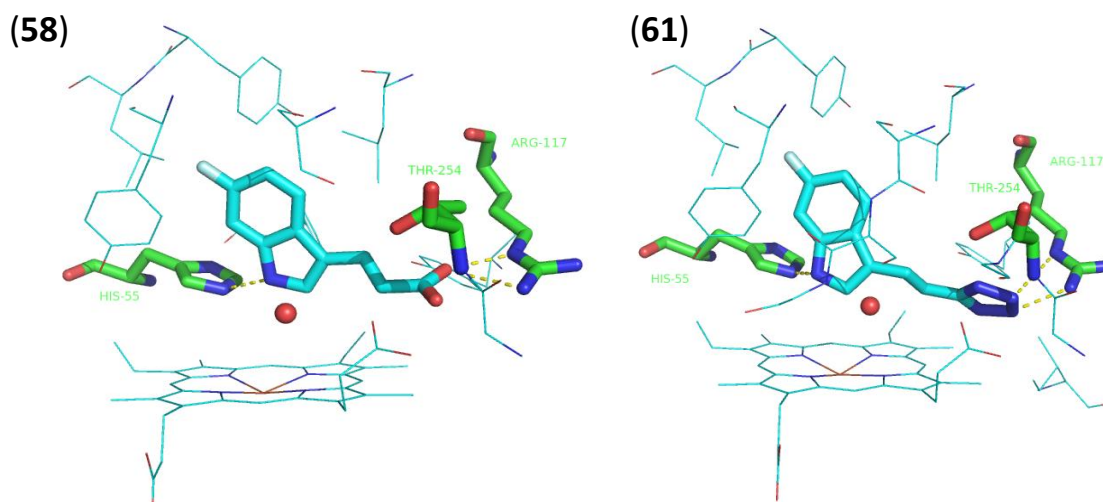


Figure IV.3 : Vue des composés 58 et 61 au sein du site actif de xcTDO. La molécule d'eau est représentée par la sphère rouge. (Image réalisée avec le programme Pymol, Delano W.L., 2008)

En effet, les liaisons entre le NH de l'indole et l'His55 ainsi que les fragments aussi bien tétrazole qu'acide carboxylique avec la chaîne guanidinium de l'Arg117 sont retrouvées au sein du site actif de xcTDO. Nos travaux de modélisation suggèrent donc que ces molécules interagissent de la même manière que l'inhibiteur de référence (680C91) expliquant ainsi leurs activités inhibitrices semblables.

D'autre part, Il a été remarqué que l'indole de l'inhibiteur de référence n'est pas coplanaire avec l'extrémité pyridyle alors que pour les molécules **58** et **61**, ce cycle indole est quant à lui coplanaire respectivement avec le groupement tétrazole et carboxylique. En perspective, il serait donc intéressant de réaliser des tests de cristallogenèse de sels de **58** et **61** afin de déterminer si la structure fournie et utilisée pour les simulations de *docking* sera la même ou non que celle obtenue lors de la cristallogenèse des molécules **58** et **61** (protonnées). Des essais ont déjà été effectués en présence de dicyclohexylamine et guanidine à différentes concentrations à 20°C et 4°C mais aucun cristal ne s'est formé dans ces conditions.

Quant aux trois isomères, la géométrie obtenue dans les solutions de *docking* est cohérente avec la structure cristallographique. En effet, la non-coplanarité et la configuration *E* observée toutes deux dans l'étude cristallographique de ces composés sont conservées dans les simulations de *docking*. De plus, il existe également des liaisons essentielles (les interactions hydrogène et π -stacking) présentes entre les inhibiteurs et les résidus du site actif de xcTDO. Par exemple, la formation de ponts hydrogène entre le NH de l'indole et l'His55 et entre l'azote de la pyridine et la Thr254 (Figure IV.4). Ces liaisons hydrogène sont similaires à celles observées dans l'étude cristallographique réalisée sur ces isomères de chloro-3-(2-pyridin-3-ylvinyl)-1H-indole. Ces molécules interagissent de la même manière que l'inhibiteur de référence (680C91).

De plus, sur base des simulations de *docking*, il est tentant de suggérer que l'inhibition plus faible tant au niveau enzymatique que cellulaire du composé **38** sur TDO est due à un déplacement significatif de cet inhibiteur, comparé aux molécules **22** et **31** qui se superposent. Ce déplacement induit par des effets stériques causés par l'atome de Cl pourrait mener à une interaction pont hydrogène moins favorable avec l'His55. De plus, la réduction significative de la valeur du moment dipolaire de **38** par rapport à **22** et **31** pourrait aussi expliquer de plus faibles interactions π - π avec le site actif de TDO et donc réduire l'affinité pour l'enzyme (voir annexe (Moineaux L., 2012)).

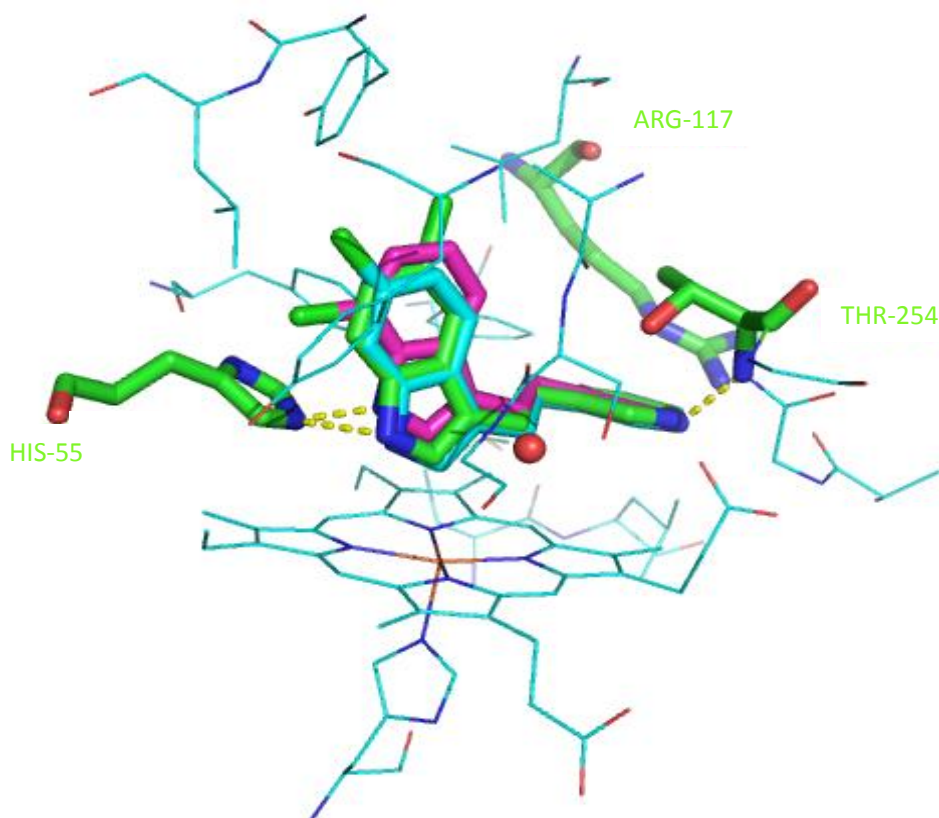


Figure IV.4 : Vue des composés 22 (vert), 31 (bleu), 38 (rose) au sein du site actif de xcTDO (image réalisée avec le programme Pymol, Delano W.L., 2008).

Pour finir, une étude *in vivo* du composé **58** a montré que cette molécule a une meilleure biodisponibilité que le composé **61** et donc plus à même à être étudié chez la souris. Après avoir réalisé un test de sélectivité sur ce composé, il a pu être étudié à raison de 160 mg/kg/j par voie orale sur des souris immunisées. Il en ressort que ce composé **58** est très prometteur vu qu'il prévient la croissance des cellules tumorales P815 exprimant TDO. De plus, il ne présente pas de toxicité chronique chez l'animal sur 100 jours de traitement et contribuerait également à diminuer l'anxiété de celui-ci.

Néanmoins, le composé **58** pourrait s'avérer toxique de par sa réactivité par addition de Michaël. En effet, ce type de composé attaque certaines enzymes, en particulier, l'ADN-polymérase, une enzyme vitale impliquée dans la division cellulaire. Celle-ci serait rendue inefficace par une addition de Michaël sur des groupements thiols et amines. Heureusement, il existe un composé important présent dans la plupart des tissus qui offre un certain degré de protection. Ce composé est le glutathion qui par son extrémité active, le thiol, neutralise les composés aptes à réaliser une addition de Michaël par une addition conjuguée (Clayden J., 2002). En pratique, aucune toxicité n'a pu être décelée *in vivo* à ce

jour avec le composé **58**. De plus, la molécule réduite **79** (Figure IV.5) a été testée au niveau enzymatique et les résultats obtenus sont similaires à ceux du composé **58** ce qui exclurait que ce dernier subisse une attaque de Michaël.

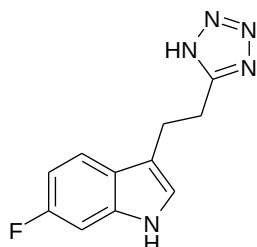


Figure IV.5 : Molécule potentiellement inhibitrice 79.

En effet, des premiers résultats obtenus par tests enzymatiques suggèrent que cette molécule (**79**) ne soit pas substrat. Elle a ensuite été testée en tant qu'inhibiteur *via* le test cellulaire global décrit au chapitre V. § 2.1 (Figure IV.6).

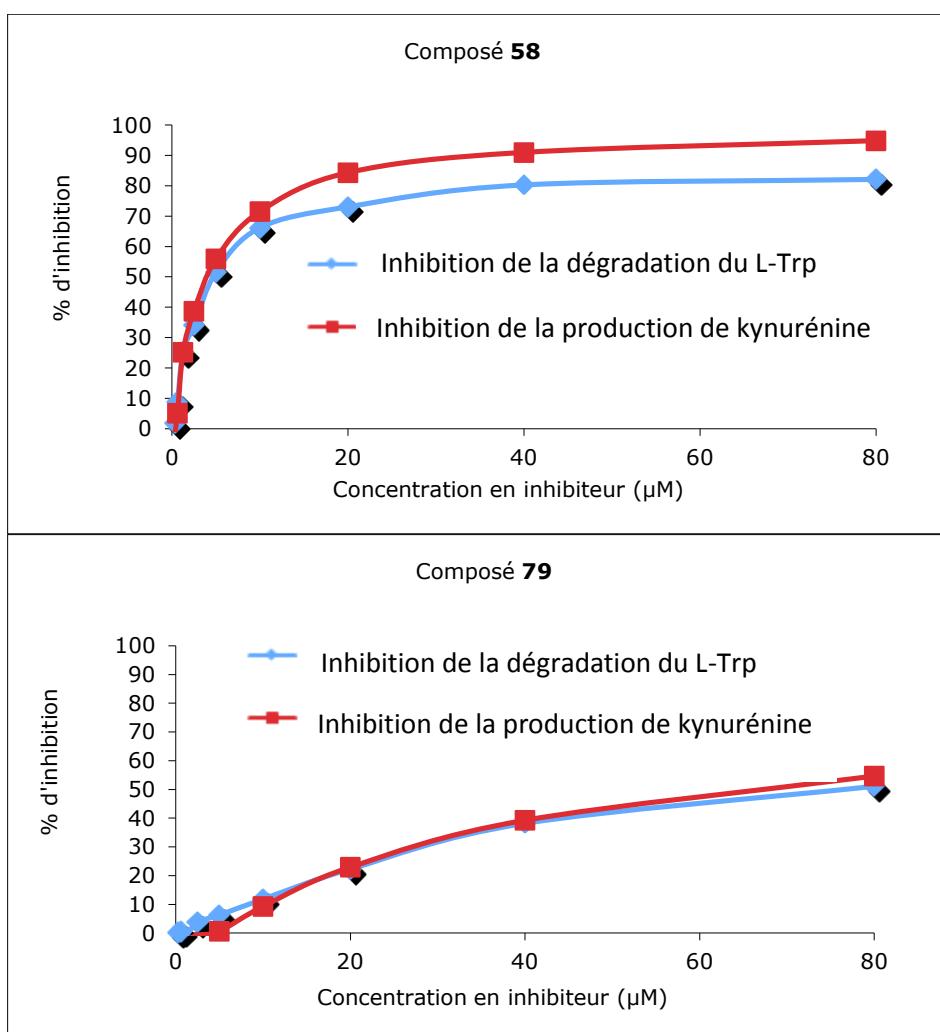


Figure IV.6 : Test cellulaire des molécules inhibitrices 58 et 79.

Au niveau enzymatique, la valeur de K_i du composé **79** reste à confirmer étant donné que lors de cette expérience l'activité de l'enzyme a été testée en présence de son substrat, L-Trp et que la valeur de K_m obtenue est de 387.8 ± 12 par rapport à la valeur de K_m obtenue pour le composé **58** qui est de 135.5 ± 5 . Mise à part cela, on remarque que contrairement aux tests enzymatiques où les deux inhibiteurs (**58** et **79**) avaient des K_i très similaires (**58** = 5.0 ± 2 et **79** = 5.4 ± 5) dans le cas de l'évaluation cellulaire, l' IC_{50} de **79** n'a pas été mesuré mais une différence au niveau du pourcentage d'inhibition à une même concentration en inhibiteur (soit 80 μ M) a pu être observée. En effet, à cette concentration **58** présente un pourcentage d'inhibition de 90 % alors que **79** n'en présente que 50 %. Cette différence peut s'expliquer par une différence de lipophilie d'une part et d'autre part par la flexibilité de **79** comparé à **58**. Effectivement, *via* le programme Pallas (« Pallas Net 2.0 » CompuDrug <http://www.compudrug.com>) le Log P de ces composés a pu être déterminé théoriquement, les valeurs étant respectivement de 4.28 et 3.77 pour le **58** et **79**. La seconde raison est le fait que **79** possède une chaîne latérale réduite par rapport à **58** et est donc plus flexible, ce qui veut dire qu'il occuperait un volume stérique plus important. Ces deux raisons suggèrent donc un passage plus difficile au niveau de la membrane cytoplasmique de nature lipophile.

A l'avenir, il serait pertinent de trouver un inhibiteur mixte de TDO/IDO ou de coupler l'inhibiteur **58** à un inhibiteur d'IDO afin d'améliorer l'efficacité de l'immunothérapie anticancéreuse. En effet, sur une série de 104 lignées tumorales humaines issues de différents types histologiques, il a été observé que 20 tumeurs expriment TDO, 17 expriment IDO et 16 expriment les deux enzymes à la fois (Tableau IV.1). Par conséquent, en ciblant à la fois IDO et TDO cela permettrait d'atteindre 51 % des tumeurs au lieu de 32 % avec un inhibiteur visant seulement IDO ou 35 % avec un autre dirigé uniquement sur TDO. En outre, les résultats suggèrent que l'inhibition de TDO pourrait être utile aussi pour les tumeurs qui n'expriment pas intrinsèquement TDO (Pilotte L., 2012). Si cela se confirme dans de prochaines études alors la proportion de tumeurs favorables à cette thérapie augmentera.

Tableau IV.1: Expression de TDO et IDO dans les lignées tumorales humaines (adapté de Pilotte L., 2012).

Type de Tumeur	TDO (positif/testé)	IDO (positif/testé)	TDO/IDO (positif/testé)	Total (positif/testé)
Carcinome colorectal	5/11	1/11	0/11	6/11
Glioblastome	1/8	3/8	1/8	5/8
Leucémie	1/4	0/4	0/4	1/4
Lymphome	0/4	0/4	0/4	0/4
Mélanome	0/12	2/12	0/12	2/12
Mésothéliome	1/7	2/7	3/7	6/7
Myélome	1/3	0/3	0/3	1/3
Carcinome de la tête et du cou	1/11	2/11	5/11	8/11
Carcinome ovarien	0/1	1/1	0/1	1/1
Adénocarcinome pancréatique	0/5	3/5	1/5	4/5
Carcinome du poumon non à petites cellules	5/7	0/7	1/7	6/7
Carcinome du poumon à petites cellules	0/6	0/6	0/6	0/6
Sarcome	0/6	0/6	2/6	2/6
Carcinome du sein	1/4	1/4	0/4	2/4
Carcinome de la vessie	0/3	1/3	2/3	3/3
Hépatocarcinome	0/2	0/2	0/2	0/2
Carcinome de la vésicule biliaire	0/1	0/1	1/1	1/1
Carcinome des cellules rénales	4/9	1/9	0/9	5/9
Total	20/104	17/104	16/104	53/104

L'expression de TDO et IDO est évaluée par RT-PCR sur des ARN isolés provenant de lignées tumorales humaines.

En résumé, ce travail a permis, entre autre, de mettre à jour un inhibiteur **(58)** présentant une inhibition semblable à l'inhibiteur de référence mais ayant des avantages pharmacologiques supérieurs, ce qui permettra peut-être à l'avenir de traiter le cancer de façon plus efficace et ciblée par la promotion du rejet immunitaire tumoral.

SECTION EXPERIMENTALE

V. Section expérimentale

1. Chimie

1.1 Techniques analytiques

a) Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres ^1H -RMN sont pris en solution dans d_6 -DMSO sur un spectromètre Jeol JNM EX 400 à 400 MHz. Le pic résiduel du solvant sert de standard interne. Les spectres ^{13}C -RMN sont enregistrés sur le même spectromètre dans une solution dans d_6 -DMSO à 100 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés à bas champ en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS).

b) Synthèse au micro-ondes

Les synthèses du micro-ondes sont menées à l'aide d'un instrument Initiator 16 single-mode produisant une irradiation contrôlée à 2.450 GHz (BiotageAB, Uppsala, Suède). La température est mesurée avec une sonde IR située à l'extérieur du réacteur.

c) Analyses élémentaires

Les analyses élémentaires (C, H, N) sont réalisées sur un appareil Thermo Finnigan FlashEA 1112.

d) Analyses LC-MS

Les analyses analytiques LC/MS sont exécutées à partir d'une HPLC Agilent 1100 Series couplée avec un MSD Trap SL système utilisant une détection à 254 et 361 nm. Les spectres de masse sont pris en utilisant une ionisation par électro-nébulisateur opérant en mode positif. Cette méthode consiste en une injection de 10 μL d'échantillon à une concentration de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans l'acétonitrile sur une colonne Zorbax SB (100 x 3 mm). Les composés sont séparés selon un gradient (flux : 0.5 mL.min^{-1}) qui débute avec un mélange eau/acide acétique (0.1 %) de 95 % et 5 % d'acétonitrile. Le pourcentage d'acétonitrile atteint 95 % en 5 min. Ensuite, il reste à 95 % durant 3 min. avant de redescendre à 5 % en 10 sec. Et enfin, il reste à 5 % durant 5 min.

e) Les points de fusion

Les points de fusion ont été déterminés par l'appareil Büchi B-540 à l'aide de capillaires et sont non corrigés.

f) Chromatographies sur couche mince

Les chromatographies sur couche mince sont réalisées sur plaque de silice (60F₂₅₄, 0.2 mm d'épaisseur, Merck) avec une visualisation sous lumière UV à 254 nm et 365 nm.

1.2 Technique de purification

Chromatographie :

La chromatographie automatisée est menée sur un système Biotage AB SP1 équipé avec une cartouche de silice prête à l'emploi KP-Sil. L'élution est réalisée selon un gradient composé d'acétate d'éthyle et de cyclohexane : l'élution débute avec un ratio acétate d'éthyle/cyclohexane 12/88 pour un volume de colonne (VC). Le ratio augmente à 62/38 sur 5 VC, et forme un plateau sur 1 VC. Ensuite, le ratio passe à 100/0 sur 7 VC et finalement garde cette valeur sur 5 VC. Le produit est détecté par absorption UV à 254 et 320 nm. Les fractions intéressantes sont rassemblées et concentrées à l'évaporateur rotatif. Le précipité obtenu est filtré et lavé 2X avec du cyclohexane pour enfin être séché à 40°C dans l'étuve. Tous les composés synthétisés sont purs au-delà de 95 % selon la LC/MS.

1.3 Solvants et réactifs

Tous les réactifs et solvants nécessaires aux synthèses ont été achetés chez différents fournisseurs (Sigma Aldrich, Maybridge, Appollo, Fisher Scientific, Biosolve). Toutes les réactions sont réalisées sous atmosphère inerte d'argon (Alphagaz 2), sauf indication contraire.

1.4 Procédure générale de synthèse

Méthode A (Condensation de Knoevenagel par chauffage conventionnel). On introduit dans un ballon bicol le dioxane (3 mL), l'acide acétique chlorhydrate de pyridin-3-yle ou un autre composé énoisable (1.5 mmol) et la triéthylamine (535 µL, 3.8 mol, sauf cas contraire). Ce mélange est agité pendant environ 10 min. à température ambiante. Le 1H-

indole-3-carbaldéhyde (1.0 mmol, soit provenant d'une source commerciale ou préparé par formylation de Vilsmeier Haack à partir du 3-indole commercial non substitué selon la procédure de la littérature (Boularot A., 2007) où ce produit est utilisé brut dans la prochaine étape) et la pipéridine (220 μ L, 2.2 mmol) sont additionnés et le mélange (typiquement une suspension jaune qui devient progressivement orangée au cours de la réaction) est agité à reflux pour un temps de réaction indiqué. Dans certains cas, la progression de la réaction était plus lente (suivie par TLC dans l'acétate d'éthyle/cyclohexane 2:1), une aliquote de pipéridine est alors ajoutée et le temps de réaction dure alors approximativement 24h. Lorsque la réaction est complète, le mélange réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle avant d'être évaporé et le résidu adsorbé sur gel de silice. Cet échantillon est déposé sur colonne de silice et purifié à l'aide de la chromatographie automatisée et cristallisé à partir des fractions récoltées suite à cette purification.

Méthode B (Condensation de Knoevenagel par chauffage micro-ondes). La méthode B est analogue à la méthode A à l'exception du solvant qui est cette fois le méthanol (3 mL) au lieu du dioxane (dans ce cas, le mélange réactionnel est généralement une solution claire dès le départ) et le chauffage au micro-ondes a lieu à 150°C dans les tubes adéquats pour un temps de réaction indiqué. Le 6-fluoro-1H-indol-3-carbaldéhyde ou les 5,6,7-chloro-1H-indol-3-carbaldéhyde (163 mg, 1 mmol) sont utilisés comme réactif de départ.

Méthode C (Synthèse du tétrazole). Il existe une procédure décrite dans la littérature (Juby P.F., 1969 ; Vereschagin L.I., 2006) qui est la suivante : le chlorure d'aluminium anhydre (1.05 mol éq.) est suspendu dans du tétrahydrofurane anhydre (THF, 1 mL/mmol) à 0°C. L'azoture de sodium (2.8 mol éq.) est additionné, le bain eau/glacé est enlevé et la suspension beige est agitée à reflux durant 2 h. Lors d'un refroidissement bref du mélange, le dérivé nitrile est ajouté (1 mol éq.). Le mélange réactionnel est ensuite laissé sous agitation à reflux pour un temps de réaction indiqué. La suspension résultante a été refroidie avant l'ajout de l'acide citrique aqueux 1 M et on extrait plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées avec une solution NaCl saturée et séchées sur MgSO_4 . La purification par chromatographie automatisée suivie de la cristallisation sont décrites ci-dessus selon le produit.

1.5 Synthèses des composés indoliques

(E)-5-chloro-3-(2-pyridin-3-ylvinyl)-1H-indole (22): est préparé avec la méthode générale B, pour un temps de réaction de 2 h. Une quantité de 112 mg (44 %) sous forme de poudre jaune est obtenue. Point de fusion : 222-223°C. LC-MS t_R 5.8 min., m/z $[MH^+]$ 255, 257. 1H RMN δ 11.56 (1H, bs, indole-H1), 8.75 (1H, d, J = 1.8 Hz, ArH), 8.34 (1H, d, J = 4.6 Hz, ArH), 8.06 (1H, d, J = 1.4 Hz, ArH), 8.00 (1H, d, J = 8.0 Hz, ArH), 7.75 (1H, d, J = 2.3 Hz, ArH), 7.53 (1H, d, J = 16.7 Hz, HC=CH), 7.41 (1H, d, J = 8.7 Hz, ArH), 7.32 (1H, dd, J = 7.9, 5.0 Hz, ArH), 7.13 (1H, dd, J = 8.6, 1.5 Hz, ArH), 7.06 (1H, d, J = 16.7 Hz, HC=CH). ^{13}C RMN δ 148.1, 147.7, 135.9, 134.6, 132.2, 128.2, 126.9, 125.1, 124.3, 124.2, 122.4, 120.6, 119.5, 114.0, 113.9. Analyse élémentaire pour $C_{15}H_{11}ClN_2$: C, 70.73; H, 4.35; N, 11.00. On observe : C, 71.29 ; H, 4.51 ; N, 10.77.

(E)-6-chloro-3-(2-pyridin-3-ylvinyl)-1H-indole (31): est préparé avec la méthode générale B, pour un temps de réaction de 2 h. Une quantité de 79 mg (31 %) sous forme de poudre jaune foncée est obtenue. Point de fusion : 206-208°C. LC-MS t_R 5.9 min., m/z $[MH^+]$ 255, 257. 1H RMN δ 11.48 (1H, bs, indole-H1), 8.72 (1H, d, J = 1.6 Hz, ArH), 8.34 (1H, dd, J = 4.6, 1.1 Hz, ArH), 8.02 (1H, d, J = 8.7 Hz, ArH), 7.97 (1H, d, J = 8.0 Hz, ArH), 7.69 (1H, d, J = 2.3 Hz, ArH), 7.51 (1H, d, J = 16.5 Hz, HC=CH), 7.44 (1H, d, J = 1.8 Hz, ArH), 7.32 (1H, dd, J = 7.9, 4.7 Hz, ArH), 7.10 (1H, recouvrement dd, ArH), 7.07 (1H, recouvrement d, HC=CH). ^{13}C RMN δ 148.1, 147.8, 137.8, 134.6, 132.1, 128.0, 127.1, 124.5, 124.4, 124.2, 121.8, 120.8, 120.5, 114.2, 112.1. Analyse élémentaire pour $C_{15}H_{11}ClN_2$: C, 70.73; H, 4.35; N, 11.00. On observe : C, 71.49 ; H, 4.40 ; N, 11.05.

(E)-7-chloro-3-(2-pyridin-3-ylvinyl)-1H-indole (38): est préparé avec la méthode générale A, pour un temps de réaction de 15 h. Une quantité de 71.26 mg (28 %) sous forme de poudre jaune est obtenue. Point de fusion : 204-205°C. LC-MS t_R 6.0 min., m/z $[MH^+]$ 255, 257. 1H RMN δ 11.73 (1H, bs, indole-H1), 8.73 (1H, s, ArH), 8.35 (1H, d, J = 4.8 Hz, ArH), 8.00 (2H, m, 2 ArH), 7.74 (1H, d, J = 2.3 Hz, ArH), 7.53 (1H, d, J = 16.7 Hz, HC=CH), 7.33 (1H, dd, J = 7.9, 4.7 Hz, ArH), 7.23 (1H, d, J = 7.8 Hz, ArH), 7.13 (2H, m, ArH, HC=CH). ^{13}C RMN δ 148.1, 147.8, 134.5, 134.3, 132.2, 127.8, 127.7, 124.3, 124.2, 122.0, 121.3, 121.2, 119.5, 116.8, 115.3. Analyse élémentaire pour $C_{15}H_{11}ClN_2$: C, 70.73; H, 4.35; N, 11.00. On observe : C, 70.97 ; H, 4.04 ; N, 10.16.

(E)-6-Fluoro-3-(2-pyridine-3-ylvinyl)-1H-indole (30) (Madge D.G., 1996 ; Salter M., 1995a ; Salter M., 1995b) : **30** est préparé avec la méthode générale A, pour un temps de réaction de 18 h. Une quantité de 229 mg (96 %) sous forme de poudre jaune est obtenue. Point de fusion : 180-181°C. LC/MS t_R = 5.5 min., m/z $[MH^+]$ 239. 1H RMN δ 11.43 (1H, bs, indole-H1) ; 8.72 (1H, d, J = 1.4 Hz, ArH) ; 8.34 (1H, d, J = 4.8 Hz, ArH) ; 8.00 (2H, m, 2 ArH) ; 7.65 (1H, s, ArH) ; 7.50 (1H, d, J = 16.7 Hz, HC=CH) ; 7.33 (1H, dd, J = 7.9, 4.7 Hz, ArH) ; 7.18 (1H, dd, J = 9.8, 2.3 Hz, ArH) ; 7.07 (1H, d, J = 16.7 Hz, HC=CH) ; 6.96 (1H, dt, 3J = 9.2 Hz, 4J = 2.4 Hz, ArH). ^{13}C RMN δ 159.6 (d, J_{CF} = 234.6 Hz) ; 148.1 ; 147.7 ; 137.6 (d, J_{CF} = 12.4 Hz) ; 134.7 ; 132.1 ; 127.7 (d, J_{CF} = 2.9 Hz) ; 124.7 ; 124.2 ; 122.5 ; 121.5 (d, J_{CF} = 10.5 Hz) ; 120.4 ; 114.2 ; 108.7 (d, J_{CF} = 23.8 Hz) ; 98.5 (d, J_{CF} = 24.8 Hz). Analyse élémentaire pour $C_{15}H_{11}FN_2$: C, 75.62; H, 4.65; N, 11.76. On observe : C, 75.78 ; H, 4.70 ; N, 11.51.

(E)-3-[2-(3-Chlorophenyl)vinyl]-6-fluoro-1H-indole (50): **50** est synthétisé selon la procédure B, à partir de l'acide 3-chlorophényle acétique sans triéthylamine avec un temps de réaction de 6 h. Une quantité de 223 mg (96 %) sous forme de poudre jaune est obtenue. Point de fusion : 153-155°C. LC/MS t_R = 7.6 min., m/z $[MH^+]$ 272, 274. 1H RMN δ 11.41 (1H, bs, indole-H1) ; 8.01 (1H, dd, J = 8.7, 5.5 Hz, ArH) ; 7.64 (1H, d, recouvrement, ArH) ; 7.63 (1H, d, recouvrement, ArH) ; 7.50 (1H, d, recouvrement, ArH) ; 7.47 (1H, d, recouvrement, HC=CH) ; 7.32 (1H, t, J = 7.9 Hz, ArH) ; 7.16-7.20 (2H, recouvrement, 2 ArH) ; 7.05 (1H, d, J = 16.7 Hz, HC=CH) ; 6.95 (1H, dt, 3J = 9.2 Hz, 4J = 2.3 Hz, ArH). ^{13}C RMN δ 159.5 (d, J_{CF} = 234.6 Hz) ; 141.4 ; 137.5 (d, J_{CF} = 12.4 Hz) ; 134.0 ; 130.9 ; 127.8 ; 126.4 ; 125.5 ; 124.6 ; 124.4 ; 122.5 (2C) ; 121.6 (d, J_{CF} = 10.5 Hz) ; 114.1 ; 108.6 (d, J_{CF} = 23.8 Hz) ; 98.5 (d, J_{CF} = 25.8 Hz). Analyse élémentaire pour $C_{16}H_{11}ClFN$: C, 70.72 ; H, 4.08 ; N, 5.15. On observe : C, 70.88 ; H, 4.21 ; N, 4.81.

(Z)-3-(6-Fluoro-1H-indol-3-yl)acrylonitrile (Z-56) et (E)-3-(6-fluoro-1H-indol-3-yl)acrylonitrile (E-56):

E-56: a été synthétisé à partir de l'acide cyanoacétique avec 2.5 mmol de triéthylamine. La procédure générale B a été envisagée avec un temps de réaction de 10 h.

Z-56: une poudre blanche, 26 mg (14 %). Point de fusion: 144-145°C. LC/MS t_R = 5.9 min., m/z $[MH^+]$ 187. 1H RMN δ 11.90 (1H, bs, indole-H1) ; 8.17 (1H, s, indole-H2) ; 7.82 (1H, dd, J =

8.7, 5.3 Hz, ArH) ; 7.64 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, HC=CH) ; 7.26 (1H, dd, $J = 9.8, 2.3$ Hz, ArH) ; 6.99 (1H, dt, $^3J = 9.2$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, ArH) ; 5.45 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, HC=CH). ^{13}C RMN δ 159.9 (d, $J_{\text{CF}} = 235.5$ Hz) ; 141.4 ; 136.1 (d, $J_{\text{CF}} = 12.4$ Hz), 128.1, 123.8, 120.3, 120.2 (d, $J_{\text{CF}} = 10.5$ Hz), 111.7 ; 109.6 (d, $J_{\text{CF}} = 24.8$ Hz) ; 98.9 (d, $J_{\text{CF}} = 24.8$ Hz) ; 88.5. Analyse élémentaire pour $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{FN}_2$: C, 70.96 ; H, 3.79 ; N, 15.05. On observe : C, 71.69 ; H, 3.74 ; N, 14.96.

E-56: poudre jaune, 69 mg (37 %). Point de fusion: 170-172°C. LC/MS $t_R = 5.8$ min., m/z $[\text{MH}^+]$ 187. ^1H RMN δ 11.85 (1H, bs, indole-H1) ; 7.90 (1H, dd, $J = 8.8, 5.4$ Hz, ArH) ; 7.85 (1H, s, indole-H2) ; 7.68 (1H, d, $J = 16.7$ Hz, HC=CH) ; 7.23 (1H, dd, $J = 9.9, 2.5$ Hz, ArH) ; 6.98 (1H, dt, $^3J = 9.3$ Hz, $^4J = 2.3$ Hz, ArH) ; 6.05 (1H, d, $J = 16.7$ Hz, HC=CH). ^{13}C RMN δ 159.8 (d, $J_{\text{CF}} = 235.5$ Hz) ; 144.5 ; 137.9 (d, $J_{\text{CF}} = 12.4$ Hz) ; 132.5 ; 121.8 ; 121.6 (d, $J_{\text{CF}} = 10.5$ Hz) ; 121.0 ; 112.6 ; 109.8 (d, $J_{\text{CF}} = 24.8$ Hz) ; 99.2 (d, $J_{\text{CF}} = 25.7$ Hz) ; 89.6. Analyse élémentaire pour $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{FN}_2$: C, 70.96 ; H, 3.79 ; N, 15.05. On observe : C, 71.18 ; H, 3.70 ; N, 14.55.

(E)-6-Fluoro-3-[2-(1H-tétrazol-5-yl)vinyl]-1H-indole (58): **58** a été synthétisé à partir du nitrile **E-56** (358 mg, 1.92 mmol) suivie par la procédure C avec un temps de réaction de 18 h. 282 mg de poudre jaune ont été obtenus (64 %). Point de fusion : 228-230°C. LC/MS $t_R = 5.1$ min., m/z $[\text{MH}^+]$ 230. ^1H RMN δ 11.69 (1H, bs, indole-H1) ; 7.87-7.89 (2H, m, 2 ArH) ; 7.78 (1H, d, $J = 16.7$ Hz, HC=CH) ; 7.22 (1H, dd, $J = 9.8, 2.3$ Hz, ArH) ; 7.02 (1H, recouvrement d, HC=CH) ; 7.01 (1H, recouvrement, ArH). ^{13}C RMN δ 159.7 (d, $J_{\text{CF}} = 235.5$ Hz) ; 155.2 (tétrazole-C5) ; 137.7 (d, $J_{\text{CF}} = 12.39$ Hz) ; 132.2 ; 130.5 ; 122.2 ; 121.1 (d, $J_{\text{CF}} = 9.53$ Hz) ; 112.7 ; 109.4 (d, $J_{\text{CF}} = 23.8$ Hz) ; 104.9 ; 99.0 (d, $J_{\text{CF}} = 25.8$ Hz). Analyse élémentaire pour $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{FN}_5$: C, 57.64 ; H, 3.52 ; N, 30.55. On observe : C, 57.35 ; H, 3.69 ; N, 30.31.

(E)-3-(6-Fluoro-1H-indol-3-yl) acide acrylique (61): Une solution d'hydroxyde de potassium (66 mg, 1.18 mmol) dans de l'eau (1.5 mL) est additionnée à une solution d'ester **50** dans de l'éthanol (3 mL) et la solution trouble est chauffée à reflux durant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, l'extraction est réalisée avec de l'acétate d'éthyle et une solution 1 M d'acide citrique aqueuse. La phase aqueuse est extraite deux fois avec de l'acétate d'éthyle et combinée à la phase organique pour enfin être séchée sur MgSO_4 . La purification par chromatographie automatisée suivie de la cristallisation décrites ci-dessus ont permis l'obtention de 75 mg de solide jaunâtre (82 %). Point de fusion : 201-203°C. LC/MS $t_R = 5.1$

min., m/z [MH^+] 206, 188. 1H RMN δ 12.23 (1H, bs) ; 11.73 (1H, bs) ; 7.88 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, ArH) ; 7.82 (1H, dd, $J = 8.8, 5.4$ Hz, ArH) ; 7.74 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, HC=CH) ; 7.21 (1H, dd, $J = 9.7, 2.4$ Hz, ArH), 6.98 (1H, dt, $^3J = 9.2$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz, ArH) ; 6.27 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, HC=CH). ^{13}C RMN δ 169.0 (C=O) ; 159.7 (d, $J_{CF} = 235.5$ Hz) ; 138.6 ; 137.9 (d, $J_{CF} = 12.4$ Hz) ; 132.4 ; 122.3 ; 121.5 (d, $J_{CF} = 10.5$ Hz) ; 113.2 ; 112.3 ; 109.6 (d, $J_{CF} = 23.8$ Hz) ; 99.0 (d, $J_{CF} = 24.8$ Hz). Analyse élémentaire pour $C_{11}H_8FNO_2$: C, 64.39 ; H, 3.93 ; N, 6.83. On retrouve : C, 64.92 ; H, 4.18 ; N, 6.50.

2. Activité biologique

2.1 Test cellulaire

Les inhibiteurs vont être testés sur leur capacité à inhiber la dégradation du L-Trp et la production de kynurénine va être évaluée dans les cellules murines de TDO (*mTDO*). Le test est réalisé par le laboratoire du professeur B. Van den Eynde à l'UCL dans des plaques multi-puits où 2×10^5 cellules sontensemencées dans un volume final de 200 μL . Tout d'abord, les composés indoliques sont évalués après une nuit d'incubation avec des cellules à 37°C dans une solution de HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) avec 80 μM en L-Trp et 2, 20 ou 200 μM du composé étudié. Les plaques sont ensuite centrifugées (10 min. à 300 g) et le surnageant (150 μL) est analysé par HPLC pour mesurer la concentration résiduelle en L-Trp et en kynurénine produite. Ces données sont exprimées en pourcentage de valeurs obtenues en l'absence d'inhibiteur (Dolušić E., 2011c).

2.2 Test de toxicité

La viabilité cellulaire a été estimée par un test MTT effectué sur les cellules provenant du test cellulaire (voir § 2.1). MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltétrazolium, un tétrazol jaune) est réduit en formazan pourpre dans les cellules vivantes. Une quantité de 50 μL de milieu de culture (milieu Iscove avec 10 % FCS et acides aminés) a été additionnée aux puits de la plaque multi-puits avec 50 μL de MTT. Après 3-4h d'incubation à 37°C, une quantité de 100 μL de SDS/DMF a été additionné pour dissoudre les cristaux de bleu de formazan et l'absorbance est mesurée à 570 nm/650 nm après une nuit d'incubation à 37°C.

2.3 Détermination de la solubilité des composés indoliques

La solubilité des inhibiteurs a été déterminée en utilisant un système Multiscreen HTS-PCF filter plate suivant une procédure adaptée de la littérature (« Quantitative method to determine drug aqueous solubility : optimization and correlation to standard methods » Onofrey, T., & Kazan., G. <http://www.millipore.com/techpublications/tech1/an1730en00>). La première étape consiste à établir une droite de calibration en préparant une solution mère 10 mM en inhibiteur dans une solution 100 % DMSO. L'étape suivante consiste à préparer 5 solutions de concentrations connues (500, 200, 50, 12.5 et 3.13 μ M) selon le tableau V.1 De chacune de ces solutions, 200 μ L sont transférés dans des fioles *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) pour l'analyse *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS).

Tableau V.1 : Composants des solutions nécessaires à la réalisation des droites de calibration.

Solutions	[C] (μ M)	V _{solution mère} (μ L)	V _{acétonitrile} (μ L)	V _{DMSO} (μ L)	V _{final} (μ L)	% DMSO
1	500	10	190	0	200	5
2	200	10	475	15	500	5
3	50	100 de 2	285	15	400	5
4	12.5	100 de 3	285	15	400	5
5	3.13	100 de 4	285	15	400	5

Après avoir réalisé les droites de calibration, il faut préparer les tampons nécessaires à la manipulation. Une première solution tampon ayant une valeur de pH égale à 7.4 a été obtenue grâce à une solution 0.05 M en Na_2HPO_4 et 0.02 M en NaCl dont le pH a été ajusté à l'aide d'une seconde solution 0.05 M en NaH_2PO_4 et 0.02 M en NaCl. Le tampon devant atteindre une valeur de pH égale à 1, a quant à lui été obtenu grâce à une solution 0.2 M en HCl et 0.03 M en NaCl ajustée par une solution 0.03 M en NaCl. Finalement, pour la dernière solution tampon d'une valeur de pH égale à 9, une solution de 0.2 M en acide borique ainsi que 100 mL de NaOH 0.1 M ont été ajustés à 2 L avec de l'eau distillée (Dolušić E., 2011c).

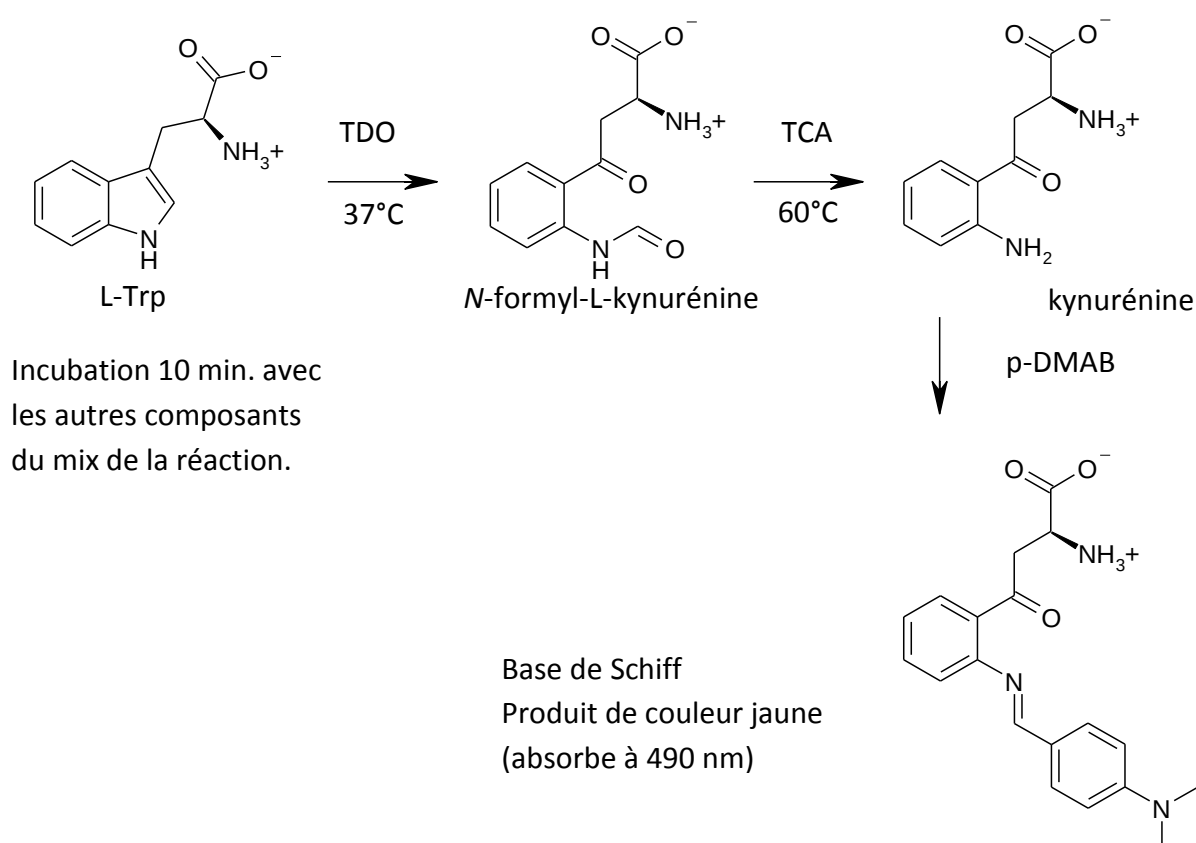
Concernant le protocole de détermination de solubilité, chaque puits doit contenir 190 μ L du tampon aqueux préparé ci-dessus ainsi que 10 μ L de DMSO pour le blanc ou 10 μ L de solution mère 10 mM (dans du DMSO) pour la mesure en elle-même. La plaque est mise

sous agitation (1 h 30, 600 rpm, T°amb). Lorsque l'incubation est terminée, la plaque doit être filtrée avec le manifold Millipore à 10-12 mmHg pendant 30 à 60 secondes. Après avoir effectué cette filtration, 160 µL de filtrat sont transférés dans une plaque multipuits où 40 µL d'acétonitrile sont ajoutés et agités (5 min., 200 rpm, 20°C). Ces 200 µL sont ensuite transférés dans des fioles HPLC pour l'analyse LC-MS.

2.4 Test colorimétrique discontinu

Le principe de ce test et les réactions mises en jeu sont représentées par le schéma V.1.

Schéma V.1 : Principe du test colorimétrique.



Le test colorimétrique discontinu a été mis en place sur base du protocole de (Matin A., 2006 ; Takikawa O., 1988) et a permis de déterminer l'activité de l'enzyme *rmTDO* mais également si les inhibiteurs potentiels n'étaient pas substrat de notre enzyme (*htTDO*). Il a également donné accès au K_i et par la même occasion au mode d'inhibition. Le tableau V.2

reprend l'ensemble des réactifs nécessaires ainsi que leur quantité respective pour mener à bien l'expérience.

Tableau V.2 : Réactifs nécessaires au test colorimétrique discontinu, adapté de (Takikawa O., 1988 ; Marin A., 2006).

	C_{initiale}	C_{finale}	Blanc (inhibiteur sans hTDO)	Réaction (hTDO + inhibiteur)	Blanc (L-Trp sans hTDO)	Réaction (hTDO + L-Trp)
Acide ascorbique (μL)	60,6 mM	20 mM	66	66	66	66
Catalase (μL)	10 mg/mL	0.5 mg/mL	10	10	10	10
Hémine (μL)	500 μM	5 μM	2	2	2	2
Bleu de méthylène (μL)	1 mM	10 μM	2	2	2	2
L-Trp (μL)	10 mM	1 mM	-	-	20	20
Tampon Tris pH = 8 (μL)	50 mM		110	90	90	70
DMSO (μL)	-	5 %	-	-	10	10
Inhibiteur (μL)	20 mM	1 mM	10	10	-	-
Extrait TDO (μL)	43 nM	4.3 nM	-	20	-	20
Volume total (μL)			200	200	200	200

Chaque composant présent dans une colonne du tableau V.2 correspond à un mélange réactionnel du test colorimétrique. L'enzyme est ajoutée après 10 min. d'incubation du mélange dans un bain à 37°C. Après 10 min. de réaction, celle-ci est stoppée par l'ajout de 40 μL d'acide trichloroacétique (TCA) 30 %. Les échantillons sont ensuite placés dans un incubateur à 60°C pendant 30 min. afin que l'hydrolyse de la *N*-formyl-L-kynurénine en kynurénine soit complète. Lorsque ce temps est écoulé, les cuvettes sont centrifugées (5 min., 14000 rpm, T°amb). Finalement, 120 μL du mélange réactionnel sont ajoutés à 120 μL

d'une solution de para-diméthyle aminobenzaldéhyde (p-DMAB) 20 % (100 mg dans 5 mL d'acide acétique 80 %). Ceci conduit à la formation d'une base de Schiff dont l'absorbance est mesurée à 490 nm grâce à un spectrophotomètre UV-Visible Biorad Model 68 Microplate reader avec une longueur de cellule de 0.5 cm. Concernant le calcul de la constante d'inhibition (K_i) ainsi que la détermination du mode d'inhibition, la méthode d'expérimentation est toujours la même que celle utilisée ci-dessus. Les réactifs à introduire dans les échantillons sont repris dans le tableau V.3 La manipulation s'effectue en triplicat.

Tableau V.3 : Réactifs nécessaires au test colorimétrique discontinu, adapté de (Matin A., 2006 ; Takikawa O., 1988).

	$C_{initiale}$	C_{finale}	Blanc (inhibiteur sans <i>hTDO</i>)	Réaction (<i>hTDO</i> + inhibiteur)
Acide ascorbique (μL)	60,6 mM	20 mM	66	66
Catalase (μL)	10 mg/mL	0.5 mg/mL	10	10
Hémine (μL)	500 μM	5 μM	2	2
Bleu de méthylène (μL)	1 mM	10 μM	2	2
L-Trp (μL)	varie		20	20
Tampon Tris pH = 8 (μL)	50 mM		90	70
DMSO (μL)	-	5 %	-	-
Inhibiteur (μL)	varie		10	10
Extrait TDO (μL)	43 nM	4.3 nM	-	20
Volume total (μL)			200	200

Les seules différences à remarquer se situent au niveau du L-Trp et de l'inhibiteur pour lesquels les concentrations varient respectivement de 100 à 400 μM et de 0 à 20 μM . Il faut également noter que l'enzyme *hTDO* fournie par l'équipe du Professeur Moreno Galleni de l'ULg a une concentration de 1.3 μM .

Quant à la sélectivité, le test est identique, la seule différence est l'enzyme utilisée, en l'occurrence, la *hIDO*.

2.5 Détermination des pK_a par spectroscopie UV-visible

Afin de mener à bien cette expérience, deux solutions doivent être préparées : la solution mère en inhibiteur (0.5 mM dans 60 % EtOH et 40 % eau distillée) ainsi que les solutions tampons à différents pH. Concernant les solutions de pH 3.00, 4.00, 4.50 et 5.00, une solution de citrate de sodium (0.2 M) a été réalisée et ajustée afin d'arriver aux valeurs de pH voulues. Pour les solutions de pH 1.00, 7.50, 9.00, les solutions sont identiques à celles préparées dans le point § 2.3 pour les tests de solubilité.

La cuvette contenant le blanc est un mélange 50:50 de la solution de pH et de la solution 60 % en EtOH. Pour ce qui est de la cuvette contenant l'échantillon à analyser, celle-ci contient un mélange 50:50 des tampons de pH et de la solution mère en inhibiteur. Lors de la mesure, les longueurs d'onde sont balayées de 280 à 420 nm (Houssier C., 1988).

2.6 Détermination de la stabilité

La stabilité a été évaluée expérimentalement (voir § 2.3) dans les mêmes conditions que pour les tests de solubilité mais cette fois dans un tampon PBS, pH = 7.4.

3. Etudes des interactions entre les inhibiteurs et l'enzyme TDO

3.1 Production de l'enzyme *rmTDO*

La séquence du gène codant pour la protéine d'intérêt est tronquée en son extrémité C-terminale et débute avec le 19^{ème} acide aminé, l'aspartate. Il possède également une queue poly-histidine (His-tag) en son extrémité N-terminale. Le plasmide disposant du gène codant pour *rmTDO* possède également un gène de résistance à un antibiotique en l'occurrence la kanamycine (Kan), une origine de répllication (Ori) ainsi qu'un gène codant pour le promoteur T7, du gène *lacI* qui intervient dans la régulation de l'expression (Figure V.1).

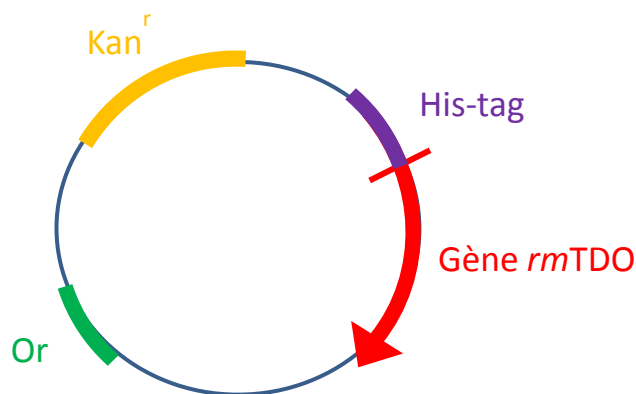


Figure V.1 : Représentation du plasmide codant pour *rmTDO*.

3.1.1 Surexpression de l'enzyme *rmTDO*

Pour mener à bien la thermotransformation, 1 μ L de plasmide est ajouté à 50 μ L de cellules thermo-compétentes BL21 (DE3) dans un tube eppendorf laissé sur glace pendant 30 min. Ensuite, un choc thermique est produit pendant 2 min. à 42°C. A cette étape, 1 mL de *Lysogeny Broth* (LB) est ajouté dans le tube eppendorf qui passera 40 min. dans l'incubateur sous agitation à 37°C. Finalement, 100 μ L de cette solution sont étalées sur une boîte de pétri (réalisée à l'aide de 25 mL de milieu *Lysogeny Broth-Agar* (LB-Agar) et 25 μ L de kanamycine (Kan)) à l'aide d'un ensementeur et la boîte est mise à incuber à 37°C toute une nuit. Après centrifugation (5 min., 5000 rpm, 20°C), le surnageant du tube eppendorf est resuspendu dans 100 μ L de milieu LB afin d'avoir une solution plus concentrée à étaler sur une seconde boîte de pétri.

A partir des colonies (culture *overnight* (O/N), 37°C) de cellules BL21 (DE3) qui ont proliférés sur la boîte de pétri, une préculture est ensemencée. Cette étape consiste à introduire 5 mL de milieu *Terrific Broth* (TB), 5 μ L de Kan et un tips contenant une colonie prélevée sur la boîte de pétri contenant la culture de cellule : BL21 DE3 transformées. Le tout est mis à agiter dans l'incubateur (O/N, 200 rpm, 37°C). Le lendemain, 500 mL de milieu TB, 200 μ L d'acide δ -aminolevulinique (précurseur de l'hème), 500 μ L de Kan et enfin 1 mL de préculture pour l'ensemencement de la culture, vont être ajoutés dans une flasque à contre pale de 2 L et placés dans l'incubateur (200 rpm, 37°C). Lorsque la densité optique (DO) à 600 nm est comprise entre 0.8 et 1.0, l'induction par 500 μ L d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 1 mM pourra se dérouler pendant 3 à 4 h toujours dans l'incubateur (200 rpm, 37°C). Après cette surexpression de la protéine d'intérêt, le tout

pourra être centrifugé (30 min., 6000 rpm, 4°C (rotor JA-14 Beckman)) afin de récupérer le culot cellulaire. Ce protocole a été adapté de Zhang Y., 2007.

3.1.2 Purification de l'enzyme *rmTDO*

Au culot obtenu au point précédent, vont être ajoutés 15 mL de tampon A (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH = 8) utilisé lors de la purification, une pastille de mini EDTA-free contenant des inhibiteurs de protéase et 200 µL du mélange de lyse contenant du lysozyme (10 mg/mL), de la RNase (1 mg/mL) et de la DNase (0.2 mg/mL). Le tout va subir une lyse par sonication (10 x 30 impulsions avec 30 sec. d'intervalle) suivie d'une centrifugation (30 min., 16000 rpm, 4°C (rotor JA-20 Beckman)) pour récupérer la protéine contenue dans le surnageant. Ce dernier sera séparé de toute impureté par filtration sur filtres 0.45 µm et 0.22 µm.

Avant d'amorcer l'étape consistant à purifier la protéine, il faut équilibrer la colonne Hitrap *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC) FF grâce à une seringue avec 5 volumes de colonne (VC) d'H₂O, ensuite, avec une solution de 3 mL NiCl₂ (0.2 M), une deuxième fois 5 VC d'H₂O, un VC de tampon B (1 M imidazole, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH = 8) et enfin 5 VC de tampon A. Chacune des solutions doit avoir été dégazée, filtrée et doit être ajoutée goutte à goutte sur la colonne afin d'éviter de créer un chemin préférentiel au sein de celle-ci. Après avoir conditionné la colonne, la protéine pourra y être introduite à l'aide d'une seringue et la solution récupérée à la sortie se nomme le *Flow Through 1* (FT1). Celui-ci se compose des protéines et d'impuretés non spécifiques à la colonne.

Les voies du dispositif *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) sur Bio-rad seront nettoyées grâce à l'eau dégazée et filtrée. Ensuite, il est nécessaire de faire passer un mélange des deux tampons A et B pour que les voies menant au mélangeur contiennent chacune leur tampon respectif. Finalement, il faudra purger (6.5 mL/min.) avec le tampon A afin que les voies menant à la colonne, au conductimètre et au détecteur UV contiennent ce tampon A.

Ensuite, la colonne est introduite dans le dispositif en marche (débit du tampon A de 0.3 mL/min.). Lorsque la colonne est connectée au système, le débit va être remis à 1 mL/min. et le *Flow Through 2* (FT2) va pouvoir être collecté. La séparation des constituants

du mélange est suivie à l'aide d'un détecteur UV-visible ainsi qu'un conductimètre (Biorad Biological LP) placé en sortie de colonne. L'absorbance mesurée à 280 nm, nous renseigne sur le contenu en protéines de chaque fraction recueillie par le collecteur.

Après avoir récupéré ce FT2, un gradient en tampon B (0 à 50 %) va prendre place pour pouvoir décrocher notre protéine d'intérêt et collecter des fractions de 3 mL dans des tubes à essais. Lorsque la protéine est décrochée, le tampon B seul va passer dans le dispositif également à 1 mL/min. et va être également récupéré pour être certain d'avoir collecté l'entièreté de notre protéine d'intérêt.

Après déconnexion de la colonne (débit du tampon B de 0.3 mL/min), les voies du système FPLC peuvent ensuite être lavées à l'aide d'H₂O et ensuite d'EtOH 20 % à un débit de 6.5 mL/min. La colonne IMAC va pouvoir être lavée goutte à goutte à l'aide de 5 volumes de colonne d'une solution d'EDTA 0.5 mM, 5 VC d'H₂O et 4 VC d'EtOH 20 %.

La dialyse va permettre d'éliminer l'imidazole présent dans le tampon contenant la protéine. Pour ce faire la membrane de dialyse est tout d'abord hydratée 5 min. dans de l'H₂O ensuite elle est hydratée à nouveau 5 min. dans le tampon A. Enfin, les fractions s'étant avérées pures par gel SDS-PAGE 12 % (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (voir § 3.1.4) sont rassemblées au sein de la membrane de dialyse et agitées à 4°C toute une nuit dans le tampon A. Dans la plupart des cas, une colonne de déssalage a été utilisée. Pour ce faire, une colonne pré-empactée (Sephadex G-25M) est vidée de son contenu liquide, rincée avec 25 mL d'H₂O. Ensuite, la colonne est équilibrée avec 25 mL de tampon A. Une fois, l'équilibrage effectuée, 2.5 mL d'échantillon sont déposés sur la colonne (le FT s'évacue au goutte à goutte et n'est pas recueilli) puis l'élution à lieu avec 3.5 mL de tampon A (dans ce cas, le FT est recueilli au goutte à goutte et sera concentré par la suite). Il faut répéter l'opération jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'échantillon. Pour finir, la colonne est nettoyée à l'aide de 25 mL d'H₂O et 20 mL d'éthanol à 20% pour être conservée ensuite à 4°C.

Une seconde étape de purification peut ensuite être réalisée sur un tamis moléculaire afin d'obtenir une pureté de >95 % pour pouvoir réaliser les essais de cristallogénèse. Pour ce faire, la protéine va devoir être concentrée par centrifugation sur amicon (3500 rpm, 4°C) pour obtenir un volume de 500 µl ce qui correspond à la capacité de

la boucle d'échantillonnage. Celle-ci est une boucle dans laquelle l'échantillon est chargé pour qu'il puisse être injecté sur la colonne. Tout comme pour l'étape de purification précédente, les voies de cet appareil sont également conservées dans de l'EtOH 20 %. La première étape consiste donc à laver les voies de l'appareil « AKTA purifier 10 » à l'aide d'H₂O dégazée et filtrée préalablement. Une colonne S200 1030 (GE Healthcare, 2007) va pouvoir être connectée en faisant passer un débit d'H₂O de 0.1 mL/min. Il faudra ensuite toute la nuit pour conditionner la colonne puisque 5 volumes de colonne d'eau et 5 volumes de colonne de tampon phosphate (25 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH = 8) doivent passer à un débit de 1 mL/min maximum (Unstore S200 1030). Le lendemain, l'échantillon filtré va pouvoir être introduit dans la boucle (lavée à l'H₂O et au tampon phosphate) à l'aide d'une seringue lorsqu'elle n'est pas connectée à la colonne. La protéine va s'éluer sur la colonne avant d'être collectée et sa pureté est à nouveau vérifiée sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE de la même manière qu'après la première purification. Pour conditionner la colonne une fois la purification terminée, qui consiste à faire passer 5 VC d'H₂O et 5 VC d'EtOH 20 % qui rincent le dispositif (méthode Store S200 1030).

3.1.3 Western Blot de l'enzyme rmTDO

Une fois les protéines séparées selon leur poids moléculaire, le gel SDS-PAGE est équilibré pendant 20 min. dans le tampon de transfert (5.8 g Tris-base, 2.9 g de glycine, 0.37 g de SDS, 200 mL de méthanol ; portés à 1 L d'H₂O). Une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) 0.45 µm, est plongée successivement dans trois bains (méthanol/eau/tampon de transfert) durant une minute chaque fois. Cette étape permet l'enlèvement de la couche hydrophobe et la mise à l'équilibre de la membrane (activation de la membrane). Les protéines sont transférées depuis le gel d'acrylamide sur une membrane de PVDF à l'aide d'un courant (14 V, 40 mA et 100 W), en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel SDS-PAGE. Il résulte de ce transfert une exposition des protéines sur la surface mince, ce qui facilite les étapes de détection ultérieures.

a) Blocage

La membrane ayant été choisie pour ses propriétés de liaison non-spécifique, des précautions doivent être prises pour minimiser les interactions entre membrane et

anticorps. Le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps est réalisé en incubant la membrane dans une solution 10 % de lait dans le TBS-T (2.46 g de Tris, 8 g de NaCl et 2 mL de Tween 20 ; porté à 1 L d'H₂O).

b) Anticorps primaire

Après blocage et lavage au TBS-T, la membrane est incubée 2 heures à température ambiante dans une solution 1:1000 d'anticorps primaires monoclonal de souris anti-His (Covance MMS 156R) diluée dans du TBS-T mélangé à 5 % de lait sous agitation modérée.

c) Anticorps secondaire

La membrane subit alors 3 rinçages successifs dans un bain de TBS-T à intervalle de 10 min. afin d'enlever les anticorps primaires non liés. Elle est ensuite incubée 45 min. à température ambiante avec une solution 1:5000 d'anticorps secondaires de chèvre anti-souris lié à la peroxydase de raifort (Amercham Biosciences NA931V), dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire. Enfin, la membrane est à nouveau rincée 3 fois à intervalle de 10 min. dans un bain de TBS-T.

d) Détection

La détection est réalisée par chimiluminescence au moyen du kit ECL[®] (tampon ECL 10 mL, H₂O₂ 30 % 3 µL, luminol 50 µL et acide coumarique 25 µL). La solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le milieu aqueux sont utilisés comme activateurs et la peroxydase présente sur l'anticorps secondaire sert de catalyseur à la réaction. Le luminol ainsi oxydé libère un photon qui vient impressionner un film photographique. On peut ainsi visualiser les différentes bandes correspondant spécifiquement aux protéines cibles reconnues par l'anticorps primaire.

3.1.4 Caractérisation de l'enzyme *rmTDO*

Un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12 % (Tableau V.4) est réalisé afin de vérifier la pureté de la protéine et de déterminer quelles fractions sont suffisamment pures pour la suite des manipulations.

Tableau V.4 : Réactifs nécessaires à la composition de 4 gels SDS-PAGE 12 %.

Composition pour 4 gels 12 %	Running gel	Stacking gel
H₂O	10.4 mL	5.6 mL
Acrylamide mix	7.8 mL	1.7 mL
1.5 M Tris pH = 8.8	6.3 mL	-
0.5 M Tris pH = 6.8	-	2.5 mL
10 % SDS	0.25 mL	0.1 mL
10 % persulfate d'ammonium (APS)	0.25 mL	0.1 mL
Tétra-méthyle-éthylènediamine (TEMED)	0.01 mL	0.01 mL

Pour cela, 15 µL de tampon d'échantillon (10 % SDS, β-mercaptoéthanol, Tris HCl 0.5 M pH 6.8, glycérol et bleu de bromophénol 0.5 %) et 15 µL de la fraction vont être mélangés dans un eppendorf et être placés 5 min. dans de l'eau bouillante afin de dénaturer les protéines. De ces eppendorfs, 20 µL vont être déposés dans chaque puits et vont migrer pendant environ 45 min. à 200 V. La migration terminée, le gel peut être mis à colorer dans une solution de Bleu de Coomassie (0.25 g dans 45 mL MeOH, 10 mL AcOH et 45 mL H₂O) pendant 20 min. Il va ensuite être mis à décolorer dans une solution de décoloration contenant 300 mL MeOH, 100 mL AcOH et 600 mL H₂O pendant un peu plus de 2 h.

Après cette étape d'évaluation de pureté de la protéine, la concentration de celle-ci peut être mesurée à l'aide d'un appareil Nanodrop 2000 en utilisant comme blanc le tampon dans lequel se trouve la protéine.

3.1.5 Essais de cristallogenèse sur l'enzyme *rmTDO*

Une solution de tri-sodium citrate dihydrate dont la concentration et le pH varient respectivement de 0.7 à 1.2 M et de 6.0 à 7.5, a été utilisée pour mettre en œuvre la méthode de la goutte pendante sur une plaque de 24 puits (Figure V.2). Ces conditions s'inspirent de la publication de (Zhang Y., 2007).

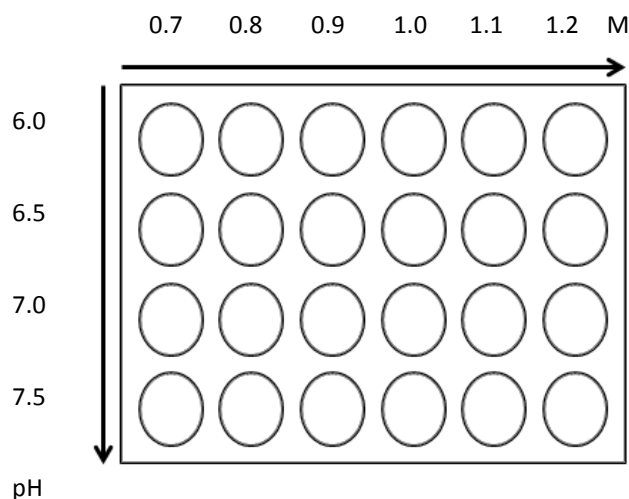


Figure V.2 : Boîte de cristallogenèse réalisée selon la méthode de la goutte pendante.

Neuf plaques ont été réalisées en faisant varier la concentration en protéine :

- Composition de la goutte dans les boîtes 1, 2, 3 : 2 μ L de réservoir + 1 μ L de protéine ($C_{\text{finale}} = 6.25 \text{ mg/mL}$) + 1 μ L d'une solution en **58, 61**, L-Trp ($C_{\text{finale}} = 0.5 \text{ mM}$)
- Composition de la goutte dans les boîtes 4, 5, 6 : 2 μ L de réservoir + 1 μ L de protéine ($C_{\text{finale}} = 3.13 \text{ mg/mL}$) + 1 μ L d'une solution en **58, 61**, L-Trp ($C_{\text{finale}} = 0.5 \text{ mM}$)
- Composition de la goutte dans les boîtes 7, 8, 9 : 2 μ L de réservoir + 1 μ L de protéine ($C_{\text{finale}} = 1.56 \text{ mg/mL}$) + 1 μ L d'une solution en **58, 61**, L-Trp ($C_{\text{finale}} = 0.5 \text{ mM}$)

De ces conditions, aucune n'est ressortie favorable à la cristallisation de la protéine *rmTDO*. Comme le représente la figure V.3, les gouttes étaient soit claires, contenaient de la protéine précipitée ou encore des cristaux de sel.

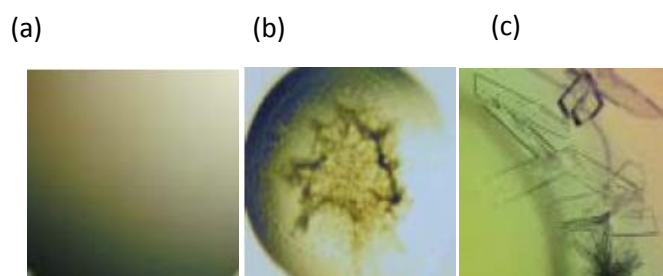


Figure V.3 : Photos : (a) d'une goutte claire, (b) d'une goutte contenant de la protéine précipitée et (c) d'une goutte contenant des cristaux de sel.

D'autres essais ont été réalisés avec la protéine *rmTDO* seule :

- Composition de la goutte dans la boîte 12 : 2 μ L de réservoir + 2 μ L de protéine (C_{finale} = 12.5 mg/mL)
- Composition de la goutte dans la boîte 13 : 2 μ L de réservoir + 2 μ L de protéine (C_{finale} = 6.25 mg/mL)
- Composition de la goutte dans la boîte 14 : 2 μ L de réservoir + 2 μ L de protéine (C_{finale} = 3.13 mg/mL)
- Composition de la goutte dans la boîte 15 : 2 μ L de réservoir + 2 μ L de protéine (C_{finale} = 1.56 mg/mL)

Grâce à la cristallisation de la protéine seule, la technique du soaking aurait pu être envisagée mais encore une fois aucun cristal n'a pu être obtenu dans ces conditions.

Vu que les conditions de la publication de la littérature (Zhang Y., 2007) n'ont pas abouti à une cristallisation de la protéine, la méthode de la goutte assise a été utilisée afin de réaliser un plus large screening avec 50 μ L de chacune des conditions des kits commerciaux JB Screen Basic 1 et 2 (Jena Bioscience : http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/632_screens.html), HR2-110 et HR2-112 (Hampton research, 2009) dans chaque réservoir. Ces kits commerciaux reprennent différentes conditions susceptibles de mener aux conditions primaires de cristallisation de notre protéine. Ces conditions ont été sélectionnées sachant que des peptides, des protéines, des oligonucléotides et de petites molécules ont déjà été cristallisées à l'aide de celles-ci. Ces plaques 96 puits contiennent trois gouttes par réservoir et contenaient respectivement :

- Composition des gouttes dans les boîtes 14, 15: 2 μL de réservoir + 1 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 12.5 \text{ mg/mL}$) + 1 μL d'une solution en **58**, **61**, L-Trp ($C_{\text{finale}} = 0.5 \text{ mM}$)
- Composition des gouttes dans les boîtes 16, 17: 2 μL de réservoir + 1 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 6.25 \text{ mg/mL}$) + 1 μL d'une solution en **58**, **61**, L-Trp ($C_{\text{finale}} = 0.5 \text{ mM}$)
- Composition des gouttes dans les boîtes 18, 19: 2 μL de réservoir + 1 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 3.13 \text{ mg/mL}$) + 1 μL d'une solution en **58**, **61**, L-Trp ($C_{\text{finale}} = 0.5 \text{ mM}$)
- Composition des gouttes dans les boîtes 20, 21: 2 μL de réservoir + 1 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 1.56 \text{ mg/mL}$) + 1 μL d'une solution en **58**, **61**, L-Trp ($C_{\text{finale}} = 0.5 \text{ mM}$)
- Composition des gouttes dans les boîtes 22, 23: 2 μL de réservoir + 2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 6.25 \text{ mg/mL} ; 3.13 \text{ mg/mL} ; 1.56 \text{ mg/mL}$)

Etant donné qu'aucun cristal n'est apparu dans ces conditions, deux lots de la protéine *rmTDO* ayant une concentration de 22.5 mg/mL ont été envoyés à l'ULg (dans le laboratoire du professeur Paulette Charlier) en vue d'essais de cristallisation au moyen d'un robot Mosquito. Effectivement, ce dernier permet de vérifier en peu de temps un grand nombre de kit de screening, ce qui semble intéressant étant donné le manque de stabilité de la protéine.

A l'ULg différents screening ont été envisagés avec des kits commerciaux tels que : cristal screen 1 et 2, index, malonate de chez Hampton Research ainsi que wizard 1 et 2 de chez Emerald et enfin des kits propres à leur laboratoire (salt et SPE). Ces différents kits ont donc permis de passer en revue au total 480 conditions.

La composition des gouttes dans les plaques étaient les suivantes :

- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 11.25 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir
- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 7.5 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir + 0.2 μL d'une solution de **61** ($C_{\text{finale}} = 0.66 \text{ mM}$)
- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 7.5 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir + 0.2 μL d'une solution de **58** ($C_{\text{finale}} = 0.66 \text{ mM}$)
- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 7.5 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir + 0.2 μL d'une solution de L-Trp ($C_{\text{finale}} = 0.33 \text{ mM}$)
- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 7.5 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir + 0.2 μL d'une solution de 4-phénylimidazole (PIM) ($C_{\text{finale}} = 0.33 \text{ mM}$)

- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 7.5 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir + 0.2 μL d'une solution NaCN ($C_{\text{finale}} = 0.66 \text{ mM}$)

De ces essais, une condition en présence de **58** (30 % MPD, 0.1 M cacodylate de sodium, pH = 6.5, 0.2 M acétate de magnésium) a donné des sphérulites.

Les kits silver bullet et additif (Hampton Research, 2009) ont été envisagés en présence de cette condition pour donner 194 nouvelles conditions.

La composition des gouttes dans les plaques étaient les suivantes :

- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 10 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir + 0.05 μL d'additif
- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 6.9 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir + 0.05 μL d'additif + 0.2 μL d'une solution de **61** ($C_{\text{finale}} = 0.62 \text{ mM}$)
- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 6.9 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir + 0.05 μL d'additif + 0.2 μL d'une solution de **58** ($C_{\text{finale}} = 0.62 \text{ mM}$)
- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 6.9 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir + 0.05 μL d'additif + 0.2 μL d'une solution L-Trp ($C_{\text{finale}} = 0.31 \text{ mM}$)
- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 6.9 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir + 0.05 μL d'additif + 0.2 μL d'une solution de 4-phényle imidazole ($C_{\text{finale}} = 0.31 \text{ mM}$)
- 0.2 μL de protéine ($C_{\text{finale}} = 6.9 \text{ mg/mL}$) + 0.2 μL du réservoir + 0.05 μL d'additif + 0.2 μL d'une solution de NaCN ($C_{\text{finale}} = 0.62 \text{ mM}$)

Néanmoins, malgré ce grand nombre de conditions étudiées aucun cristal de la protéine seule ou en complexe avec un inhibiteur ou son substrat n'est exploitable.

3.2 Cristallographie des inhibiteurs

Les cristaux sont obtenus par évaporation lente des solutions d'échantillons à température ambiante ou à 4°C. Les mesures de DRX sont réalisées à partir du système X-ray Gemini Ultra R utilisant la radiation Mo ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Les structures ont été résolues par des méthodes directes avec le programme SHELXS-97 et ensuite affinée sur F^2 en utilisant le programme SHELXS-97 (Sheldrick G.M., 1997). La représentation avec ellipsoïdes de vibration (ORTEP) de ces isomères a été obtenue par le programme PLATON (Speck A.L., 2001).

a) Composé 22

Des monocristaux du composé **22** ont pu être obtenus à partir d'un mélange (1:1) en toluène-acétate de méthyle à T°amb. Un cristal incolore est représenté à la figure V.4.

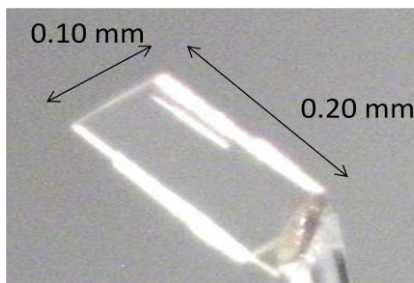


Figure V.4 : Cristal de la molécule inhibitrice **22**.

Ce dernier dont les dimensions sont de 0.20 mm x 0.10 mm x 0.28 mm a été analysé par DRX. Données du cristal **22**: Monoclinique C2/c, $a = 15.784(2) \text{ \AA}$, $b = 9.352(1) \text{ \AA}$, $c = 17.080(2) \text{ \AA}$, $\alpha = 90.000(0)^\circ$, $\beta = 98.676(4)^\circ$, $\gamma = 90.000(0)^\circ$, $Z = 8$, $D_{\text{calc}} = 1.3576 \text{ g/cm}^3$, $\mu (\text{Mo K}\lambda) = 0.288 \text{ mm}^{-1}$, $F(000) = 1056$, $\theta_{\text{min}} = 3.4^\circ$ à $\theta_{\text{max}} = 27.9^\circ$, $R = 0.0344$, $wR^2 = 0.072$, données observées ($I > 2\sigma I$) = 1257, total = 2599, $R(\text{int}) = 0.035$, $S = 0.793$.

b) Composé 31

Des monocristaux du composé **31** ont pu être obtenus à partir d'un mélange (1:1) en toluène-méthanol à T°amb. Un cristal incolore et translucide est représenté à la figure V.5.

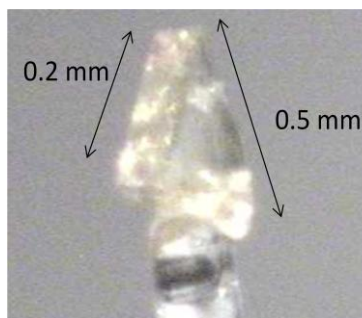


Figure V.5 : Cristal de la molécule inhibitrice **31**.

Ce dernier dont les dimensions sont de 0.50 mm x 0.33 mm x 0.20 mm a été analysé par DRX. Données du cristal **31**: Monoclinique C2/c, $a = 18.657(2) \text{ \AA}$, $b = 8.437(1) \text{ \AA}$, $c = 17.513(2) \text{ \AA}$, $\alpha = 90.000(0)^\circ$, $\beta = 126.44(3)^\circ$, $\gamma = 90.000(0)^\circ$, $Z = 8$, $D_{\text{calc}} = 1.3307 \text{ g/cm}^3$, $\mu (\text{Mo K}\lambda) = 0.282 \text{ mm}^{-1}$, $F(000) = 1056$, $\theta_{\text{min}} = 3.2^\circ$ à $\theta_{\text{max}} = 31.7^\circ$, $R = 0.07$, $wR^2 = 0.184$, données observées ($I >$

$2\sigma I = 1544$, total = 2681, $R(\text{int}) = 0.03$, $S = 1.04$. Un désordre est observé sur la molécule et les degrés de liberté de cette dernière ont été maintenus lors de l'affinement de sa structure cristallographique.

c) Composé 38

Des monocristaux du composé **38** ont pu être obtenus à partir d'un mélange (1:1) en toluène-acétate d'éthyle à $T^\circ \text{amb}$. Un cristal translucide est représenté à la figure V.6.

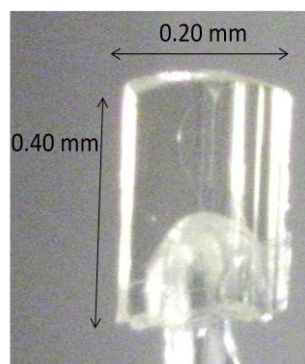


Figure V.6 : Cristal de la molécule inhibitrice 38.

Ce dernier dont les dimensions sont de 0.20 mm x 0.40 mm x 0.35 mm a été analysé par DRX. Données du cristal **38**: Triclinique P-1, $a = 11.081(1) \text{ \AA}$, $b = 13.128(1) \text{ \AA}$, $c = 14.863(1) \text{ \AA}$, $\alpha = 95.558(6)^\circ$, $\beta = 107.658(7)^\circ$, $\gamma = 111.505(7)^\circ$, $Z = 6$ (3 molécules dans l'unité asymétrique (u.a.)), $D_{\text{calc}} = 1.3623 \text{ g/cm}^3$, $\mu(\text{Mo K}\lambda) = 0.289 \text{ mm}^{-1}$, $F(000) = 792$, $\theta_{\text{min}} = 3.3^\circ$ à $\theta_{\text{max}} = 32.6^\circ$, $R = 0.0636$, $wR^2 = 0.119$, données observées ($I > 2\sigma I$) = 4184, total = 12288, $R(\text{int}) = 0.05$, $S = 0.845$.

d) Composé 58

Des monocristaux du composé **58** ont pu être obtenus à partir d'un mélange (2:1) en dioxane-méthanol à 4°C . Un cristal de couleur jaune pâle est représenté à la figure V.7.

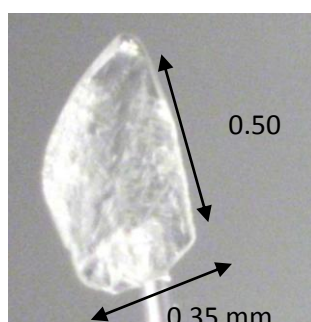


Figure V.7 : Cristal de la molécule inhibitrice 58.

Ce dernier dont les dimensions sont de 0.5 mm x 0.35 mm x 0.02 mm a été analysé par DRX. Données du cristal **58** : Système monoclinique $P2_1/c$, $a = 13.7007(6) \text{ \AA}$, $b = 9.3760(3) \text{ \AA}$, $c = 12.6680(6) \text{ \AA}$, $\alpha = 90.000(0)^\circ$, $\beta = 107.895(5)^\circ$, $\gamma = 90.000(0)^\circ$, $Z = 4$, $D_{\text{calc}} = 1.3911(1) \text{ g/cm}^3$, $\mu (\text{Cu K}\lambda) = 0.103 \text{ mm}^{-1}$, $F(000) = 663.8$, $\theta_{\text{min}} = 3.4^\circ$ à $\theta_{\text{max}} = 32.6^\circ$, $R = 0.082$, $wR^2 = 0.24$, données observées ($I > 2\sigma$) = 1779, total = 3342, $R(\text{int}) = 0.026$, $S = 1.030$.

e) Composé 61

Des monocristaux du composé **61** ont pu être obtenus à partir d'un mélange (2:1) en diéthyléther-diisopropyléther à 4°C. Un cristal de couleur jaune est représenté à la figure V.8.

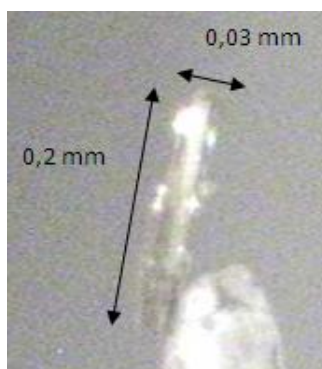


Figure V.8 : Cristal de la molécule inhibitrice 61.

Ce dernier possède les dimensions suivantes : 0.20 mm x 0.03 mm x 0.03 mm et a été analysé par DRX. Données du cristal **61**: système monoclinique $P2_1/c$, $a = 5.6068 \text{ \AA}$, $b = 18.7141 \text{ \AA}$, $c = 9.1622 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.000(0)^\circ$, $\beta = 100.644(13)^\circ$, $\gamma = 90.000(0)^\circ$, $Z = 4$, $D_{\text{calc}} = 1.44 \text{ g/cm}^3$, $\mu (\text{Cu K}\lambda) = 0.962 \text{ mm}^{-1}$, $F(000) = 423.9$, $\theta_{\text{min}} = 4.7^\circ$ à $\theta_{\text{max}} = 66.6^\circ$, $R = 0.064$, $wR^2 = 0.172$.

3.3 Modèle d'inhibition: docking

Les études de modélisation moléculaire ont été réalisées sur une plateforme Linux. Les composés sont construits en utilisant le module SKETCH du programme SYBYL (SYBYL, Version 8.0). Le *docking* a été réalisé en utilisant les coordonnées 3D de TDO (code PDB : 2NW9) avec l'aide du programme GOLD (Jones G., 1997) (le site actif a été défini à 9 Å autour du 6-fluorotryptophane). De manière à tenir compte de la flexibilité du complexe enzyme-inhibiteur, celui-ci a été optimisé en utilisant le module MINIMIZE du programme

SYBYL. Le processus de minimisation utilise la méthode de POWELL avec le champ de force TRIPOS (constante diélectrique 1 r) pour atteindre une convergence finale de 0.01 kcal.mol⁻¹.

4. Evaluation *in vivo*

Les détails expérimentaux de ce paragraphe sont repris dans la publication (Pilotte L., 2012) qui se trouve en annexe.

BIBLIOGRAPHIES

VI. Bibliographies

- ACD/Structure Designer, version 12.0; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario, Canada, www.acdlabs.com. **2010**.
- Allen F.H., Kennard O. & Watson D.G. Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1987**, 12, S1-S19.
- Altun A. & Ugur-Altun B. Melatonin: therapeutic and clinical utilization, *Int. J. Clin. Pract.* **2007**, 61, 835-845.
- Amersham Biosciences. Protein electrophoresis. Amersham Biosciences, 1999.
- Andrieu J-M. & Colonna P. Cancers : évaluation, traitement et surveillance. *Estem, Paris* **1997**.
- Atkins P. W. The elements of physical chemistry. *Oxford University Press* **1996**, 162.
- Basran J., Efimov I., Chauhan N., Thackray S.J., Krupa J.L., Eaton G., Griffith G.A., Mowat C.G., Handa S. & Raven E.L. The mechanism of formation of N-formylkynurenine by heme dioxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 16251-16257.
- Basran J., Rafic, S.A., Chauhan N., Efimov I., Cheesman M.R., Ghamsari L., & Raven E. L. A kinetic, spectroscopic, and redox study of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem.* **2008**, 47, 4752-4760.
- Batabyal D. & Yeh S. Human tryptophan dioxygenase: a comparison to indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15690-15701.
- Batabyal D. & Yeh S-R. Substrate-Protein Interaction in Human Tryptophan Dioxygenase: The Critical Role of H76. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 3260-3270.
- Baurain J-F., Van Der Bruggen P., Van den Eynde B., Coulie P.G. & Van Baren N., Principes généraux et premiers essais cliniques de vaccination thérapeutique contre le cancer. *Bull. Cancer* **2008**, 95, 327-335.
- Berger M., Gray J.A. & Roth B.L. The expanded biology of serotonin, *Annu. Rev. Med.* **2009**, 60, 355-366.
- Blumberg B.S. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, 94, 7121-7125.
- Borghaie H., Smith M.R. & Campbell K.S. Immunotherapy of cancer. *Eur. J. Pharm.* **2009**, 625, 41-54.

- Boularot A., Giglione C., Petit S., Duroc Y., Alves de Sousa R., Larue V., Cresteil T., Dardel F., Artaud I. & Meinnel T. Discovery and refinement of a new structural class of potent peptide deformylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 10-20.
- Brändle D., Bilsborough J., Rulicke T., Uyttenhove C., Boon T. & Van den Eynde B. The shared tumor-specific antigen encoded by mouse gene P1A is a target not only for cytolytic T lymphocytes but also for tumor rejection. *Eur. J. Immunol.* **1998**, *28*, 4010-4019.
- Brigelius R., Spottl R., Bors W., Lengfelder E., Saran M. & Weser U. Superoxide dismutase activity of low molecular weight Cu²⁺-chelates studied by pulse radiolysis. *FEBS Lett.* **1974**, *47*, 72-75.
- Burgess N.K., Dao T.P., Stanley A-M. & Fleming K.G. β -Barrel proteins that reside in the Escherichia coli outer membrane *in vivo* demonstrate varied folding behavior *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 26748-26758.
- Burnette W.N. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **1981**, *112*, 195-203.
- Buxbaum E. Biophysical chemistry of proteins. *Springer* **2011**, 33-35.
- Cady S.G. & Sono M. 1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3- benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3- dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *291*, 326-333.
- Campesan S., Green E.W., Breda C., Sathyaikumar K.V., Muchowski P.J., Schwarcz R., Kyriacou C.P., Giorgini F. The kynurenine pathway modulates neurodegeneration in a Drosophila model of Huntington's disease. *Curr. Biol.*, **2011**, *21*, 961-966.
- Caniato R., Filippini R., Piovan A., Puricelli L., Borsarini A. & Cappelletti E.M. Melatonin in plants, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, *527*, 593-597.
- Capece L., Arrar M., Roitberg A.E., Yeh S.R., Marti M.A. & Estrin D.A. Substrate stereo-specificity in tryptophan dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proteins* **2010**, *78*, 2961-2972.
- Capece L., Lewis-Ballester A., Batabyal D., Di Russo N., Yeh S.R., Estrin D.A. & Marti M.A. The first step of the dioxygenation reaction carried out by tryptophan

dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase as revealed by quantum mechanical/molecular mechanical studies. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 811-823.

- Chauhan N., Basran J., Efimov I., Svistunenko D.A., Seward H.E., Moody P.C.E. & Raven E.L. The role of serine 167 in human indoleamine 2,3-dioxygenase: a comparison with tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem.* **2008**, *47*, 4761-4769.
- Chauhan N., Thackray S.J., Rafice S.A., Eaton G., Lee M., Efimov I., Basran J., Jenkins P.R., Mowat C.G., Chapman S.K. & Raven E.L. Reassessment of the reaction mechanism in the heme dioxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4186-4187.
- Chomez P., De Backer O., Bertrand M., De Plaen E., Boon T. & Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5544-5551.
- Chung L.W., Li X., Sugimoto H., Shiro Y. & Morokuma K. Density functional theory study on a missing piece in understanding of heme chemistry: the reaction mechanism for indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12299-12309.
- Chung L.W., Li X., Sugimoto H., Shiro Y. & Morokuma K. ONIOM study on a missing piece in our understanding of heme chemistry: bacterial tryptophan 2,3-dioxygenase with dual oxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11993-12005.
- Clayden J., Greeves N., Warren S. & Wothers P. Chimie organique. De Boeck supérieur **2002**.
- Coley W.B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases, 1893. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1991**, 3-11.
- CompuDrug. Pallas Net 2.0. <http://www.compudrug.com>.
- Cornish-Bowden A., Jamin M. & Sacks V. Cinétique enzymatique. *EDP Sciences.* **2005**.
- Coussens L.M. & Werb Z., Inflammation and cancer. *Nature.* **2002**, *420*, 860-867.
- Creighton T.E. Hydrodynamic properties of biological macromolecules. *Helvetian Press* **2011**.
- Creighton T.E. Interactions between biological molecules. *Helvetian Press* **2011**.
- Davydov R.M., Chauhan N., Thackray S.J., Anderson J.L., Papadopoulou N.D., Mowat C.G., Chapman S.K., Raven E.L. & Hoffman B.M. Probing the ternary complexes of

indoleamine and tryptophan 2,3-dioxygenases by cryoreduction EPR and ENDOR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5494-5500.

- de la Maza L.M. & Peterson E.M. Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant human gamma-interferon on the concentration of tryptophan in culture media. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 346-50.
- DeFranco A.L., Robertson M. & Loksley R.M. Immunité: La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires, *De Boeck supérieure* **2009**.
- Degen A. Cours de « Pathologie générale », **2008**.
- Delano W.L. The PyMOL molecular graphics system on World Wide Web. <http://www.pymol.org>. **2008**.
- Denisov I.G., Makris T.M., Sligar S.G. & Schlichting I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253-2277.
- Desiraju G.R. & Steiner T. The weak hydrogen bond: in structural chemistry and biology. *IUCr. Oxford University Press.* **2001**, *9*.
- Dick R., Murray B.P., Reid M.J. & Correia M.A. Structure function relationships of rat hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase: identification of the putative heme-ligating histidine residues, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *392*, 71-78.
- Dolušić E., Larrieu P., Blanc S., Sapunarić F., Norberg B., Moineaux L., Colette D., Stroobant V., Pilotte L., Colau D., Ferain T., Fraser G., Galeni M., Frère, J-M., Masereel B., Van den Eynde B., Wouters J. & Frédérick R. Indol-2-yl ethanones as novel indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2011a**, *19*, 1550-1561.
- Dolušić E., Larrieu P., Blanc S., Sapunarić F., Pouyez J., Moineaux L., Colette D., Stroobant V., Pilotte L., Colau D., Ferain T., Fraser G., Galleni M., Frère J-M., Masereel B., Van den Eynde B., Wouters J. & Frédérick R. Discovery and preliminary SARs of ketoindoles as novel indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2011b**, *46*, 3058-3065.
- Dolušić E., Larrieu P., Moineaux L., Stroobant V., Pilotte L., Colau D., Pochet L., Van den Eynde B., Masereel B., Wouters J., & Frédérick R. Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) inhibitors: 3-(2-(pyridyl)ethenyl)indoles as potential anticancer immunomodulators. *J. Med. Chem.* **2011c**, *54*, 5320-5334.

- Dupuy D., Bertin N., Hidalgo C.A., Venkatesan K., Tu D., Lee D., Rosenberg J., Svrzikapa N., Blanc A., Carnec A., Carvunis A.R., Pulak R., Shingles J., Reece-Hoyes J., Hunt-Newbury R., Viveiros R., Mohler W.A., Tasan M., Roth F.P., Le Peuch C., Hope I.A., Johnsen R., Moerman D.G., Barabási A.L., Baillie D. & Vidal M. Genome-scale analysis of in vivo spatiotemporal promoter activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 663-668.
- Eguchi N., Watanabe Y., Kawanishi K., Hashimoto Y. & Hayaishi O. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase by beta-carboline and indole derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, 232, 602-609.
- English A.M. & Tsaprailis G. Catalytic and structure-function relationships in heme peroxidases. *Adv. Inorg. Chem.* **1995**, 43, 79-125.
- Feig B.W., Berger D.H. & Fuhrman G.M., eds **1998** The MD Anderson surgical oncology handbook, MD, Hagerstown.
- Ferlay J., Autier M., Boniol M., Heanue M., Colombet M. & Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann. Oncol.* **2006**, 18, 581-592.
- Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C. & Parkin D.M. Estimate of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* **2010**, 127, 2893-2917.
- Forouhar F., Anderson J.L.R., Mowat C., Vorobiev S.M., Hussain A., Abashidze M., Bruckmann C., Thackray S.J., Seetharaman J., Tucker T., Xiao R., Ma L.C., Zhao L., Acton T.B., Montelione G.T., Chapman S. K. & Tong L. Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104, 473-478.
- Frieden E., Westmark G.W. & Schor J.M. Inhibition of tryptophan pyrrolase by serotonin, epinephrine and tryptophan analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**, 92, 176-182.
- Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Montgomery J.A., Vreven Jr.T., Kudin K.N., Burant J.C., Millam J.M., Iyengar S.S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J.E., Hratchian H.P., Cross J.B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O.,

Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Ayala P.Y., Morokuma K., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Zakrzewski V.G., Dapprich S., Daniels A.D., Strain M.C., Farkas O., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Ortiz J.V., Cui Q., Baboul A.G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B., Chen W., Wong M.W., Gonzalez C. & Pople J.A., Gaussian 03. Revision B.04. Gaussian. Inc., Wallingford CT **2004**.

- Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Damonte G., Benatti U. & Ferrara G.B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* **2002**, 196, 459-68.
- Fuchs D., Malkovsky M., Reibnegger G., Werner E.R., Forni G. & Wachter H. Endogenous release of interferon-gamma and diminished response of peripheral blood mononuclear cells to antigenic stimulation. *Immunol. Lett.* **1989**, 23, 103-8.
- Fukumura E., Sugimoto H., Misumi Y. Ogura T. & Shiro Y. Cooperative binding of L-Trp to human tryptophan 2,3-dioxygenase: resonance Raman spectroscopic analysis, *J. Biochem.* **2009**, 145, 505-515.
- Gallivan J.P. & Dougherty D.A. Cation- π interactions in structural biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96, 9459-9464.
- Garcia-Ruiz J-M., Otalora F., Novella M-L., Gavira J.A., Sauter C. & Vidal O. A supersaturation wave of protein crystallization. *J. Cryst. Growth* **2001**, 232, 149-155.
- Garscha U. & Oliw E.H. Critical amino acids for the 8(R)-dioxygenase activity of linoleate diol synthase. A comparison with cyclooxygenases. *FEBS Lett.* **2008**, 582, 3547-3551.
- GE Healthcare. Affinity chromatography. *GE Healthcare* **2007**.
- GE Healthcare. Gel filtration. *GE Healthcare* **2007**.
- Giorgini F., Guidetti P., Nguyen Q., Bennett S.C. & Muchowski P.J. A genomic screen in yeast implicates kynurenine 3-monooxygenase as a therapeutic target for Huntington disease. *Nat. Genet.* **2005**, 37, 526-531.
- GraphPadPrism, **2003**. Version 5.03, GraphPad software, SanDiego CA.

- Grimster N.P., Gauntlett C., Godfrey C.R.A. & Gaunt M.J. Palladium-catalyzed intermolecular alkenylation of indoles by solventcontrolled regioselective C-H functionalization. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3125-3129.
- Grohmann U. & Bronte V. Control of immune response by amino acid metabolism. *Immunol. Rev.* **2010**, *236*, 243-264.
- Grohmann U., Fallarino F. & Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* **2003**, *24*, 242-8.
- Gromov S.P., Vedernikov A.I., Ushakov E.N., Lobova N.A., Botsmanova A.A., Kuz'mina L.G., Churakov A.V., Strelenko Y.A., Alfimov M.V., Howard J.A.K., Johnels D. & Edlund U.G. Novel supramolecular charge-transfer systems based on bis(18-crown-6)stilbene and viologen analogues bearing two ammonioalkyl groups. *New J. Chem.* **2005**, *29*, 881-894.
- Groves J.T. Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry, *Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York* **2005**.
- Guillemin G.J., Cullen K.M., Lim C.K., Smythe G.A., Garner B., Kapoor V., Takikawa O. & Brew B.J. Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 12884-12892.
- Hamilton G.A. eds **1974** In "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation". Academic Press, New York.
- Hamilton G.A. Mechanisms of two- and four-electron oxidations catalyzed by some metalloenzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **1969**, *32*, 55-96.
- Hampton Research. Viewing crystallization experiments. *Hampton Research*, **2009**.
- Hanahan D. & Weinberg R.A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
- Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance, *Endocrine* **2005**, *27*, 119-130.
- Higuchi K. & Hayaishi O. Enzymic formation of D-kynurenine from D-tryptophan, *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *120*, 397-403.
- Houssier C. Analyse structurale des biomolécules par spectroscopie optique. *ULg*, **1988**, 19-20

- Hu X., Bao Z., Hu J., Shao M., Zhang L., Bi K., Zhan A. & Huang, X. Cloning and characterisation of tryptophan 2,3-dioxygenase gene of Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones and Preston 1904), *Aquaculture Research* **2006**, 37, 1187-1194.
- Hwu P., Du M.X., Lapointe R., Do M., Taylor M.W. & Young H.A. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol.* **2000**, 164, 3596-699.
- Inouye M. & Yee M-L. Dodecyl sulfate of envelope electrophoresis in sodium separated by gel proteins of *Escherichia coli* homogeneity. *J. Bacteriol.* **1973**, 113, 304.
- Jones G., Willett P., Glen R.C., Leach A.R. & Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727-748.
- Jones R.D., Summerville D.A. & Basolo F. Synthetic oxygen carriers related to biological systems. *Chem. Rev.* **1979**, 79, 139-179.
- Joule J.A. & Mills K. Heterocyclic Chemistry. Blackwell Science, *Cambridge* **2000**.
- Juby P.F. & Hudyma T.W. Preparation and anti-inflammatory properties of some 1 substituted 3-(5-tetrazolylmethyl)indoles and homologs. *J. Med. Chem.* **1969**, 12, 396-401.
- Kaim W. & Schwederski B. Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life: an introduction and guide, Wiley, *Chichester* **1994**.
- Kanai M., Funakoshi H., Takahashi H., Hayakawa T., Mizuno S., Matsumoto K. & Nakamura T. Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Mol. Brain* **2009**, 2, 8.
- Katritzky A.R., Jain R., Lomaka A., Petrukhin R., Maran U. & Karelson M. Perspective on the relationship between melting points and chemical structure. *Cryst. Growth Des.* **2001**, 1, 261-265.
- Kerns E.H. & Di L. Drug-like properties: concepts, structure design and methods. *Academic Press* **2008**, 60-65.
- Knox W.E. Tryptophan oxidation. A tryptophan peroxidase from liver, Academic Press, *New York* **1955**.
- Koeduka T., Matsui K., Akakabe Y. & Kajiwarara T. Catalytic properties of rice alpha-oxygenase, a comparison with mammalian prostaglandin H synthases. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 22648-22655.

- Koldobskii G.I., Ostrovskii V.A. & Gidasov B.V. Tautomerism and acid-base properties of tetrazoles. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1981**, 16, 665-674.
- Kotake Y. & Masayama I. The intermediary metabolism of tryptophan. XVIII. The mechanism of formation of kynurenin from tryptophan, *Z. Physiol. Chem.* **1936**, 243, 237-244.
- Kurien B.T. & Scofield R.H. Western blotting, *Methods*, **2006**, 38, 283-293.
- Lacave R., Larsen C-J. & Robert J. Cancérologie Fondamentale, Société française du cancer, Eurotext, *Paris* **2005**.
- Ladd M.F.C. & Palmer R.A. Structure determination by X-ray crystallography. *Plenum press* **1977**, 119-193.
- Lafont P. Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. <http://www.biologie.upmc.fr/>
- Larsen R.J. & Buss D.M. *Personality psychology : domains of knowledge about human nature*, International ed., *Boston* **2002**.
- Lebel H., Davi M., Díez-Gonzalez S. & Nolan S.P. Copper carbene complexes as catalysts in the synthesis of functionalized styrenes and aliphatic alkenes. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 144-149.
- Leblanc B. Biochimie des protéines. <http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/5e1.html>. **2004**.
- Leeds J.M., Brown P.J., McGeehan G.M., Brown F.K. & Wiseman J.S. Isotope effects and alternative substrate reactivities for tryptophan 2,3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 17781-17786.
- Lee-Ruff E. The organic chemistry of superoxide. *Chem. Soc. Rev.* **1977**, 6, 195-214.
- Lefoix M., Daillant J-P., Routier S., Merour J-Y., Gillaizeau I. & Coudert G. Versatile and convenient methods for the synthesis of C-2 and C-3 functionalised 5-azaindoles. *Synthesis* **2005**, 20, 3581-3588.
- Lehninger A.L., Lehninger A.L.P.o.b., Nelson D.L. & Cox M.M. *Lehninger principles of biochemistry*, Michael M. Cox. ed., *New York* **2000**.
- Lewgowd W., Stanczak A., Pietrzak B. & Rzeszowska-Modzelewska K. Determination of lipophilicity, pK_a measurement and action on the central nervous system of some pyrimido[5.4-c]quinolines. *Drug Research* **2005**, 62, 271-281.

- Lewis-Ballester A., Batabyal D., Egawa T., Lu C., Lin Y., Marti M.A., Capece L., Estrin D.A. & Yeh S.R. Evidence for a ferryl intermediate in a heme-based dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 17371-17376.
- Li J.S., Han Q., Fang J., Rizzi M., James A.A. & Li, J. Biochemical mechanisms leading to tryptophan 2,3-dioxygenase activation, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2007**, *64*, 74-87.
- Littlejohn T.K., Takikawa O., Skylas D., Jamie J.F., Walker M.J. & Truscott R.J.W. Expression and purification of recombinant human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Prot. Exp. Purif.* **2000**, *19*, 22-29.
- Lob S., Konigsrainer A., Rammensee H.G., Opelz G. & Terness P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 445-452.
- Lu C., Lin Y. & Yeh S.R. Inhibitory substrate binding site of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12866-12867.
- Lu C., Lin Y. & Yeh S.R. Spectroscopic studies of ligand and substrate binding to human indoleamine 2,3-dioxygenase, *Biochem.* **2010**, *49*, 5028-5034.
- MacKenzie C.R., Heseler K., Muller A. & Daubener W. Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Antimicrobial Defence and Immuno-Regulation: Tryptophan Depletion Versus Production of Toxic Kynurenines. *Curr. Drug Metab.* **2007**, *8*, 237-244.
- Madge D.G., Hazelwood R. I., Jones H.T. & Salter M. Novel tryptophan dioxygenase inhibitors and combined tryptophan dioxygenase/5-HT reuptake inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 857-860.
- Maghzal G.J., Thomas S.R., Hunt N.H. & Stocker R. Cytochrome b5, not superoxide anion radical, is a major reductant of indoleamine 2,3-dioxygenase in human cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 12014-12025.
- Makris T.M., Von Koenig K., Schlichting I. & Sligar S.G. The status of high-valent metal oxo complexes in the P450 cytochromes. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 507-518.
- Manandhar S.P., Shimada H., Nagano S., Egawa T. & Ishimura Y. Subunit structure of recombinant rat liver L-tryptophan 2,3-dioxygenase, *Internat. Congr. Series* **2002**, *1233*, 161-169.
-

- Mannhold R. & Rekker R.F. The hydrophobic fragmental constant approach for calculating log P in octanol/water and aliphatic hydrocarbon/water systems. **2000**, *18*, 1-18.
- Martinez-Torres C., Romano E.L., Renzi M. & Layrisse M. Fe(III)-EDTA complex as iron fortification further studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **1979**, *32*, 809-816.
- Matin A., Streete I.M., Jamie I.M., Truscott R.J.W. & Jamie J.F. A fluorescence-based assay for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Anal. Biochem.* **2006**, *349*, 96-102.
- McGaughey B.G., Gagne M. & Rappe A.K. π -Stacking interactions. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15458-15463.
- McPherson. Crystallization of biological macromolecules. *Cold Spring Harbor Laboratory Press : New York* **1998**.
- Mersmann A. & Bartosch K. How to predict the metastable zone width. *J. Cryst. Growth* **1998**, *183*, 240-250.
- Michiels C., Cours de « Chimie biologique avancée », **2007**.
- Miller C.L., Llenos I.C., Dulay J.R. & Weis S. Upregulation of the initial step of the kynurenine pathway in postmortem anterior cingulate cortex from individuals with schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Research* **2006**, *1073-1074*, 25-37.
- Miller C.L., Llenos I.C., Dulay J.R., Barillo M.M., Yolken R.H. & Weis S. Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia, *Neurobiol. Dis.* **2004**, *15*, 618-629.
- Millett E.S., Efimov I., Basran J., Handa S., Mowat C.G. & E.L. Raven. Heme-containing dioxygenases involved in tryptophan oxidation, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *in press*.
- Moineaux L., Laurent S., Reniers J., Dolušić E., Galleni M., Frère J-M., Masereel B., Frédérick R. & Wouters J. Synthesis, crystal structures and electronic properties of isomers of chloro-pyridinylvinyl-1H-indoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *1-8*.
- Moriya T., Hagio K. & Yoneda N. Preparation and reactions of 3-(aminomethylene)-3H-indoles. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 1711-1721.
- Moroni F., Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *375*, 87-100.
- Muller A.J., DuHadaway J.B., Donover P.S., Sutanto-Ward E. & Prendergast G.C. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer

suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 312-319.

- Muller A.J., Sharma M.D., Chandler P.R., Duhadaway J.B., Everhart M.E., Johnson B.A. 3rd, Kahler D.J., Pihkala J., Soler A.P., Munn D.H., Prendergast G.C. & Mellor A.L. Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **2008**, *105*, 17073-17078.
- Munn D.H. & Mellor A.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 1147-1154.
- Munn D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T., Bondarev I., Pashine A. & Mellor A.L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1363-1372.
- Munn D.H., Sharma M.D., Lee J.R., Jhaver K.G., Johnson T.S., Keskin D.B., Marshall B., Chandler P., Antonia S.J., Burgess R., Slingluff C.L. & Mellor A.L. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* **2002**, *297*, 1867-70.
- Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T., Bondarev I., Conway S.J., Marshall B., Brown C. & Mellor A.L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* **1998**, *281*, 1191-1193.
- Myerson A.S. Handbook of industrial crystallization. *Butterworth-Heinemann* **2002**, 281.
- Opitz C.A., Litzenburger U.M., Sahm F., Ott M., Tritschler I., Trump S., Schumacher T., Jestaedt L., Schrenk D., Weller M., Jugold M., Guillemin G.J., Miller C.L., Lutz C., Radlwimmer B., Lehmann I., Von Deimling A., Wick W., Platten M. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. **2011**, *478*, 197-203.
- Ozaki Y., Edelstein M.P. & Duch D.S. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 1242-6.
- Paglino A., Lombardo F., Arca B., Rizzi M. & Rossi F. Purification and biochemical characterization of a recombinant *Anopheles gambiae* tryptophan 2,3-dioxygenase expressed in *Escherichia coli*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *38*, 871-876.

- Papadopoulou N.D., Mewies M., McLean K.J., Seward H.E., Svistunenko D.A., Munro A.W. & Raven E.L. Redox and spectroscopic properties of human indoleamine 2,3-dioxygenase and a His303Ala variant: implications for catalysis. *Biochemistry* **2005**, *44*, 14318-14328.
- Pearson J.T., Siu S., Meininger D.P., Wienkers L.C. & Rock D.A. In vitro modulation of cytochrome P450 reductase supported indoleamine 2,3-dioxygenase activity by allosteric effectors cytochrome b(5) and methylene blue. *Biochemistry* **2010**, *49*, 2647-2656.
- Pfefferkorn E.R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 908-12.
- Pilotte L., Larrieu P., Stroobant V., Colau D., Dolušić E., Frédérick R., De Plaen E., Uyttenhove C., Wouters J., Masereel B. & Van den Eynde B. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 2497-2502.
- Pitche P.T. Pellagra. *Sante* **2005**, *15*, 205-208.
- Pogson C.I., Knowles R.G. & Salter M. The control of aromatic amino acid catabolism and its relationship to neurotransmitter amine synthesis, *Crit. Rev. Neurobiol.* **1989**, *5*, 29-64.
- Prendergast G.C. & Jaffee E.M. eds **2007** Cancer immunotherapy. Academic Press., London.
- Price P. & Sikora K. Treatment of cancer, Chapman and Hall, *London* **2000**.
- Primrose S.B., Twyman R.M. & Old R.W. Principes de génie génétique. *De Boeck* **2004**, 74-75.
- Que L. & Ho R.Y.N. Dioxygen Activation by Enzymes with Mononuclear Non-Heme Iron Active Sites. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2607-2624.
- Raven E.L. & Mauk A.G. Chemical reactivity of the active site of Myoglobin. *Adv. Inorg. Chem.* **2001**, *51*, 1-49.
- Reiter R.J., Acuna-Castroviejo D., Tan D.X. & Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *939*, 200-215.

- Rekker R.F. & Mannhold R. Calculation of Drug Lipophilicity. The hydrophobic fragmental constant approach. *VCH, Weinheim*, **1992**.
- Ren S., Liu H., Licad E. & Correia M.A. Expression of rat liver tryptophan 2,3-dioxygenase in *Escherichia coli*: structural and functional characterization of the purified enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *333*, 96-102.
- Reniers J., Robert S., Frédérick R., Masereel B., Vincent S. & Wouters J. Synthesis and evaluation of beta-carboline derivatives as potential monoamine oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 134-144.
- Rescigno M., Avogadri F. & Curigliano G. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1776*, 108-123.
- Rogers L.J., Eva L.J. & Luesley D.M. Vaccines against cervical cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **2008**, *20*, 570-574.
- Ruddick J.P., Evans A.K., Nutt D.J., Lightman S.L., Rook G.A. & Lowry C.A. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications, *Expert Rev. Mol. Med.* **2006**, *8*, 1-27.
- Salter M., Hazelwood R., Pogson C.I., Iyer R. & Madge D.G. The effects of a novel and selective inhibitor of tryptophan 2,3-dioxygenase on tryptophan and serotonin metabolism in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **1995a**, *49*, 1435-1442.
- Salter M., Hazelwood R., Pogson C.I., Iyer R., Madge D.J., Jones H.T., Cooper B.R., Cox R.F., Wang C.M. & Wiard R.P. The effects of an inhibitor of tryptophan 2,3-dioxygenase and a combined inhibitor of tryptophan 2,3-dioxygenase and 5-HT reuptake in the rat. *Neuropharmacology* **1995b**, *34*, 217-227.
- Santarsiero B.D., Yegian D.T., Lee C.C., Spraggon G., Gu J., Scheibe D., Uber D.C., Cornell E.W., Nordmeyer R.A., Kolbe W.F., Jin J., Jones A.L., Jaklevic J.M., Schultz P.G. & Stevens R.C. An approach to rapid protein crystallization using nanodroplets. *J. Appl. Cryst.* **2002**, *35*, 278-281.
- Sauter C., Lorber B., Kern D., Cavarelli J., Moras D. & Giegé R. Crystallogensis studies on aspartyl-tRNA synthetase: use of phase diagram to improve crystal quality. *Acta Cryst.* 1999, *D55*, 149-56.
- Sawyer D.T. & Valentine J.S. How super is superoxide? *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 393-400.

- Schmidt S.K., Müller A., Heseler K., Woite C., Spekker K., MacKenzie C.R. & Däubener W. Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39*, 2755-2764.
- Schröcksnadel K., Wirleitner B., Wrinkler C. & Fuchs D. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *364*, 82-90.
- Sheldrick G.M. SHELXL97. Program for the refinement of crystal structures. *University of Göttingen* **1997**.
- Shimizu T., Nomiya S., Hirata F. & Hayaishi O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 4700-4706.
- Sono M., Roach M.P., Coulter E.D. & Dawson J.H. Heme-Containing Oxygenases. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841-2887.
- Sørensen U.S. & Pombo-Villar E. Copper-free palladiumcatalyzed Sonogashira-type coupling of aryl halides and 1-aryl-2-(trimethylsilyl) acetylenes. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2697-2703.
- Speck A.L. PLATON, a multipurpose crystallographic tool. *University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands* **2001**.
- Stone T.W. & Darlington L.G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, *1*, 609-620.
- Sugimoto H., Oda S., Otsuki T., Hino T., Yoshida T. & Shiro Y. Crystal structure of indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 2611-2616.
- Sundberg R.G., Luis J.G., Parton R.L., Schreiber S., Srinivasan P.C., Lamb P., Forcier P. & Bryan R.B. Chloroacetamide photocyclization of indole derivatives. Synthesis, stereochemistry, and crystal structure of 3,7-methano-3-azacycloundecino[5,4-b]indole (deethylquebrachamine) derivatives. *J. Org. Chem.* **1978**, *23*, 4859-4865.
- Sureshbabu V.V., Vasantha B. & Hemantha H.P. Synthesis of N-Fmoc-protected amino alkyl thiocyanates/selenocyanates and their application in the preparation of 5-substituted S/Se linked tetrazoles. *Synthesis* **2011**, *9*, 1447-1455.
- SYBYL, version 8.0 ; Tripos Inc. (South Hanley Rd, St. Louis, MO, 63144, U.S.).
- Takikawa O., Kuroiwa T., Yamazaki F. & Kido R. Mechanism of interferon- γ action. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 2041-2048.

- Terentis A.C., Thomas S.R., Takikawa O., Littlejohn T.K., Truscott R.J.W., Armstrong R.S., Yeh S.-R. & Stocker R. The heme environment of recombinant human indoleamine 2,3-dioxygenase: structural properties and substrate–ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 15788-15794.
- Terness P., Bauer T.M., Röse L., Dufter C., Watzlik A., Simon H. & Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* **2002**, 196, 447-57.
- Thackray S.J., Bruckmann C., Anderson J.L.R., Campbell L.P., Xiao R., Zhao L., Mowat C., Forouhar F., Tong L. & Chapman S. K. Histidine 55 of tryptophan 2,3-dioxygenase is not an active site base but regulates catalysis by controlling substrate binding. *Biochem.* **2008**, 47, 10677-10684.
- Uyttenhove C., Pilotte L., Théate I., Stroobant V., Colau D., Parmentier N., Boon T. & Van den Eynde B. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* **2003**, 9, 1269-1274.
- Van de Waterbeemd H. & Testa B. Drug bioavailability. *Wiley-VCH* **2009**, 144.
- Van den Eynde B., Lethé B., Van Pel A., De Plaen E. & Boon T. The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J. Exp. Med.* **1991**, 173, 1373-1384.
- Van den Eynde B., Pilotte L. & De Plaen E. Tryptophan catabolism in cancer treatment and diagnosis. *WO2010008427*, **2010**.
- Van der Goot A.T., Zhu W., Vázquez-Manrique R.P., Seinstra R.I., Dettmer K., Michels H., Farina F., Krijnen J., Melki R., Buijsman R.C., Ruiz Silva M., Thijssen K.L., Kema I.P., Neri C., Oefner P.J. & Nollen E.A. Delaying aging and the aging-associated decline in protein homeostasis by inhibition of tryptophan degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109, 14912-14917.
- Vereshchagin L. I., Petrov A.V., Kizhnyaev V.N., Pokatilov F.A. & Smirnov A.I. Polynuclear nonfused bis(1,3,4-oxadiazole)-containing systems. *Russ. J. Org. Chem.* **2006**, 42, 1049-1055.
- Vetto J. Current practice and therapy in surgical oncology, MD, *Hagerstown* **1999**.

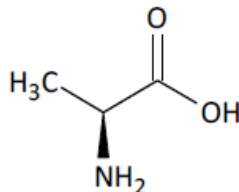
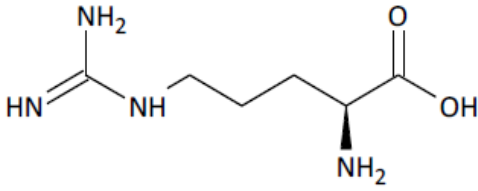
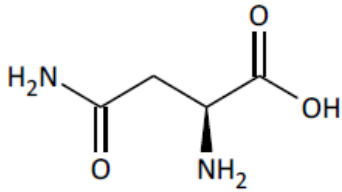
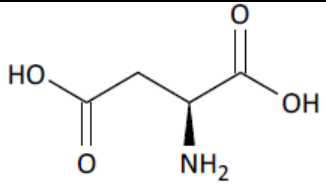
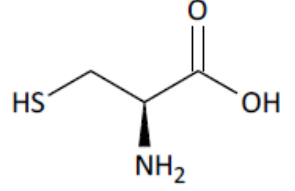
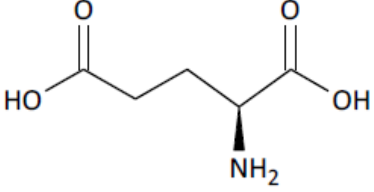
- Viola A. & Bronte V. Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses, *Semin. Cancer Biol.* **2007**, *17*, 309-316.
- Voet D. & Voet J.G. Biochimie. *De Boeck Universit * **1998**, 356-358.
- Vottero E., Mitchell D.A., Page M.J., MacGillivray R.T.A., Sadowski I.J., Roberge M. & Mauk A.G. Cytochrome b5 is a major reductant *in vivo* of human indoleamine 2,3-dioxygenase expressed in yeast. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2265-2268.
- Walsh A. & Daya S. Inhibition of hepatic tryptophan-2,3-dioxygenase: Superior potency of melatonin over serotonin. *J. Pineal Res.* **1997**, *23*, 20-23.
- Watanabe Y., Fujiwara M., Yoshida R. & Hayaishi O. 2, 5-Dihydro-L-phenylalanine: a competitive inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *85*, 273-279.
- Weast R.C., Astle M.J. & Beyer W.H. Handbook of Chemistry and Physics. *CRC Press* **1987**.
- Westermeier R. & Marouga R. Protein detection methods in proteomics research. *Bioscience Reports* **2005**, *25*, 19-32.
- Widner B., Werner E.R., Schennach H., Watcher H. & Fuchs D. Simultaneous measurement of serum tryptophan and kynurenine by HPLC. *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 2424-2426.
- Wilkins M.R., Gasteiger E., Bairoch A., Sanchez J.C., Williams K.L. & Hochstrasse D.F. protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *Methods Mol. Biol.* **1999**, *112*, 531-552.
- Wirleitner B., Neurauter G., Schro cksadel K., Frick B. & Fuchs D. Interferon- -induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1581-91.
- Wong L.L. Cytochrome P450 monooxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1989**, *2*, 263-268.
- World health organization-NCD country profiles, <http://www.who.int/nmh/countries/en/>, **2011**.
- Yagil G. The proton dissociation constant of pyrrole, indole and related compounds. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 2855-2861.

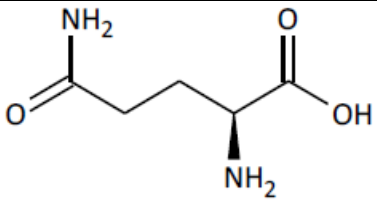
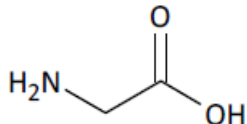
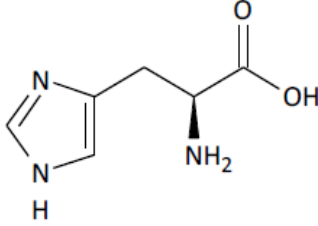
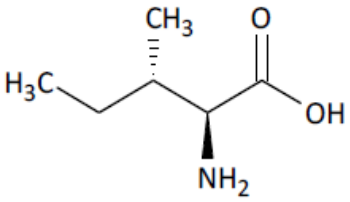
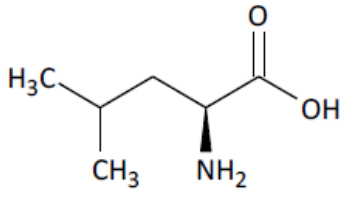
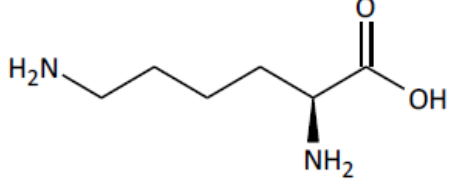
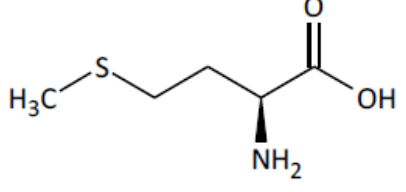
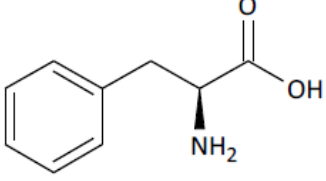
- Yanagisawa S., Horitani M., Sugimoto H., Shiro Y., Okada N. & Ogura T. Resonance Raman study on the oxygenated and the ferryl-oxo species of indoleamine 2,3-dioxygenase during catalytic turnover. *Faraday Discuss.* **2010**, *148*, 1-9.
- Yanagisawa S., Yotsuya K., Hashiwaki Y., Horitani M., Sugimoto H., Shiro Y., Appelman E.H. & Ogura T. Identification of the Fe–O₂ and the Fe=O heme species for indoleamine 2,3-dioxygenase during catalytic turnover. *Chem. Lett.* **2010**, *39*, 36-37.
- Young S.N. Nutrition and the brain. *Wurtman J.J. Eds, Raven Press, New York* **1986**.
- Yue E.W., Douty B., Wayland B., Bower M., Liu X., Leffert L., Wang Q., Bowman K.J., Hansbury M.J., Liu C., Wei M., Li Y., Wynn R., Burn T.C., Koblisch H.K., Fridman H.K., Metcalf B., Scherle P.A. & Combs A.P. Discovery of potent competitive inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase with in vivo pharmacodynamic activity and efficacy in a mouse melanoma model. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7364-7367.
- Zhang Y., Kang S.A., Mukherjee T., Bale S., Crane B.R., Begley T.P. & Ealick S.E. Crystal structure and mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase, a heme enzyme involved in the tryptophan catabolism and the quinolinate biosynthesis. *Biochem.* **2007**, *46*, 145-155.
- Zwilling D., Huang S.Y., Sathyaikumar K.V., Notarangelo F.M., Guidetti P., Wu H.Q., Lee J., Truong J., Andrews-Zwilling Y., Hsieh E.W., Louie J.Y., Wu T., Searce-Levie K., Patrick C., Adame A., Giorgini F., Moussaoui S., Laue G., Rassoulpour A., Flik G., Huang Y., Muchowski J.M., Masliah E., Schwarcz R. & Muchowski P.J. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell.* **2011**, *145*, 863-874.

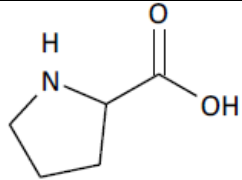
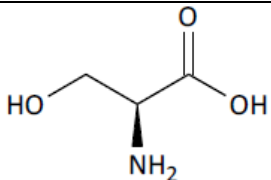
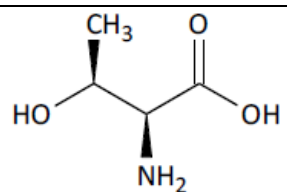
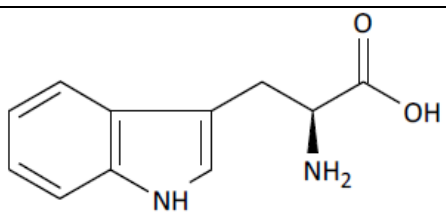
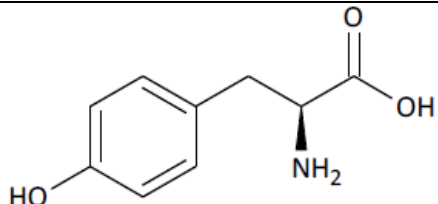
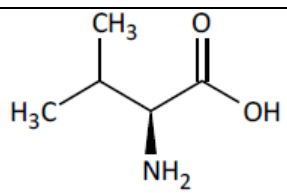
ANNEXES

Annexes

Annexe 1 : Liste des acides aminés.

Nom	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres	Structure
Alanine	A	Ala	
Arginine	R	Arg	
Asparagine	N	Asn	
Aspartate	D	Asp	
Cystéine	C	Cys	
Glutamate	E	Glu	

Glutamine	Q	Gln	
Glycine	G	Gly	
Histidine	H	His	
Isoleucine	I	Ile	
Leucine	L	Leu	
Lysine	K	Lys	
Méthionine	M	Met	
Phénylalanine	F	Phe	

Proline	P	Pro	
Sérine	S	Ser	
Thréonine	T	Thr	
Tryptophane	W	Trp	
Tyrosine	Y	Tyr	
Valine	V	Val	

Annexe 2 : Composition des tampons et solutions utilisées.

- **Tampon d'échantillon SDS-PAGE**

3.55 mL d'H₂O distillée

1.25 mL de tampon Tris-HCl 0.5 M pH = 6.8

2.5 mL de glycérol

2.0 mL de solution SDS 10 %

0.2 mL de bleu de bromophénol 0.5 %

- **Tampon d'électrophorèse (10X)**

30.35 g de Tris

44 g de glycine

10 g de SDS pour un volume de 1 L

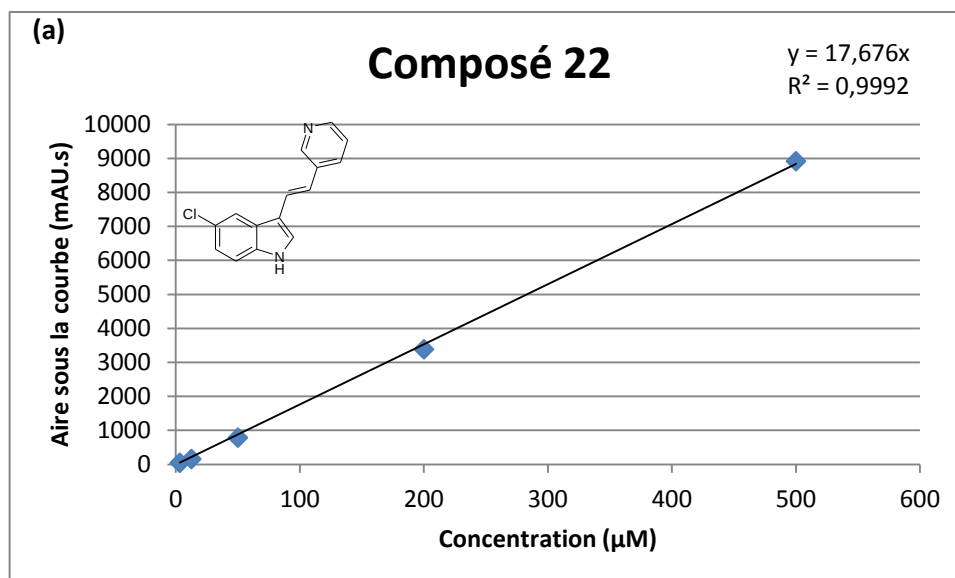
- **Solution de Bleu de Coomassie**

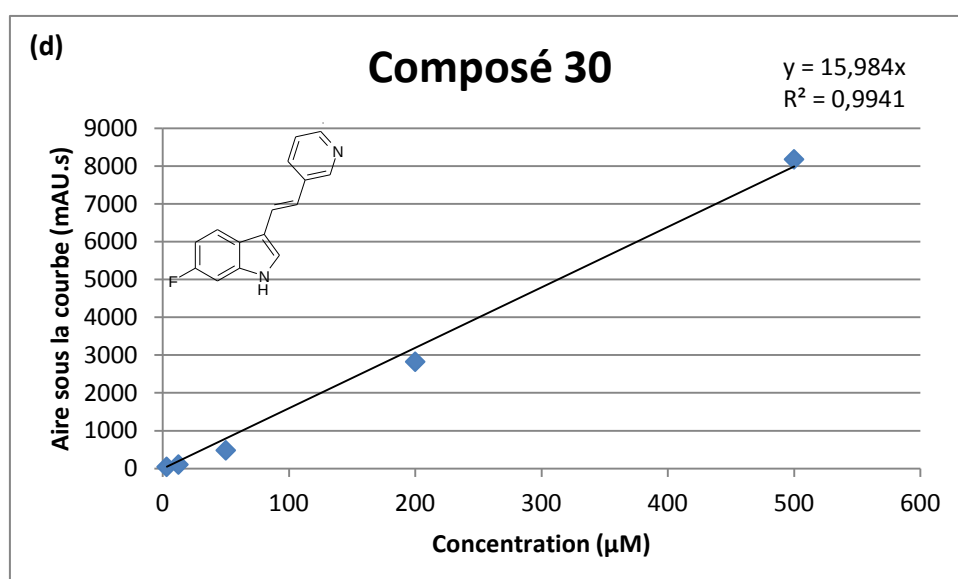
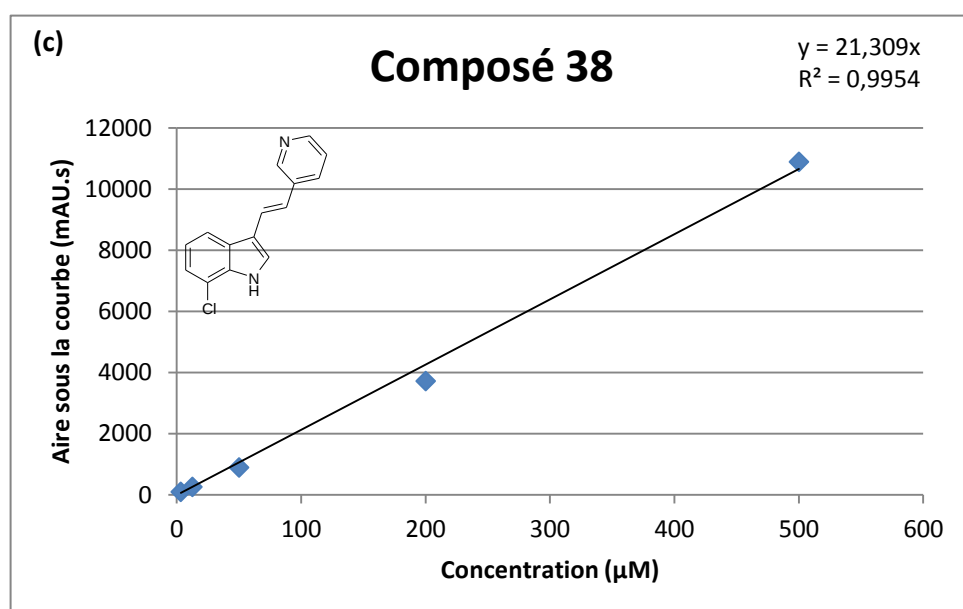
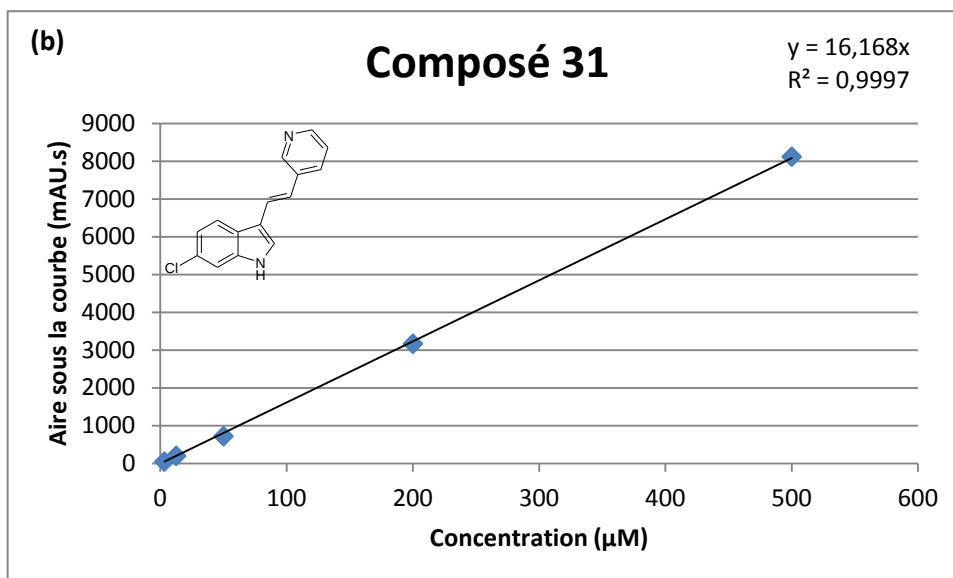
0.25 g de Bleu de Coomassie

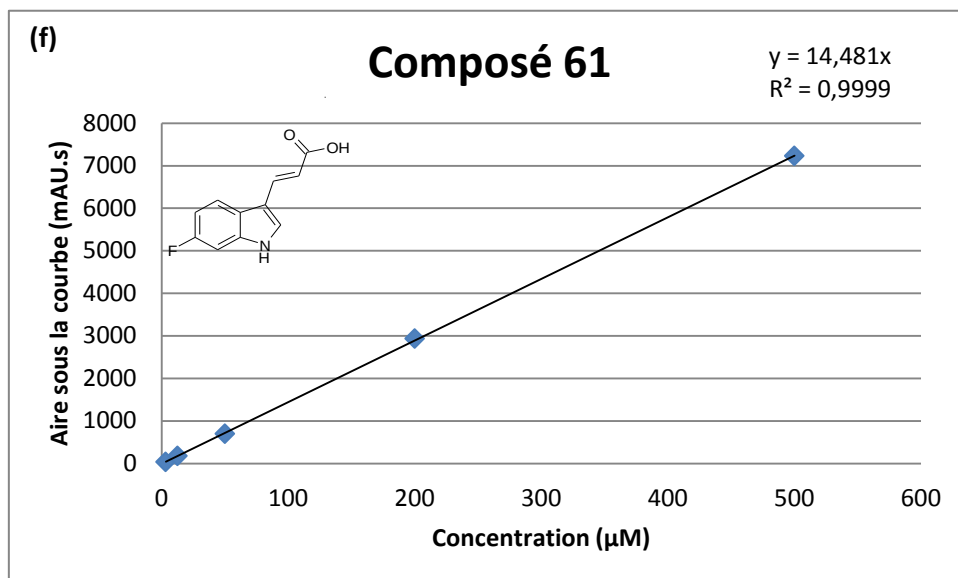
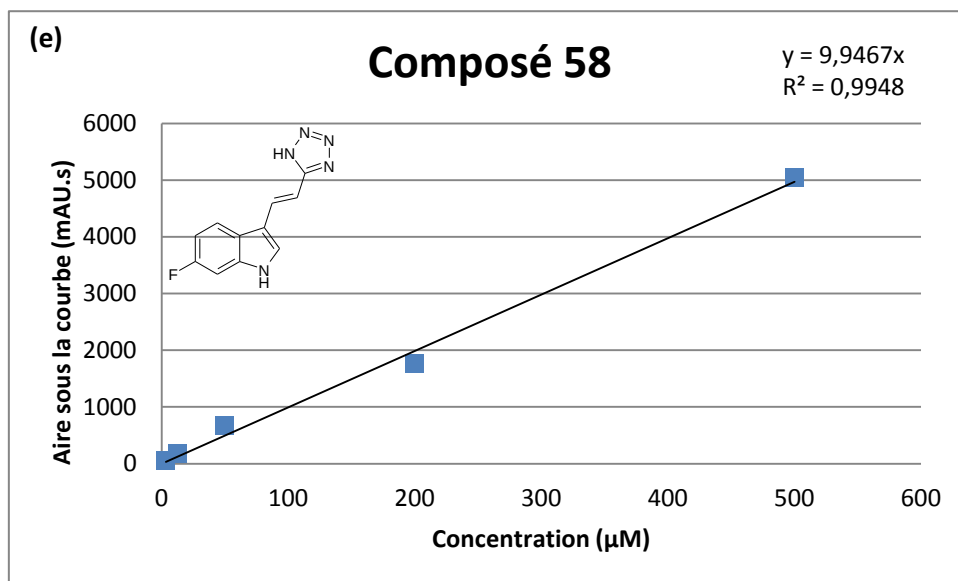
45 mL de méthanol

10 mL d'acide acétique pour 100 mL de solution

Annexe 3 : Droites de calibration nécessaires pour déterminer la solubilité des molécules (a) **22**, (b) **31**, (c) **38**, (d) **30**, (e) **58** et (f) **61**.





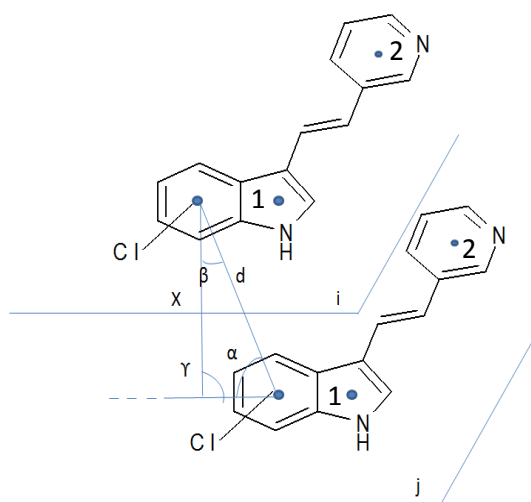


Annexe 4 :

Tableau 1 : Longueurs de liaisons des inhibiteurs 22, 31 et 38 mesurées dans la structure cristallographique.

(a) Distances (Å)	22	31	38(a)	38(b)	38(c)
N(1)-C(2)	1.355(2)	1.264(6)	1.360(3)	1.357(4)	1.355(3)
C(2)-C(3)	1.367(2)	1.402(8)	1.378(4)	1.367(4)	1.373(4)
C(3)-C(10)	1.444(3)	1.301(9)	1.452(4)	1.454(4)	1.450(4)
C(3)-C(9)	1.436(2)	1.539(6)	1.439(4)	1.441(4)	1.439(4)
C(4)-C(9)	1.406(2)	1.540(7)	1.401(4)	1.394(4)	1.392(4)
C(4)-C(5)	1.367(3)	1.373(7)	1.364(5)	1.374(4)	1.380(5)
C(5)-C(6)	1.390(3)	1.328(6)	1.397(5)	1.399(5)	1.382(5)
Cl(1)-C(5/6/7)	1.750(2)	1.756(4)	1.737(3)	1.739(3)	1.734(4)
C(6)-C(7)	1.380(3)	1.511(5)	1.371(4)	1.366(4)	1.369(4)
C(7)-C(8)	1.379(3)	1.382(5)	1.388(4)	1.390(4)	1.392(4)
C(8)-C(9)	1.406(2)	1.320(6)	1.414(4)	1.415(4)	1.421(4)
N(1)-C(8)	1.378(2)	1.539(5)	1.365(3)	1.369(3)	1.356(3)
C(10)-C(11)	1.330(2)	1.387(12)	1.329(4)	1.325(4)	1.318(4)

Tableau 2 : Paramètres géométriques décrivant le π -stacking des fragments aromatiques.



i() = plan de nombre i (le nombre de cycle se trouve entre parenthèse et est défini comme suit: (**22** : a, b, c, d) = cycle à 5 de l'indole; (**31** : a, b, c, d) = pyridine; (**38** : a, b, c, d) = cycle à 6 de l'indole)

d = distance entre deux centroïdes de deux cycles.

α = angle dièdre entre le plan i et j.

β = angle entre le vecteur i-j et la normale au plan i.

γ = angle entre le vecteur i-j et la normale au plan j.

X = distance entre i et la projection perpendiculaire de j sur le cycle i.

Molécule **22**

	d (Å)	x (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	Symétrie
i(1a)-j(1a)	4.76(1)	3.284	1.72	0.00	43.61	-x, -y, -z
i(1a)-j(1a)	5.49(1)	4.071	-5.41	0.00	47.80	-x, 1-y, -z
i(1a)-j(2a)	5.06(2)	/	-2.16	45.85	30.90	-x, 1-y, -z
i(1a)-j(2a)	5.76(3)	/	2.92	75.61	32.97	x, 1-y, -1/2+z
i(1a)-j(3a)	3.65(2)	/	1.74	1.11	18.73	-x, -y, -z
i(2a)-j(1a)	5.31(3)	/	-10.82	75.61	44.93	x, 1-y, -1/2+z
i(2a)-j(1a)	4.99(2)	/	5.67	34.13	44.61	-x, y, 1/2-z
i(2a)-j(2a)	5.65(3)	/	34.13	39.51	73.36	1/2-x, 1/2+y, 1/2+z

i(2a)-j(3a)	5.98(3)	/	76.32	58.08	86.29	1/2-x, 1/2+y, 1/2+z
i(3a)-j(1a)	3.65(2)	/	1.72	1.11	17.87	-x, -y, -z
i(3a)-j(2a)	5.60(3)	/	46.81	37.68	83.10	-x, 1-y, -z
i(3a)-j(2a)	5.05(3)	/	2.92	76.32	18.49	x, 1-y, -1/2+z
i(3a)-j(3a)	5.64(3)	/	80.51	52.18	52.18	-x, y, -1/2-z
i(3a)-j(3a)	3.65(1)	1.117	0.04	17.83	17.83	-x, -y, -z

Molécule **31**

	d (Å)	x (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	Symétrie
i(1a)-j(1a)	3.48(1)	1.31	-1.45	0.03	19.05	-x, 1-y, -z
i(1a)-j(1a)	5.48(1)	4.65	-7.64	0.03	58.04	-x, 2-y, -z
i(1a)-j(2a)	4.41(2)	/	-7.93	1.47	45.60	-x, 2-y, -z
i(1a)-j(3a)	3.82(3)	/	-1.29	2.78	32.06	-x, 1-y, -z
i(2a)-j(1a)	4.41(1)	/	-7.64	1.47	45.08	-x, 2-y, -z
i(2a)-j(1a)	5.93(1)	/	-1.59	1.47	59.30	1/2-x, 3/2-y, -z
i(2a)-j(2a)	4.16(2)	2.41	-8.10	0.00	35.32	1/2-x, 5/2-y, -z
i(2a)-j(3a)	5.82(3)	/	-7.22	4.25	56.30	-x, 2-y, -z
i(2a)-j(3a)	4.83(3)	/	-1.31	4.25	52.86	1/2-x, 3/2-y, -z
i(3a)-j(1a)	3.82(1)	/	-1.45	2.78	30.34	-x, 1-y, -z
i(3a)-j(2a)	5.82(2)	/	-7.93	4.25	59.02	-x, 2-y, -z
i(3a)-j(2a)	5.19(2)	/	-2.16	86.87	21.39	x, 2-y, -z
i(3a)-j(2a)	4.83(2)	/	-1.79	4.25	52.95	1/2-x, 3/2-y, -z
i(3a)-j(3a)	5.59(3)	/	-1.58	89.24	52.55	-x, y, 1/2-z
i(3a)-j(3a)	5.31(3)	4.12	-1.29	0.02	50.95	-x, 1-y, -z

Molécule **38** (a, b, c)

	d (Å)	x (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	Symétrie
i(2b)-j(3c)	4.15(2)	/	-1.64	15.48	29.62	1-x, 1-y, 1-z
i(2b)-j(2d)	4.64(3)	/	1.86	47.46	17.12	x, 1+y, z
i(2b)-j(3d)	5.95(3)	/	-1.39	30.81	58.07	1+x, 1+y, z
i(2b)-j(1d)	5.62(3)	/	1.38	48.28	35.15	1-x, 1-y, -z
i(3b)-j(2b)	5.75(2)	/	-2.36	19.49	55.40	2+x, 2-y, 1-z
i(2b)-j(2c)	4.20(2)	/	-0.24	23.27	48.98	1-x, 1-y, 1-z
i(3b)-j(1c)	3.87(3)	/	-0.56	25.84	19.08	1-x, 1-y, 1-z
i(3b)-j(3d)	3.81(2)	/	-1.39	11.40	23.36	1+x, 1+y, z
i(1b)-j(3c)	3.62(2)	/	-1.64	15.63	5.01	1-x, 1-y, 1-z
i(1b)-j(2d)	5.66(3)	/	1.86	47.43	38.38	x, 1+y, z
i(1b)-j(1d)	4.74(3)	/	1.38	48.24	14.64	1-x, 1-y, -z
i(2c)-j(3b)	4.20(3)	/	-8.08	23.27	26.35	1-x, 1-y, 1-z
i(2c)-j(2c)	3.50(3)	0.66	-1.20	0.00	10.92	-x, 1-y, 1-z
i(2c)-j(1c)	4.38(3)	/	-1.67	2.62	39.35	-x, 1-y, 1-z
i(3c)-j(2b)	4.15(3)	/	6.53	15.48	44.41	1-x, 1-y, 1-z
i(3c)-j(1b)	3.62(3)	/	6.54	15.63	13.21	1-x, 1-y, 1-z
i(3c)-j(2c)	5.95(3)	/	-0.24	20.85	51.29	1-x, 1-y, 1-z
i(3c)-j(3c)	4.46(2)	2.77	-1.64	0.00	38.36	1-x, 1-y, 1-z
i(3c)-j(1c)	5.69(3)	/	-0.56	23.44	58.56	1-x, 1-y, 1-z
i(1c)-j(3b)	3.87(3)	/	-8.08	25.84	11.48	1-x, 1-y, 1-z
i(1c)-j(2c)	4.38(3)	/	-1.20	8.62	36.88	-x, 1-y, 1-z
i(1c)-j(1c)	5.95(3)	4.78	-1.67	0.00	53.41	-x, 1-y, 1-z
i(1c)-j(1d)	4.70(2)	/	1.46	54.48	41.82	-1+x, -1+y, z
i(2d)-j(1c)	4.69(2)	/	-2.98	53.77	21.32	1+x, y, z
i(2d)-j(2d)	3.58(3)	1.09	1.54	0.00	17.76	1-x, -y, -z
i(2d)-j(3d)	5.47(2)	/	1.78	16.67	53.73	-x, -y, -z
i(2d)-j(1d)	4.56(3)	/	1.46	1.19	41.96	1-x, -y, -z
i(3d)-j(3b)	3.81(2)	/	5.46	11.40	16.16	-1+x, -1+y, z
i(3d)-j(2d)	5.47(2)	/	1.87	16.67	50.51	-x, -y, -z
i(3d)-j(3d)	4.66(2)	3.01	1.78	0.00	40.30	-x, -y, -z
i(3d)-j(1d)	5.30(3)	/	1.97	17.47	57.53	-x, -y, -z
i(1d)-j(2b)	5.62(3)	/	-5.30	48.28	17.82	1-x, 1-y, -z
i(1d)-j(1b)	4.74(3)	/	-5.24	48.24	37.56	1-x, 1-y, -z
i(1d)-j(2c)	5.69(2)	/	-0.24	51.96	37.82	1-x, 1-y, 1-z

