

Université de Montréal

**La dihydrofolate réductase R67, comme une cible
d'antibiotiques et biocatalyseur potentiel**

par

Natalia Timchenko

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Chimie

décembre, 2010

© Natalia Timchenko, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

La dihydrofolate réductase R67,
comme une cible d'antibiotiques et biocatalyseur potentiel

Présenté par :
Natalia Timchenko

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Andreea R. Schmitzer, président-rapporteur
Pr. Joelle N. Pelletier, directrice de recherche
Pr. William D. Lubell, membre du jury

Résumé

La dihydrofolate réductase de type II R67 (DHFR R67) est une enzyme bactérienne encodée par un plasmide donc aisément transmissible. Elle catalyse la réaction de réduction du dihydrofolate (DHF) en tétrahydrofolate (THFA) essentiel pour la prolifération cellulaire. La DHFR R67 est une enzyme qui dépend du cofacteur NADPH. La DHFR R67 est différente, structurellement et génétiquement, de l'enzyme DHFR chromosomale présente chez tous les organismes et elle est résistante au triméthoprim (TMP) qui est largement utilisé dans les traitements antibactériens chez l'Homme. Aucun inhibiteur sélectif contre la DHFR R67 n'est actuellement répertorié.

Le but de cette étude a été d'identifier des molécules qui pourront inhiber la DHFR R67 sélectivement, sans affecter la DHFR humaine (DHFRh). La vérification de la qualité des essais enzymatiques en conditions déterminées pour le criblage d'inhibiteurs sur plusieurs lectrices à plaques a identifié des appareils appropriés pour l'analyse. L'étude de l'activité enzymatique de la DHFR R67 et de la DHFRh en présence des solvants organiques et liquides ioniques (LIs), comme des co-solvants pour le criblage rationnel d'inhibiteurs, a montré que certains LIs peuvent servir de milieu alternatif pour les essais enzymatiques. Le criblage rationnel basé sur l'approche du design d'un inhibiteur à partir de petites molécules, a révélé des molécules primaires qui inhibent la DHFR R67 de façon faible, mais sélective. Le test des composés biologiquement actifs qui comprennent des petits fragments, a montré l'augmentation de l'affinité entre la DHFR R67 et les composés testés. Trois composés ont été déterminés comme des inhibiteurs sélectifs prometteurs pour la DHFR R67.

Mots-clés : Dihydrofolate réductase bactérienne R67, résistance bactérienne, triméthoprim, activité enzymatique, solvants organiques, liquides ioniques, biocatalyse, inhibiteur sélectif, criblage rationnel, design d'un médicament à partir des fragments.

Abstract

Type II R-plasmid encoded dihydrofolate reductase (DHFR), R67 DHFR is a bacterial enzyme that catalyzes the reduction of dihydrofolate (DHF) to tetrahydrofolate (THFA) which is essential for cell proliferation. R67 DHFR is an enzyme that depends on the cofactor NADPH as the hydride donor. R67 DHFR is distinct, structurally and genetically, from *E. coli* chromosomal DHFR (DHFR Ec) and it provides drug resistance to the widely-administered antibiotic trimethoprim (TMP). No selective inhibitor against R67 DHFR exists currently.

The goal of this study was to discover molecules that can selectively inhibit R67 DHFR, without affecting human DHFR (hDHFR). Verification of the quality of enzyme assays under defined conditions for inhibitor screening on plate readers found several appropriate instruments for analysis. The study of the enzymatic activity of R67 DHFR and hDHFR in the presence of organic solvents and ionic liquids (ILs), as co-solvents for rational screening of inhibitors, showed that ILs can provide alternative media for enzymatic assays. Rational screening based on the approach of fragment-based drug design, revealed primary molecules that inhibited DHFR R67 weakly, but selectively. The testing of more complex compounds with known biological activities gave ligands with increased affinity for R67 DHFR. Three compounds were identified as promising selective inhibitors for R67 DHFR.

Keywords : R67 dihydrofolate reductase, bacterial resistance, trimethoprim, enzyme activity, organic solvents, ionic liquids, biocatalysis, selective inhibitor, rational screening, fragment-based drug design.

Table des matières

1. INTRODUCTION	1
1.1. LES ANTIBIOTIQUES ET LA RÉSISTANCE BACTÉRIENNE.....	1
1.1.1. L'importance de la DHFR	3
1.1.2. Les DHFRs résistantes au TMP.....	6
1.2. LES APPROCHES DANS LA RECHERCHE D'INHIBITEURS DE LA DHFR R67.....	15
1.2.1. Recherche des composés primaires pour le design d'un inhibiteur.....	17
1.2.2. Promiscuité catalytique de la DHFR R67.....	20
1.3. RÔLE DE CO-SOLVANTS DANS LE CRIBLAGE D'INHIBITEURS	23
1.3.1. Les solvants organiques.....	24
1.3.2. Les liquides ioniques comme nouveaux co-solvants.....	25
1.4. OBJECTIFS DE RECHERCHE	27
2. RÉSULTATS	29
2.1. ÉTABLISSEMENT DU PROTOCOLE DE CRIBLAGE À HAUT DÉBIT.....	29
2.1.1. Optimisation de la purification de la DHFR R67	32
2.1.2. Vérification de la qualité des essais pour le criblage.....	38
2.1.3. Conclusion	45
2.2. IDENTIFICATION DE SYSTÈMES DE CO-SOLVANTS POUR LE CRIBLAGE	46
2.2.1. Les solvants organiques.....	47
2.2.2. Les liquides ioniques	50
2.2.3. Conclusion	62

2.3. CRIBLAGE POUR LA DÉCOUVERTE D'INHIBITEURS DE LA DHFR R67	64
2.3.1. Les petites molécules.....	65
2.3.2. Les composés poly-hétérocycliques.....	71
2.3.3. Conclusion.....	75
3. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	77
4. PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	81
5. BIBLIOGRAPHIE	88
6. ANNEXES	98

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Comparaison des enzymes DHFRs : chromosomale et plasmidique.....	6
Tableau 2.1. Évaluation de la performance du test* sur différents appareils.....	43
Tableau 2.2. Inhibition de la DHFR R67 par les composés 1 – 9.	68
Tableau 2.3. IC_{50} et K_i pour les inhibiteurs sélectifs de la DHFR R67.	69
Tableau 2.4. Inhibition de la DHFR R67 et de la DHFRh par les composés 10 – 13.	73

Liste des figures

Figure 1.1. Structures du substrat et d'inhibiteurs de la DHFR.	4
Figure 1.2. Structures des DHFRs.	8
Figure 1.3. Liaison des ligands dans le site actif de la DHFR R67.	10
Figure 1.4. Schéma du mécanisme de la réaction catalysée par la DHFR R67.	11
Figure 1.5. Comparaison de la séquence de DHFRs plasmidiques de type II d' <i>E. coli</i>	14
Figure 1.6. Inhibiteurs de la DHFR R67.	16
Figure 1.7. Principe du design d'un inhibiteur basé sur l'utilisation de petites molécules ("Fragment Based Drug Design").	19
Figure 1.8. Comparaison du substrat primaire et des substrats alternatifs de la DHFR R67.	22
Figure 2.1. Chromatogramme de purification de la DHFR R67 avec un gradient linéaire en imidazole.	34
Figure 2.2. Chromatogramme de purification de la DHFR R67 avec gradient d'imidazole modifié.	35
Figure 2.3. SDS PAGE de la DHFR R67 après purification.	37
Figure 2.4. Représentation d'activité enzymatique de la DHFR.	39
Figure 2.5. Images du signal des tests de facteur Z'.	44
Figure 2.6. Influence des solvants organiques sur l'activité des DHFRs.	48
Figure 2.7. Structures des LIs étudiés.	51
Figure 2.8. Influence des LIs miscibles avec l'eau sur l'activité des DHFRs.	52
Figure 2.9. Influence d'un LI non-miscible avec l'eau sur l'activité des DHFRs.	54

Figure 2.10. SDS-PAGE de la DHFR R67 après l'incubation avec le LI [BMIm][PF ₆].	56
Figure 2.11. Stabilité des DHFRs en présence de co-solvants.	59
Figure 2.12. Stabilité de la DHFRh.	61
Figure 2.13. Représentation structurelle des composés inhibant la DHFR R67.	67
Figure 2.14. Comparaison de la qualité des données.	70
Figure 2.15. Détermination du type d'inhibition par le modèle de Dixon.	74
Figure 4.1. Changement du signal pendant la réaction catalysée par la DHFR.	84
Figure 4.2. Exemple du modèle de Dixon pour l'inhibition compétitive.	86

Liste des abréviations

ACN	acétonitrile
BMIm ⁺	cation 1-butyle-3-méthylimidazolium
DHF	dihydrofolate (acide dihydrofolique)
DHFR	dihydrofolate réductase
DHFRh	dihydrofolate réductase chromosomale humaine
DHFR Ec	dihydrofolate réductase chromosomale d' <i>E.coli</i>
DHFR R67	dihydrofolate réductase encodée par plasmide R67 d' <i>E.coli</i>
DO	densité optique
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
UE	unité enzymatique
FPLC	“fast-protein liquid chromatography”
GFC	“Gel Filtration Chromatography”
IC ₅₀	concentration inhibitrice à 50%
IMAC	“Immobilized Metal Affinity Chromatography”
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
K_i	la concentration d'inhibiteur nécessaire pour doubler le K_M
K_M	la concentration de substrat nécessaire pour réaliser une moitié de la vitesse maximale
LI	liquide ionique

Me	méthyle
MTX	méthotrexate
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Oct	octyl
PDB	Protein Data Bank
SDS PAGE	“sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”
THFA	tétrahydrofolate (acide tétrahydrofolique)
THF	tétrahydrofurane
TMP	triméthoprim
TPN	température et pression normales (ambiantes)

*À mes fils, pour l'inspiration,
à mes parents, pour leur support*

Remerciements

Pendant mes études à l'Université de Montréal, j'ai rencontré beaucoup de gens qui font maintenant une grande part de ma vie. Ils m'ont supportée dès le début et jusqu'à ces jours, ils m'ont encouragée à faire des choses que je n'avais jamais fait, ils m'ont formée et j'ai grandi grâce à eux et j'aimerais les remercier.

Tout d'abord, je voudrais dire merci à ma directrice de recherche, professeur Joelle Pelletier, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire premièrement pour un stage et après pour ma maîtrise. Elle n'est pas seulement une scientifique dynamique et enseignante talentueuse, mais aussi elle est une personne qui possède la capacité d'inspirer et de pousser les gens à dépasser leurs limites. J'ai beaucoup appris pendant ces temps là, j'ai grandi ici. Merci Joelle pour ta patience, pour ta générosité, pour m'avoir fait confiance et de croire en moi, et *me* faire croire en moi.

Un merci particulier à Damien Colin, qui m'a aidé énormément avec le français pendant la rédaction et pour son aide avec les trucs de logiciels de mon ordinateur aussi. J'ai vraiment apprécié les discussions sur les particularités de la langue française (et le russe aussi, bien sûr!) et les explications pour que je puisse maîtriser mon français par moi-même. Merci pour sa générosité et son temps.

Merci à Christopher Clouthier et Petra Gadler, pour leurs conseils utiles, leur support et leur vue de l'extérieur sur les problèmes dans mes études et, particulièrement, pour une occasion précieuse pour moi d'améliorer mon anglais. Merci également à Dominic Bastien, mon ancien stagiaire et le membre actuel du projet DHFR R67, pour sa volonté d'aider et sa contribution dans le développement du projet.

Merci aussi à tous les autres membres, actuels et anciens, du laboratoire : Sophie Gobeil, Maria Gundersen, Élisabeth Nguyen, Jordan Volpato, Maximilian Ebert, Claudio Gnaccarini, Elena Fossati, Jonathan Blanchet et Vanessa Guerrero. Merci pour l'aide au laboratoire, pour les discussions intéressantes et pour votre compagnie et les activités que nous avons eues tous ensemble. Un grand merci également aux membres des laboratoires de Andreea R. Schmitzer et de William D. Lubell, nos collaborateurs, et de Jeff Keillor, nos voisins.

Merci à mes parents et ma sœur Olga, qui sont loin mais qui étaient toujours dans mon cœur. Leur support et leur amour j'ai senti toujours à travers les kilomètres qui nous séparent. Merci à Vadim, mon mari, grâce à qui mes études sont devenues réalité. Merci à mes deux fils, Christian et Patrick, les hommes les plus "grands" dans ma vie, qui me donnent la force de m'avancer quel que soit.

Merci aux organismes subventionnaires pour le financement : les bourses de la faculté d'études supérieures, ainsi que le groupe PROTEO.

1. Introduction

1.1. Les antibiotiques et la résistance bactérienne

Les millions d'années d'évolution ont créé des milliers de micro-organismes contenant des enzymes capables de catalyser une grande variété de réactions. Une enzyme est un catalyseur biologique. Ils peuvent permettre d'accélérer jusqu'à 10^{19} fois [1] les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire. Ce sont les plus efficaces et spécifiques catalyseurs.

Depuis la découverte des antibiotiques, des substances qui inhibent la croissance bactérienne, les enzymes essentielles pour les fonctions vitales des micro-organismes pathogènes ont été des cibles dans les traitements antimicrobiens [2]. La grande majorité des antibiotiques inhibe soit la synthèse des protéines bactériennes soit la synthèse de la paroi bactérienne. Par exemple, la tétracycline bloque la liaison de l'aminocycle ARNt au ribosome de la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*), ainsi inhibant la synthèse des protéines [3, 4]; la portion β -lactame des pénicillines se lie à l'enzyme transpeptidase de la bactérie, empêchant la synthèse de peptidoglycane, l'élément clé de la paroi cellulaire de la bactérie [5, 6]. La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses. La résistance aux antibiotiques la plus répandue est lorsque les bactéries développent des mécanismes faisant que l'antibiotique ne peut pas atteindre sa cible. Cela arrive, par exemple, avec une souche d'*E. coli* qui est capable d'hydrolyser le noyau β -lactame de

l'antibiotique, inactivant ce dernier [6]. Cette résistance est un facteur majeur compliquant le traitement des infections bactériennes et la dissémination des souches multi-résistantes.

La résistance bactérienne aux antibiotiques se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétique. Il y a deux types de résistance : la résistance naturelle, qui fait partie du patrimoine génétique normal du germe, et la résistance acquise, qui est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, qui est un phénomène rare, soit par transfert d'ADN de plasmides conjugatifs ou de transposons (mécanisme le plus fréquent) [7-9].

La résistance acquise provient de deux sources : des plasmides, l'information génétique est portée par des plasmides, transférables à d'autres bactéries, ou des transposons, les fragments d'ADN "sauteurs" qui peuvent s'intégrer soit dans le chromosome soit dans des plasmides, en allant de l'un à l'autre. Plusieurs types de mécanismes de la résistance bactérienne aux antibiotiques sont connus, tels que la modification de la cible des antibiotiques, la synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques et la diminution de la perméabilité bactérienne aux antibiotiques [8, 9]. Une espèce bactérienne peut être résistante à plusieurs antibiotiques selon des mécanismes différents. Par exemple, le *Staphylococcus aureus Méti R* est résistant par modification de la cible et peut être résistant aux aminosides par production d'enzymes [10].

La mutation est un événement spontané qui se produit indépendamment de la présence d'un antibiotique. Une bactérie portant une telle mutation a un énorme avantage, car les cellules sensibles sont rapidement tuées par l'antibiotique, ce qui laisse une sous-population résistante. La résistance transférable est connue depuis 1959, lorsque des gènes de résistance dans *Shigella* se sont transférés à *E. coli* par

des plasmides. Les plasmides sont des pièces autorépliquatives d'ADN circulaire, plus petits que le génome bactérien, qui codent pour leur transfert par la répllication dans une autre souche bactérienne ou espèces. Ils peuvent transporter et transférer des gènes de résistance multiple, qui peuvent être situés sur une section d'ADN qui est capable de se transférer d'un plasmide à un autre, ou à l'autre génome. Ce dernier représente le transposon [8].

Les mutations favorables qui surviennent dans les bactéries peuvent être insérées dans des séquences des plasmides, puis être transférées à différentes espèces bactériennes.

1.1.1. L'importance de la DHFR

La dihydrofolate réductase (DHFR ; EC 1.5.1.3), présente chez tous les organismes, catalyse la réduction du dihydrofolate (DHF) en tétrahydrofolate (THFA) à l'aide du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et est une enzyme essentielle dans la biochimie et la chimie médicinale. Puisque les dérivés du THFA sont utilisés pour la synthèse des purines et de l'acide thymidique, précurseurs de l'ADN, la DHFR est essentielle dans le métabolisme des folates et dans la prolifération cellulaire. Une inhibition efficace de l'enzyme entraîne alors un blocage dans la synthèse d'ADN et entraîne la mort de la cellule, ce qui permet de contrôler la propagation des maladies, incluant les infections microbiennes. Les DHFRs de vertébrés ont un haut degré d'homologie (72-89% d'identité de séquence pour les DHFRs du poulet, de la souris, bovine et humaine); 25% d'homologie de séquence a été observée entre les DHFRs des animaux et des

bactéries [11, 12]. Pourtant, les structures tertiaires de la DHFR bactérienne d'*E. coli* (DHFR Ec) et de la DHFR humaine (DHFRh) sont très semblables malgré un degré d'identité de séquence inférieur à 30% [11, 13]. Les résidus de la cavité du site actif sont généralement conservés, mais la différence est assez significative pour que certaines DHFR aient des inhibiteurs sélectifs [11, 14]. Par exemple, le méthotrexate (MTX) qui est un analogue du folate (Figure 1.1), utilisé pour des traitements par chimiothérapie de cancers [15], est un inhibiteur puissant avec une grande affinité; il se lie de manière presque irréversible à la DHFRh et à la DHFR Ec, avec K_i de l'ordre de pM [16]. La structure d'un autre inhibiteur utilisé pour traiter un grand nombre d'infections bactériennes [17] chez les humains, le triméthoprime (TMP), diffère de celle du folate (Figure 1.1). Son affinité pour la DHFRh est environ 10^4 fois moins forte que son affinité pour la DHFR Ec ; les valeurs de K_i sont de 0,96 μ M et 80 pM respectivement, ce qui permet d'utiliser le TMP comme agent antibactérien sélectif chez les humains.

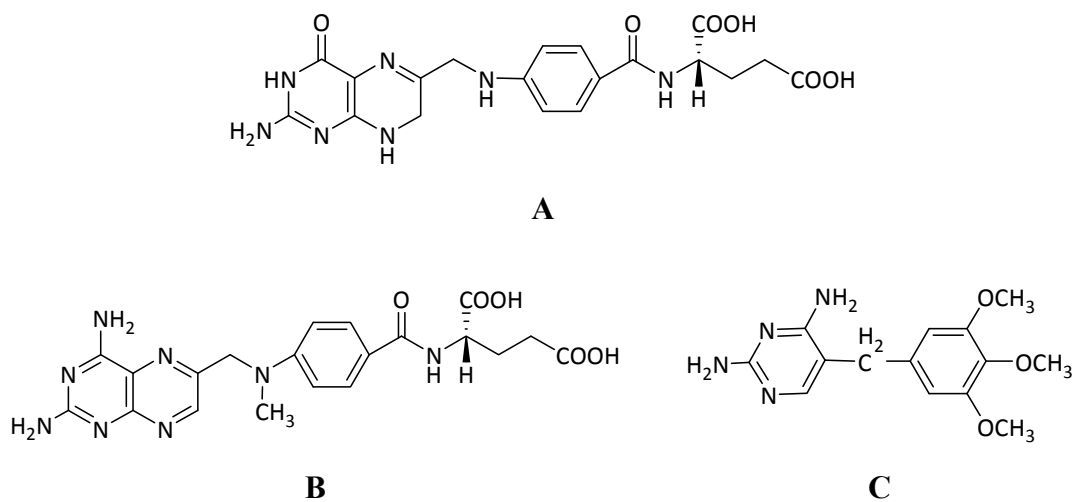


Figure 1.1. Structures du substrat et d'inhibiteurs de la DHFR.

(A) Dihydrofolate, DHF; (B) méthotrexate, MTX; (C) triméthoprime, TMP.

Depuis les années 1970, une grande variété de DHFRs bactériennes résistantes au TMP, dirigées par différents mécanismes de résistance autant naturelle qu'acquise, a été rapportée. Une classification non exhaustive est présentée dans une revue de Then [18]. Par exemple, une mutation du gène codant pour la DHFR, dans *E. coli* et *Klebsiella aerogenes* cliniquement isolées, a mené à la production d'une enzyme avec une sensibilité réduite au TMP [19]. De plus, dans certaines souches l'augmentation de l'activité de la DHFR a été observée; cette augmentation était assez haute pour rendre la cellule moins sensible au TMP.

Parmi ces mécanismes de résistance il y a en un particulier, qui n'a pas été retrouvé dans les études de résistance aux autres médicaments : la DHFR encodée par un plasmide [20, 21]. La classification des enzymes encodées par un plasmide, contenant un gène codant pour une DHFR autre que la chromosomale, retrouvée dans le génome d'*E. coli* (DHFR Ec), a été donnée par White et Rawlinson en 2001 [22]. Les DHFRs de deuxième groupe, connues comme DHFR de type II, encodées par un plasmide R (pour résistance), sont 1 000 fois moins sensibles au TMP que les autres types de DHFRs, résistants aux antibiotiques [23, 24] et 10^6 fois moins sensible à cet inhibiteur que la DHFR Ec (Tableau 1.1).

En comparant l'activité catalytique des DHFRs bactériennes chromosomale et plasmidiques, on peut remarquer que ces dernières sont plus faibles, par exemple, les valeurs de k_{cat} de la DHFR plasmidique encodée par le plasmide R67 (DHFR R67) et la DHFR Ec sont de $0,83 \text{ s}^{-1}$ et 29 s^{-1} respectivement [25, 26]. Les enzymes de type II résistantes au TMP sont moins efficaces au niveau catalytique, mais elles ont un grand avantage par rapport aux autres : grâce à elles les bactéries survivent. Le plasmide pouvant être transféré par répllication dans une autre souche bactérienne, la résistance au TMP devient un des problèmes à résoudre au niveau clinique.

Tableau 1.1. Comparaison des enzymes DHFRs : chromosomale et plasmidique.

Enzyme	Forme d'enzyme	K_i^{MTX} (pM)	K_i^{TMP} (nM)	K_M^{DHF} (μ M)	K_M^{NADPH} (μ M)	k_{cat} (s^{-1})
DHFRh	monomère, 22 kDa	3,4 ^a	960 ^a	$\leq 0,075$ ^b	0,26 ^c	10 ^b
DHFR Ec	monomère, 18 kDa	1,0 ^a	0,08 ^a	1,1 ^d	0,94 ^d	29 ^d
DHFR R67	tétramère, 34 kDa	$>500 \times 10^6$ ^e	$1,5 \times 10^6$ ^f	8,2 ^g	1,6 ^g	0,83 ^g

^a Appleman *et al.* 1988 [16]; ^b Volpato *et al.* 2007 [27]; ^c Huang *et al.* 1990 [28]; ^d Howell *et al.* 1990 [25]; ^e Jackson *et al.* 2005 [29]; ^f Amyes & Smith, 1976 [20], la valeur de K_i correspond à la DHFR de type II encodée par le plasmide R388 (DHFR R388) qui a une haute homologie de séquence avec la DHFR R67 [30-33]; ^g Schmitzer *et al.* 2004 [26].

1.1.2. Les DHFRs résistantes au TMP

Dans la littérature, les enzymes DHFRs résistantes au TMP sont divisées en deux classes : *dfrA* et *dfrB* [22, 34]. La classe *dfrA* comprend 17 enzymes de plusieurs types de DHFRs composées de 157 à 187 résidus; puisque les acides aminés impliqués dans les interactions avec le substrat et le cofacteur sont conservés, il est suggéré que les enzymes de cette classe sont des homologues des DHFR chromosomales. La classe *dfrB* rassemble trois enzymes de type II et elles montrent la plus haute résistance aux inhibiteurs [23, 35], y compris au MTX [20, 29, 36, 37]. Les séquences de ces dernières enzymes sont plus courtes (78 acides

aminés), et elles n'ont pas de lien d'homologie avec la DHFR chromosomale ni génétiquement, ni structurellement [32, 38] (Figure 1.2). L'origine des DHFR de type II n'est pas encore connue. Cette protéine pourrait servir comme un modèle pour les organismes primitifs [39] : à cause de sa structure particulière et de ses paramètres cinétiques (Tableau 1.1), en plus de l'observation qu'elle catalyse la réduction de plus d'un substrat de type folate [36, 40], elle pourrait potentiellement catalyser une variété des réactions, tel que les enzymes primitives auraient pu le faire [39, 41, 42]. En comparant les structures cristallines de deux DHFRs, une chromosomale et une plasmidique, montrées sur la Figure 1.2, aucune ressemblance n'a été observée. La DHFR Ec chromosomale est un monomère de 159 acides, ayant une masse totale d'environ 18 000 Da; sa structure est composée de cinq brins β antiparallèles, compactés en tonneau β qui forment deux domaines rigides séparés par une région charnière [43, 44]. À cause de la structure particulière de la DHFR R67, différente de celle de la DHFR Ec, le site de liaison pour le substrat et le cofacteur sont distincts de ceux de la DHFR Ec chromosomale. [45].

Contrairement à la DHFR Ec, la DHFR de type II est active sous forme d'un homotétramère auto-assemblé en forme de beigne D_2 (groupe ponctuel de symétrie 222). Chaque monomère de cette enzyme est constitué d'une chaîne peptidique de 78 acides aminés ce qui donne un tétramère d'environ 34 000 Da. Chaque monomère est composé de cinq brins β antiparallèles, dont trois sont associés avec les brins similaires de l'autre monomère en formant le tonneau β à l'interface du dimère. L'association de dimères en tétramère s'effectue grâce aux interactions entre les histidines (H62) de chaque monomère. Cet équilibre, tétramère \leftrightarrow 2 dimères, dépend de l'état de la protonation du résidu H62 : positivement chargé au pH faible, il favorise la dissociation du tétramère en dimère. L'ionisation de ces histidines dans leur environnement a été confirmée par des études de RMN et par fluorescence : les valeurs des pK_a des histidines étant de 6,77 et de 6,84,

respectivement [46]. Dans les cellules à pH neutre, ~ 7 , la DHFR de type II est donc présente principalement sous forme de tétramère.

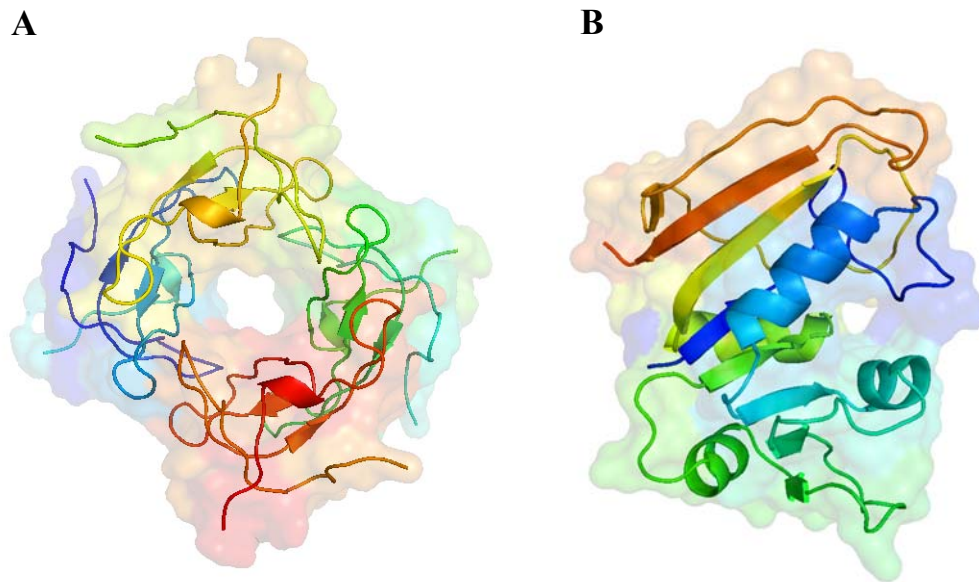


Figure 1.2. Structures des DHFRs.

(A) DHFR d'*E. coli* encodée par le plasmide R67 (2RK1.PDB) [43] : la structure de la forme active de la protéine est composée de quatre monomères colorés en rouge, jaune, vert et bleu; chaque monomère est composé de cinq brins β antiparallèles, compactés en tonneau β . (B) DHFR d'*E. coli* chromosomale (1RF7.PDB) [47], possédant un noyau de huit brins β avec quatre hélices α .

Le pore du site actif dans le tétramère est situé au centre de l'enzyme; il est unique et symétrique, où la contribution de chaque monomère est égale [39, 48]. À cause de la symétrie du site actif, il n'y a pas de liaisons spécifiques pour le substrat ou pour le cofacteur : deux substrats ou deux cofacteurs peuvent être liés à

l'enzyme en même temps [49], formant des complexes ternaires non productifs. À cause de son site actif inhabituel, cette enzyme est considérée comme un modèle d'enzyme primitive qui n'est pas optimisée par l'évolution [42]. Selon les données obtenues par les structures cristallines de la DHFR R67 [39, 43], les deux ligands sont liés dans des conformations étendues aux faces opposées et ils se rencontrent au milieu du pore du site actif formant un motif "sandwich" (Figure 1.3). Le résidu Q67 participe en paire avec son analogue symétrique dans les interactions avec le NADPH; le résidu I68 forme des ponts hydrogènes avec l'anneau ptérine du DHF [48]. Les résidus Y69 et K32 peuvent interagir avec les deux ligands.

Dans le site actif, les positions du DHF et du NADPH sont favorables pour la transmission d'hydrogène de l'atome C₄ du NADPH à l'atome C₆ du DHF (Figure 1.4). Ce transfert est facilité par la protonation de l'atome N₅ du substrat. Dans le cas de la DHFR Ec, le proton provient du groupement acide du résidu D27 [50], strictement conservé. La mutation de ce résidu, D27S, diminue la vitesse de transfert d'hydrure plus de 100 fois et son activité catalytique devient dépendante du pH [50]. Ce résidu correspond au résidu E30 dans les DHFRs de mammifères [42, 51-53]. Pourtant, la DHFR R67 ne possède pas de groupement donneur de proton dans la cavité du site actif [26]. Les études du groupe de E.E. Howell ont montré l'augmentation de l'activité enzymatique de la DHFR R67 avec diminution de la valeur pH de 9,5 à 6,5 (voir ci-dessous) [36, 40]. Par contre, il n'est pas possible d'étudier l'effet d'un pH plus acide sur l'activité de la DHFR R67 car le tétramère se dissociera, suite à la protonation de l'histidine 62 ($pK_a = 6,84$). À cause de cela, un tétramère covalent de la DHFR R67, stable aux pH de 4 à 9, a été créé par mutation H62C [36, 40]. L'activité enzymatique de ce mutant augmente lorsque pH diminue. Ce comportement ressemble à celui du mutant de la DHFR Ec D27S et il est cohérent avec l'hypothèse de substrat productif DHF si l'atome N₅ est protonné. Cette protonation provient du solvant et non pas d'un groupement acide du site actif de la DHFR R67, ce qui rend l'enzyme dépendante du pH du milieu

[36, 40, 54, 55]. Dès que le DHF dans le site actif est protonné, le transfert d'hydrure s'effectue.

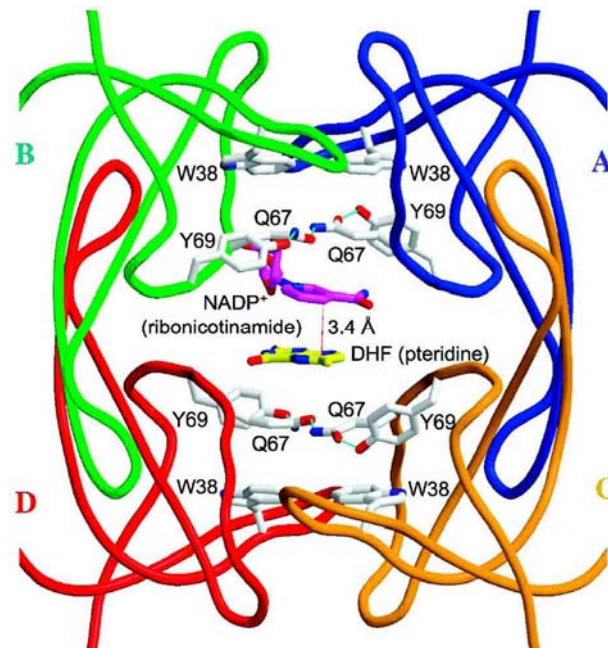


Figure 1.3. Liaison des ligands dans le site actif de la DHFR R67.

Un tétramère avec une seule (asymétrique) paire de ligands. Les monomères ont un code de couleur et sont étiquetés A-D. Le pore site actif fait face à l'observateur. Les quatre résidus W38, qui contribuent à l'empilement, se situent sur les couches extérieures du "sandwich". Vers l'intérieur, les couches suivantes sont liées symétriquement : les résidus Y69-Q67 avec Q67'-Y69' "pincent" les anneaux de nicotinamide (NADPH) et de pteridine (DHF) au centre. Les ligands : le DHF (jaune) et le NADP⁺ (magenta, l'anneau nicotinamide est montré seulement pour la simplicité). Une ligne rouge montre la proximité de la C₄ (nicotinamide) et C₆ (ptérine), qui sont impliqués dans le transfert d'hydrure. La figure est adaptée de la référence Krahn *et al.* [43].

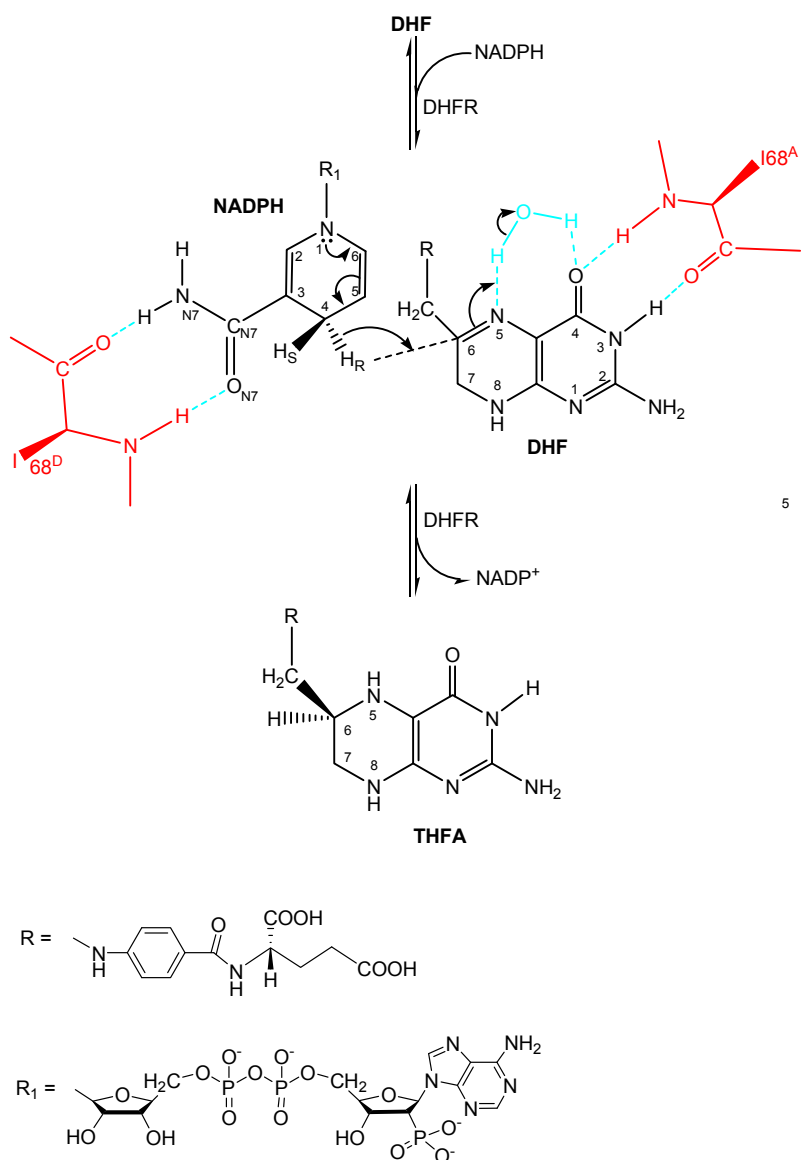


Figure 1.4. Schéma du mécanisme de la réaction catalysée par la DHFR R67.

La réaction de la réduction du 7,8-dihydrofolate (DHF) en 5,6,7,8-tétrahydrofolate (THFA) catalysée par la DHFR utilisant le cofacteur NADPH comme donneur d'hydrure; les interactions établies entre l'enzyme et le substrat et le cofacteur sont illustrées. Les structures en rouge et en bleu représentent les résidus de l'enzyme et les ponts hydrogènes. Le schéma est adapté de référence Kamath *et al.* [55].

En se basant sur les études de E.E. Howell, le mécanisme de la réduction du DHF catalysée par la DHFR R67 peut être proposé (résumé en Figure 1.3). Selon des valeurs relatives de K_d , obtenues pendant les études de comportement des mutants du site actif [49, 56], la liaison initiale dans la DHFR R67 s'effectue avec le cofacteur. Les groupements amide et carbonyle du résidu I68 du monomère A forment des liaisons hydrogènes avec les atomes O_{7N} et N_{7N} de carboxamide du NADPH, respectivement. Le résidu Q67 forme des interactions hydrophobes avec l'atome C_4 , donneur d'hydrure [55]. Les interactions additionnelles des résidus V66 et G64 avec le groupement ribose du nicotinamide contribuent à la formation de la conformation optimale pour le transfert d'hydrure [57]. Deux groupements de l'adénosine phosphate du cofacteur interagissent avec les résidus K32 de monomères A et D, exposés à l'extérieur de même côté du pore du site actif. Dès que le complexe enzyme·NADP⁺ est formé, l'approche du DHF est favorisée [29]. Les anneaux de deux ligands, ptéridine et nicotinamide, sont placés en conformation *endo* l'un par rapport à l'autre. Les interactions entre le substrat et le résidu I68 de l'enzyme du monomère D s'effectuent de la semblable au cofacteur : les atomes O_4 et N_3 du substrat interagissent avec les groupements amide et carbonyle du résidu I68. La queue *p*-aminobenzoyl glutamate (*p*-ABG) du DHF forme des ponts hydrogènes entre ses groupements carbonyles et les résidus K32 des monomères B et C, de l'autre côté du site actif [55]. Les études calorimétriques (calorimétrie isotherme à titration) de la liaison des ligands dans la DHFR R67 [29] indiquent une forte préférence pour l'anneau ptéridine non-protoné avant que la liaison entre le DHF et le complexe enzyme·NADP⁺ soit formée. En plus, le fait que la quantité de DHF protoné à pH 7 n'est pas très élevée, dû au pK_a de l'atome N_5 qui est 2,60 (à 25 °C) [58, 59], supporte l'hypothèse de la protonation du N_5 après la formation du complexe enzyme·NADP⁺·DHF. La source du proton pour N_5 n'est pas encore connue. Selon une des hypothèses proposées par le groupe de recherche E.E. Howell, la queue *p*-ABG peut servir de donneur de proton si les résidus glutamates sont protonés [55, 58]. En accord avec cette proposition, la

dépendance de la catalyse de la DHFR R67 de pH bas concorde avec l'augmentation de la fraction des groupements carboxyles protonés. À la suite de ces interactions, le transfert d'hydrure est effectué.

Depuis que la résistance de la DHFR bactérienne au TMP a été découverte, la DHFR de type II encodée par le plasmide R67, la DHFR R67, est la plus étudiée par rapport aux autres enzymes résistantes de même type. Les trois enzymes de type II connues sont des homologues avec 78-85% d'identité et ~ 90% de similarité; les résidus importants dans liaison des ligands, soient K32 et la région V66-Q67-I68-Y69 [39, 48, 55] sont conservés dans le site actif (Figure 1.5). Ce dernier suggère un comportement similaire de ces trois enzymes, y compris l'influence des antibiotiques. Donc, la DHFR R67 peut servir de modèle pour l'étude des DHFRs de type II.

		10	20	30	40	50
DHFR R388		M Q SS DEANA PVAGQFAL PL SATFGLGDRVR KK SGAAWQ Q VVGWYCTKL				
		.: : .:. :. : : : : :				
DHFR R67		M ER SSNEVS N PVAG NFVF PS N ATFG M GDRVR KK SGAAWQ Q I V GWYCT NL				
		:..::. : : : : :				
DHFR R751		M DQ HNN G V STL VAGQFAL PS H ATFGLGDRVR KK SGAAWQ Q VVGWYCTKL				
		60	70	78		
DHFR R388		TPEGYAVESESHPGSV Q IYPVAALERVA				
		: : : :				
DHFR R67		TPEGYAVESE A H PGSVQ IYPVAALER IN				
		: : : :				
DHFR R751		TPEGYAVESESHPGSV Q IYPVAALERVA				
		: : : :				

Figure 1.5. Comparaison de la séquence de DHFRs plasmidiques de type II d'*E. coli*.

Les séquences des DHFR IIa, DHFR IIb et DHFR IIc encodées par les plasmides R67, R388 et R751 respectivement; les lettres colorés en noir représentent la conservation de séquence (identique), en cyan pour les substitutions conservatives, et en rouge pour les substitutions non-conservatives. En gras, les résidus jouant un rôle important dans la catalyse.

1.2. Les approches dans la recherche d'inhibiteurs de la DHFR R67

Le TMP a été introduit en 1962 [60] et, en 1968, il a été mis en utilisation clinique en combinaison avec le sulfonamide [61], qui cible une autre enzyme bactérienne, la dihydroptéroate synthétase, impliquée dans la synthèse de l'acide folique [62]. L'association du sulfonamide et du TMP permet d'obtenir une synergie marquée grâce à une inhibition séquentielle de la synthèse des folates.

Depuis les années 1970, le TMP est largement utilisé en tant qu'agent antibactérien efficace pour combattre des infections urinaires, prostatites, respiratoires, la gonorrhée et le typhus aussi que la tuberculose [63-66]. La résistance chez *E. coli* aux antibiotiques est de plus en plus rapportée [67-71]. La résistance dont la DHFR R67 est responsable, devient de plus en plus dangereuse en milieu hospitalier car des bactéries pathogènes peuvent se transmettre le plasmide de résistance; de plus, la forte pression de sélection dans les hôpitaux favorise le développement de bactéries résistantes au TMP [18, 19]. Depuis longtemps, le TMP est un des antibiotiques les plus utilisés [64, 72]. Selon des données statistiques de l'Organisation mondiale de santé (World Health Organization, WHO), le TMP est présent dans la liste modèle des médicaments essentiels (Model Lists of Essential Medicines, [73] http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/Updated_sixteenth_adult_list_en.pdf, Annexe 1). Pourtant, la recherche d'inhibiteurs pour la DHFR R67 est très peu développée. Dans les études d'E.E. Howell, plusieurs analogues du folate et quelques autres molécules ont été criblées [29, 42]. Quelques-uns ont été

rapportés comme de bons candidats pour l'inhibition de la DHFR R67, tels la novobiocine (également connu sous le nom albamycine ou cathomycine) et le rouge congo (Figure 1.6) avec des valeurs de K_i 70 μM et 2 μM respectivement [42]. Par contre, ces composés n'ont pas été testés pour la sélectivité envers la DHFR humaine (DHFRh). Ainsi, aucun inhibiteur sélectif contre la DHFR R67 n'est actuellement répertorié dans la littérature, alors que les DHFRs résistantes au TMP causent des problèmes dans les traitements antibactériens. Par conséquent, la recherche d'un inhibiteur sélectif contre la DHFR R67 présente un intérêt majeur. Cet inhibiteur peut servir de base pour le développement d'un antibiotique et pourra éventuellement être utilisé conjointement avec le TMP, redonnant au TMP une plus grande efficacité.

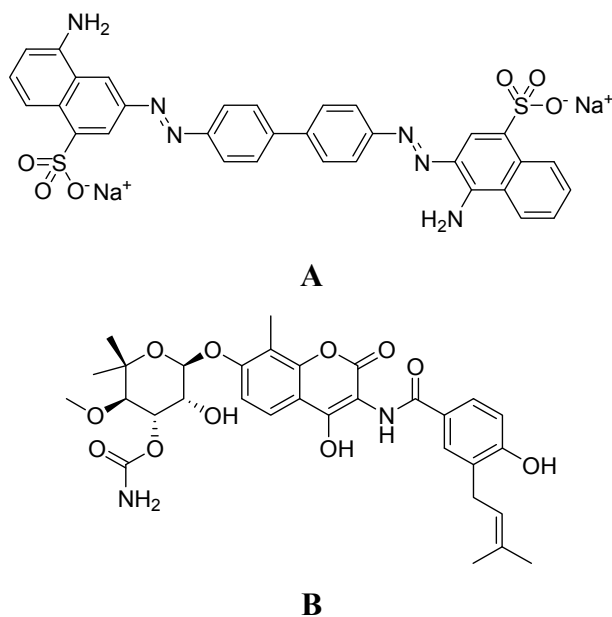


Figure 1.6. Inhibiteurs de la DHFR R67.

(A) Rouge congo et (B) novobiocine [42].

1.2.1. Recherche des composés primaires pour le design d'un inhibiteur

Le criblage à haut débit, “High-throughput Screening” (HTS), est largement utilisé dans la première étape de la découverte d'un médicament pour déterminer les composés primaires (“*lead compounds*”) [74, 75]. Ces composés doivent être optimisés pendant des études pharmacologiques. Le criblage à haut débit est un processus de dosage d'un grand nombre de composés sur des cibles biologiques. Jusqu'à 100 000 composés peuvent être analysés en un jour [75, 76]. Les robots peuvent généralement préparer et analyser simultanément de nombreuses plaques de 96 ou de 384 puits où les composés sont déposés [76].

Dans la littérature, beaucoup de recherches sur les propriétés des petites molécules nécessaires pour produire des bons composés fonctionnels (“*hits*”) sont référencées [74, 77, 78]. La “règle des cinq”, développée par Lipinski *et al.* [79], fournit certains critères pour le développement de candidats avec une bonne biodisponibilité pour les médicaments délivrés par voie orale. La règle est la suivante :

- le poids moléculaire est inférieur à 500;
- le nombre de donneurs de ponts hydrogène est inférieur ou égal à 5;
- le nombre d'accepteurs de ponts hydrogène est inférieur ou égal à 10;
- la valeur de logP est inférieure ou égale à 5.

Ces règles ont été renforcées par d'autres, tels que Veber et al., qui ont découvert que le nombre de liaisons rotatives ("NROT") est un paramètre important, un maximum de sept semblant être optimal pour la biodisponibilité par voie orale [80]. Récemment, un terme semblable à composé primaire a été introduit pour les molécules identifiées au moyen d'un criblage à haut débit; ces molécules ont été adaptées pour l'optimisation et ont des propriétés relativement proches aux valeurs de la règle des cinq de Lipinski [78, 81]. La problématique quant à la taille des composés identifiés par le criblage à haut débit a été récemment soulevée dans la littérature : dès que la molécule devient plus complexe, la chance d'observer une interaction utile pour un ligand choisi au hasard chute de façon dramatique [77]. Donc, une approche alternative dans la découverte d'un médicament a été proposée : le design d'une drogue basé sur l'utilisation de petites et relativement simples molécules, les "fragments" ("Fragment Based Drug Design"), pour préparer un composé fonctionnel [82-84]. Cette approche est basée sur la détermination des molécules primaires de faible poids moléculaire qui peuvent se lier à une cible biologique avec une faible affinité (Figure 1.7). Ces molécules peuvent être déterminées grâce à la minimisation des interactions défavorables (électroniques ou stériques) qui les empêcheraient de se lier efficacement [77]. Puis, à partir des molécules déterminées, une librairie de composés plus complexes sera créée et testée afin d'identifier le meilleur composé fonctionnel. Cette façon de construire un composé primaire, en utilisant des composés avec une faible affinité comme des fragments, permet d'enrichir leur diversité chimique et la reconnaissance moléculaire.

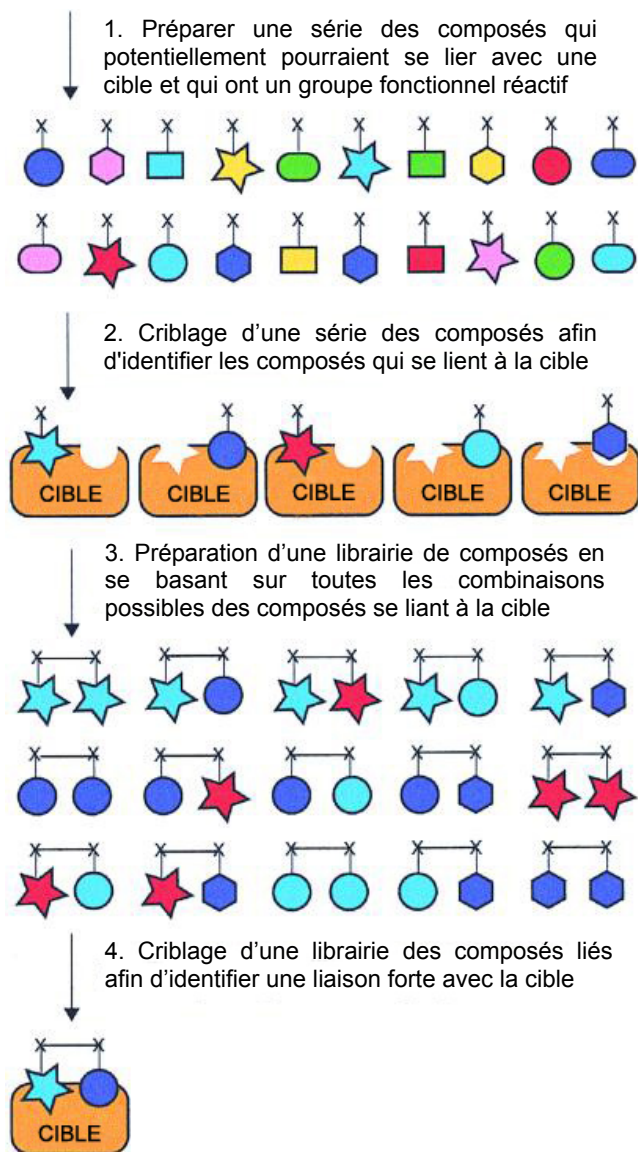


Figure 1.7. Principe du design d'un inhibiteur basé sur l'utilisation de petites molécules ("Fragment Based Drug Design").

Le schéma est adapté de la référence Maly *et al.* [85].

En utilisant cette approche, les composés fonctionnels identifiés généralement obéissent à la “règle des trois” [86], où :

- le poids moléculaire est inférieur à 300;
- le nombre de donneurs de ponts hydrogènes est inférieur ou égal à 3;
- le numéro d’accepteurs de ponts hydrogènes est inférieur ou égal à 3;
- la valeur de logP est inférieure ou égale à 3;
- le nombre de liaisons rotatives est inférieur ou égal à 3.

Ces données impliquent que la “règle des trois” pourrait être utile lors de la construction de bibliothèques pour la découverte de fragments efficaces pour des composés fonctionnels.

Une autre partie importante de la recherche d’inhibiteurs pour la DHFR R67 est de s’assurer que la molécule inhibitrice est sélective et n’a pas d’influence sur la DHFRh. La sélectivité d’un inhibiteur est un paramètre important, car l’inhibiteur de la DHFR R67 sera utilisé comme agent antibactérien chez l’Homme.

1.2.2. Promiscuité catalytique de la DHFR R67

Bien que la DHFR R67 puisse différencier le TMP du DHF, le site de liaison des folates dans l’enzyme n’est pas très spécifique. C’est à cause de la particularité du site actif de l’enzyme. Comme il est indiqué plus haut, grâce à la symétrie du site actif, il n’y a pas de site de liaison spécifique ni pour le substrat, ni

pour le cofacteur. Le site actif peut accommoder soit le substrat ou soit le cofacteur dans le même site de liaison et les résidus impliqués dans l'optimisation du ligand pour la catalyse sont les mêmes [87]. La formation de complexes non productifs, tel que la DHFR R67 avec deux molécules de DHF ou de NADPH liées à la fois, est donc possible [49]. Cette promiscuité dans la liaison du substrat et du cofacteur suggère qu'il y a une forte possibilité de lier d'autres analogues du substrat, ce qui était observé avec les inhibiteurs novobiocine et rouge congo [42] (Figure 1.6). Dans le cas d'inhibition compétitive, si le NADPH peut se lier simultanément, l'inhibiteur a le potentiel de servir comme un substrat alternatif de réduction par la DHFR R67. Dans la littérature, certains analogues du folate (Figure 1.8) sont rapportés comme des substrats alternatifs pour la DHFR R67, mais ne sont pas des substrats pour les DHFRs chromosomales : la 6,6-diméthylidihydroptérine quinonoïde (q-DMP) et le N5,N10-méthylène-tétrahydrofolate (MTHF), avec des k_{cat} de 0,40 s⁻¹ et 0,84 s⁻¹ et K_M de 185 μM et 78μM respectivement [36].

La réduction du substrat par la DHFR R67 demande l'utilisation du cofacteur NADPH comme donneur d'hydrure. Dans la littérature, la stéréosélectivité des enzymes qui dépendent de NAD(P)H a été rapportée (par exemple, les déshydrogénases d'alcool [88]). Le produit de la réaction dépend de la position du cofacteur pendant la réduction du substrat, et, par conséquent, des propriétés de la liaison du cofacteur avec l'enzyme. De façon analogue, il fut démontré que la position du NADPH dans le site actif de la DHFR R67 favorise le transfert de H_R lors de la catalyse [37, 43]. Ces propriétés rendent la DHFR R67 stéréosélective, en faisant potentiellement un nouveau biocatalyseur dans la réduction des imines prochirales, si de tels substrats peuvent se lier dans le site actif et présenter au NADPH la liaison imine, pour favoriser la réduction. Ainsi, la découverte de molécules se liant dans la cavité centrale (inhibition compétitive) permettra le criblage de molécules analogues comprenant une ou plusieurs liaisons

réductibles. Si le criblage est effectué en présence de NADPH, on pourra détecter si une réduction à lieu, par spectrophotométrie.

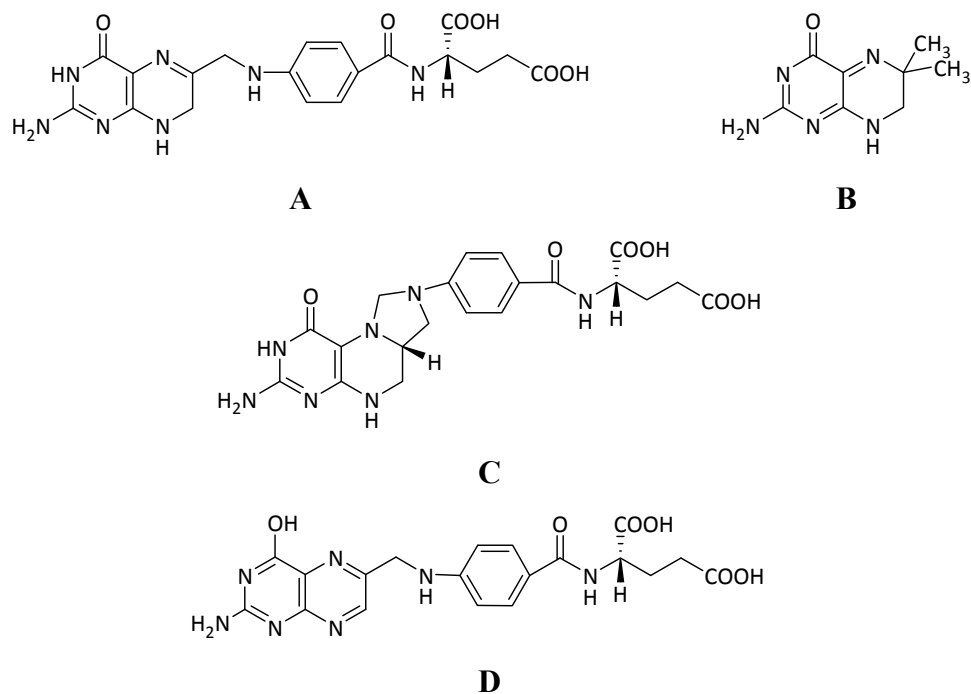


Figure 1.8. Comparaison du substrat primaire et des substrats alternatifs de la DHFR R67.

(A) Dihydrofolate (DHF); (B) 6,6-diméthyldihydroptérine quinonoïde (q-DMP); (C) N5,N10-méthylène-tétrahydrofolate (MTHF); (D) acide folique.

La recherche d'inhibiteurs pour la DHFR R67 peut donc révéler des nouveaux substrats potentiels, ou gabarits pour la conception de substrat, pour les processus de la biocatalyse.

1.3. Rôle de co-solvants dans le criblage d'inhibiteurs

Dans la recherche d'un inhibiteur de la DHFR R67 nous avons exploité l'approche du design basé sur l'utilisation de petites molécules, et donc, nous avons cherché des molécules primaires, qui pourraient servir de point de départ dans la construction d'un composé plus complexe et plus efficace. Souvent, les petites molécules organiques sont peu solubles dans l'eau, alors que l'enzyme cible est active en milieu aqueux.

La présence de l'eau est importante pour l'activité catalytique des enzymes. Au cœur de la protéine, où la constante diélectrique est faible, les interactions dipôle-dipôle influencent significativement le repliement de la protéine [89], et par conséquent l'activité enzymatique peut être affectée. L'eau participe à la formation de liaison hydrogène (un cas particulier d'interaction dipolaire) et stabilise la structure de la protéine.

Dans les interactions entre la DHFR R67 et le substrat DHF, la présence de l'eau est un facteur important [90]. Il a été mentionné que la protonation du substrat facilite le transfert d'hydrogène et la réduction. Ce point de vue propose que l'eau est intimement liée à la spécificité de liaison ainsi que l'affinité de la DHFR R67. Donc, la présence de l'eau est une condition nécessaire pour la réalisation de fonctions catalytiques de la DHFR R67; ce qui demande l'utilisation de co-solvant miscible avec l'eau pour solubiliser les composés pour le criblage.

1.3.1. Les solvants organiques

Les solvants organiques sont des composés comportant des atomes de carbone présentant habituellement des températures d'ébullition inférieures à 100 °C, facilitant alors leur évaporation. Ils peuvent servir, en fonction de leurs caractéristiques, de co-solvants pour faciliter la solubilisation de composés hydrophobes en milieu aqueux.

La plupart des solvants organiques sont dénaturants, à cause de leur influence sur la constante diélectrique du milieu, donc les forces qui stabilisent la protéine et aussi sur les interactions hydrophobes de la protéine. Les solvants organiques solubles dans l'eau interfèrent avec les forces hydrophiles qui stabilisent les structures protéiques et ce, à cause de leurs propres interactions avec l'eau [89].

Cependant l'utilisation des solvants organiques a certaines limitations dans le contexte du criblage avec une cible protéique. L'addition de solvants organiques communs, tels que l'acétonitrile (ACN), le diméthylsulfoxyde (DMSO), le tétrahydrofurane (THF) ou le méthanol (MeOH), mène souvent à la dénaturation de la protéine ou à la diminution significative de l'activité enzymatique [91-94].

1.3.2. Les liquides ioniques comme nouveaux co-solvants

Au cours des dix dernières années, les liquides ioniques (LIs) ont émergé dans le domaine de la biocatalyse en tant qu'alternative aux solvants organiques. Les LIs ont été définis comme des sels avec des points de fusion inférieurs à 100 °C. Ils sont constitués d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique. Dans plusieurs revues la dépendance des propriétés des LIs sur leur composition est soulignée [95-98]. En général, les propriétés des LIs comme solvants ressemblent aux solvants organiques polaires tel l'ACN, le N-méthylpyrrolidone ou le méthanol [99]. Les caractéristiques de base des LIs, comme la polarité, l'hydrophobie ou la miscibilité avec d'autres solvants, peuvent être modifiées par le changement approprié de l'anion ou du cation, et aussi y améliorer la solubilité des composés hydrophobes [96, 100].

D'après van Rantwijk et Sheldon [96], les avantages principaux dans l'utilisation des LIs sont :

- une tension de vapeur négligeable,
- non volatile,
- ininflammable,
- une grande stabilité thermique, chimique et électrochimique,
- un état liquide sur une grande gamme de températures,
- une capacité à dissoudre des composés polaires,

- une miscibilité variable avec l'eau et d'autres solvants facilitant l'extraction,
- un recyclage facilité,
- des propriétés facilement modulables par la variation d'un des deux ions.

En général, les enzymes solubilisées dans les LIs purs perdent leur activité catalytique. Cependant, l'addition de petites quantités de LIs dans la solution aqueuse contenant l'enzyme peut augmenter leur activité et leur stabilité [94, 101, 102]. Les classes d'enzymes les plus largement étudiées comme biocatalyseurs dans les LIs sont les lipases [101, 103, 104], ainsi que les protéases [105] et les acylases [106]. Le comportement des oxydoréductases dans les milieux avec LIs est moins développé dans la littérature par rapport aux lipases [95, 96, 100]. Pourtant, les oxydoréductases sont largement utilisées dans la synthèse organique : elles sont impliquées dans la production de composés chiraux, dans la modification de cétones, d'alcools, et d'aldéhydes, et aussi elles sont importantes dans le domaine pharmaceutique. Parmi les oxydoréductases mentionnées sont retrouvées les peroxydases [107, 108], les oxydases [109], les laccases [94] et les déshydrogénases d'alcools [102, 110, 111].

L'activité des DHFRs en présence de LIs n'a jamais été étudiée; pourtant, l'utilisation efficace des LIs en biocatalyse avec des oxydoréductases peut servir de base pour l'exploration du comportement des DHFRs dans les LIs. Le comportement d'enzymes dans un nouveau système de co-solvant ne peut pas être prédit et doit être déterminé empiriquement. Par contre, si l'enzyme manifeste une activité catalytique en présence de LIs, ces derniers peuvent servir comme solvants alternatifs aux solvants organiques pour solubiliser des composés hydrophobes pour le criblage d'inhibiteurs.

1.4. Objectifs de recherche

L'objectif principal de cette étude est la détermination d'inhibiteurs sélectifs pour les DHFRs bactériennes plasmidiques de type *dfrB*, qui pourraient servir de base pour le développement d'un antibiotique efficace. L'enzyme DHFR R67 servira de modèle pour ces études. Afin d'entreprendre la recherche d'inhibiteurs nous proposons le dépistage de composés qui peuvent moduler l'activité de la DHFR R67, basé sur le criblage à haut débit effectué sur la plateforme de criblage à l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie (IRIC). Cette collaboration permettra de tester un grand nombre de composés dans court temps. La réalisation de cette tâche demande de nous assurer d'obtenir l'enzyme rapidement et en quantité suffisante pour effectuer le criblage à haut débit des inhibiteurs. Au début de ces travaux, aucun protocole de purification automatisé (par FPLC) n'avait été développé dans notre groupe de recherche pour cette enzyme. Donc, dans un premier temps, l'élaboration d'un protocole de purification efficace et rapide sera présenté. En second lieu, le développement des conditions pour les essais enzymatiques pour le criblage, et ensuite, la vérification de la qualité de ces conditions seront présentés. Le test contrôle des essais sur la plateforme de criblage à l'IRIC nous a permis de nous assurer de la qualité des données de dépistage d'inhibiteurs.

De plus, dans la recherche d'inhibiteurs, nous proposons de mettre en œuvre le criblage rationnel, se basant sur l'approche du design d'une drogue à partir des fragments. Dans le cadre de cette approche, les molécules primaires qui peuvent servir des fragments pour l'élaboration de composés plus complexes, seront déterminées. En parallèle, ces dernières seront testées comme des substrats

alternatifs pour la DHFR R67. Dans le cadre de criblage de petites molécules, nous proposons la détermination d'un co-solvant approprié pour les essais enzymatiques. Plusieurs solvants organiques et LIs ont été testés afin de proposer les meilleures conditions pour le criblage les inhibiteurs.

2. Résultats

2.1. Établissement du protocole de criblage à haut débit

Comme il a été mentionné plus haut, l'objectif principal de cette étude est la mise au point des molécules inhibitrices sélectives pour la DHFR R67. Un moyen efficace dans la recherche d'inhibiteurs est le criblage à haut débit qui permet d'analyser un grand nombre de composés dans une courte période de temps. Une molécule inhibitrice peut être déterminée par évaluation de son influence sur l'activité enzymatique. L'activité enzymatique est caractérisée par la vitesse de la réaction catalysée sous des conditions déterminées. La vitesse d'une réaction enzymatique peut être affectée par plusieurs facteurs, tels que la présence d'un inhibiteur, la température, le pH ou la concentration du substrat par rapport à celle de l'enzyme ou par rapport à celle d'un inhibiteur.

L'augmentation de la température a un double effet sur l'enzyme : d'un côté, la vitesse de la réaction catalysée augmente, et de l'autre, la vitesse de dénaturation de l'enzyme (une protéine) augmente aussi, diminuant ainsi son activité catalytique. Lorsque l'enzyme se trouve dans sa conformation native et que la vitesse réactionnelle est maximale, on dit que c'est la température optimale. Dans le cas de la DHFR R67, selon les études de E. E. Howell, le changement de l'enthalpie de la formation du complexe ternaire enzyme·NADP⁺·DHF, ΔH , estimé

par le suivi de la dépendance de la valeur $1/K_M^{\text{DHF}}$ en fonction de température (de 20 à 50 °C), suggère que le complexe ternaire, formé à 25 °C, est le plus productif [58].

Le pH peut agir sur plusieurs facteurs tel que : l'ionisation des résidus de l'enzyme et du substrat et/ou du produit; la structure tertiaire des protéines et donc la stabilité de l'enzyme; la liaison du substrat à l'enzyme; l'activité catalytique de l'enzyme. Étant des protéines, les enzymes ont des propriétés sensibles au pH. La plupart des protéines ne sont actives, en fait, que pour une zone de pH étroite, généralement comprise entre 5 et 9 [112]. Dans le cas de la DHFR R67, le pH a un fort effet sur l'activité : son site actif ne possède pas de résidu-donneur de proton pour la protonation du substrat, contrairement aux DHFRs de type I, chromosomales [42, 50-53]. Cette protonation est essentielle pour la catalyse, le pK_a de l'atome N₅ du DHF est de 2,60 [58, 59]. Ainsi, il fut proposé que la source de proton est le solvant [43, 113]. En même temps, la désactivation de la DHFR R67 à pH < 7 est observée [36, 58], suite à la protonation des His62 [46] dont le pK_a dans l'environnement de la protéine est 6,84 [36, 40]. Ainsi, le pH optimal, où l'équilibre est maintenu entre la formation du tétramère de la DHFR R67 et la source de proton pour le substrat DHF, est de 7,0; ce dernier a été confirmé expérimentalement (L. Chaussé et J.N. Pelletier, non publié).

En ce qui concerne la stabilité du substrat et du cofacteur, dans la littérature il est constaté que dans l'échelle de pH de 2 à 9, les deux sont plus stables à pH basique [114-116]. L'influence de la température a été déterminée dans l'intervalle de 19 à 41 °C et de 4 à 37 °C pour le NADPH et le DHF, respectivement. La stabilité de deux composés testés est inversement proportionnelle à l'augmentation de la température [114-116]. Par les expériences effectués au laboratoire de J.N. Pelletier, nous avons confirmé la même tendance, et déterminé des conditions optimales pour la réaction et pour les solutions mères préparées : les solutions mères ont été préparées dans un tampon phosphate 50 mM à pH 8,0 et ont été

conservées à 4 °C, alors que la réaction a été effectuée dans le tampon phosphate 50 mM pH 7,0 et à 30 °C.

L'augmentation de la concentration de substrat $[S]$, lorsque la concentration d'enzyme $[E]$ est fixe, influence la vitesse réactionnelle jusqu'au point où l'enzyme est saturée, c'est à dire lorsque $[S] \gg K_M$, si $[S] \gg [E]$. La concentration saturante de substrat pour une enzyme peut être déterminée en se basant sur une constante de dissociation apparente du substrat, la constante de Michaelis-Menten, K_M . Ce paramètre représente la concentration de substrat nécessaire pour réaliser la moitié de la vitesse maximale. Pour saturer une enzyme, la concentration du substrat devrait être $[S] \geq 10 \times K_M$. Les conditions saturantes en substrat, permettent une simplification de la vitesse réactionnelle, qui ne dépendra que de la concentration d'enzyme et de la constante de vitesse k_{cat} . Celle-ci représente la constante de vitesse de l'étape limitante de la réaction enzymatique. Normalement, la vitesse initiale d'une réaction enzymatique est mesurée ($\leq 10\%$ de conversion de substrat en produit) dans les conditions saturantes. Dans ce cas, la concentration de substrat diminue de façon linéaire. Cependant, dans le cas de la détermination des inhibiteurs pour une enzyme, la saturation par le substrat peut masquer les inhibiteurs compétitifs faibles. La vitesse réactionnelle dans le cas où $[S] \gg K_M$, selon l'équation de Michaelis-Menten (Équation 2.1), ne sera pas trop affectée, si l'inhibiteur est faible (la valeur de K_i est grande). Pour augmenter l'effet d'inhibition, la concentration de substrat ne devrait pas être saturante pour l'enzyme : $1 \times K_M < [S] < 10 \times K_M$, donc, pour le substrat et le cofacteur les concentrations sont $8,2 \mu\text{M} \leq [DHF] \leq 82 \mu\text{M}$ et $1,6 \mu\text{M} \leq [NADPH] \leq 16 \mu\text{M}$, respectivement. En même temps, la concentration d'inhibiteur devrait être au moins 100 fois plus grande que la valeur de K_i attendue.

Équation 2.1.

$$v = \frac{V_{\text{MAX}} \cdot [S]}{[S] + K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Une autre condition importante dans la recherche des inhibiteurs est la qualité de l'enzyme. La protéine criblée devrait être de haute pureté pour éviter la possibilité d'interférence, car la DHFR R67 est exprimée dans une souche d'*E. coli*, qui possède sa propre DHFR chromosomale de type I, qui catalyse la même réaction et qui a une k_{cat} 35 fois plus grande (Tableau 1.1).

2.1.1. Optimisation de la purification de la DHFR R67

Pour la réalisation du criblage de 120 000 composés à l'IRIC, il a été prévu d'effectuer l'analyse de 350 plaques de 384 puits (communication personnelle, Jean Duchaine, plateforme de criblage à haut débit de l'IRIC). Selon les tests préliminaires, effectués par une ancienne étudiante au laboratoire Pelletier, Linda Chaussée, la quantité nécessaire de DHFR R67 pour chaque puits est de $\sim 0,45 \mu\text{g}$ pour obtenir un signal suffisamment fort lors de l'analyse d'inhibition. Ainsi, la quantité totale d'enzyme requise pour le criblage d'inhibiteurs, calculée comme $0,45 \mu\text{g} \times 384 \text{ puits} \times 350 \text{ plaques}$, donne $\sim 60,5 \text{ mg}$ de DHFR R67. La méthode utilisée pour la production de la DHFR R67 n'était pas suffisamment productive; le rendement étant d'environ 10 mg de protéine ($\sim 75\text{-}80\%$ pure) obtenu de 1 L de

culture cellulaire. Donc, il faudrait effectuer au moins 6 purifications pour avoir la quantité d'enzyme nécessaire. En outre, pendant la conservation de l'enzyme, son activité peut diminuer, et en conséquence affecter les résultats du criblage d'inhibiteurs. Ainsi, l'objectif de la modification du protocole de purification était d'offrir un protocole simple et reproductible donnant lieu à un rendement élevé d'enzyme de haute pureté.

La purification de la DHFR R67 effectuée par L. Chaussée a été réalisée par chromatographie échangeuse d'anions à l'aide de la colonne DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma), tel que décrit par Schmitzer *et al.* [26]. Cependant, la séquence de la DHFR R67 sauvage portant une queue poly-histidine était disponible. Cette construction nous permet l'utilisation de chromatographie par affinité d'ions métalliques immobilisés (IMAC), sur une colonne pré-chargée de Ni-NTA Sépharose, à débit rapide ("His-Trap, FF"). L'avantage d'utilisation de cette colonne est que son volume est 18 fois plus petit que celui de la DEAE-Sepharose utilisé précédemment, tout en ayant une capacité de liaison semblable, ce qui diminue le temps pour le lavage et l'élution de la protéine, rendant la purification plus rapide.

Les résultats de la purification sur colonne Ni-NTA Sépharose, obtenus suivant le protocole recommandé par Amersham Biosciences, n'ont pas amélioré le rendement significativement. Le surnageant a été appliqué sur la colonne pré-équilibrée avec 10 volumes de colonne (VC) de tampon phosphate 100 mM pH 8,0 avec 5 mM d'imidazole (tampon A) et suivi d'un lavage avec 12 VC de ce même tampon. L'élution de la protéine se fait par application d'un gradient avec du tampon phosphate 100 mM pH 8,0 avec 250 mM d'imidazole (tampon B) pendant 60 VC. La DHFR R67 a commencé à éluer à environ 30% de tampon B (~ 75 mM d'imidazole), et le pic de la protéine est apparu lorsque le gradient a atteint 100% de tampon B. Le pic de la protéine était trop large (Figure 2.1), n'était pas bien défini et l'activité enzymatique des fractions était très faible.

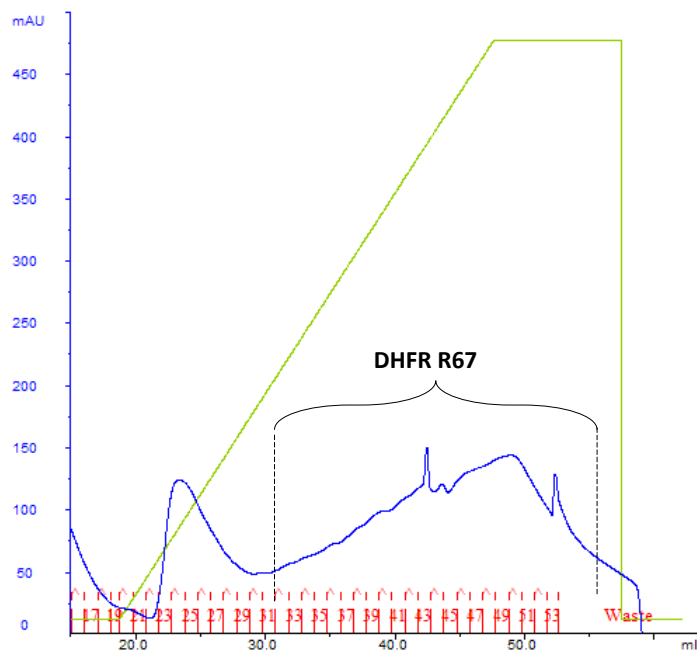


Figure 2.1. Chromatogramme de purification de la DHFR R67 avec un gradient linéaire en imidazole.

Les lignes bleue et verte, et la numération en rouge représentent le changement d'absorbance à 280 nm, le changement de gradient et le numéro des fractions, respectivement.

En tenant compte du fait que le maximum du pic est atteint après 100% du tampon B, nous avons proposé de créer un gradient linéaire avec un plateau avant que la concentration d'imidazole arrive à ~ 50 mM, afin séparer des impuretés avant l'élution de la protéine. Donc, nous avons créé un gradient linéaire pendant 6 VC jusqu'à 8% du tampon B avec concentration d'imidazole de 300 mM, ce que correspond à ~ 30 mM d'imidazole. Le gradient est maintenu constant pendant 6 VC (le plateau), puis augmenté jusqu'à 100% de tampon B instantanément (Figure

2.2). La vérification d'efficacité du nouveau gradient proposé, nous a montré une meilleure séparation des impuretés et de la protéine d'intérêt. Nous avons obtenu plusieurs pics additionnels d'impuretés qui éluent lorsque le plateau est atteint. Le pic de la DHFR R67 n'a pas la forme symétrique idéale, mais il est plus étroit.

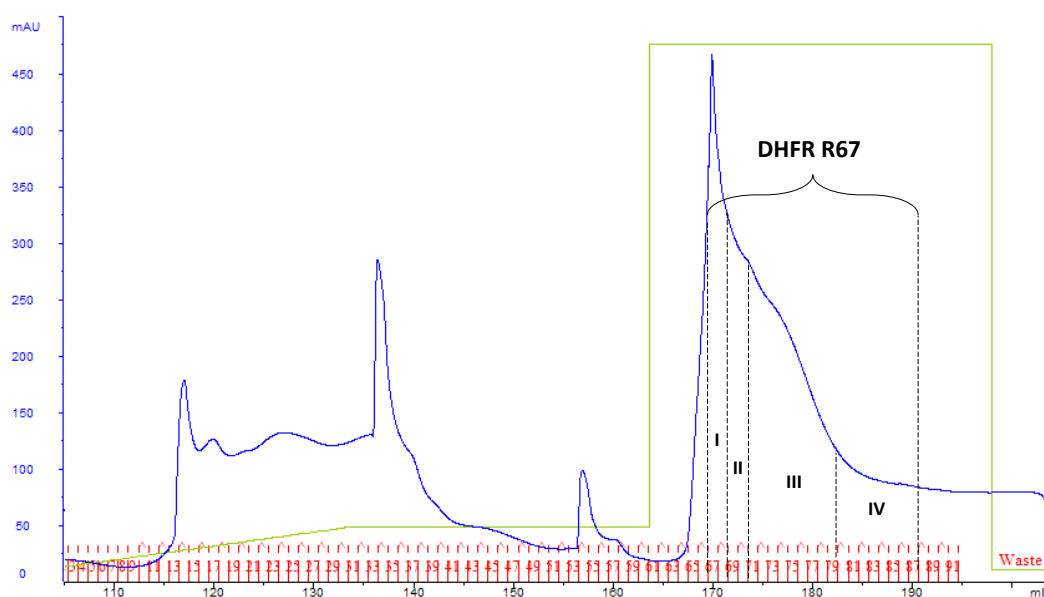


Figure 2.2. Chromatogramme de purification de la DHFR R67 avec gradient d'imidazole modifié.

Les lignes bleue, verte et la numérotation en rouge représentent le changement d'absorbance à 280 nm, le gradient de tampon B et le numéro des fractions, respectivement. Les segments I, II, III et IV ont été déterminés après l'analyse des fractions 66-87 par électrophorèse SDS-PAGE tricine, en fonction de la présence d'impuretés, et elles correspondent aux fractions 67-68, 69-70, 71-79 et 80-87, respectivement.

L'évaluation des impuretés dans les fractions récoltées, fait par électrophorèse de type SDS-PAGE tricine [117], utilisé généralement pour une meilleure séparation des protéines avec petite masse moléculaire [118] (Figure 2.3, A), a révélé les impuretés. La quantité de DHFR R67 dans les quatre premières fractions était plus élevée; par contre, ces fractions n'étaient pures qu'à 60-70% et nécessitaient ainsi une purification additionnelle. Les deux mélanges I (fractions 67, 68) et II (fractions 69, 70) ont été purifiés séparément par chromatographie d'exclusion stérique (GFC). Deux autres mélanges III (fractions 71-79) et IV (fractions 80-87) ont été dialysés contre un tampon phosphate 100 mM pH 8,0. Après avoir effectué les purifications additionnelles, la pureté de chaque mélange a été évaluée par analyse de gel SDS de type tricine (Figure 2.3, B).

Selon les résultats obtenus, les changements apportés au protocole de purification ont permis d'améliorer le rendement, donnant un total de 63 mg de protéine à partir de 1 L de culture cellulaire contre 10 mg avec l'ancienne méthode, tout en conservant une pureté suffisante pour le criblage d'inhibiteurs, avec l'activité spécifique de 0,46 UE/mg. Donc, la nouvelle méthode avec deux purifications : par IMAC et par GFC, nous a permis d'obtenir la DHFR R67 en quantité et en qualité requise (60 mg, 95 % pure) pour le criblage.

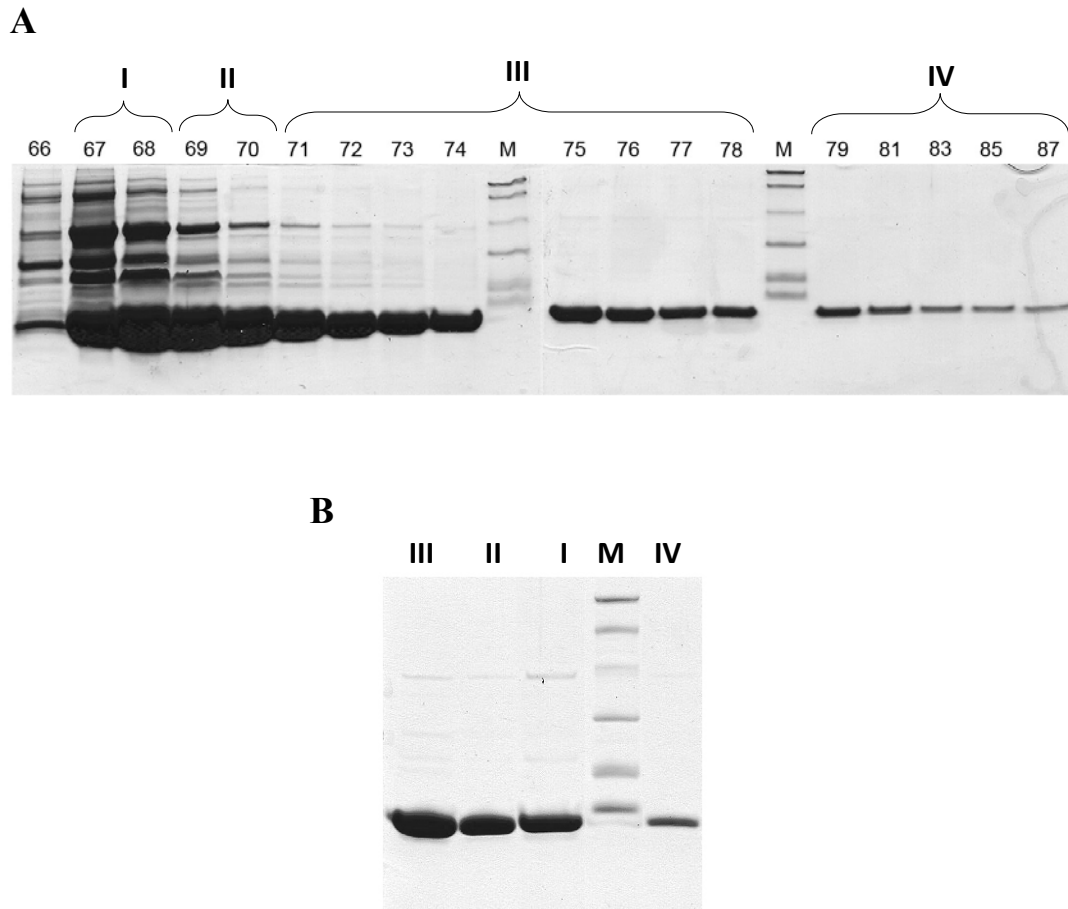


Figure 2.3. SDS PAGE de la DHFR R67 après purification.

(A) SDS-PAGE tricine des fractions correspondant au pic de DHFR R67 selon les tests d'activité enzymatique à la Figure 2.2; les mélanges des fractions 67, 68 (I) et 69, 70 (II) ont été purifiés séparément par GFC; les mélanges des fractions 71-78 (III) et 79-87 (IV) ont été dialysées, quantifiées et conservées. (B) SDS-PAGE tricine de la DHFR R67 des mélanges : I et II après purification sur colonne Ni-NTA Sépharose et GFC; III et IV après purification sur colonne Ni-NTA Sépharose et dialyse. La pureté de mélanges est évaluée par le logiciel Scion Image et estimée à environ 95-98%. (M est le marqueur de masse moléculaire).

2.1.2. Vérification de la qualité des essais pour le criblage.

L'activité enzymatique des DHFRs est suivie par la disparition du substrat DHF et du cofacteur NADPH pendant la réaction (l'Équation 2.2) en mesurant l'absorbance à 340 nm. Selon la loi de Beer-Lambert, le changement d'absorbance ΔA mesuré correspond au changement des concentrations en DHF et NADPH et peut être calculé utilisant le coefficient d'absorption molaire de la réaction $\Delta \epsilon_{340 \text{ nm}}$, représenté par la différence entre les coefficients d'absorption molaires des substrats (DHF + NADPH) et des produits (THFA + NADP⁺) de la réaction (Figure 2.4, cf. 4. Partie expérimentale, méthodologie, analyse des données).



$$\Delta \epsilon_{340 \text{ nm}} ([\text{DHF} + \text{NADPH}] - [\text{THFA} + \text{NADP}^+]) = 12\,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ [119]}$$

La présence d'un inhibiteur dans le milieu réactionnel réduit l'activité de l'enzyme et en conséquence, la vitesse de conversion du substrat en produit, donc la pente diminue. Ainsi, l'observation de la diminution de la pente initiale indique que le composé testé agit comme inhibiteur. Toutefois, ceci ne donne aucune indication du type d'inhibiteur, soit réversible ou irréversible; il peut même s'agir d'un agent dénaturant.

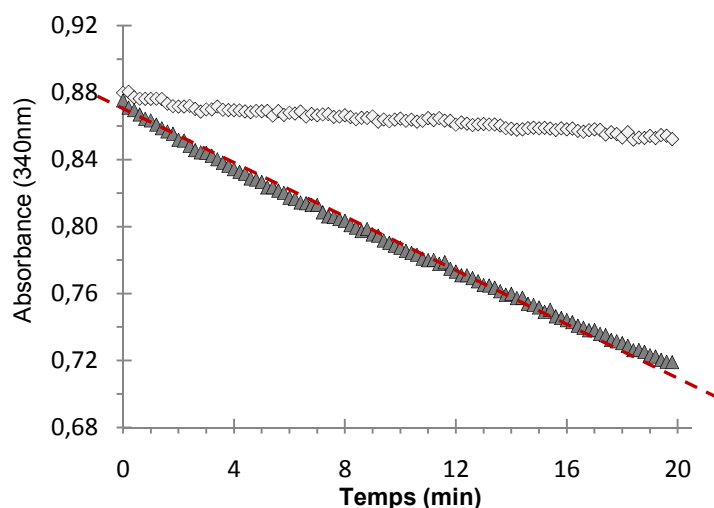


Figure 2.4. Représentation d'activité enzymatique de la DHFR.

La vitesse de la réaction catalysée par la DHFR (▲) représentée par le changement d'absorbance ΔA en fonction du temps; control négatif sans enzyme (◇).

Avant de lancer le criblage à haut débit, il faut bien définir les conditions de la réaction : type de tampon, le pH, la température et les concentrations du substrat, du cofacteur et de l'enzyme. Le tampon (la concentration et le pH) et la température pour les essais enzymatiques de la DHFR R67 ont été définis précédemment dans le laboratoire; ces conditions sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature [58, 114-116].

Pour définir la quantité d'enzyme et de substrat nécessaire pour obtenir des données fiables, il faut respecter les paramètres suivants :

- la concentration de substrat dans les essais ne devrait pas être saturante par rapport à celle d'enzyme pour permettre de détecter les cas d'inhibition compétitive par un inhibiteur faible;
- la disparition du substrat (signal mesuré, $\Delta\text{Abs}_{340\text{ nm}}$) change de façon linéaire en fonction du temps au cours de la vitesse initiale de la réaction enzymatique (la conversion de 10% de substrat en produit) et dépend de la concentration d'enzyme;
- le changement du signal pendant le temps de mesures (entre t_0 et t) devrait être significatif, soit $\Delta\text{Abs} \leq 0,03$ sur 20 minutes (communication personnelle, Jean Duchaine, IRIC plateforme de criblage à haut débit).

La condition principale dans la détermination des conditions réactionnelles est la concentration de substrat et de cofacteur : leurs concentrations ne devraient pas être saturées pour permettre d'identifier plus d'inhibiteurs faibles possibles. La concentration de substrat $[S]$, est saturante si $[S] \geq K_M$. Donc, la concentration de substrat devrait être dans un intervalle : $1 \times K_M \leq [S] \leq 10 \times K_M$. En sachant que l'intensité du signal dépend de la quantité de substrat et de cofacteur, la diminution de leurs concentrations affaiblit le signal enregistré, ce dernier, à son tour, affecte la qualité des données. Dans ce cas, notre but était de déterminer les concentrations de substrat et de cofacteur, avec lesquelles un signal fiable peut être obtenu tout en demeurant à des concentrations sous-saturantes.

L'autre paramètre important est la concentration d'enzyme afin que la vitesse initiale puisse être aisément mesurée, soit entre 1 et 20 minutes, selon le type d'instrumentation utilisé. Comme les tests seront effectués en plaques de 96 puits, le temps de mélange des composés réactionnels sur toute la plaque fait de sorte que la première mesure (T_0) sera prise après environ 1 ou 2 minutes; il est

essentiel que moins de 5% de la réaction ait eu lieu au cours de cette période, sinon la pente de vitesse mesurée sera plus faible (car $[S] < [S_0]$) ce qui peut ressembler à l'action d'un inhibiteur.

La concentration optimale de DHF à laquelle on peut obtenir un signal élevé en utilisant une concentration de substrat faible, a été définie expérimentalement : 25 μM , ce qui correspond à $\sim 3 \times K_M^{\text{DHF}}$; la concentration du NADPH est de 15 μM ($\sim 10 \times K_M^{\text{NADPH}}$). Aussi, nous avons déterminé à 75 nM la concentration de l'enzyme DHFR R67 dans l'essai, concentration qui fournit un changement de signal linéaire; le changement d'absorbance obtenu dans ces conditions correspond à 0,03 pendant 20 minutes. Nous avons obtenu ces résultats en faisant des essais en triplicata sur une lectrice à plaque FLUOstar OPTIMA. Nous avons évalué la reproductibilité des essais sous les conditions déterminées à l'aide de facteur Z' .

Le facteur Z' est une caractéristique statistique de tout essai. C'est le paramètre le plus couramment utilisé pour contrôler la qualité d'un essai et pour suivre la performance du test au cours d'un criblage à haut débit [120]. La valeur du facteur Z' est calculée selon l'Équation 2.3 :

Équation 2.3.
$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|}$$

σ_{c+} , σ_{c-} sont les écart-types de l'échantillon et du contrôle négatif (blanc), respectivement;

μ_{c+} , μ_{c-} sont les valeurs moyennes de l'échantillon et du contrôle négatif (blanc), respectivement.

Plus la valeur du facteur Z' d'un dosage est élevée, plus la qualité des données de l'essai pour le criblage à haut débit est bonne. L'interprétation des valeurs du facteur Z' selon Zhang *et al.* [120], est la suivante. Si Z' est égal à :

- 1 : l'essai idéal (les écart-types égalent zéro, où la gamme dynamique, représentée comme le rapport du signal mesurable maximal (l'échantillon) sur le signal mesurable minimal (blanc), tend vers l'infini);
- $1 > Z' \geq 0,5$: les essais sont excellents (la zone de séparation entre l'échantillon et le blanc est grande);
- $0,5 > Z' > 0$: les essais ne sont pas fiables (la zone de séparation entre l'échantillon et le blanc est petite);
- 0 : les essais de type "oui ou non" (il n'y pas de zone de séparation, la variation du signal de l'échantillon et la variation du signal du blanc se rencontrent);
- < 0 : le criblage est pratiquement impossible (il n'y pas de zone de séparation, la variation du signal de l'échantillon et la variation du signal du blanc se recouvrent).

Pendant l'évaluation du facteur Z' des conditions pour le criblage sur lectrice à plaques FLUOstar OPTIMA, nous avons eu des difficultés avec la reproductibilité de lecture du signal; la valeur de facteur Z' n'était pas assez bonne et les données non fiables (Tableau 2.1). Nous avons donc testé plusieurs lectrices à plaques sous les mêmes conditions pour déterminer si un autre appareil peut offrir une lecture plus fiable du même signal faible.

Les deux lectrices à plaques de la compagnie BMG, soient le FLUOstar et POLARstar OPTIMA, ont donné un facteur Z' inférieur à 0, ce qui indique

l'impossibilité de la réalisation du criblage à haut débit sur ces deux appareils. Par contre, le même test effectué sur la lectrice à plaques de plus vieille génération, HTS 7000 Bio Assay Reader, a obtenu un meilleur facteur Z' (Tableau 2.1, Figure 2.5). Deux autres lectrices plus modernes, l'Infinite M 200 et le DTX 800, ont aussi confirmé la possibilité d'utilisation des conditions définies pour le criblage : les facteurs Z' sont dans l'intervalle de 1 à 0,5 pour les deux.

Tableau 2.1. Évaluation de la performance du test* sur différents appareils.

Compagnie	Marque d'appareil	Facteur Z'	Interprétation
BMG	FLUOstar OPTIMA ^a	< 0	Criblage pratiquement impossible
BMG	POLARstar OPTIMA ^b	< 0	Criblage pratiquement impossible
Perkin Elmer	HTS 7000 Bio Assay Reader ^c	0,8	Essais excellents
Tecan	Infinite M 200 ^d	0,9	Essais excellents
Beckman Coulter	DTX 800 ^a	0,6	Essais excellents

* Les conditions déterminées en triplicata sur la lectrice à plaques FLUOstar OPTIMA, ont été testées à grande échelle (48 blancs, 48 échantillons dans une plaque de 96-puits) sur les différents appareils. Conditions : 15 μ M NADPH, 25 μ M DHF en tampon phosphate 50 mM pH 7,0; la réaction est démarrée avec l'ajout de l'enzyme DHFR R67, 75 nM dans l'essai; volume total 200 μ L.

Les appareils appartiennent à : ^a laboratoire Dr. J.N. Pelletier; ^b plateforme de criblage de l'IRIC; ^c laboratoire Dr. J.W. Keillor; ^d laboratoire Dr. K.J. Wilkinson.

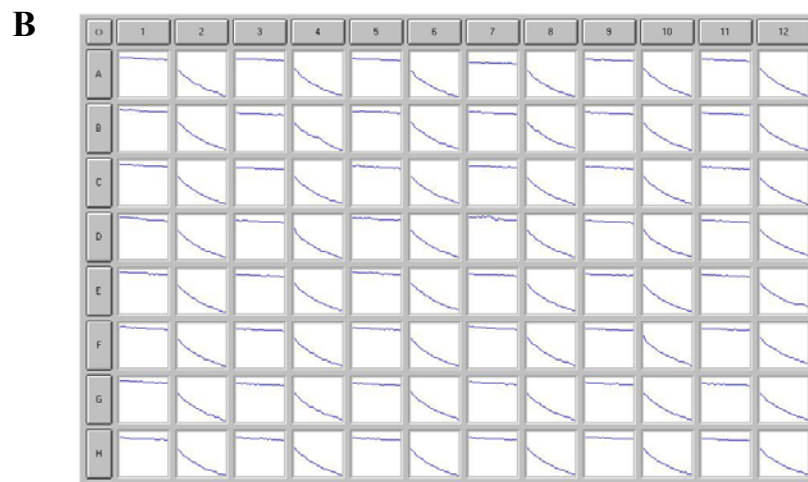
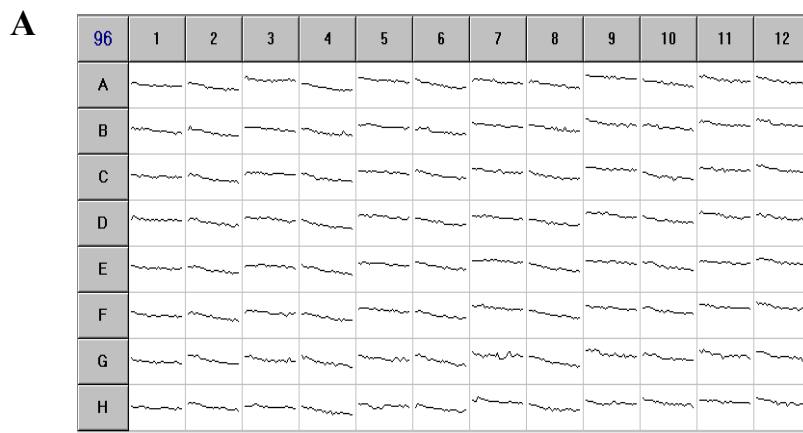


Figure 2.5. Images du signal des tests de facteur Z'.

Résultats obtenus sur FLUOstar OPTIMA (A) et sur HTS 7000 Bio Assay Reader (B). Les colonnes impaires correspondent au contrôle négatif (blanc); les colonnes paires correspondent au contrôle positif (échantillon). L'axe horizontal représente le temps, et l'axe vertical l'absorbance; l'échelle est comparable pour A et B.

2.1.3. Conclusion

Optimisation de la purification : Les changements apportés à la purification de la DHFR R67 par FPLC sur la colonne pré-chargée de Ni-NTA Sépharose, tel qu'un plateau de gradient de 8% et ensuite l'élution immédiate, nous permet d'enlever des impuretés additionnelles et d'obtenir un extrait concentré de la protéine. Une purification supplémentaire des fractions moins pures par chromatographie d'exclusion stérique permet d'obtenir une protéine de haute qualité pour les essais. Le rendement a été amélioré de 10,5 mg à 63 mg de protéine en total avec une pureté de $\geq 95\%$.

Vérification de la qualité des essais : Nous avons déterminé les conditions des essais enzymatiques pour la DHFR R67, sur lesquelles le criblage des inhibiteurs peut être basé. L'évaluation de la qualité des essais, le facteur Z' , a été effectué sur plusieurs appareils. Selon des données obtenues, le dépistage des inhibiteurs sur la plateforme de criblage à haut débit de l'IRIC n'est pas possible, car la lecture du signal faible, raisonnable dans les conditions déterminées, est limité par la capacité de la lectrice à plaques POLARstar OPTIMA. Ainsi, les 120 000 composés de la librairie disponible à l'IRIC ne peuvent pas être testés contre la DHFR R67. Donc, nous nous sommes tournés vers un criblage rationnel. Pour les tests des inhibiteurs, nous avons utilisé la lectrice à plaques DTX 800, de la compagnie Beckman Coulter.

2.2. Identification de systèmes de co-solvants pour le criblage

La DHFR est une enzyme soluble dans l'eau, ainsi que le sont le substrat et le cofacteur, de telle sorte que la réduction de DHF en THFA catalysée par la DHFR s'effectue en milieu aqueux. De plus, pour l'activité catalytique de la DHFR R67 la protonation du substrat est très importante, donc elle dépend du pH [36] de sorte que la présence de l'eau joue un rôle important dans la catalyse.

Par contre, les petites molécules organiques, proposées comme les molécules primaires pour être testées en tant qu'inhibiteurs, sont très peu solubles dans l'eau. Donc, il est nécessaire d'utiliser un co-solvant qui va permettre de solubiliser des molécules hydrophobes en milieu aqueux. Le co-solvant pour les tests d'inhibiteurs devrait être miscible avec l'eau et, comme il était mentionné précédemment, ne pas affecter l'activité de l'enzyme. En pratique, il est rare que ces trois paramètres soient parfaitement satisfaits. Donc, il faut trouver l'équilibre optimal entre ces trois paramètres qui nous permettra d'obtenir des résultats fiables.

Pour identifier le co-solvant approprié, l'influence de différents solvants organiques et LIs sur l'activité enzymatique de la DHFR R67 et de la DHFRh a été étudiée. Malgré que les deux DHFRs catalysent la même réaction, les deux possèdent une structure différente et l'impact d'un solvant sur une enzyme ne sera pas prédictif de son influence sur l'autre.

2.2.1. Les solvants organiques

Les solvants organiques choisis sont miscibles avec l'eau et sont des solvants polaires. Ce sont des solvants communément utilisés dans la biocatalyse [121, 122]. Cinq solvants organiques ont été testés : le méthanol (MeOH), l'acétonitrile (ACN), le tétrahydrofurane (THF), le diméthyle formamide (DMF) et le diméthylsulfoxyde (DMSO). Les concentrations testées varient de 0 à 25%.

Dans le cas de la DHFR R67, l'augmentation des concentrations de chacun des co-solvants testés a entraîné une diminution progressive du taux initial de la réaction (Figure 2.6). Bien que le DMSO ait été le moins perturbateur en égard de l'activité de la DHFR R67 à 5% de co-solvant (85% d'activité restante, comparativement à $\approx 55\%$ pour tous les autres), une augmentation à 10% de DMSO a entraîné une baisse importante de l'activité (30% d'activité résiduelle). À des concentrations élevées de co-solvant, le THF était le moins perturbateur, où 40%, 35% et 30% de l'activité est demeurée à 15%, 20% et 25% de THF, respectivement. Ces résultats montrent que les co-solvants organiques testés affectent négativement l'activité enzymatique de la DHFR R67. L'utilisation d'un ou l'autre des solvants pour le criblage d'inhibiteurs dépendra du pourcentage nécessaire de co-solvant pour la réalisation du test. À 5% de co-solvant dans le milieu réactionnel, le meilleur candidat pour les futures analyses est le DMSO. À 10% de co-solvant, les solvants qui ont moins d'impact sur l'activité de la DHFR R67 sont le MeOH et l'ACN; les trois autres solvants, le THF, le DMF et le DMSO, affectent la DHFR R67 moins fortement que les deux premiers et ils ont à peu près le même niveau d'impact que le MeOH et l'ACN à 15%.

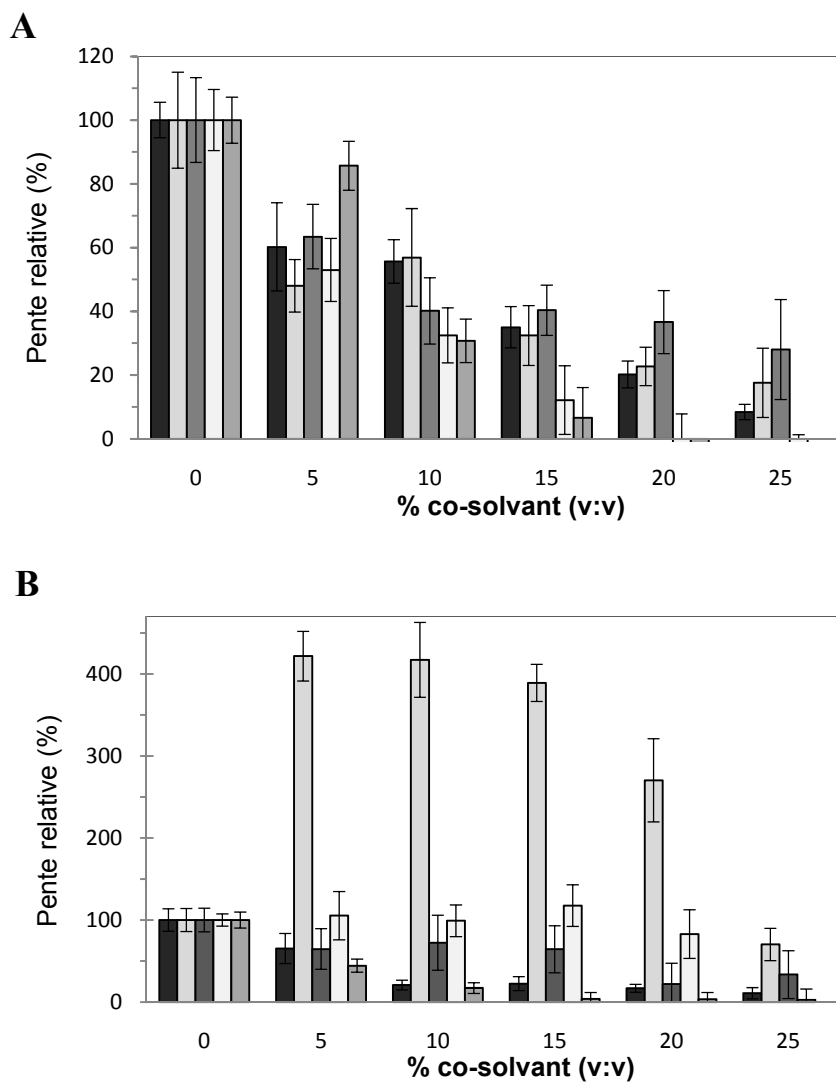


Figure 2.6. Influence des solvants organiques sur l'activité des DHFRs.

La pente initiale de la réaction standard (sous conditions saturantes en réactifs) catalysée par la DHFR R67 (**A**) et la DHFRh (**B**) en présence des co-solvants organiques : MeOH (■); ACN (□); THF (■); DMF (□); DMSO (■). L'activité enzymatique en absence de co-solvant a été prise comme valeur de référence. Les données représentent la moyenne de 3 séries de mesures en triplicata, et les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Dans le cas de la DHFRh, une perte d'activité similaire a été observée lorsque le MeOH, le THF ou le DMSO ont été utilisés comme co-solvants. Toutefois, le DMF et, dans une mesure encore plus prononcée, l'ACN, se sont démarqués. En effet, la présence de 5-15% d'ACN a entraîné une augmentation de l'activité DHFRh de 4 fois, passant à une augmentation de 3 fois à 20% d'ACN, alors qu'à 25% une baisse de l'activité à environ 70% de l'activité initiale est observée. L'addition de 5-20% de DMF n'a pas affecté significativement l'activité de la DHFRh, par contre 25% de DMF réduit l'activité enzymatique à 10%. Les résultats obtenus montrent que le meilleur co-solvant pour la DHFRh est l'ACN : à 5-20% de co-solvant l'activité n'a pas diminuée mais augmentée. Le DMF a aussi montré un bon potentiel, car l'activité enzymatique n'a presque pas été affectée à la même gamme de concentrations de co-solvant. Ces deux solvants ont la priorité par rapport aux autres.

Un autre facteur déterminant dans le choix d'un co-solvant est la solubilité des composés qui seront testés lors du dépistage d'inhibiteurs. En émettant l'hypothèse que les molécules "simples" qui seront criblées dans une approche de découverte par fragments, se lieront faiblement à leur cible, leur influence sur l'activité enzymatique sera également faible si testées à de faibles concentrations (< μM). Donc, pour amplifier l'impact d'un inhibiteur faible sur l'enzyme, il est nécessaire d'effectuer les essais enzymatiques à une haute concentration du composé, d'ordre mM. De plus, la concentration de la solution mère du composé doit être à plus haute concentration, car cette solution va être diluée dans le mélange réactionnel. C'est pourquoi la solubilité des composés à tester devient un facteur important. La vérification de la solubilité des composés choisis pour le criblage (Annexe 2; *vide infra*) a révélé la grande capacité de 5% de DMSO de solubiliser des composés à ces concentrations mM, tel que requis pour les solutions mères. L'ACN a offert une solubilisation égale ou moins bonne à celle de DMSO, sauf que nous n'avons pas réussi à solubiliser tous les composés dans l'ACN. Le

MeOH, le THF et le DMF n'ont pas offert une solubilisation des composés suffisante.

Cependant, 10% de DMSO a entraîné une perte de $\geq 70\%$ de l'activité pour la DHFR R67 ainsi que pour la DHFRh. En conséquence, nous avons cherché à identifier d'autres co-solvants qui ont moins d'impact sur l'activité enzymatique tout en dissolvant efficacement les composés à tester.

2.2.2. Les liquides ioniques

Les liquides ioniques (LIs) les plus étudiés dans la biocatalyse, au niveau des oxydoréductases, sont des LIs basés sur l'imidazolium. Le cation peut être le butyleméthyleimidazolium (BMIm) ou l'éthyleméthyleimidazolium (EMIm), avec une plus grande diversité pour le contre-anion qui comprend PF_6^- , BF_4^- , MeSO_4^- et NTf_2^- [95, 97, 100]. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a rapporté l'effet de LIs sur les DHFRs. Dans le cadre de ce projet, nous avons étudié l'influence sur l'activité de la DHFR R67 et de la DHFRh par deux LIs miscibles avec l'eau, le [BMIm][OctSO₄] et le [BMIm][BF₄], et un LI non miscible avec l'eau, le [BMIm][PF₆] (Figure 2.7).

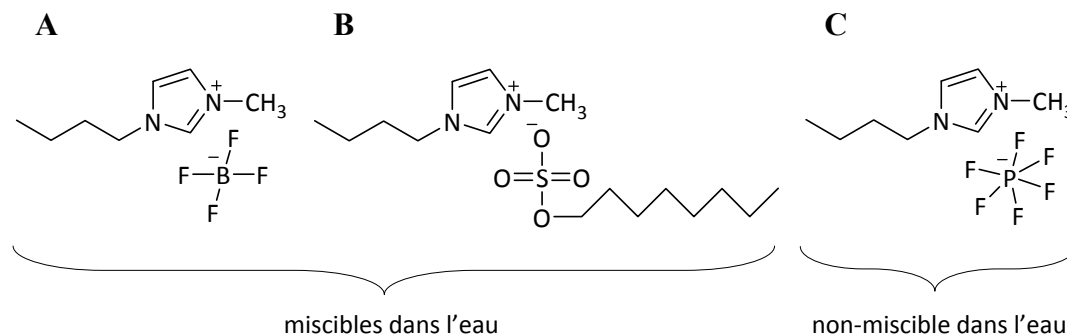


Figure 2.7. Structures des LIs étudiés.

- (A) Le tétrafluoroborate de 1-butyle-3-méthyleimidazolium, [BMIm][BF₄];
 (B) l'octylesulfate de 1-butyle-3-méthyleimidazolium, [BMIm][OctSO₄];
 (C) l'hexafluorophosphate de 1-butyle-3-méthyleimidazolium, [BMIm][PF₆].

L'activité de la DHFR R67 a diminué progressivement avec des concentrations croissantes de [BMIm][OctSO₄] (Figure 2.8, **A**). À 10% et 40% de [BMIm][OctSO₄] il restait 75% et 50% de l'activité de la DHFR R67, respectivement. En revanche, la DHFRh a perdu toute activité, même à la plus faible concentration de [BMIm][OctSO₄] testée (5%). La modification du contre-anion pour obtenir le [BMIm][BF₄] a produit des résultats très différents: à 5% et 10% de [BMIm][BF₄], la DHFRh était pleinement active, tandis que la DHFR R67 a perdu 35% et 80% d'activité, respectivement (Figure 2.8, **B**). Les essais à des concentrations plus élevées de [BMIm][BF₄] ont été limités à cause de l'augmentation de l'acidité de la solution [101]; il est particulièrement important de travailler au-dessus de pH 6 pour le maintien de la structure quaternaire de la DHFR R67 [36], et pour la stabilité du substrat.

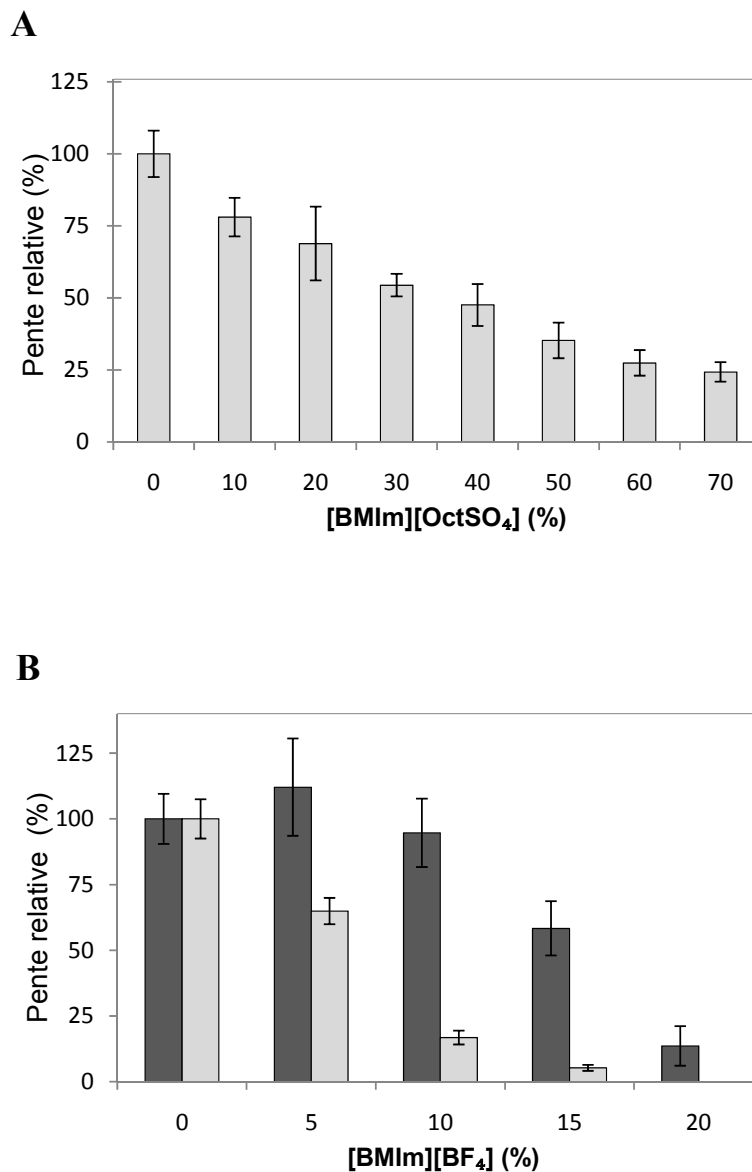


Figure 2.8. Influence des LIs miscibles avec l'eau sur l'activité des DHFRs.

La pente initiale de la réaction standard catalysée par la DHFR R67 (□) et la DHFRh (■) en présence des LIs miscibles avec l'eau : le [BMIm][OctSO₄], (A) et le [BMIm][BF₄], (B). L'activité enzymatique en absence de co-solvant a été prise comme valeur de référence. Les données représentent la moyenne de 3 séries de mesures en triplicata, et les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Environ 90% d'inactivation de la DHFR R67 et de la DHFRh a été observée à 10% et 20% de [BMIm][BF₄] respectivement. Ainsi, les systèmes de co-solvant avec la plus grande activité de l'enzyme sont 10% de [BMIm][OctSO₄] pour la DHFR R67 et 10% de [BMIm][BF₄], ACN ou DMF pour la DHFRh.

L'objectif d'utilisation d'un co-solvant non miscible avec l'eau est de fournir une phase non-aqueuse ayant un meilleur potentiel de dissolution de composés à tester en tant qu'inhibiteurs. Cependant, l'utilisation de solvants organiques non-miscibles avec l'eau a tendance à entraîner une dénaturation des enzymes à l'interface. Afin de vérifier la robustesse des DHFRs sous ces conditions, nous nous sommes tournés vers un LI non-miscible avec l'eau, le [BMIm][PF₆], pour les essais. L'activité enzymatique des deux DHFRs a augmenté proportionnellement aux concentrations de [BMIm][PF₆] (Figure 2.9, A).

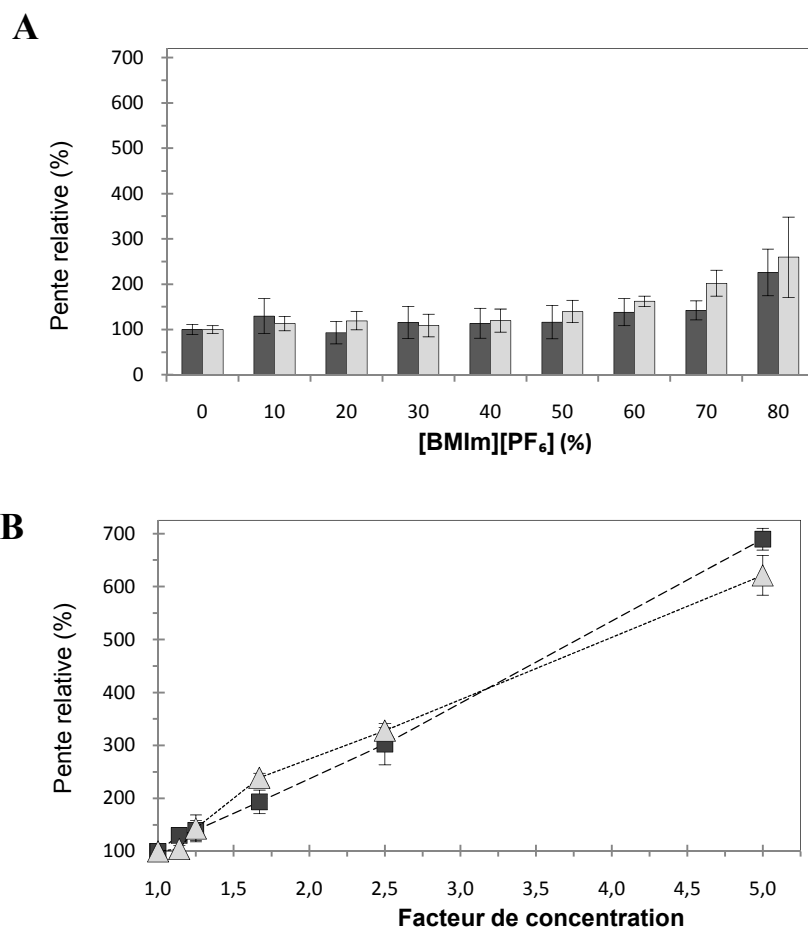


Figure 2.9. Influence d'un LI non-miscible avec l'eau sur l'activité des DHFRs.

(A) La pente initiale de la réaction standard catalysée par la DHFR R67 (□) et la DHFRh (■) en présence d'un LI non-miscible avec l'eau, le [BMIm][PF₆]. L'activité enzymatique en absence de co-solvant a été prise comme valeur de référence. (B) L'effet de l'augmentation des concentrations de composés réactionnels (DHF, NADPH et DHFR) sur l'activité enzymatique de la DHFR R67 (△) et de la DHFRh (■). Le facteur de concentration de 1,0; 1,1; 1,3; 1,7; 2,5 et 5,0 est relatif aux conditions de la réaction standard et mime les volumes aqueux à 0, 10, 20, 40, 60 et 80% de [BMIm][PF₆], respectivement. Les données représentent la moyenne de 3 séries de mesures en triplicata, et les barres d'erreur représentent l'écart-type.

En effet, à 70 et 80% de [BMIm][PF₆], l'activité relative des deux enzymes a été de $\geq 200\%$. Au cours de ces expériences, la quantité de réactifs, DHF, NADPH et DHFR, a été maintenue constante, tandis que les variables étaient les volumes de LI et du tampon aqueux (avec un volume final constant). Il est donc possible que l'enzyme et les réactifs deviennent progressivement plus concentrés dans la phase aqueuse lorsque le volume de cette phase diminue, si la solubilisation du composé est faible dans le volume croissant de LI. Pour vérifier cette possibilité, les concentrations du substrat, de cofacteur et d'enzyme ont été recalculées seulement en fonction du volume de la phase aqueuse, pour 0, 10, 20, 40, 60 et 80% de [BMIm][PF₆]. Par exemple, à 80% de LI, le volume de la phase aqueuse (20%) est cinq fois plus petit qu'en absence de LI. Si tout le substrat DHF est partitionné dans la phase aqueuse, il sera donc 5 fois plus concentré. Nous avons ensuite appliqué les nouvelles concentrations à de simples tests d'activité enzymatique (en absence de LI). Comme prévu, l'activité enzymatique augmente avec la concentration croissante des enzymes et réactifs (Figure 2.9, **B**). Toutefois, l'augmentation a été nettement supérieure à celle observée en présence de [BMIm][PF₆] (Figure 2.9, **A**), pour atteindre 600-700% du contrôle sous les conditions imitant 80% de [BMIm][PF₆] où l'activité atteignit 42% et 33% du contrôle de la DHFR R67 et de la DHFRh respectivement. Il s'ensuit que l'augmentation de l'activité observée à des concentrations élevées de [BMIm][PF₆] est moindre que prévue en raison de la concentration accrue de l'enzyme et des réactifs. Nous émettons l'hypothèse qu'au moins certaines des composantes de la réaction se partitionnent dans la phase LI où ils ne réagissent pas, ou peu. Bien que les deux DHFRs sont solubles dans l'eau, l'étendue de leur répartition dans la phase LI est inconnue. Nous avons analysé la quantité de DHFR R67 dans la phase aqueuse avant et après incubation avec 80% de [BMIm][PF₆] par électrophorèse SDS-PAGE (Figure 2.10). Environ 60% de la DHFR R67 demeure dans la phase aqueuse après l'incubation, ce qui suggère qu'au moins une partie de la diminution de l'activité enzymatique dans le [BMIm][PF₆] est due à la diminution de la

concentration d'enzyme dans la phase aqueuse. Néanmoins, il convient de noter que l'activité des deux DHFRs n'est pas significativement affectée par 10-20% [BMIm][PF₆] (même en tenant compte du changement de volume aqueux), ce qui en fait un autre système potentiel de co-solvant, compatible avec l'activité des deux DHFRs.

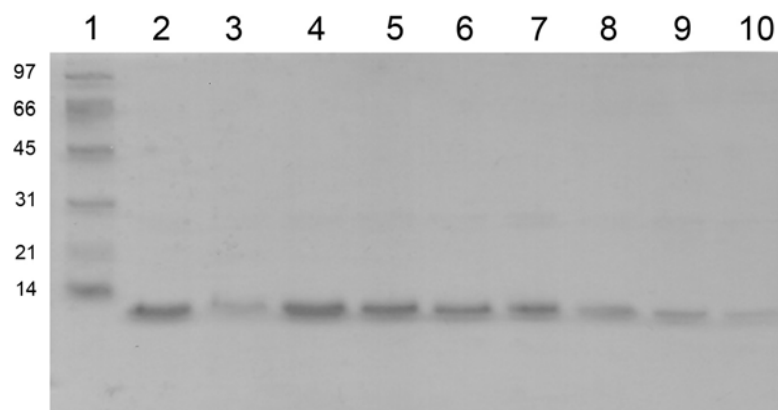


Figure 2.10. SDS-PAGE de la DHFR R67 après l'incubation avec le LI [BMIm][PF₆].

Électrophorèse par SDS-PAGE tricine de la phase aqueuse avec la DHFR R67 avant et après incubation pendant 15 min avec 80% de [BMIm][PF₆]. Les colonnes : 1, marqueur de masse moléculaire (la masse en kDa est indiquée sur le côté gauche); 2 et 4-10, les échantillons-contrôles avec des pourcentages de DHFR R67 différents : 100, 95, 81, 80, 77, 71, 50 et 37% respectivement, par rapport aux 4 µg d'origine (analysé par logiciel Scion Image, Scion Corporation); 3, la phase aqueuse après incubation avec le LI; ~60% de la protéine est restée dans la phase aqueuse.

Nous avons ensuite vérifié la capacité des LIs à solubiliser les concentrations mM de composés à tester en tant qu'inhibiteurs potentiels de la DHFR R67. À cet égard, l'utilisation d'un système à deux phases utilisant le [BMIm][PF₆] pose un problème car nous ne pouvons pas prédire comment chaque composé sera partitionné. Pour cette raison, nous n'avons pas favorisé l'utilisation du [BMIm][PF₆]. Toutefois, 10% de [BMIm][OctSO₄] s'est avéré plus efficace pour solubiliser certains composés que 10% de DMSO. Par contre, le [BMIm][BF₄] n'a pas eu beaucoup de succès en tant que solvant. Il ne peut pas être utilisé dans les essais avec la DHFRh, malgré ses propriétés avantageuses par rapport à la conservation de son activité enzymatique.

Dans le cadre de ce projet nous avons déterminé que les DHFRs sont actives en présence de certains LIs. Nous avons noté la diminution de l'activité de deux DHFRs suite à une courte exposition à des concentrations élevées de LIs. L'influence des LIs sur la stabilité des DHFRs à long terme n'est pas encore connue. Il est important d'étudier le comportement de ces deux enzymes en fonction des LIs pour savoir si les LIs peuvent avoir une autre application, tel qu'une solution pour conserver l'enzyme à long terme. Puisque la DHFRh et la DHFR R67 sont toutes deux importantes au niveau de leur impact sur la santé humaine, des applications de ses enzymes en biodétection sont envisagées où leur stabilisation sera essentielle. Afin de comparer l'influence des LIs avec celle de solvants organiques, nous avons choisi le DMSO, puisque celui-ci offre la meilleure solubilité des composés à cribler. Les concentrations de co-solvants ont été choisies selon les tests d'activité : nous devons conserver un rapport raisonnable entre la concentration du co-solvant, la plus élevée possible, et l'activité enzymatique restante (au moins autour de 50%) en présence du co-solvant (Figure 2.6, Figure 2.8).

Afin de tester la stabilité à plus long terme, les enzymes, la DHFR R67 et la DHFRh ont été incubées avec les LIs et le DMSO; l'activité enzymatique a été

testée périodiquement pendant 96 heures d'incubation. Les tampons utilisés pour la majorité des essais sont le phosphate de potassium 50 mM pH 7,0 et le Tris-Cl 50mM pH 7,6 pour la DHFR R67 et la DHFRh, respectivement. Les essais de la DHFR R67 avec le [BMIm][BF₄] ont été faits dans le tampon Tris-Cl 50 mM pH 7,0 à cause de la formation d'un précipité lorsque la protéine est ajoutée à ce LI. (Par contre, en mélangeant la même quantité de [BMIm][BF₄] avec le tampon phosphate sans protéine, aucune précipitation a été observée.) Pour les deux DHFRs, les contrôles dans le tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0 et le tampon Tris-Cl (même concentration et pH) sont comparables.

La stabilité des DHFRs dans les échantillons du contrôle (dans le tampon) est différente entre l'enzyme bactérienne, DHFR R67, et l'enzyme humaine, DHFRh : l'activité enzymatique de la DHFR R67 est conservée plus longtemps (Figure 2.11). L'activité de la DHFR R67 n'est pas significativement affectée ni par 10% de DMSO, par 50% de [BMIm][PF₆], ni par 5% de [BMIm][BF₄] même après 3 jours à température et pression normale (TPN) (Figure 2.11 **A**). De plus, après 7 jours d'incubation en DMSO ou en LI non-miscible avec l'eau, le [BMIm][PF₆], la DHFR R67 garde la même activité enzymatique que le contrôle. Dans l'échantillon avec le [BMIm][BF₄], il reste environ 75% d'activité après 7 jours. L'échantillon avec 50% de [BMIm][OctSO₄] a montré une grande influence du LI sur la stabilité de la DHFR R67 : après 4 et 24 heures d'incubation, l'enzyme a perdu 50 et 85% de l'activité initiale, respectivement. Ces tests ont confirmé l'inactivation continue de l'enzyme par [BMIm][OctSO₄]. Il convient de noter la grande capacité de la DHFR R67 à conserver son activité pendant plusieurs jours consécutifs sous plusieurs conditions, ce qui n'est pas le cas pour la DHFRh (Figure 2.11, **B**).

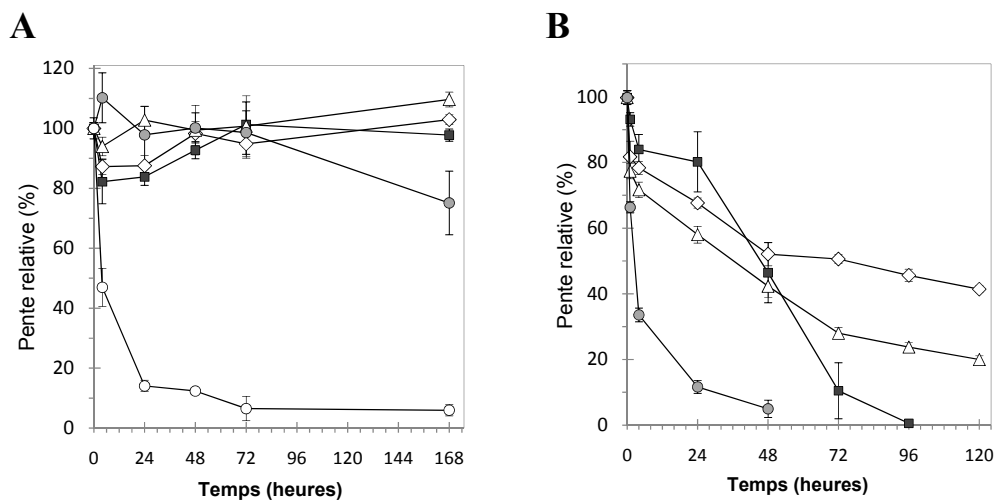


Figure 2.11. Stabilité des DHFRs en présence de co-solvants.

La pente initiale de la DHFR R67 (A) et la DHFRh (B) après incubation des enzymes en présence de co-solvants : 10% DMSO (◇), 50% [BMIm][PF₆] (△), 50% [BMIm][OctSO₄] (○), 5% [BMIm][BF₄] (●) et le contrôle (tampon phosphate 50 mM pH 7,0) (■). Les données représentent la moyenne de triplicata, et les barres d'erreur représentent l'écart-type.

La stabilité de la DHFRh à TPN est plus faible que celle de la DHFR R67, même en absence des co-solvants. L'enzyme perd 20%, 50 % et 90 % de son activité après 24, 48 et 72 heures respectivement. Les mesures d'activité des échantillons avec le DMSO et le [BMIm][PF₆] montrent une diminution d'activité par rapport au contrôle : 6% et 12% après 4 heures d'incubation et 12% et 22% après 24 heures, respectivement. Après 48 heures d'incubation de la DHFRh en présence des co-solvants, l'activité de l'enzyme dans ces deux échantillons ne diffère pas significativement de celle du contrôle : 6% plus haute dans le cas de

DMSO et 4% plus basse pour le [BMIm][PF₆]. Les observations suivantes ont montré que la DHFRh dans l'échantillon avec 10% de DMSO garde son activité plus longtemps et elle est environ 45% plus active que le contrôle pour les mesures après 72 et 96 heures. L'influence du co-solvant non-miscible, le [BMIm][PF₆], sur l'enzyme montre la même tendance que le DMSO, sauf que la DHFRh est à peu près 20% moins active. Ces deux co-solvants diminuent l'activité enzymatique au début de l'incubation par rapport au contrôle, mais après 48 heures les changements d'activité sont moins marqués (en comparaison avec le contrôle), ce qui permet de garder l'enzyme active plus longtemps. La présence du [BMIm][BF₄] dans la solution avec l'enzyme a un impact négatif plus fort sur la stabilité de la DHFRh que les deux autres co-solvants. L'enzyme perd son activité très rapidement : 66%, 34% et 12% d'activité restante après 1, 4 et 24 heures d'incubation, respectivement. Donc, ce LI n'est pas un co-solvant approprié pour la conservation de la DHFRh à long terme.

Pendant le test de stabilité des DHFRs dans différents co-solvants, nous avons remarqué une observation importante liée à la conservation de l'enzyme après sa purification. La protéine purifiée est quantifiée et conservée à -80 °C en aliquots. Avant chaque expérience, l'activité spécifique enzymatique après décongélation est vérifiée. Pour la DHFRh provenant d'une même préparation d'enzyme, la stabilité à long terme diminue de façon proportionnelle au temps de conservation de l'aliquot à -20 °C (Figure 2.12), malgré que l'activité spécifique initiale de l'enzyme après décongélation ne varie que de 10%. La différence en stabilité entre les aliquots conservés pendant soit 2 ou 3 mois devient significative, ~55%, moins stable pour un test de stabilité sur 48 heures à TPN. Après 10 mois de conservation à -20 °C, la stabilité de l'enzyme après seulement 4 heures à TPN chute à ~40%. Plus l'enzyme est fraîchement isolée, plus elle reste active longtemps à TPN. Ceci indique de ne pas utiliser la DHFRh conservée pendant plus de 2 mois à -20 °C pour les essais à long terme.

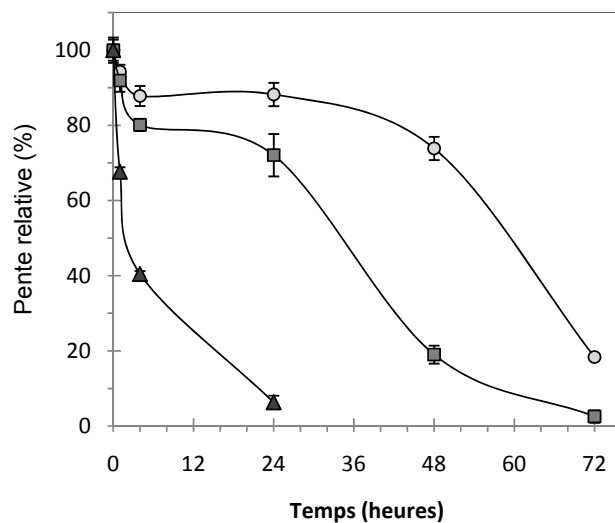


Figure 2.12. Stabilité de la DHFRh.

La pente initiale de la DHFRh en fonction du temps passé à TPN. Les mesures sont prises à différentes périodes après la purification, soit après : 2 mois (○), 3 mois (■) et 10 mois (▲).

Cependant, aucune influence de la durée de la conservation à -20 °C sur l'activité de la DHFR R67 ne fut pas observée (résultats non présentés).

2.2.3. Conclusion

Solvant approprié pour le criblage : L'activité enzymatique de la DHFR R67 a été influencée négativement par les solvants organiques. Les LIs, en même concentrations que les solvants organiques, perturbent moins l'activité de la DHFR R67. Pourtant, le haut coût et la disponibilité réduite des LIs en limitent l'accès envers une application telle le criblage. Pour la DHFRh, le meilleur solvant organique est l'ACN ou le DMF; les LIs n'ont pas donné de meilleurs résultats que ces deux solvants organiques. Cependant, le meilleur solvant pour la solubilisation des composés pour criblage d'inhibiteurs était le DMSO et dans certains cas l'ACN. Selon ces résultats, nous avons effectué le criblage de la DHFR R67 en présence de 5% ou 10% DMSO ou en présence de 10% de [BMIm][OctSO₄], selon la solubilité des composés. Les tests avec la DHFRh furent effectués en présence de 20-25% d'ACN ou de 5% de DMSO selon la solubilité des composés.

L'influence d'un LI non-miscible avec l'eau, le [BMIm][PF₆], sur les deux enzymes a été étudiée. Nous avons déterminé que 10-20% de ce LI n'affecte pas l'activité enzymatique des deux DHFRs. Par contre, aux concentrations élevées, soit plus de 50% de [BMIm][PF₆], une diminution de l'activité est observée due au moins en partie à la diminution de la concentration de la protéine dans la phase aqueuse.

Stabilité des enzymes : La stabilité des DHFRs à plus long terme en présence de LIs a été étudiée. La stabilité de la DHFR R67 a été affectée négativement par le [BMIm][OctSO₄], plus que par le [BMIm][PF₆] et [BMIm][BF₄] pendant le période de 7 jours. Il faut noter que les tests d'activité qui

seront entrepris pour le criblage d'inhibiteurs ne durent que 6-10 min et que la pente initiale est généralement calculée sur les premières 2 à 4 minutes de la réaction.

La DHFR R67 est beaucoup plus stable que la DHFRh; nous avons révélé la dépendance proportionnelle de la stabilité de la DHFRh en fonction du temps de conservation à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de l'enzyme, ce qui introduit certaines limitations dans l'application de la DHFRh pour les essais à long terme. Toutefois, la stabilité de la DHFR R67 dans différents milieux démontre que cette enzyme est suffisamment robuste pour envisager son développement comme un biocatalyseur potentiel pour la synthèse organique.

2.3. Criblage pour la découverte d'inhibiteurs de la DHFR R67

L'intention initiale dans la recherche d'inhibiteurs contre la DHFR R67 était le criblage à haut débit de 120 000 composés constituant les bibliothèques disponibles pour le criblage sur la plateforme de criblage à l'IRIC. Cependant, pendant la détermination des conditions appropriées pour le criblage, nous avons révélé l'impossibilité de réaliser le criblage dans les conditions requises pour cette enzyme à cause de la limite de détection de la lectrice à plaques de la plateforme de l'IRIC. Donc, nous nous sommes tournés vers un criblage rationnel, basé sur la ressemblance avec le substrat DHF, nous permettant d'utiliser une lectrice à plaques offrant une limite de détection compatible avec les conditions expérimentales requises.

Selon les résultats de l'activité enzymatique et en tenant compte de la solubilisation des composés d'essai, les conditions préférées pour le criblage d'inhibiteur sont, pour la DHFR R67: 10% de [BMIm][OctSO₄] ou 5-10% de DMSO et pour la DHFRh: 10-20% d'ACN ou 5-10% de DMSO. Le choix des composés pour le criblage d'inhibiteurs potentiels a été basé sur la similarité structurelle avec le substrat et le cofacteur [43, 48].

2.3.1. Les petites molécules

Comme il a été mentionné dans la section 1.2.1, l'approche de design d'une drogue à partir de fragments ("Fragment Based Drug Design") permet de construire un composé fonctionnel (l'inhibiteur dans notre cas) avec une bonne affinité pour la protéine à partir de petites molécules avec une faible affinité. Le choix de petites molécules à tester a été basé sur la ressemblance des caractéristiques stériques ou des fonctions électroniques du groupe ptéroyle du substrat DHF ou de l'anneau nicotinamide du cofacteur NADPH (Figure 2.13). Trente-trois composés ont été retenus après l'analyse manuelle de 3 850 composés disponibles dans liste des composés des laboratoires Pr. J.W. Keillor et Pr. W.D. Lubell. La liste des composés choisis, avec des structures, est disponible en Annexe 2. Puis, nous avons élaboré la méthode de criblage de ceux-ci sur la station de pipetage automatisé (Beckman Biomek) liée à une lectrice à plaques DTX 800 selon les conditions déterminées au chapitre 2.1.2. Les conditions et le protocole du criblage sont en partie expérimentale et en Annexe 3. Afin de vérifier la sélectivité de composés identifiés comme étant des inhibiteurs de la DHFR R67, ils seront ensuite testés sur l'activité enzymatique de la DHFRh en utilisant les mêmes concentrations de substrat DHF et d'inhibiteur.

Comme les composés sont simples, l'inhibition forte n'a pas été prévue. Par conséquent, ils ont été testés pour l'inhibition à des concentrations mM. Pendant l'expérience, les composés dissous dans le co-solvant sont ajoutés dans le mélange réactionnel consistant du tampon, du substrat et du cofacteur. La réaction est démarrée par l'ajout de l'enzyme. La Figure 2.13 illustre les composés **1 – 9**, qui

ont fourni de l'inhibition de la DHFR R67. Les composés **7** et **9** ont montré une inhibition non sélective car ils inhibent la DHFRh à un degré similaire (Tableau 2.2). Les composés **1** – **6** et **8** ont inhibé la DHFR R67 sélectivement, bien que faiblement, où le composé **5** a eu l'effet le plus faible. Il est à noter que les composés contenant les acides carboxyliques semblaient généralement augmenter l'activité de la DHFR R67. C'est probablement le résultat d'une légère acidification du milieu qui augmente le taux de protonation du substrat DHF [36].

Ces résultats préliminaires ont révélé les candidats potentiels pour la création d'une molécule inhibitrice plus complexe. Nous avons déterminé les valeurs d'IC₅₀ pour les composés **1** – **4**, **6** et **8**, pour une meilleure caractérisation fonctionnelle de ces composés (Tableau 2.3). À partir d'IC₅₀ et de K_M^{DHF} les valeurs de K_i ont été calculées; les constantes d'inhibitions de l'ordre du mM obtenues illustrent la faible affinité des composés à l'enzyme d'intérêt.

Au cours de l'expérience nous avons vérifié si les données obtenues sur la nouvelle station de pipetage automatisé Biomek, lié avec une lectrice à plaques DTX 800, peut produire des résultats comparables à ceux obtenus selon un protocole de pipetage manuel et de mesures du changement de l'absorbance par spectrophotomètre Varian 100. Les données obtenues par les deux méthodes sont de qualité comparable (Figure 2.14).

Les IC₅₀ pour les composés **1** et **8** ont été déterminés en utilisant 10% de [BMIm][OctSO₄] comme co-solvant. Ces données ont été confirmées par l'expérience faite avec 10% de DMSO : nous avons obtenu des valeurs dans les limites d'erreur.

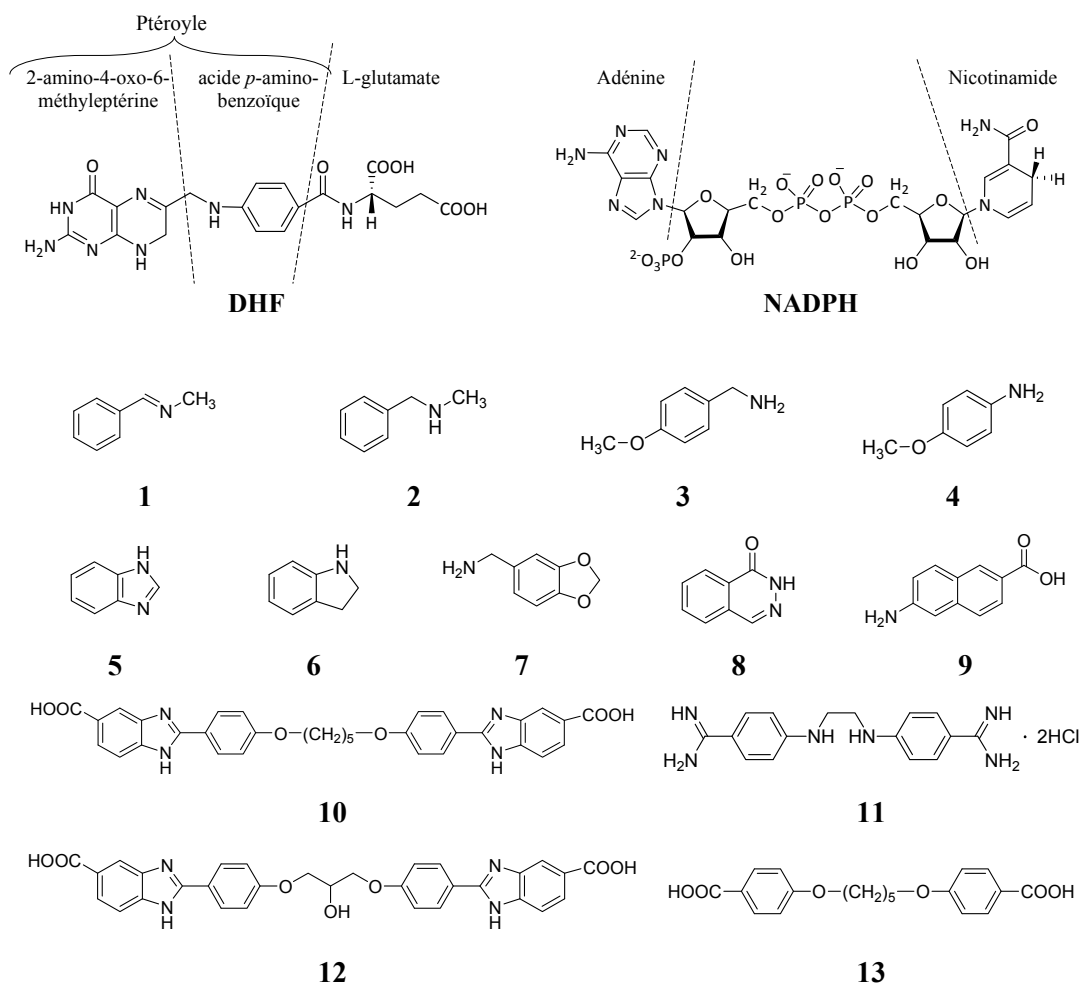


Figure 2.13. Représentation structurale des composés inhibant la DHFR R67.

(1) *N*-benzylidèneméthylamine; (2) *N*-benzylméthylamine; (3) 4-méthoxybenzylamine; (4) *p*-anisidine; (5) benzimidazole; (6) indoline; (7) pipéronylamine; (8) phtalazinone; (9) acide 6-amino-2-naphthoïque; (10) acide 2,2'-[1,5-pentanediylobis(4-oxyphénylène)]-1-benzimidazole-5-carboxylique; (11) 4,4'-[1,2-éthanediyle (*N,N'*-diméthyle bis-nitrilo)]-bis-(*N*-hydroxy benzènecarboximidamide); (12) acide 2'-(4,4'-(2-hydroxypropane-1,3-diyl)-bis(oxy)-bis(4,1-phénylène))-bis(1-benzimidazole-5-carboxylique); (13) acide 4,4'-[1,5-pentanediylobis(oxy)]-bisbenzoïque.

Tableau 2.2. Inhibition de la DHFR R67 par les composés 1 – 9.

Composé	DHFR R67 activité relative (%)		DHFRh activité relative (%)	
	2 mM	10 mM	2 mM	10 mM
1 ^a	91 ± 16	25 ± 11	98 ± 20	123 ± 10
2	47 ± 3	20 ± 4	92 ± 5	76 ± 2
3	43 ± 5	6 ± 3	111±7	87±7
4	87 ± 2	37 ± 8	104 ± 8	87 ± 4
5 ^a	101 ± 10	66 ± 10	94 ± 10	46 ± 10
6	47 ± 6	48 ± 6	106 ± 4	87 ± 9
7 ^b	46 ± 4	–	105 ± 5	34 ± 3
8 ^a	97 ± 10	10 ± 5	114 ± 7	112 ± 7
9	29 ± 12	21 ± 14	6±5	3±3

^a Les composés **1**, **5** et **8** ont été testés à 1mM et 20 mM; ^b la valeur d'activité relative à 10 mM non déterminée à cause de bruit de fond élevé.

Tableau 2.3. IC₅₀ et K_i pour les inhibiteurs sélectifs de la DHFR R67.

Composé	IC ₅₀ ^a (mM)	K _i (mM)
1	6,6 ± 0,7	0,9 ± 0,1
2	12 ± 2	20 ± 4
3	4,8 ± 0,7	0,8 ± 0,1
4	15 ± 1	2,2 ± 0,1
6	12 ± 2	1,8 ± 0,3
8	4,7 ± 1,0	0,7 ± 0,1

^a Les valeurs d'IC₅₀ pour les composés ont été déterminés par Graph Pad Prism 5 en utilisant l'équation log [inhibiteur] vs réponse et les valeurs de K_i par l'équation Cheng et Prusoff: $K_i = IC_{50} / (1 + [S]/K_M^{DHF})$ [123], en supposant le mode d'inhibition est compétitif; K_M^{DHF} utilisé pour calcul était 8,2 ± 0,1 μM [26]. Les IC₅₀ de composés **1** et **8** obtenus en présence de LI approprié comme co-solvant (10 % de [BMIm][OctSO₄]) ont été confirmés en utilisant 5% de DMSO comme co-solvant.

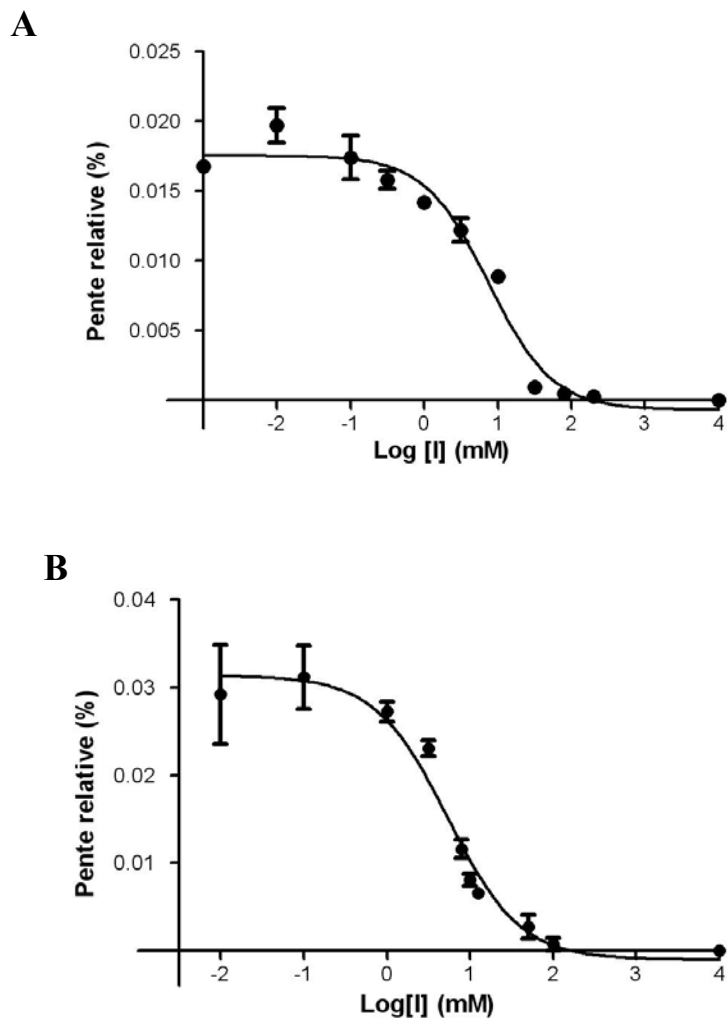


Figure 2.14. Comparaison de la qualité des données.

Représentation graphique de la détermination d' IC_{50} du composé **1**, obtenue au moyen de : (A) la lectrice à plaques DTX 800 liée avec la station de pipetage Biomek.; (B) le spectrophotomètre Varian 100 et le pipetage manuel. Les valeurs d' IC_{50} sont de $6,6 \pm 0,7$ mM et de $5,6 \pm 0,9$ mM pour A et B respectivement; le coefficient de régression est de 0,94 et 0,96 pour A et B respectivement.

Parmi des composés inhibiteurs de la DHFR R67 (**1 – 9**), nous avons choisi les composés **1**, **5** et **8** qui comprennent une liaison imine (Figure 2.13) pour vérifier s'ils peuvent être réduits par la DHFR R67 en présence NADPH, et peuvent ainsi servir de substrats alternatifs. Ces composés ont été testés en absence du substrat DHF en concentration de 20 mM. Aucune activité enzymatique n'a été observée. Probablement, les interactions entre l'enzyme et ces composés ne sont pas formées de façon appropriée et la position de liaison imine du composé dans le site actif de l'enzyme par rapport à l'anneau nicotinamide du cofacteur, donneur d'hydrure, ne favorise pas le transfert et, donc, la réaction n'a pas lieu.

2.3.2. Les composés poly-hétérocycliques

La prochaine étape dans la recherche d'un composé primaire à partir de fragments, est de tester des molécules plus complexes composées de petites molécules avec une affinité faible. En collaboration avec le laboratoire de Pr. J.J. Vanden Eynde, l'Université de Mons, Belgique, nous avons obtenu 8 composés biologiquement actifs (communication personnelle, Dr. Delphine Forge, Université de Mons, Belgique). Nous avons eu des difficultés avec leur solubilisation : 4 composés n'étaient solubles que dans le DMSO 100% donc ne sont pas appropriés pour les essais enzymatiques. Quatre autres composés étaient solubles à 10% de DMSO, dont 2 étaient solubles en 10% de LI [BMIm][OctSO₄]. Ces quatre composés solubles sont représentés à la Figure 2.13, **10 – 13**. Les composés **10** et **12** possèdent des propriétés bactériostatiques, le **13** est actif contre *Pneumocystis carinii* et le **11** est actif contre la tuberculose ainsi que contre divers modèles de blessures neurologiques [124]. Les cycles aromatiques des substituants de ces

composés symétriques poly-hétérocycliques, comprennent des fragments qui ressemblent stériquement et électroniquement aux composés **1** – **5**, déterminés comme inhibiteurs faibles mais sélectifs de la DHFR R67, dont le composé **5** était le plus faible (Tableau 2.2). En dépit de l'inhibition non sélective du composé **9**, les acides carboxyliques ont été suggérés comme une caractéristique souhaitable, car qu'elles imitent les groupements acides du constituant glutamate du DHF ainsi que les groupements phosphate du NADPH. Des essais préliminaires ont été effectués utilisant 10% de DMSO comme co-solvant et 1 mM des composés **10** – **13** (Tableau 2.4), révélant que les composés **10**, **12** et **13** offrent l'inhibition sélective de la DHFR R67. Les composés **11** [124] et **12** sont solubles dans 10% de [BMIm][OctSO₄], permettant de répéter les tests d'inhibition sous ces conditions. Dans le cas de composé **11**, nous avons obtenu les mêmes résultats que ceux obtenus avec 10% de DMSO. Par contre, l'inhibition de la DHFR R67 par le composé **12** était plus faible en présence de [BMIm][OctSO₄], comparativement à celle en présence de DMSO pour la même concentration de composé. À 1 mM de composé **12** solubilisé dans le LI, l'enzyme était à 70% de son activité initiale. Lorsque ce composé est solubilisé dans le DMSO à une même concentration, la DHFR R67 est inhibée au complet (Annexe 4). Ceci suggère la possibilité d'interactions inconnues entre le LI et le composé. Ces interactions pourraient affecter son affinité à la protéine.

Le mode d'inhibition de la DHFR R67 ainsi que les K_i pour le composé **13** ont été déterminés par une expérience effectuée à des concentrations variables de substrat et d'inhibiteur selon le modèle de Dixon [125]. La Figure 2.15 montre que le composé **13** est un inhibiteur compétitif du substrat DHF, suggérant que la liaison de l'inhibiteur se fait dans la cavité du site actif. Il n'a pas été possible de déterminer le mode d'inhibition par rapport au cofacteur NADPH, parce que les données doivent être collectées à des concentrations près du K_M , où le K_M^{NADPH} faible 1,6 μM donne lieu à un signal faible, près de bruit du fond.

Tableau 2.4. Inhibition de la DHFR R67 et de la DHFRh par les composés 10 – 13.

Composé	DHFR R67			DHFRh
	activité relative ^a (%)	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)	activité relative ^a (%)
10	19 ± 4	57 ± 10	8,0 ± 1,4	96 ± 13
11	56 ± 5	350 ± 36	50 ± 5	66 ± 5
12	0,5 ± 0,8	76 ± 14	11 ± 2	100 ± 6
13	28 ± 1	41 ± 9	5,8 ± 1,3	80 ± 11

^a L'activité relative de l'enzyme mesurée en présence de 1 mM du composé.

En parallèle avec l'expérience de détermination du mode d'inhibition, des études de modélisation moléculaire ont été effectuées par D. Bastien. L'arrimage moléculaire a été effectué en utilisant la structure cristalline de la DHFR R67 (2RK1.PDB) [43] et les composés **10 – 13**, avec le logiciel Molegro Virtual Docker 4.0.0. Les résultats obtenus appuient l'hypothèse de la liaison dans la cavité du site actif, tel que suggéré par l'observation d'inhibition compétitive. Les résultats d'arrimage du composé **12** sont illustrés à l'Annexe 5, à titre représentatif.

La détermination des IC₅₀ et des K_i (Tableau 2.4) montrent que les composés **10 – 13** offrent des constantes d'inhibition de l'ordre du μM, ce qui confirme l'efficacité de l'approche du design d'une drogue à partir de fragments. Parmi les

quatre composés testés, **10**, **12** et **13** offrent l'inhibition avec la plus forte affinité à la DHFR R67 tout en étant sélectifs.

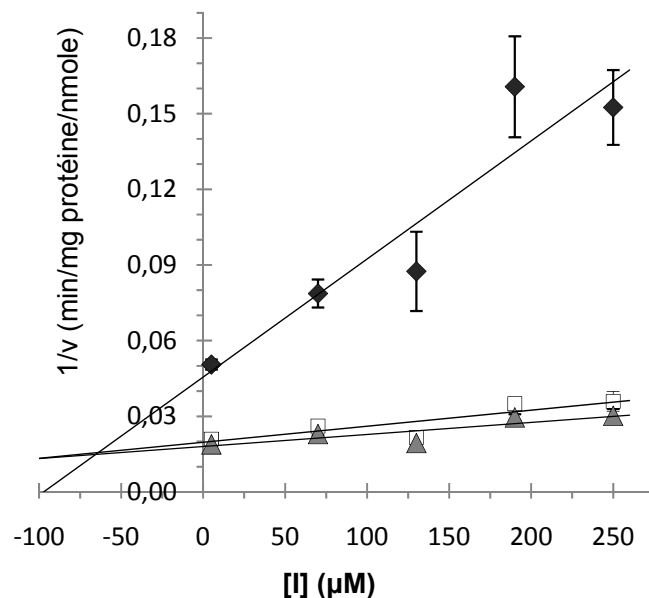


Figure 2.15. Détermination du type d'inhibition par le modèle de Dixon.

L'inhibition compétitive de la DHFR R67 par le composé **13** contre le substrat DHF déterminée par graphique de Dixon : l'inverse de la vitesse de réduction du DHF ($1/v$) en fonction de la concentration d'inhibiteur $[I]$. Les paramètres expérimentaux : l'enzyme est saturée par le cofacteur, soit à une concentration $\sim 30 \times K_M^{\text{NADPH}}$; les concentrations du substrat : $1 \times K_M$ (\blacklozenge), $3 \times K_M$ (\square), and $30 \times K_M$ (\triangle); le co-solvant utilisé pour la solubilisation de l'inhibiteur est 10% de DMSO dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7,0. L'intersection des droites au dessous de l'axe $[I]$ correspond à l'inhibition compétitive [125]; (voir section 4. Partie expérimentale, détermination du mode d'inhibition).

2.3.3. Conclusion

Comparaison de deux systèmes pour les mesures d'activité : Les données obtenues sur la nouvelle station de pipetage automatisée Biomek liée avec la lectrice à plaques DTX 800 (Beckman Coulter) sont de bonne qualité. La variation de 7 à 10% de valeurs d'écart types obtenus, indique que les valeurs mesurées sont fiables. Ces données sont comparables à celles obtenues sur un appareil plus précis, le spectrophotomètre suite à un pipetage manuel, mais permettent une expérimentation plus rapide.

Résultats du criblage : Nous avons identifié 9 molécules inhibitrices de la DHFR R67 possédant une faible affinité à la protéine, parmi lesquelles 7 composés, **1 – 4, 6 et 8** (Tableau 2.3), sont sélectifs par rapport à la DHFRh. Le test de composés plus complexes comprenant dans leur structure des fragments des molécules identifiées comme inhibiteurs faibles, a montré l'augmentation d'affinité entre les composés et la protéine. Le groupement carboxylique de la partie glutamate du DHF joue un rôle important dans les interactions entre le substrat et l'enzyme [55]. Ce dernier suggère donc la présence de ce groupe dans les structures de composés **10, 12 et 13**, qui peuvent contribuer à une augmentation de l'affinité entre l'inhibiteur et la DHFR R67. Cette hypothèse corrèle avec les résultats expérimentaux : tous les trois possèdent une meilleure affinité à l'enzyme par rapport au composé **11** (Tableau 2.4). Ces composés poly-hétérocycliques ont été identifiés comme des inhibiteurs sélectifs prometteurs pour la DHFR R67. Les études de modélisation virtuelle, effectués par D. Bastien, ont proposé le modèle des interactions entre la protéine et le composé **12**; le mode d'inhibition déterminé

par arrimage moléculaire a été confirmé expérimentalement par graphique de Dixon : l'inhibition est compétitive.

Pendant ces expériences nous avons observé un différent degré d'inhibition par le même composé en présence de co-solvants différents. Le composé **12** en présence de LI [BMIm][OctSO₄] perd son efficacité comme inhibiteur par rapport à celle en présence de DMSO. Ce dernier résultat suggère la possibilité des interactions entre LI et l'inhibiteur, ce qui pourra être étudié dans le futur.

La vérification des composés inhibiteurs contenant une liaison imine dans leur structure, n'a pas révélé des molécules pouvant servir comme substrat alternatif.

3. Conclusion générale et perspectives

Le but initial de cette étude était de proposer une approche dans la recherche d'inhibiteurs sélectifs pour la DHFR R67 et de développer une méthode pour l'identification des molécules primaires qui peuvent être optimisées dans les études suivantes. Notre première intention dans la réalisation de ce projet était l'utilisation de la plateforme de criblage à haut débit de l'IRIC, qui permet de tester 120 000 composés dans un court laps de temps. Pour la réalisation de ce criblage chimique, nous avons besoin de quantités suffisantes de l'enzyme. Nous avons donc optimisé le protocole de purification de la DHFR R67 par FPLC. Grâce à la chromatographie par affinité d'ions métalliques immobilisés (IMAC) et de la chromatographie d'exclusion stérique (GFC) nous avons obtenu la DHFR R67 en pureté ~ 95% et en quantité suffisantes pour le criblage, augmentant de 6 fois le rendement de purification. Les conditions pour le criblage d'inhibiteurs ont été déterminées; cependant, la vérification des conditions requises pour donner un facteur Z' acceptable avec la lectrice à plaques. En place à la plateforme de criblage de l'IRIC, a révélé l'impossibilité de la réalisation de cette analyse à cause de la limite de détection de l'appareil. Par contre, d'autres lectrices à plaque plus sensibles, donnent un facteur Z' excellent, furent identifiées, permettant la poursuite d'approches alternatives à la découverte d'inhibiteurs.

Donc, une autre approche dans la recherche d'inhibiteur a été proposée : le design rationnel basé sur des petits composés primaires avec une faible affinité. En tenant compte de la faible solubilité aqueuse des composés organiques qui furent testés comme inhibiteurs faibles de la DHFR R67, nous avons étudié l'influence de

plusieurs solvants organiques et aussi des solvants alternatifs, les LIs, sur l'activité enzymatique, afin d'identifier des co-solvants compatibles avec l'enzyme DHFR R67. Le comportement des DHFRs en présence de LIs n'avait pas été étudié auparavant. Les LIs ont des propriétés physicochimiques avantageuses par rapport à celles des solvants organiques et peuvent servir d'environnement alternatif pour les essais enzymatiques. Dépendamment de la composition des LIs, leur effet sur l'activité enzymatique peut être modifié; il ne peut pas être prédit (s'avère empirique). Les co-solvants retenus pour les tests avec la DHFR R67 à court terme sont le DMSO de 5 à 10% et 10% de [BMIm][OctSO₄]. Les résultats d'études de la stabilité à long terme de la DHFR R67 dans les co-solvants ont montré un haut potentiel de leur stabilité dans toutes les conditions testées, sauf le LI [BMIm][OctSO₄]. Pourtant, les résultats du criblage ne furent pas affectés par l'influence à plus long terme de [BMIm][OctSO₄] sur la stabilité de la DHFR R67. De plus, les données, obtenues en utilisant le [BMIm][OctSO₄] comme co-solvant pour la solubilisation des composés, ont été confirmées par les résultats obtenus en utilisant le DMSO comme co-solvant. Les tests de stabilité des enzymes en présence de LIs peuvent nous donner des idées pour les applications futures, tel que le SPR, l'immobilisation, etc.

En parallèle avec les tests d'inhibition de la DHFR R67, nous avons vérifié la susceptibilité de la DHFRh aux mêmes composés. Nous avons donc déterminé le comportement de la DHFRh face aux mêmes co-solvants. Les co-solvants retenus pour cette enzyme sont l'ACN en concentrations jusqu'à 25%, ou 5% de DMSO. La DHFRh incubée avec les co-solvants à long terme n'est pas stable : son activité enzymatique a été affectée significativement après 4 h d'incubation. Au cours de cette étude, nous avons observé une réduction de la stabilité de la DHFRh lorsqu'elle est entreposée à -20 °C à long terme. Cette observation est de grande importance pour plusieurs autres projets en cours au laboratoire.

Globalement, cette étude de co-solvants a permis la comparaison des propriétés des deux DHFRs sans relation structurelle, en présence d'une variété d'agents potentiellement dénaturants. Cette comparaison avait, comme avantage, que les réactifs utilisés par les deux DHFRs sont identiques, permettant une constance des conditions d'étude et donc, une comparaison non-biaisée. Ces études ont révélé la haute stabilité de la DHFR R67 sous plusieurs conditions. Ceci rend cette enzyme attrayante pour applications prochirales comme biocatalyseur dans la réduction d'imines.

Les résultats de criblage rationnel basé sur la ressemblance structurelle au substrat et au cofacteur, nous ont permis de révéler les composés prometteurs comme inhibiteurs sélectifs de la DHFR R67. Les tests des composés plus complexes qui comprennent les fragments identifiés ont confirmé l'efficacité de l'approche de la construction d'un inhibiteur sélectif plus puissant à partir des fragments. Cette approche est un moyen puissant dans la recherche d'inhibiteurs pour la DHFR R67; elle permet d'augmenter les chances de révéler des nouveaux fragments pour la construction de "lead compound" et peut changer soit l'affinité ou soit la sélectivité de nouveaux composés. De plus, les données obtenues peuvent être utiles dans le développement des études sur la DHFR R67 comme biocatalyseur potentiel.

Un autre aspect de l'étude des composés poly-hétérocycliques a été développé par D. Bastien : la modélisation moléculaire. Les résultats d'arrimage moléculaire ont eu bonne corrélation avec les données expérimentales. Pour confirmer ces résultats, des études cristallographiques ont été proposées afin d'identifier les interactions entre l'enzyme et l'inhibiteur. Outre cela, la modélisation moléculaire peut servir d'outils dans l'analyse des composés comme des inhibiteurs potentiels pour la DHFR R67. Les banques électroniques de composés Maybridge et Chembridge seront analysées pour diminuer le nombre

d'essais enzymatiques requis et, en même temps, augmenter les chances de déterminer des molécules fonctionnelles, et, ainsi, diminuer le coût de l'analyse.

4. Partie expérimentale

Matériel

Les solvants organiques ont été livrés de la compagnie EMD Chemicals (Gibbstown, NJ); le diméthyleformamide (DMF) était d'A&C American Chemicals LTD (Montréal, QC); le diméthylesulfoxyde (DMSO) and le méthanol (MeOH) étaient de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ); le tétrahydrofurane (THF) était d'EM Science, Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Les liquides ioniques ont été achetés auprès de Fluka, d'Alfa Aesar (Haverhill, MA) ou ont été synthétisés tel que décrit par Gauchot *et al* [126]. Le dihydrofolate (DHF) a été synthétisé à partir d'acide folique tel que décrit par Blakley [127]. Le β -NADPH a été acheté auprès d'Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Tous les autres réactifs ont été obtenus de BioShop Canada inc. (Burlington, ON). Les composés criblés viennent de la compagnie Sigma-Aldrich; l'acide usnique vient d'un collaborateur : J. Sorrensen (Université du Manitoba).

Méthodologie

Surexpression d'enzyme. La DHFR R67 de type II, sauvage : la séquence de la protéine, portant à son extrémité N-terminale une queue de polyhistidine (His-tagged) [26], a été surexprimée dans *E. coli* BL21 comprenant le plasmide pRep4 (Qiagen, Mississauga, ON). Une culture bactérienne confluite (3 mL) a été

ajoutée au milieu Terrific Broth (1 L; 100 µg/mL d'ampicilline et 50 µg/mL de kanamycine) pour incubation à 37 °C et 250 rpm jusqu'à une DO₆₀₀ d'approximativement 0,7. L'expression de la protéine a été induite par l'addition d'isopropyle β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Bioshop, Burlington, ON) en concentration de 1 mM, avec incubation à 37 °C pendant 3 h. Les cellules ont été récoltées par centrifugation (30 min, 4000 g, 4 °C). Le culot cellulaire a été remis en suspension dans 30 mL de tampon de lyse (0,1 M phosphate de potassium, 5 mM d'imidazole, pH 8,0), et les cellules ont été lysées par un passage à travers un fractionnateur de cellules (Constant Systems, Kennesaw, GA) ajusté à 27 kpsi. Un supplément de 10 mL du tampon de lyse a été ajouté comme lavage résiduel de l'appareil. Après centrifugation (30 min, 23 500 g, 4 °C) et filtration sous filtre de 0,22 µm, le surnageant a été purifié (ci-dessous).

La DHFRh a été surexprimée dans *E. coli* BL21 (DE3) et purifiée tel que décrit par Volpato & Yachnin [128].

Purification de la DHFR R67. La purification de la DHFR R67, portant une queue de polyhistidine (His-tagged) a été effectuée suivant un protocole de purification par chromatographie d'affinité sur métal immobilisé (IMAC), sur une colonne de 5 mL de Ni-NTA Sépharose, à débit rapide (His-Trap, FF, GE Healthcare, Piscataway, NJ), utilisant un système Akta FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography) (GE Healthcare) à 4 °C. Tout d'abord, le surnageant a été appliqué sur la colonne et suivi d'un lavage avec 12 volumes de colonne (VC) de tampon phosphate de potassium 100 mM pH 8,0 avec 5 mM d'imidazole, à un débit de 1,5 mL/min. Un gradient linéaire (6 VC) jusqu'à un plateau (6 VC) à 30 mM d'imidazole a été suivi d'une étape à 300 mM imidazole pour l'élution. Le protocole détaillé de la programmation du FPLC est fourni à l'Annexe 6. Les fractions contenant la DHFR R67 ont été identifiées en fonction de tests d'activité

et d'analyses par électrophorèse Tricine-SDS-PAGE [117]. Les fractions d'intérêt ont été combinées pour dialyse à 4 °C dans un tampon phosphate de potassium 100 mM pH 8,0 à l'aide d'un tube de dialyse ayant une limite de poids moléculaire de 3 500 Da (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA). La concentration de la protéine a été déterminée en utilisant le dosage des protéines Bio-Rad, une méthode basée sur l'analyse de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en tant que protéine de référence.

Essais enzymatiques des dihydrofolate réductases. Les substrats ont été quantifiés par spectrophotométrie en présence de tampon phosphate de potassium (50 mM pH 8,0). Le coefficient d'absorptivité molaire pour le NADPH et le DHF est $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6\,200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et $\epsilon_{282 \text{ nm}} = 28\,400 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivement [27]. L'activité enzymatique a été déterminée par le suivi de la consommation de NADPH et de DHF à 340 nm ($\Delta\epsilon_{340 \text{ nm}} = 12\,300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [119]). Certains composés testés en tant qu'inhibiteurs ont contribué à une absorption de fond excessive à une longueur d'onde de 340 nm. Dans ces cas, l'activité a été suivie à 350 nm ou à 360 nm, où le $\Delta\epsilon$ observé pour la réaction est de $10\,100 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et de $6\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, ou $79 \pm 3\%$ et $47 \pm 3\%$ de $\Delta\epsilon_{340 \text{ nm}}$, respectivement. Afin de minimiser les volumes réactionnels, en particulier lors de l'utilisation des liquides ioniques ou des inhibiteurs potentiels, les tests ont généralement été réalisés dans des plaques de 96-puits ou de 384-puits avec un volume réactionnel de 200 μL ou de 100 μL respectivement. La manipulation des liquides a été principalement réalisée en utilisant une station de pipetage automatisée Biomek NX^P (Beckman Coulter, Brea, CA) et les données recueillies avec la lectrice à plaques intégrée Beckman DTX 880. Le protocole détaillé de la manipulation automatisée des liquides est donné dans l'Annexe 3. Lorsque le volume réactionnel fut augmenté jusqu'à 1 mL, l'activité a été suivie dans des cuvettes en quartz de chemin optique

de 1 cm avec un spectrophotomètre UV/Vis Cary 100 Bio (Varian Canada Inc, Montréal, QC).

Analyse des données. L'activité enzymatique a été suivie par le changement de l'absorbance en fonction du temps. Selon la loi de Beer-Lambert, nous avons calculé le ΔA , où $\Delta A = A_i - A_0$, qui correspond à 10% de la conversion de substrat en produit. La pente initiale correspondant à la vitesse initiale, a été déterminée selon l'équation : $pente = \Delta A / \Delta t$, tel qu'illustré ci-dessous (Figure 4.1).

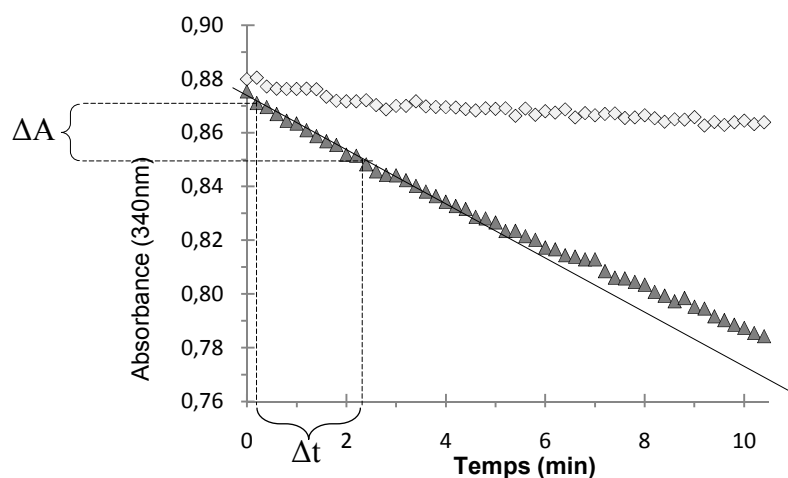


Figure 4.1. Changement du signal pendant la réaction catalysée par la DHFR.

Représentation graphique du changement de l'absorbance due à la diminution de la concentration de substrat et de cofacteur pendant la réduction du DHF par la DHFR : (▲) l'échantillon avec l'enzyme et (◇) le contrôle sans enzyme. La ΔA et la Δt correspondent à la partie linéaire de la courbe et à la période de temps où le changement ΔA est effectué.

Les valeurs de la pente initiale ont été corrigées par le blanc calculé de la même façon que les échantillons. Chaque essai a été fait en triplicata, la valeur moyenne a été calculée à l'aide de logiciel Microsoft Excel; l'erreur (écartype, σ) a été calculé selon l'Équation 4.1 (avec Excel) :

Équation 4.1

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}},$$

où x est la moyenne de l'échantillon et n est la taille de l'échantillon.

Criblage d'inhibiteurs. Le criblage des inhibiteurs a été effectué au moyen de la station de pipetage automatisé Beckman Biomek NX (tête "Span-8") liée avec une lectrice à plaques DTX 800 (Beckman Coulter). La solubilité maximale de chaque composé a été testée jusqu'à 100 mM dans les co-solvants purs et après dans les systèmes appropriés de co-solvants (généralement 10% de co-solvant dans une solution aqueuse tamponnée, sauf indication contraire). Pour les tests d'inhibition, chaque composé a été dissout dans le co-solvant pur et repris dans le tampon de la réaction contenant les substrats, où la concentration finale de co-solvant est généralement de 10%, sauf indication contraire. Les concentrations finales de NADPH et de DHF étaient de 50 μ M (~ 30 et $\sim 6 \times K_M$ [26] respectivement, pour la DHFR R67; ou ~ 200 et $\sim 650 \times K_M$ [27, 28], respectivement, pour la DHFRh). Ces paramètres ont fourni un signal spectrophotométrique clair. Les réactions sont initiées par l'addition de 250 nM de DHFR R67 ou 56 nM de DHFRh. Les pentes initiales (généralement moins de 10% de conversion du substrat) ont été déterminées. La conversion au produit par rapport au contrôle (en absence du composé testé) a également été suivie.

Détermination du mode d'inhibition. Le graphique de Dixon est souvent utilisé pour la détermination du mode d'inhibition et de la valeur du K_i . Le graphique de Dixon, préparé tel que décrit par Kakkar *et al* [129], représente l'inverse de la vitesse inverse de la réduction de substrat ($1/v$) en fonction de la concentration d'inhibiteur $[I]$. L'Équation 4.2 régissant cette relation est donnée ci-dessous [125, 130] :

Équation 4.2
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M \cdot [I]}{V_{MAX} \cdot [S] \cdot K_i} + \frac{1}{V_{MAX}} \left(1 + \frac{K_M}{[S]}\right)$$

Pour l'estimation du K_i , trois séries de mesures de la vitesse initiale ont été effectuées à trois concentrations de substrat, où $[S]_1$ représente la concentration de substrat non saturante, $[S]_3$ est la concentration saturante et la concentration $[S]_2$ est entre $[S]_1$ et $[S]_3$. Les trois droites $(1/v) f [I]$ sont tracées (Figure 4.2).

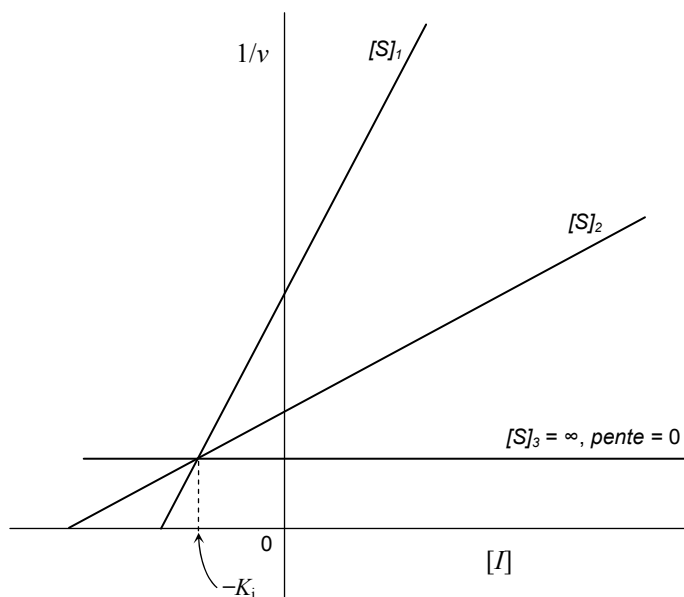


Figure 4.2. Exemple du modèle de Dixon pour l'inhibition compétitive.

La pente positive représente l'impact de l'inhibiteur sur l'activité enzymatique (Équation 4.3) :

Équation 4.3
$$pente = \frac{K_M}{V_{MAX} \cdot K_i} + \frac{1}{[S]}$$

L'augmentation de la concentration de substrat diminue l'influence de l'inhibiteur compétitif et dans le cas de $[S]$ trop élevée, la croissance de $[I]$ n'aura pas d'effet d'inhibition sur la vitesse initiale de la réaction. Le point d'intersection des droites correspond à la valeur inverse de K_i : $[I] = -K_i$. Puisque l'intersection des droites est au dessus de l'axe $[I]$, l'inhibition est compétitive [125, 130].

5. Bibliographie

1. Wolfenden, R. and M.J. Snider, *The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts*. Acc Chem Res, 2001. **34**(12): p. 938-45.
2. Alberts, B., et al., *Agents pathogènes, infection et immunité innée*, in *Biologie moléculaire de la cellule*, F. Médecine-Sciences, Editor. 2004: Paris. p. 1423-1463.
3. Griffin, M.O., et al., *Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(3): p. C539-48.
4. Tritton, T.R., *Ribosome-tetracycline interactions*. Biochemistry, 1977. **16**(18): p. 4133-4138.
5. Mattei, P.J., D. Neves, and A. Dessen, *Bridging cell wall biosynthesis and bacterial morphogenesis*. Curr Opin Struct Biol, 2010. **20**(6): p. 749-55.
6. Livermore, D.M., *beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance*. Clin Microbiol Rev, 1995. **8**(4): p. 557-84.
7. Moellering, R.C., Jr., *Past, present, and future of antimicrobial agents*. Am J Med, 1995. **99**(6A): p. 11S-18S.
8. Hawkey, P.M., *The origins and molecular basis of antibiotic resistance*. BMJ, 1998. **317**(7159): p. 657-60.
9. Wright, G.D., *Mechanisms of resistance to antibiotics*. Curr Opin Chem Biol, 2003. **7**(5): p. 563-9.
10. Gaspard, P., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus contamination of healthcare workers' uniforms in long-term care facilities*. Journal of Hospital Infection, 2009. **71**(2): p. 170-175.
11. Cody, V., J.R. Luft, and W. Pangborn, *Understanding the role of Leu22 variants in methotrexate resistance: comparison of wild-type and Leu22Arg variant mouse and human dihydrofolate reductase ternary crystal complexes with methotrexate and NADPH*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2005. **61**(Pt 2): p. 147-55.
12. Matthews, D.A., et al., *Dihydrofolate reductase. The stereochemistry of inhibitor selectivity*. J Biol Chem, 1985. **260**(1): p. 392-9.

13. Volz, K.W., et al., *Crystal structure of avian dihydrofolate reductase containing phenyltriazine and NADPH*. J Biol Chem, 1982. **257**(5): p. 2528-36.
14. Bowman, A.L., M.G. Lerner, and H.A. Carlson, *Protein flexibility and species specificity in structure-based drug discovery: dihydrofolate reductase as a test system*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(12): p. 3634-40.
15. Chu, E. and C.J. Allegra, *Antifolates*, in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, B.A. Chabner and D.L. Longo, Editors. 1996, Lippincott-Raven: Philadelphia, PA. p. 149-212.
16. Appleman, J.R., et al., *Kinetics of the formation and isomerization of methotrexate complexes of recombinant human dihydrofolate reductase*. J Biol Chem, 1988. **263**(21): p. 10304-13.
17. Burman, L.G., *The antimicrobial activities of trimethoprim and sulfonamides*. Scand J Infect Dis, 1986. **18**(1): p. 3-13.
18. Then, R.L., *Mechanisms of resistance to trimethoprim, the sulfonamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole*. Rev Infect Dis, 1982. **4**(2): p. 261-9.
19. Grey, D., J.M. Hamilton-Miller, and W. Brumfitt, *Incidence and mechanisms of resistance to trimethoprim in clinically isolated gram-negative bacteria*. Chemotherapy, 1979. **25**(3): p. 147-56.
20. Amyes, S.G. and J.T. Smith, *The purification and properties of the trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase mediated by the R-factor, R388*. Eur J Biochem, 1976. **61**(2): p. 597-603.
21. Fleming, M.P., N. Datta, and R.N. Gruneberg, *Trimethoprim resistance determined by R factors*. Br Med J, 1972. **1**(5802): p. 726-8.
22. White, P.A. and W.D. Rawlinson, *Current status of the aadA and dfr gene cassette families*. J Antimicrob Chemother, 2001. **47**(4): p. 495-6.
23. Huovinen, P., *Trimethoprim resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 1987. **31**(10): p. 1451-6.
24. Pattishall, K.H., et al., *Two distinct types of trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified by R-plasmids of different compatibility groups*. J Biol Chem, 1977. **252**(7): p. 2319-23.
25. Howell, E.E., et al., *A second-site mutation at phenylalanine-137 that increases catalytic efficiency in the mutant aspartate-27----serine Escherichia coli dihydrofolate reductase*. Biochemistry, 1990. **29**(37): p. 8561-9.
26. Schmitzer, A.R., F. Lepine, and J.N. Pelletier, *Combinatorial exploration of the catalytic site of a drug-resistant dihydrofolate reductase: creating alternative functional configurations*. Protein Eng Des Sel, 2004. **17**(11): p. 809-19.

27. Volpato, J.P., E. Fossati, and J.N. Pelletier, *Increasing methotrexate resistance by combination of active-site mutations in human dihydrofolate reductase*. J Mol Biol, 2007. **373**(3): p. 599-611.
28. Huang, S., et al., *Role of lysine-54 in determining cofactor specificity and binding in human dihydrofolate reductase*. Biochemistry, 1990. **29**(35): p. 8063-9.
29. Jackson, M., et al., *Calorimetric studies of ligand binding in R67 dihydrofolate reductase*. Biochemistry, 2005. **44**(37): p. 12420-33.
30. Brisson, N. and T. Hohn, *Nucleotide sequence of the dihydrofolate-reductase gene borne by the plasmid R67 and conferring methotrexate resistance*. Gene, 1984. **28**(2): p. 271-4.
31. Fling, M.E., L. Walton, and L.P. Elwell, *Monitoring of plasmid-encoded, trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase genes: detection of a new resistant enzyme*. Antimicrob Agents Chemother, 1982. **22**(5): p. 882-8.
32. Swift, G., B.J. McCarthy, and F. Heffron, *DNA sequence of a plasmid-encoded dihydrofolate reductase*. Mol Gen Genet, 1981. **181**(4): p. 441-7.
33. Zolg, J.W. and U.J. Hanggi, *Characterization of a R plasmid-associated, trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase and determination of the nucleotide sequence of the reductase gene*. Nucleic Acids Res, 1981. **9**(3): p. 697-710.
34. Recchia, G.D. and R.M. Hall, *Gene cassettes: a new class of mobile element*. Microbiology, 1995. **141**(12): p. 3015-3027.
35. Broad, D.F. and J.T. Smith, *Classification of trimethoprim-resistant dihydrofolate reductases mediated by R-plasmids using isoelectric focussing*. Eur J Biochem, 1982. **125**(3): p. 617-22.
36. Holland, J.C., et al., *Does R67 dihydrofolate reductase possess a proton donor?* Adv Exp Med Biol, 1993. **338**: p. 493-8.
37. Matthews, D.A., et al., *Crystal structure of a novel trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified in Escherichia coli by R-plasmid R67*. Biochemistry, 1986. **25**(15): p. 4194-204.
38. Stone, D. and S.L. Smith, *The amino acid sequence of the trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified in Escherichia coli by R-plasmid R67*. J Biol Chem, 1979. **254**(21): p. 10857-61.
39. Narayana, N., et al., *A plasmid-encoded dihydrofolate reductase from trimethoprim-resistant bacteria has a novel D2-symmetric active site*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(11): p. 1018-25.

40. Park, H., et al., *Mechanistic studies of R67 dihydrofolate reductase. Effects of pH and an H62C mutation.* J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2252-8.
41. Alonso, H. and J.E. Gready, *Integron-sequestered dihydrofolate reductase: a recently redeployed enzyme.* Trends Microbiol, 2006. **14**(5): p. 236-42.
42. Howell, E.E., *Searching sequence space: two different approaches to dihydrofolate reductase catalysis.* Chembiochem, 2005. **6**(4): p. 590-600.
43. Krahn, J.M., et al., *Crystal structure of a type II dihydrofolate reductase catalytic ternary complex.* Biochemistry, 2007. **46**(51): p. 14878-88.
44. Bystroff, C. and J. Kraut, *Crystal structure of unliganded Escherichia coli dihydrofolate reductase. Ligand-induced conformational changes and cooperativity in binding.* Biochemistry, 1991. **30**(8): p. 2227-39.
45. Bystroff, C., S.J. Oatley, and J. Kraut, *Crystal structures of Escherichia coli dihydrofolate reductase: the NADP⁺ holoenzyme and the folate.NADP⁺ ternary complex. Substrate binding and a model for the transition state.* Biochemistry, 1990. **29**(13): p. 3263-77.
46. Nichols, R., et al., *Titration of histidine 62 in R67 dihydrofolate reductase is linked to a tetramer<-->two-dimer equilibrium.* Biochemistry, 1993. **32**(7): p. 1695-706.
47. Sawaya, M.R. and J. Kraut, *Loop and subdomain movements in the mechanism of Escherichia coli dihydrofolate reductase: crystallographic evidence.* Biochemistry, 1997. **36**(3): p. 586-603.
48. Alonso, H., et al., *Multiple ligand-binding modes in bacterial R67 dihydrofolate reductase.* J Comput Aided Mol Des, 2005. **19**(3): p. 165-87.
49. Bradrick, T.D., J.M. Beechem, and E.E. Howell, *Unusual binding stoichiometries and cooperativity are observed during binary and ternary complex formation in the single active pore of R67 dihydrofolate reductase, a D2 symmetric protein.* Biochemistry, 1996. **35**(35): p. 11414-24.
50. Howell, E.E., et al., *Functional role of aspartic acid-27 in dihydrofolate reductase revealed by mutagenesis.* Science, 1986. **231**(4742): p. 1123-8.
51. Wang, Y., et al., *Isolation of rat dihydrofolate reductase gene and characterization of recombinant enzyme.* Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(9): p. 2517-23.
52. Oefner, C., A. D'Arcy, and F.K. Winkler, *Crystal structure of human dihydrofolate reductase complexed with folate.* Eur J Biochem, 1988. **174**(2): p. 377-85.

53. Ma, L., et al., *Genetic divergence of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in Pneumocystis carinii from 7 different host species*. J Infect Dis, 2001. **184**(10): p. 1358-62.
54. Dam, J., et al., *Complementation between dimeric mutants as a probe of dimer-dimer interactions in tetrameric dihydrofolate reductase encoded by R67 plasmid of E. coli*. J Mol Biol, 2000. **302**(1): p. 235-50.
55. Kamath, G., E.E. Howell, and P.K. Agarwal, *The tail wagging the dog: insights into catalysis in R67 dihydrofolate reductase*. Biochemistry, 2010. **49**(42): p. 9078-88.
56. Hicks, S.N., et al., *Role of Lys-32 residues in R67 dihydrofolate reductase probed by asymmetric mutations*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46995-7002.
57. Andres, J., et al., *On Transition Structures for Hydride Transfer Step in Enzyme Catalysis. A Comparative Study on Models of Glutathione Reductase Derived from Semiempirical, HF, and DFT Methods*. The Journal of Organic Chemistry, 1996. **61**(22): p. 7777-7783.
58. Chopra, S., et al., *Effects of Temperature and Viscosity on R67 Dihydrofolate Reductase Catalysis*. Biochemistry, 2006. **45**(21): p. 6596-6605.
59. Maharaj, G., et al., *Dissociation constants for dihydrofolic acid and dihydrobiopterin and implications for mechanistic models for dihydrofolate reductase*. Biochemistry, 1990. **29**(19): p. 4554-60.
60. Roth, B., et al., *5-Benzyl-2,4-Diaminopyrimidines as Antibacterial Agents. I. Synthesis and Antibacterial Activity in Vitro*. J Med Pharm Chem, 1962. **91**: p. 1103-23.
61. Bushby, S.R. and G.H. Hitchings, *Trimethoprim, a sulphonamide potentiator*. Br J Pharmacol Chemother, 1968. **33**(1): p. 72-90.
62. Anand, N., *Sulfonamides and sulfones.*, in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, M.E. Wolff, Editor. 1996, J. Wiley & Sons: New York. p. 527-573.
63. Friesen, W.T., Y.A. Hekster, and T.B. Vree, *Trimethoprim: clinical use and pharmacokinetics*. Drug Intelligence & Clinical Pharmacy, 1981. **15**(5): p. 325-330.
64. Masters, P.A., et al., *Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited*. Arch Intern Med, 2003. **163**(4): p. 402-10.
65. Caspers, P., et al., *In vitro and in vivo properties of dihydrophthalazine antifolates, a novel family of antibacterial drugs*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(9): p. 3620-7.

66. Wang, F., et al., *Mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase is not a target relevant to the antitubercular activity of isoniazid*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(9): p. 3776-82.
67. Bean, D.C., et al., *Resistance among Escherichia coli to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man*. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(5): p. 962-4.
68. Livermore, D.M., et al., *Regional variation in ampicillin and trimethoprim resistance in Escherichia coli in England from 1990 to 1997, in relation to antibacterial prescribing*. J Antimicrob Chemother, 2000. **46**(3): p. 411-22.
69. Seputiene, V., et al., *Prevalence of trimethoprim resistance genes in Escherichia coli isolates of human and animal origin in Lithuania*. J Med Microbiol, 2010. **59**(Pt 3): p. 315-22.
70. Skold, O., *Resistance to trimethoprim and sulfonamides*. Vet Res, 2001. **32**(3-4): p. 261-73.
71. Zhanel, G.G., et al., *Antibiotic resistance in Escherichia coli outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA)*. Int J Antimicrob Agents, 2006. **27**(6): p. 468-75.
72. Smilack, J.D., *Trimethoprim-sulfamethoxazole*. Mayo Clin Proc, 1999. **74**(7): p. 730-4.
73. WHO. *Model Lists of Essential Medicines*. March 2010 [cited 2010 -12-17]; 16th edition:[Available from: http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/Updated_sixteenth_adult_list_en.pdf].
74. Bleicher, K.H., et al., *Hit and lead generation: beyond high-throughput screening*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(5): p. 369-378.
75. Hann, M.M. and T.I. Oprea, *Pursuing the leadlikeness concept in pharmaceutical research*. Current Opinion in Chemical Biology, 2004. **8**(3): p. 255-263.
76. Agresti, J.J., et al., *Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4004-9.
77. Hann, M.M., A.R. Leach, and G. Harper, *Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery*. J Chem Inf Comput Sci, 2001. **41**(3): p. 856-64.
78. Oprea, T.I., et al., *Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective*. J Chem Inf Comput Sci, 2001. **41**(5): p. 1308-15.

79. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
80. Veber, D.F., et al., *Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates*. J Med Chem, 2002. **45**(12): p. 2615-23.
81. Teague, S.J., et al., *The Design of Leadlike Combinatorial Libraries*. Angew Chem Int Ed Engl, 1999. **38**(24): p. 3743-3748.
82. Carr, R. and H. Jhoti, *Structure-based screening of low-affinity compounds*. Drug Discov Today, 2002. **7**(9): p. 522-7.
83. Erlanson, D.A., et al., *Site-directed ligand discovery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9367-72.
84. Vetter, D., *Chemical microarrays, fragment diversity, label-free imaging by plasmon resonance--a chemical genomics approach*. J Cell Biochem Suppl, 2002. **39**: p. 79-84.
85. Maly, D.J., I.C. Choong, and J.A. Ellman, *Combinatorial target-guided ligand assembly: Identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors*. 2000, The National Academy of Sciences.
86. Congreve, M., et al., *A 'rule of three' for fragment-based lead discovery?* Drug Discov Today, 2003. **8**(19): p. 876-7.
87. Howell, E.E., et al., *One site fits both: a model for the ternary complex of folate + NADPH in R67 dihydrofolate reductase, a D2 symmetric enzyme*. J Comput Aided Mol Des, 2001. **15**(11): p. 1035-52.
88. Benner, S.A., *The stereoselectivity of alcohol dehydrogenases: a stereochemical imperative?* Experientia, 1982. **38**(5): p. 633-6.
89. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochimie*. 2 ed. 2005, Bruxelles: De Boeck & Larcier.
90. Chopra, S., et al., *A balancing act between net uptake of water during dihydrofolate binding and net release of water upon NADPH binding in R67 dihydrofolate reductase*. J Biol Chem, 2008. **283**(8): p. 4690-8.
91. Chefson, A. and K. Auclair, *CYP3A4 activity in the presence of organic cosolvents, ionic liquids, or water-immiscible organic solvents*. Chembiochem, 2007. **8**(10): p. 1189-97.
92. Chin, J.T., S.L. Wheeler, and A.M. Klibanov, *On protein solubility in organic solvent*. Biotechnol Bioeng, 1994. **44**(1): p. 140-5.
93. Cowan, D.A., *Thermophilic proteins: stability and function in aqueous and organic solvents*. Comp Biochem Physiol A Physiol, 1997. **118**(3): p. 429-38.

94. Tavares, A.P., O. Rodriguez, and E.A. Macedo, *Ionic Liquids as Alternative Co-Solvents for Laccase: Study of Enzyme Activity and Stability*. Biotechnol Bioeng, 2008. **101**(1): p. 201-7.
95. Muginova, S.V., Galimova, A.Z., Polyakov, A.E., Shekhovtsova, T.N., *Ionic liquids in enzymatic catalysis and biochemical methods of analysis: Capabilities and prospects*. Journal of Analytical Chemistry, 2010. **65**: p. 331-351.
96. van Rantwijk, F. and R.A. Sheldon, *Biocatalysis in ionic liquids*. Chem Rev, 2007. **107**(6): p. 2757-85.
97. Yang, Z., *Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis*. J Biotechnol, 2009. **144**(1): p. 12-22.
98. Zhao, H., *Are ionic liquids kosmotropic or chaotropic? An evaluation of available thermodynamic parameters for quantifying the ion kosmotropicity of ionic liquids* J Chem Technol Biotechnol, 2006. **81**: p. 877-891.
99. Abraham, M.H. and J.W.E. Acree, *Comparative analysis of solvation and selectivity in room temperature ionic liquids using the Abraham linear free energy relationship*. Green Chemistry, 2006. **8**(10): p. 906-915.
100. Pinto, P.C., M.L. Saraiva, and J.L. Lima, *Oxidoreductase behavior in ionic liquids: a review*. Anal Sci, 2008. **24**(10): p. 1231-8.
101. Lou, W.Y., et al., *Efficient enantioselective hydrolysis of D,L-phenylglycine methyl ester catalyzed by immobilized Candida antarctica lipase B in ionic liquid containing systems*. J Biotechnol, 2006. **125**(1): p. 64-74.
102. de Gonzalo, G., et al., *Asymmetric biocatalytic reduction of ketones using hydroxy-functionalised water-miscible ionic liquids as solvents*. Tetrahedron: Asymmetry, 2007. **18**(21): p. 2541-2546.
103. Kaar, J.L., *Lipase activation and stabilization in room-temperature ionic liquids*. Methods Mol Biol, 2011. **679**: p. 25-35.
104. Lee, S.H., et al., *Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid ester using ionic liquids mixtures*. J Biotechnol, 2008. **133**(4): p. 486-9.
105. Wehofsky, N., et al., *Ionic Liquids and Proteases: A Clean Alliance for Semisynthesis*. Chembiochem, 2008. **9**(9): p. 1493-1499.
106. Gremos, S., et al., *Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid*. Bioresource Technology, 2011. **102**(2): p. 1378-1382.
107. Hong, E.S., O.Y. Kwon, and K. Ryu, *Strong substrate-stabilizing effect of a water-miscible ionic liquid [BMIM][BF(4)] in the catalysis of horseradish peroxidase*. Biotechnol Lett, 2008. **30**(3): p. 529-33.

108. Moniruzzaman, M., N. Kamiya, and M. Goto, *Biocatalysis in water-in-ionic liquid microemulsions: a case study with horseradish peroxidase*. Langmuir, 2008. **25**(2): p. 977-982.
109. Wu, X., et al., *Effects of ionic liquids on enzymatic catalysis of the glucose oxidase toward the oxidation of glucose*. J Phys Chem B, 2009. **113**(40): p. 13365-73.
110. Bräutigam, S., et al., *Whole-cell biocatalysis: Evaluation of new hydrophobic ionic liquids for efficient asymmetric reduction of prochiral ketones*. Enzyme and Microbial Technology, 2009. **45**(4): p. 310-316.
111. Okochi, M., et al., *Enhanced activity of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase by addition of the co-solvent 1-butyl-3-methylimidazolium (L)-lactate in aqueous phase of biphasic systems for reductive production of steroids*. J Biotechnol, 2007. **128**(2): p. 376-82.
112. Holme, D.J. and H. Peck, *Analytical Biochemistry*. 2e ed. 1993, New York: Wiley. 507.
113. Deng, H., R. Callender, and E. Howell, *Vibrational structure of dihydrofolate bound to R67 dihydrofolate reductase*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 48956-60.
114. Rover Jr, L., et al., *Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design*. Analytical Biochemistry, 1998. **260**(1): p. 50-55.
115. Wu, J.T., L.H. Wu, and J.A. Knight, *Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation*. Clin Chem, 1986. **32**(2): p. 314-9.
116. De Brouwer, V., et al., *pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates*. Phytochem Anal, 2007. **18**(6): p. 496-508.
117. Schagger, H. and G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem, 1987. **166**(2): p. 368-79.
118. Schagger, H., *Tricine-SDS-PAGE*. Nat. Protocols, 2006. **1**(1): p. 16-22.
119. Hillcoat, B.L., P.F. Nixon, and R.L. Blakley, *Effect of substrate decomposition on the spectrophotometric assay of dihydrofolate reductase*. Anal Biochem, 1967. **21**(2): p. 178-89.
120. Zhang, J.H., T.D. Chung, and K.R. Oldenburg, *A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays*. J Biomol Screen, 1999. **4**(2): p. 67-73.

121. Sellek, G.A. and J.B. Chaudhuri, *Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles*. Enzyme and Microbial Technology, 1999. **25**: p. 471-482.
122. Park, S. and R.J. Kazlauskas, *Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green technology*. Curr Opin Biotechnol, 2003. **14**(4): p. 432-7.
123. Cheng, Y. and W.H. Prusoff, *Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction*. Biochem Pharmacol, 1973. **22**(23): p. 3099-108.
124. Vamecq, J., et al., *1,2-ethane bis-1-amino-4-benzamidine is active against several brain insult and seizure challenges through anti-NMDA mechanisms targeting the 3H-TCP binding site and antioxidant action*. Eur J Med Chem, 2010. **45**(7): p. 3101-10.
125. Dixon, M., *The determination of enzyme inhibitor constants*. Biochem J, 1953. **55**(1): p. 170-1.
126. Gauchot, V., W. Kroutil, and A.R. Schmitzer, *Highly recyclable chemo-/biocatalyzed cascade reactions with ionic liquids: one-pot synthesis of chiral biaryl alcohols*. Chemistry, 2010. **16**(23): p. 6748-51.
127. Blakley, R.L., *Crystalline Dihydropteroylglutamic Acid*. Nature, 1960. **188**: p. 231 - 232.
128. Volpato, J.P., et al., *Multiple conformers in active site of human dihydrofolate reductase F31R/Q35E double mutant suggest structural basis for methotrexate resistance*. J Biol Chem, 2009. **284**(30): p. 20079-89.
129. Kakkar, T., H. Boxenbaum, and M. Mayersohn, *Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: comparisons among three methods of data analysis*. Drug Metab Dispos, 1999. **27**(6): p. 756-62.
130. Segel, I.H., ed. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. New ed. Wiley Classics Library. 1993, John Wiley & Sons, inc.

6. Annexes

Annexe 1

WHO Model Lists of Essential Medicines

16th edition (updated) Essential Medicines

WHO Model List (March 2010)

Explanatory Notes

The **core list** presents a list of minimum medicine needs for a basic health-care system, listing the most efficacious, safe and cost-effective medicines for priority conditions. Priority conditions are selected on the basis of current and estimated future public health relevance, and potential for safe and cost-effective treatment.

The **complementary list** presents essential medicines for priority diseases, for which specialized diagnostic or monitoring facilities, and/or specialist medical care, and/or specialist training are needed. In case of doubt medicines may also be listed as complementary on the basis of consistent higher costs or less attractive cost-effectiveness in a variety of settings.

The **square box symbol** (□) is primarily intended to indicate similar clinical performance within a pharmacological class. The listed medicine should be the example of the class for which there is the best evidence for effectiveness and safety. In some cases, this may be the first medicine that is licensed for marketing; in other instances, subsequently licensed compounds may be safer or more effective. Where there is no difference in terms of efficacy and safety data, the listed medicine should be the one that is generally available at the lowest price, based on international drug price information sources. Not all square boxes are applicable to medicine selection for children – see the second EMLc for details.

Therapeutic equivalence is only indicated on the basis of reviews of efficacy and safety and when consistent with WHO clinical guidelines. National lists should not use a similar symbol and should be specific in their final selection, which would depend on local availability and price.

The **a** symbol indicates that there is an age or weight restriction on use of the medicine; details for each medicine can be found in Table 1.

Where the **c** symbol is placed next to the complementary list it signifies that the medicine(s) require(s) specialist diagnostic or monitoring facilities, and/or specialist medical care, and/or specialist training for their use in children.

Where the **c** symbol is placed next to an individual medicine or strength of medicine it signifies that there is a specific indication for restricting its use to children.

The presence of an entry on the Essential Medicines List carries no assurance as to pharmaceutical quality. It is the responsibility of the relevant national or regional drug regulatory authority to ensure

that each product is of appropriate pharmaceutical quality (including stability) and that when relevant, different products are interchangeable.

For recommendations and advice concerning all aspects of the quality assurance of medicines see the WHO Medicines web site http://www.who.int/medicines/areas/quality_assurance/en/index.html.

Medicines and dosage forms are listed in alphabetical order within each section and there is no implication of preference for one form over another. Standard treatment guidelines should be consulted for information on appropriate dosage forms.

The main terms used for dosage forms in the Essential Medicines List can be found in Annex 1.

Definitions of many of these terms and pharmaceutical quality requirements applicable to the different categories are published in the current edition of *The International Pharmacopoeia* <http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/en/index.html>.

Essential Medicines
WHO Model List

16th edition (updated)

□ erythromycin	Powder for injection: 500 mg (as lactobionate) in vial. Powder for oral liquid: 125 mg/5 ml (as stearate or ethyl succinate). Solid oral dosage form: 250 mg (as stearate or ethyl succinate).
□ gentamicin	Injection: 10 mg; 40 mg (as sulfate)/ml in 2-ml vial.
□ metronidazole	Injection: 500 mg in 100-ml vial. Oral liquid: 200 mg (as benzoate)/5 ml. Suppository: 500 mg; 1 g. Tablet: 200 mg to 500 mg.
nitrofurantoin	Oral liquid: 25 mg/5 ml [c]. Tablet: 100 mg.
spectinomycin	Powder for injection: 2 g (as hydrochloride) in vial.
sulfamethoxazole + trimethoprim	Injection: 80 mg + 16 mg/ml in 5-ml ampoule; 80 mg + 16 mg/ml in 10-ml ampoule. Oral liquid: 200 mg + 40 mg/5 ml. Tablet: 100 mg + 20 mg; 400 mg + 80 mg.
trimethoprim [a]	Oral liquid: 50 mg/5 ml [c]. Tablet: 100 mg; 200 mg. [a] >6 months.
<i>Complementary List</i>	
clindamycin	Capsule: 150 mg. Injection: 150 mg (as phosphate)/ml. Oral liquid: 75 mg/5 ml [c].
vancomycin	Powder for injection: 250 mg (as hydrochloride) in vial.
6.2.3 Antileprosy medicines	
Medicines used in the treatment of leprosy should never be used except in combination. Combination therapy is essential to prevent the emergence of drug resistance. Colour coded blister packs (MDT blister packs) containing standard two medicine (paucibacillary leprosy) or three medicine (multibacillary leprosy) combinations for adult and childhood leprosy should be used. MDT blister packs can be supplied free of charge through WHO.	
clofazimine	Capsule: 50 mg; 100 mg.
dapsone	Tablet: 25 mg; 50 mg; 100 mg.
rifampicin	Solid oral dosage form: 150 mg; 300 mg.

Essential Medicines
WHO Model List

16th edition (updated)

quinine*	Injection: 300 mg quinine hydrochloride/ml in 2-ml ampoule. Tablet: 300 mg (quinine sulfate) or 300 mg (quinine bisulfate). * For use only in the management of severe malaria, and should be used in combination with doxycycline.
sulfadoxine + pyrimethamine*	Tablet: 500 mg + 25 mg. * Only in combination with artesunate 50 mg.
6.5.3.2 For prophylaxis	
chloroquine*	Oral liquid: 50 mg (as phosphate or sulfate)/5 ml. Tablet: 150 mg (as phosphate or sulfate). * For use only in central American regions, for use for <i>P. vivax</i> .
doxycycline [a]	Solid oral dosage form: 100 mg (as hydrochloride). [a] >8 years.
mefloquine [a]	Tablet: 250 mg (as hydrochloride). [a] >5 kg or >3 months.
proguanil*	Tablet: 100 mg (as hydrochloride). * For use only in combination with chloroquine.
6.5.4 Antipneumocystosis and antitoxoplasmosis medicines	
pyrimethamine	Tablet: 25 mg.
sulfadiazine	Tablet: 500 mg.
sulfamethoxazole + trimethoprim	Injection: 80 mg + 16 mg/ml in 5-ml ampoule; 80 mg + 16 mg/ml in 10-ml ampoule. Oral liquid: 200 mg + 40 mg/5 ml [c]. Tablet: 100 mg + 20 mg; 400 mg + 80 mg [c].
<i>Complementary List</i>	
pentamidine	Tablet: 200 mg; 300 mg.
6.5.5 Antitrypanosomal medicines	
6.5.5.1 African trypanosomiasis	
Medicines for the treatment of 1 st stage African trypanosomiasis	
pentamidine*	Powder for injection: 200 mg (pentamidine isetionate) in vial. * To be used for the treatment of <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> infection.
suramin sodium*	Powder for injection: 1 g in vial. * To be used for the treatment of the initial phase of <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> infection.

Table 1: Medicines with age or weight restrictions

atazanavir	>25 kg
atropine	>3 months
benzyl benzoate	>2 years
betamethasone topical preparations	Hydrocortisone preferred in neonates
cefazolin	>1 month
ceftriaxone	>41 weeks corrected gestational age
chlorphenamine	>1 year
diloxanide	>25 kg
doxycycline	>8 years (except for serious infections e.g. cholera)
efavirenz	>3 years or >10 kg
emtricitabine	>3 months
fluoxetine	>8 years
ibuprofen	>3 months (except IV form for patent ductus arteriosus)
mefloquine	>5 kg or >3 months
metoclopramide	Not in neonates
ondansetron	>1 month
saquinavir	>25 kg
silver sulfadiazine	>2 months
tetracaine	Not in preterm neonates
trimethoprim	>6 months
xylometazoline	>3 months

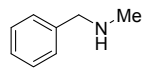
**Essential Medicines
WHO Model List**

16th edition (updated)

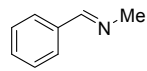
sodium fluoride.....	31	tetracaine.....	27
sodium hydrogen carbonate.....	30	tetracycline.....	27
sodium lactate.....	30	thiamine.....	31
sodium nitrite.....	3	thiopental.....	1
<i>sodium nitroprusside</i>	19	timolol.....	27
sodium stibogluconate or meglumine antimoniate.....	12	triclabendazole.....	5
sodium thiosulfate.....	3, 20	trimethoprim.....	7
spectinomycin.....	7	tropicamide.....	21
spironolactone.....	21, 22	tuberculin, purified protein derivative (PPD).....	25
stavudine (d4T).....	10	typhoid vaccine.....	26
<i>streptokinase</i>	19	urea.....	20
streptomycin.....	8	valproic acid.....	4, 29
sulfadiazine.....	14	<i>vancomycin</i>	7
sulfadoxine + pyrimethamine.....	14	varicella vaccine.....	26
sulfamethoxazole + trimethoprim.....	7, 14	vecuronium.....	27
<i>sulfasalazine</i>	2, 22	verapamil.....	18
<i>suramin sodium</i>	4, 14	<i>vinblastine</i>	16
<i>surfactant</i>	31	<i>vinorelbine</i>	16
suxamethonium.....	27	warfarin.....	17
<i>tamoxifen</i>	16	water for injection.....	30
tenofovir disoproxil fumarate.....	10	xylometazoline.....	31
testosterone.....	23	yellow fever vaccine.....	26
tetanus vaccine.....	26	zidovudine (ZDV or AZT).....	10
		zinc sulfate.....	23

Annexe 2

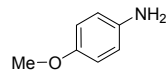
Représentation des structures des composés testés comme inhibiteurs potentiels



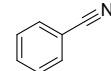
N-benzyle-méthyle amine



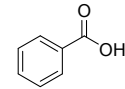
N-benzylidène-méthyle amine



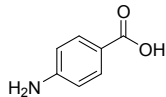
p-Anisidine



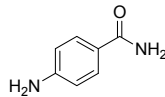
Benzonitrile



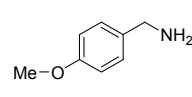
Acide benzoïque



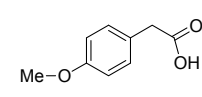
Acide 4-aminobenzoïque



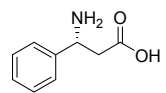
Aminobenzamide



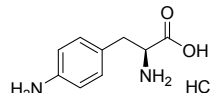
4-méthoxybenzyle amine



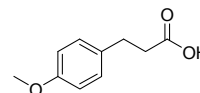
Acide 4-méthoxyphényle-acétique



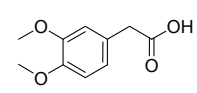
Acide (R)-3-amino-3-phénylpropanoïque



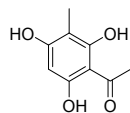
Hydrochlorure d'aminophénylalanine



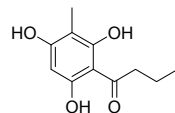
Acide 3-(4-méthoxyphényle)-propionique



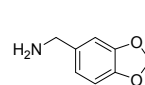
Acide 3,4-diméthoxyphényle acétique



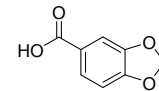
Méthylephloracétophénone



Méthylephlorpropionyle-phénone



Pipéronyleamine



Acide pipéronylique



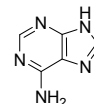
Indoline



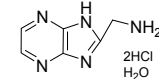
Benzimidazole



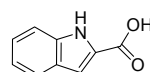
Benzotriazole



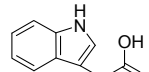
Adénine



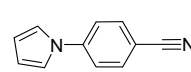
Hydrate de dihydrochlorure-2-(aminométhyle)-benzimidazole



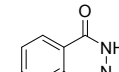
Acide indole-2-carboxylique



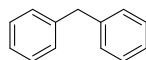
Acide indole-3-acétique



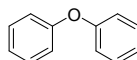
N-(3cyanophényle)-pyrrole



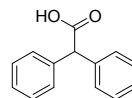
Phtalazinone



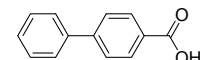
Diphénylméthane



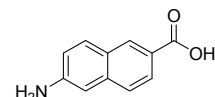
Ester de phényle



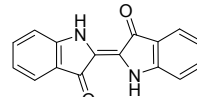
Acide diphénylacétique



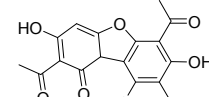
Acide diphényle-4-carboxylique



Acide amino-2-naphtoïque



Indigo



Acide usnique

Annexe 3

Protocole de criblage et de manipulation automatisée des liquides et des données (Beckman DTX 880)

1. *Les concentrations finales dans un essai ($V = 200 \mu\text{L}$, plaque de 96 puits) :*

- [tampon phosphate de potassium] = 50 mM pH 7,0;
- [NADPH] = 50 μM ;
- [DHF] = 50 μM ;
- [composé] = 2mM et 10mM dans 10% de DMSO;
- [DHFR R67] = 200 nM.

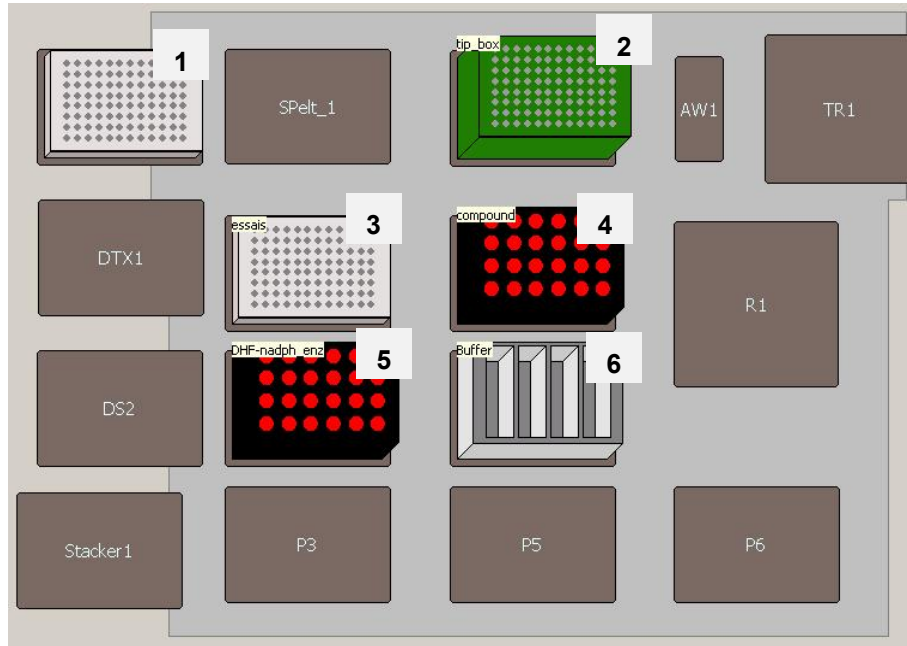
La lecture du signal (absorbance) est effectuée par lectrice à plaques DTX 880, à 340 nm, pendant 5 min, à TPN.

2. *Pipetage pour chaque essai (puits), effectué sur la station automatisée de Beckman :*

- 130 μL (ou 65 $\mu\text{L} \times 2$ fois) de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0;
- 20 μL de solution mère du mélange de 500 μM NADPH et 500 μM DHF dans le tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0;
- 40 μL de solution mère de 10 mM (ou 50 mM) dans 50 % de DMSO, 50% de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0;

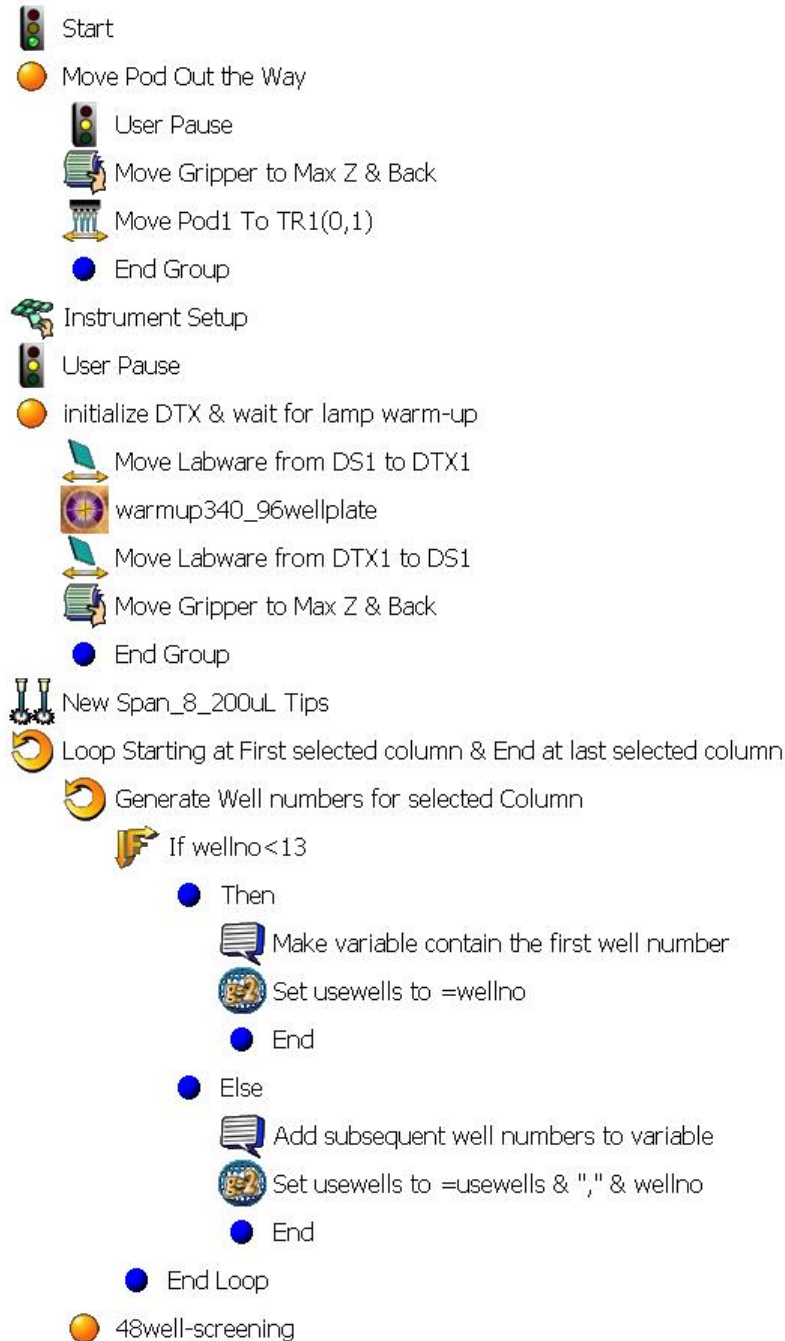
- 10 μL de la DHFR R67 en concentration 4 μM pour démarrer la réaction (pour les essais de blanc : 10 μL de tampon).









3. Disposition des plaques et réservoirs sur la plate-forme :



- 1- Plaque pour préchauffage de DTX 880
- 2- Boîte des embouts (tip box)
- 3- Plaque pour les essais (essais)
- 4- Support pour les solutions mères de composés (compound)
- 5- Support pour les solutions mères du mélange NADPH et DHF, et l'enzyme (DHF-nadph ens)
- 6- Réservoir pour le tampon (Buffer)

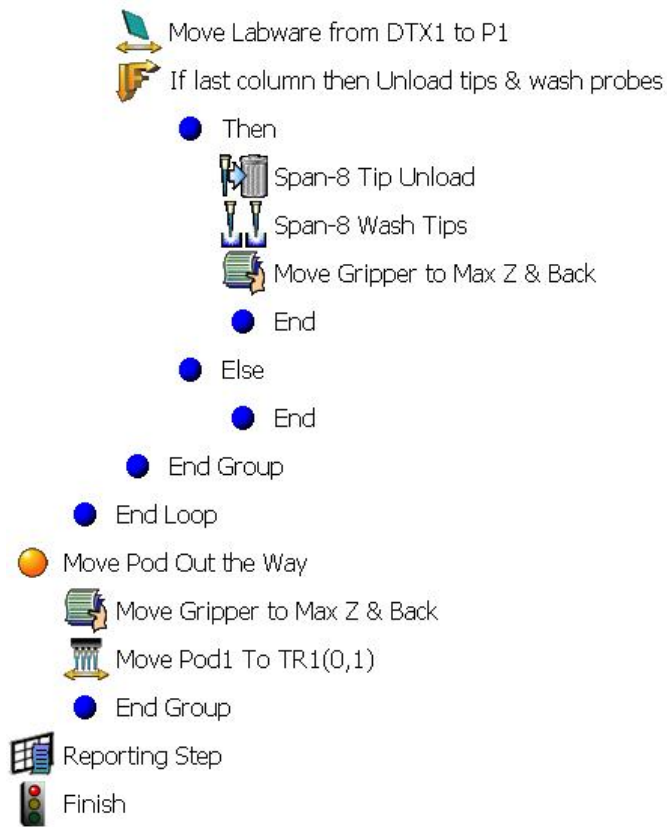
4. Protocole de la programmation :



- 48well-screening
 -  Transfer Buffer to Selected Column
 -  Loop from 1 to 2 step 1
 -  Transfer 65 µL from Buffer to essays
 - End Loop
 -  Transfer 20 µL from DHF-nadph_enz to essays
 -  Span-8 Wash Tips
 -  Transfer 40 µL from compound to essays
 -  Span-8 Wash Tips
 - Transfer Enzyme to rows C->H, and Buffer to rows A->B
 -  Aspirate 10 µL at Buffer
 -  For probesused = 2 to 4 step 1
 -  Aspirate 10 µL at DHF-nadph_enz
 - End Loop
 -  Dispense 10 µL at essays
 - End Group
 - Send Assay plate to DTX for reading
 -  Move Labware from P1 to DTX1
 -  Span-8 Wash Tips
 -  If column=1
 - Then
 -  6min_DHFR_340nm_column1_1-48
 - End
 - Else
 - End
 -  If column=2
 - Then
 -  6min_DHFR_340nm_column2_1-48
 - End
 - Else
 - End



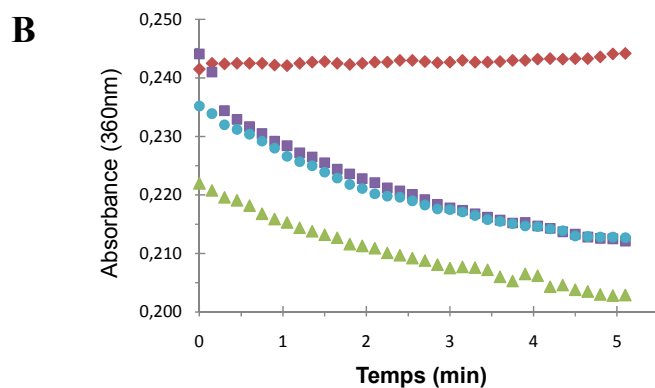
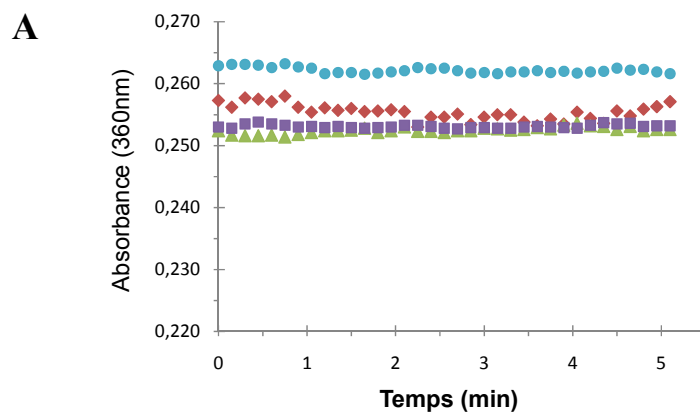




Annexe 4

Comparaison d'inhibition de la DHFR R67 par l'acide 2'-(4,4'-(2-hydroxypropane-1,3-diyl)-bis-(oxy)-bis-(4,1-phenylene))-bis-(1H-benzimidazole-5-carboxylique) (composé **12**) en présence de différents solvants.

La vitesse de la réaction catalysée par la DHFR R67, représentée par le changement d'absorbance en fonction du temps, en présence de 1mM composé **12** solubilisé avec 10% de DMSO (A) ou 10% de [BMIm][OctSO₄] (B). Les marqueurs rouges représentent le control négatif (sans enzyme), les marqueurs bleus, violets et verts représentent les échantillons en triplicata.

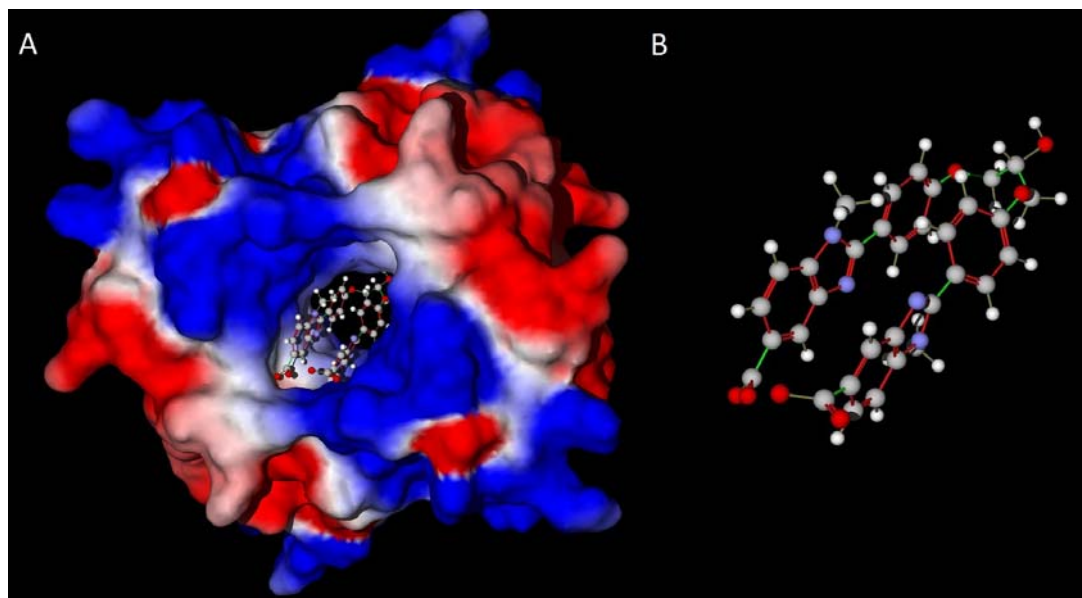


Annexe 5

Arrimage moléculaire de la DHFR R67 et du composé **12** avec le logiciel Molegro Virtual Docker 4.0.0.

Le panneau **A** représente la DHFR R67 montrée avec la surface électrostatique et le composé **12** arrimé dans le pore du site actif; les couleurs bleue, rouge et blanches montrent les régions basiques, acides et hydrophobes, respectivement.

Le panneau **B** représente la conformation du composé **12** dans le site actif de la DHFR R67. Les billes de couleurs grise, bleue, rouge et blanche représentent les atomes de carbone, azote, oxygène et hydrogène respectivement. Les liaisons en vert et rouge représentent les liaisons rotatives et non-rotatives, respectivement, utilisées pour l'arrimage.



Annexe 6

Le protocole détaillé de la programmation du FPLC

Variables

Column	HisTrap HP 5 ml
Wash InletA	ON
Wash InletB	ON
Flow Rate	2 (ml/min)
Column Pressure Limit	0,300 (MPa)
Averaging Time UV	10,00
Eluent A Intet	A1
Start ConcB	0 (%B)
Equilibrate With	5,00 (CV)
System Pump	Normal
System PressLevel	0 (MPa)
System MinFlow	0 (ml/min)
Empty loop with	43 (ml)
Wash column with	12,00 (CV)
Eluate Frac Size	1 (ml)
Peak Frac Size	0 (ml)
Target ConcB	8,0 (%B)
Length of Gradient	6,00 (base)
Gradient Delay	30,00 (ml)
Clean with	12,00 (CV)
Reequilibrate with	5,00 (CV)