

### Introduction générale

Les glycosidases sont une famille d'enzymes présente chez presque tous les êtres vivants. Elles ont un rôle capital dans 8600 processus biologiques connus<sup>1</sup>. Parmi ces enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidique, l' $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20) impliquée dans l'étape finale de la digestion des carbohydrates de l'alimentation de l'être humain en permettant la dégradation complète des oligosaccharides libérés par l' $\alpha$ -amylase salivaire et pancréatique et non absorbés par le corps. Ce processus permet la libération du glucose pour être ensuite véhiculé par le sang vers les organes.

Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche pour pouvoir accéder à une diversité de composés utilisés comme agents thérapeutiques contre les maladies dans lesquelles l' $\alpha$ -glucosidase est impliqué telle que le diabète type II<sup>2</sup>. Dans ce travail, nous nous intéresserons aux inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase dans l'objectif d'enrichir cette classe thérapeutique avec des substances médicamenteuses candidates à base de xanthone, dont certains composés de la famille ont montré leur effet inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase<sup>3</sup>.

Les interactions entre molécules sont à la base de la plupart des mécanismes biologiques. Etudier les détails d'interactions, à l'échelle moléculaire, entre un ligand et la cible thérapeutique s'avère donc d'un très grand intérêt. Actuellement, les approches de criblage virtuel basé sur la structure de la cible, et plus précisément le docking moléculaire, permettent de prédire les modes d'interactions possibles et fournissent un moyen d'étudier les interactions au niveau moléculaire et sont, de ce fait, une indication de l'activité biologique de nouvelles molécules ne tenant compte que des critères structuraux<sup>4</sup>.

Le docking moléculaire est devenu, un outil indispensable dans le domaine de la conception de molécules médicamenteuses qui pourraient agir le plus favorablement, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre que les méthodes classiques<sup>5</sup>.

Dans ce contexte, ce manuscrit est présenté comme suit :

Une étude bibliographique exposée sous forme de deux chapitres, le premier représente un aperçu général sur les glycosidases; leur site actif, leur classification, leur mécanisme d'action et un bref rappel sur la cinétique enzymatique montrant les différents types d'inhibition. Un rappel bibliographique sur les inhibiteurs les plus significatifs des glycosidases est présenté dans ce même chapitre.

## Introduction Générale

---

Le second chapitre sera consacré aux approches et méthodes de criblage devenus indispensables pour la conception de nouvelles substances médicamenteuses.

Les travaux et résultats obtenus seront ensuite exposés et discutés dans une deuxième partie comprenant deux chapitres. Dans un premier temps, nous exposerons le criblage par docking moléculaire effectué sur une chimiothèque virtuelle de dérivés de xanthone dans le but de sélectionner les composés prometteurs qui réagissent plus favorablement avec l' $\alpha$ -glucosidase.

Le dernier chapitre s'articule autour de la synthèse de certains dérivés de xanthone, l'évaluation de leur inhibition avec un test in-vitro, la détermination du type d'inhibition avec une étude cinétique, la génération de la structure 3D de la cible utilisée pour les tests et enfin l'étude des modes d'interactions par docking moléculaire.

Enfin, une conclusion générale suivra les résultats de cette thèse et exposera les perspectives.

### Références Bibliographiques

1. D. G. Naumoff, *Biochemistry (Moscow)*, 2011, **76**, 622-635.
2. G. T. Gallienne E, Lemaire. M, *J OrgChem*, 2006, **71**, 894-902.
3. Y. Liu, Z. F. Ke, J. F. Cui, W. H. Chen, L. Ma and B. Wang, *Bioorg. Med. Chem*, 2008, **16** 7185 – 7192.
4. A. C. Cheng, R. G. Coleman and K. T. Smyth, *Nat Biotechnol*, 2007, **25**, 71-75.
5. E. Yuriev, M. Agostino and P. A. Ramsland, *J. Mol. Recognit*, 2011, **24**, 149-164.

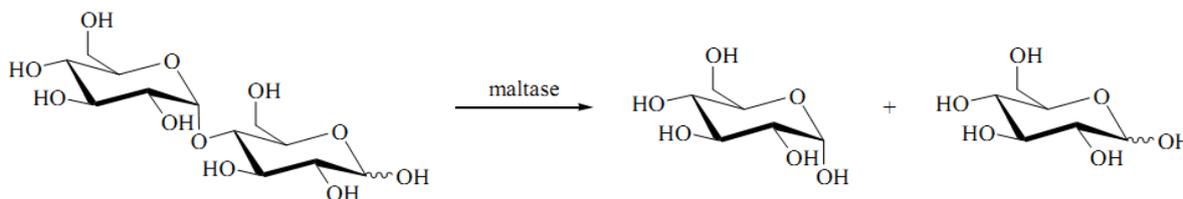
# **Chapitre I :**

Les glycosidases et leurs  
inhibiteurs

## 1. Les glycosidases :

### 1.1. Généralités :

Les glycosidases ou glycoside-hydrolases sont les enzymes qui catalysent l'hydrolyse sélective des liaisons glycosidiques dans les polysaccharides et les glycoconjugués. Elles permettent la libération de molécules non saccharidiques, de monosaccharides ou d'oligosaccharides de plus faible poids moléculaire. Ainsi, la maltase, à titre d'exemple, catalyse l'hydrolyse de la liaison entre les deux unités du maltose pour donner deux molécules de glucose (Schéma 1). De toutes les enzymes présentes dans la nature, ce sont les plus abondantes, les plus évoluées et comptent parmi les plus efficaces. Elles arrivent à augmenter jusqu'à 1017 fois la vitesse de la réaction de coupure de la très stable liaison glycosidique ( $347 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )<sup>1</sup>.



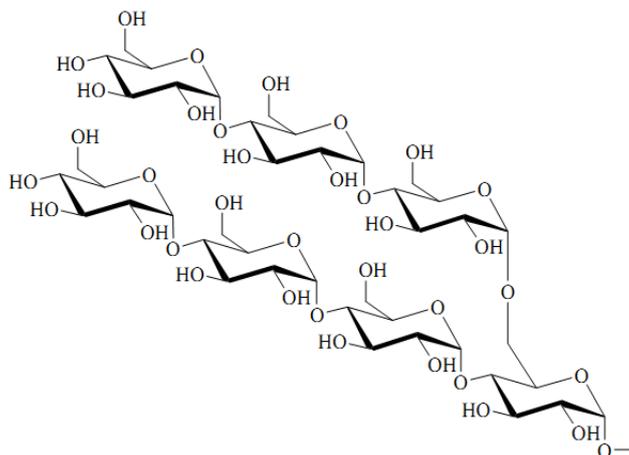
**Schéma I. 1.** hydrolyse du maltose

Elles sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques.<sup>2</sup> Elles sont spécifiques de l'unité glucidique hydrolysée, de sa série D ou L, de sa forme furanique ou pyranique et de la configuration de la liaison glycosidique  $\alpha$  ou  $\beta$ . Ainsi les  $\alpha$ -D-glycosidases hydrolysent les  $\alpha$ -D-glucosides, les  $\beta$ -D-galactosidases les  $\beta$ -D-galactosides etc. De plus, au sein de chaque famille, il existe de petites variations selon l'origine de l'enzyme.<sup>3</sup>

Chez l'homme, les glycosidases sont responsables de la digestion des polysaccharides de l'alimentation dans la bouche et l'intestin grêle, en permettant la dégradation de ceux-ci en monosaccharides, qui peuvent ensuite passer la barrière intestinale pour être véhiculés par le sang vers les organes. Par exemple, l' $\alpha$ -amylase sécrétée par les glandes salivaires et le pancréas transforme l'amidon en maltose, maltotriose et dextrines. Les deux premiers composés sont hydrolysés par la maltase et le dernier par l' $\alpha$ -dextrinase pour donner du glucose. De même, le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose par la saccharase et le lactose en glucose et galactose par la lactase. Ces enzymes sont localisées à la surface des cellules épithéliales qui tapissent l'intestin grêle<sup>4</sup>.

## Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

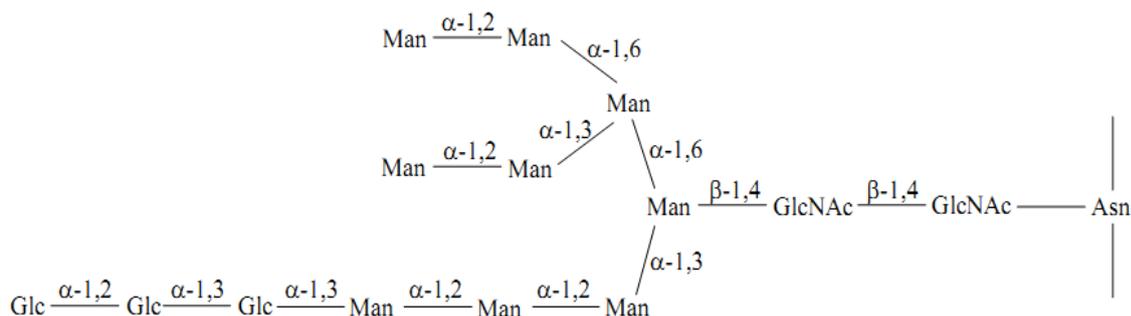
Certaines de ces enzymes, dont l' $\alpha$ -1,6-glycosidase, jouent également un rôle important dans la dégradation du glycogène stocké dans le foie et les muscles. L'hydrolyse de ce polysaccharide formé d'unités glucose reliées entre elles par des liaisons  $\alpha$ -1,4 et possédant des ramifications créées par des liaisons  $\alpha$ -1,6, sur environ un résidu sur dix (Figure 1), permet d'apporter rapidement de l'énergie sous forme de glucose aux différents organes.<sup>5</sup>



**Figure I. 1. Structure du glycogène**

Les glycosidases sont également impliquées dans le processus de maturation des glycoprotéines et des glycolipides qui sont très répandus dans l'organisme et leurs fonctions sont très variées.

Les glycoprotéines sont notamment présentes dans les membranes cellulaires et interviennent dans de nombreux processus, comme le transport membranaire, la reconnaissance cellulaire, la réplication des virus, la réponse immunitaire etc. Les unités oligosaccharidiques des glycoprotéines sont liées à des résidus asparagine par des liaisons N-glycosidiques ou à des résidus sérine et thréonine par des liaisons O-glycosidiques. Dans le cas des oligosaccharides N-liés (Figure 2), quatorze résidus osidiques sont transférés en bloc d'un transporteur lipidique à la protéine.<sup>6</sup> Il s'agit d'un enchaînement de deux N-acétylglucosamines (GlcNAc), suivies de neuf mannoses (Man) et de trois glucoses (Glc) hydrolysés dans le réticulum endoplasmique par action de différentes glycosidases.



**Figure I. 2.** Glycoprotéine avec oligosaccharides N-liés

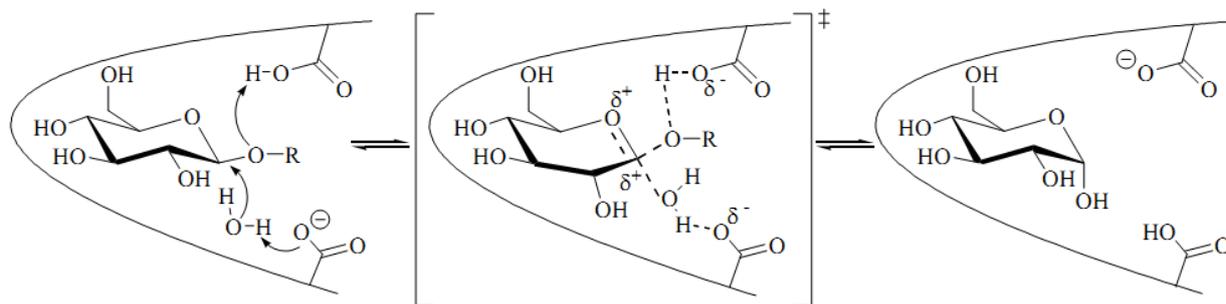
Les glycoprotéines sont ensuite transportées vers l'appareil de Golgi, cet organe a pour but de poursuivre la modification des protéines N-glycosylées et d'entamer la maturation des protéines O-glycosylées qui sont ensuite envoyées vers leurs sites d'activité : le lysosome, la membrane ou les vésicules de sécrétion.

## 1.2. Mécanismes :

Les glycosidases agissent selon deux mécanismes principaux décrits pour la première fois par Koshland en 1953<sup>7</sup>. Les séquences d'acides aminés, ainsi que les structures en trois dimensions d'un grand nombre de glycosidases sont désormais connues, ce qui permet d'affiner encore les connaissances relatives aux mécanismes de ces enzymes<sup>8, 9</sup>. Ces mécanismes mettent principalement en jeu deux groupements carboxyliques provenant de résidus glutamate ou aspartate du site actif de l'enzyme, dont l'un joue le rôle de donneur de proton (acide-base) et l'autre agit en tant que base/nucléophile.

### 1.2.1. Mécanisme avec inversion de configuration :

C'est le mécanisme le moins répandu qui libère un glucide dont la configuration anomérique est l'inverse de celle du substrat. Il correspond à une substitution nucléophile s'effectuant selon un mécanisme concerté avec une catalyse acide-base générale. L'un des groupements carboxyliques permet le départ de l'aglycone par son rôle de catalyseur acide, tandis que l'autre sous forme de carboxylate déprotone l'eau pour favoriser son attaque sur le carbone anomérique. En effet, pour ce type de glycosidases, une distance moyenne de 10,5 Å entre les deux acides aminés doit être mise en évidence<sup>10-12</sup>. Cette réaction s'effectue en passant par un état de transition dont la structure est proche de celle d'un cation oxocarbénium (Schéma 2).

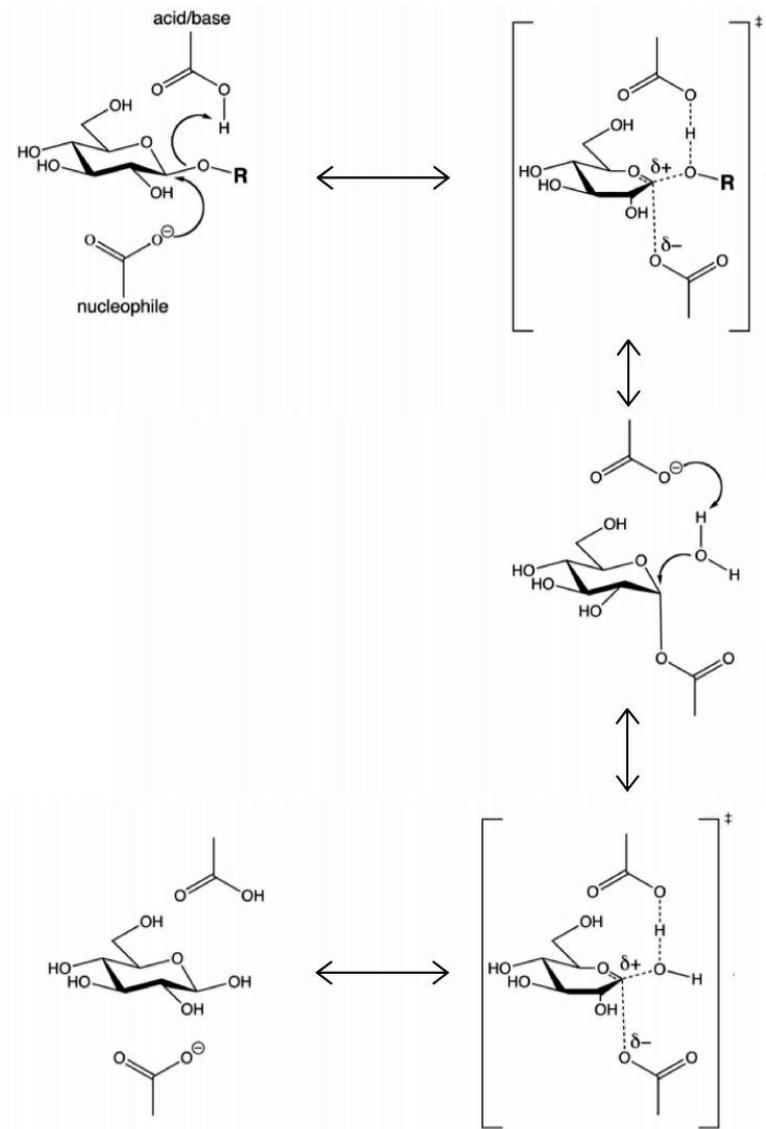


**Schéma I. 2.** Mécanisme de la réaction d'hydrolyse par les glycosidases avec inversion de configuration.<sup>13</sup>

### 1.2.2. Mécanisme avec rétention de configuration :

Les glucosidases agissant avec rétention de configuration anomérique, libèrent un glucide dont la stéréochimie du carbone anomérique est la même que celle du substrat (suite à deux inversions de configuration successives). Dans ce cas, les résidus carboxyliques sont moins éloignés (5,5Å) et l'hydrolyse a lieu en deux étapes<sup>11, 14</sup>. Le nucléophile effectuant la première attaque sur le carbone anomérique est l'acide carboxylique déprotoné de l'enzyme (Asp ou Glu), ce qui implique la formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme. Par conséquent, le substituant du glucoside est relâché à cette première étape. Par la suite, un deuxième résidu acide active une molécule d'eau qui, en attaquant le carbone anomérique, libère le glucide de l'enzyme.

Deux étapes de type  $S_N2$  se suivent donc, il y a rétention de la configuration du carbone anomérique en passant par des états de transition également proches de cations oxocarbenium (schéma 3).



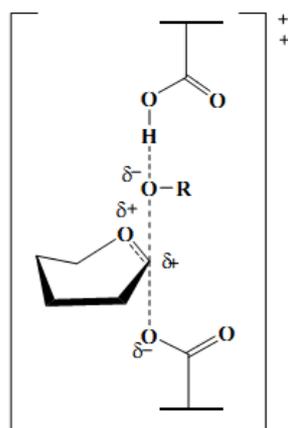
**Schéma I. 3.** Mécanisme de la réaction d'hydrolyse par les glycosidases avec rétention de configuration.<sup>13</sup>

### 1.2.3. Quelques aspects mécanistiques particuliers :

Il s'agit des cas particuliers où l'acide catalytique peut être remplacé par un phosphate inorganique, comme, par exemple: la maltose phosphorylase, la sucrose phosphorylase ou la cellobiose phosphorylase<sup>13, 15</sup>. Certaines glycosidases comme les myrosinases, les chitinases et les endo N-acétylglucosaminidases présentent un mécanisme moléculaire d'hydrolyse n'impliquant l'intervention que d'un seul acide aminé catalytique comme N-acétyl-β-hexosaminidases dont le groupement N-acétyl du substrat joue le rôle du nucléophile en formant un intermédiaire oxazolinium<sup>16, 17</sup>. D'autres impliquent des mécanismes d'oxydoréduction et/ou d'élimination<sup>18, 19</sup>.

## 1.2.4. Etat de transition :

L'état de transition impliqué au cours du chemin réactionnel des glycosidases est similaire quel que soit le mécanisme mis en jeu (Schéma 4). Il se caractérise essentiellement par une distorsion de cycle du substrat dont les liaisons entre le nucléophile et l'oxygène glycosidique du groupement partant (ou l'eau dans l'étape de déglycosylation) sont partiellement formées et rompues. Cette distorsion se traduit par une structure dont la conformation est demi-chaise, bateau ou twist selon l'enzyme ce qui permet la formation d'une structure "pseudo-cationique" de type oxocarbénium.<sup>20</sup>



**Schéma I. 4.** état de transition lors de l'hydrolyse glycosidique.

Dans le cas des glycosidases agissant sur les liaisons  $\beta$ -anomériques, et particulièrement pour les  $\beta$ -glycosidases, la distorsion du cycle du substrat dans l'intermédiaire covalent glycosyl-enzyme est nécessaire pour amener la liaison glycosidique dans une position pseudoaxiale pour faciliter l'attaque nucléophile sur le carbone anomérique et rapprocher l'oxygène exocyclique du catalyseur acide.

En effet, cette position pseudoaxiale entraîne le recouvrement de l'orbitale occupée par une des paires libres d'électrons de l'oxygène endocyclique avec l'orbitale antiliante de la liaison glycosidique, ce qui constitue un facteur favorable à l'hydrolyse de la liaison<sup>21, 22</sup>. Par contre, pour certaines enzymes agissant sur des liaisons  $\alpha$ -anomériques, la distorsion du cycle reste inutile vu la position déjà axiale de la liaison glycosidique<sup>23</sup>.

## 1.3. Classifications des glycosidases :

### 1.3.1. Classification traditionnelle :

Dans la nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUB-MB) basée sur le type de réaction catalysée et la spécificité de

## Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

---

substrat, les glycosidases possèdent un numéro du type EC 3.2.1.x. Les trois premiers chiffres indiquent qu'elles hydrolysent des liaisons O-glycosidiques, le dernier (x) est variable et dépend du substrat transformé<sup>24</sup>. Cette classification systématique permet de nommer précisément la spécificité de substrat d'une enzyme et possède en outre, l'avantage de pouvoir classer rapidement une enzyme. Cependant, ce système ne tient pas compte des similarités de séquence protéique et donc de la structure tridimensionnelle.

De plus, cette classification n'est pas systématique quant au mécanisme d'action des enzymes. Elle paraît mal adaptée aux glycosidases qui peuvent agir sur différents substrats et elle ne reflète pas les aspects structuraux des enzymes. C'est notamment le cas de la  $\beta$ -glucosidase BglA, de *Pyrococcus furiosus* DSM 3638. Elle est annotée avec le numéro EC 3.2.1.21, on pourrait penser qu'elle n'a que cette activité, or elle montre des activités  $\beta$ -galactosidasique (EC 3.2.1.23) et  $\beta$ -xylosidasique (EC 3.2.1.37)<sup>25</sup>. Il peut se trouver également que deux numéros EC différents décrivent la même activité.

### 1.3.2. Classification structurale :

#### 1.3.2.1. Principe et classification :

Avec l'accumulation de séquences des glycosidases (GHs), une nouvelle classification était indispensable car la diversité de propriétés et le comportement de certaines enzymes étaient inexplicables par rapport à la seule référence EC. Ces raisons ont amené Bernard Henrissat, à partir de 1989, à chercher une autre alternative pour classer ces enzymes selon leurs propriétés structurales. Il a donc créé une classification, basée sur la similarité de séquences en acides aminés.<sup>26</sup> Elle est basée sur la détection de segments structuraux constituant le cœur hydrophobe des protéines globulaires. Grâce à cette approche, des similarités dans le repliement tridimensionnel peuvent être détectées entre les protéines.<sup>27</sup>

Les séquences ayant une forte similarité entre elles ont été classées dans les mêmes familles.<sup>28</sup> Cette classification diffère de la classification de l'IUB-MB par le fait que des enzymes de spécificité différente peuvent appartenir à la même famille. Elle permet de prendre en considération la structure tridimensionnelle ainsi que le mécanisme moléculaire d'action des glycosidases. Elles sont ainsi regroupées en familles (notées GH) en fonction des similarités dans leur séquence d'acides aminés. Certaines glycosidases sont multifonctionnelles. Elles contiennent des domaines catalytiques qui appartiennent à différentes familles des glycosidases. Puisqu'il existe une relation directe entre similarités de séquence en acides aminés et similarités de repliement<sup>29</sup>, il peut être admis que les

## Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

membres d'une même famille possèdent des repliements similaires. Cette situation permet de prédire les structures tridimensionnelles générales des sites actifs des membres de chaque famille, si cette information est connue pour un ou plusieurs de ses représentants.

Le mécanisme d'action d'une enzyme étant donné par la structure du site actif et par la position des différents groupes fonctionnels, le mécanisme et la stéréochimie de la réaction seront conservés dans un clan (exception faite de la famille GH4). Toutes les glycosidases agissent généralement selon un mécanisme qui implique deux résidus importants. Chez ces enzymes, les acides aminés catalytiques sont le plus souvent des aspartates et/ou des glutamates (Tableau 1).

**Tableau I. 1.** Mécanismes réactionnels et acides aminés impliqués dans la catalyse enzymatique des familles des glycosidases classées en clans<sup>25</sup>.

Clan de glycosidases	Famille de glycosidases	Nombre de familles	Mécanisme réactionnel	Résidus catalytiques impliqués dans la catalyse enzymatique (acide-base/nucléophile)
GH-A	1, 2, 5, 10, 17, 26, 30, 35, 39, 42, 50, 51, 53, 59, 72, 79, 86, 113, 128	19	Rétention	Glu / Glu
GH-B	7, 16	2	Rétention	Glu / Glu
GH-C	11, 12	2	Rétention	Glu / Glu
GH-D	27, 31, 36	3	Rétention	Asp / Asp
GH-E	33, 34, 83, 93	4	Rétention	Tyr+Glu / non connu
GH-F	43, 62	2	Inversion	non connu / non connu
GH-G	37, 63	2	Inversion	non connu / non connu
GH-H	13, 70, 77	3	Rétention	Asp / Glu
GH-I	24, 46, 80	3	Inversion	non connu ou Asp / non connu ou Glu
GH-J	32, 68	2	Rétention	Asp / Glu
GH-K	18, 20, 85	3	Rétention	Oxygène carbonyle / Glu
GH-L	15, 65, 125	3	Inversion	Glu ou phosphate /Glu
GH-M	8, 48	2	Inversion	Asp ou non connu /Glu
GH-N	28, 49	2	Inversion	Asp / Asp

## Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

---

Cet effort a abouti à la classification de 291 séquences en acides aminés en 35 familles de glycosidases différentes. Cette courte liste de familles a été, par la suite, mise à jour plusieurs fois<sup>30</sup>. A l'heure actuelle, 133 familles de glycosidases différentes sont répertoriées et peuvent être consultées sur internet.

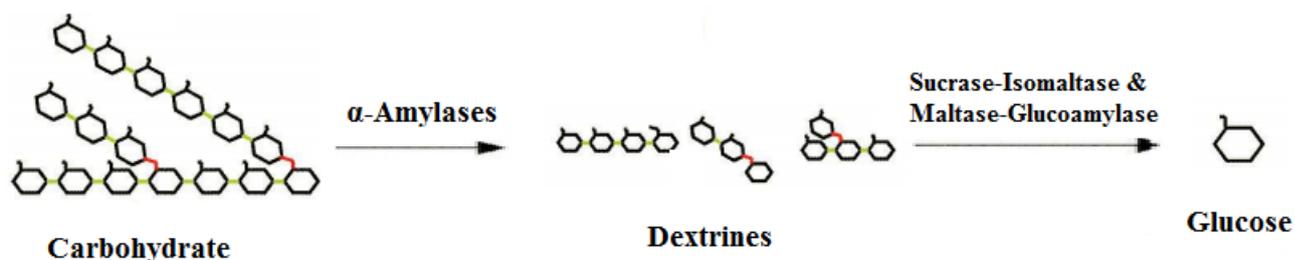
Par ailleurs, beaucoup de ces familles, présentant des similarités dans le repliement tridimensionnel des enzymes qu'elles contiennent, ont été regroupées pour former des clans ou super-familles<sup>31</sup>. On dénombre actuellement 14 clans (Clan GH: Clan des GlycosylHydrolases) appelés A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M et N (Tableau 1).

Réactualisée en permanence, la classification CAZy (Carbohyrate-Active enZymes) est maintenant étendue à d'autres classes d'enzymes actives sur les sucres : les glycosyltransférases (96 familles), les polysaccharides lyases (23 familles), et les carbohydrates estérases (16 familles). Cette classification permet d'avoir un certain pouvoir prédictif : le même repliement, le même mécanisme d'action, et les mêmes résidus catalytiques sont conservés à l'intérieur d'une même famille. Or depuis des années, CAZy est devenue une des principales références en ce qui concerne les CAZymes.

Devant l'accumulation de séquences enzymatiques dans une même famille telle que la famille GH13 (contenant 20902 séquences), Stamet al., dans le but d'améliorer les procédures d'annotation de séquences, ont fourni un effort de division des familles de GHs en sous-familles suivant l'idée que des enzymes possédant des séquences très similaires doivent partager des propriétés biochimiques très proches<sup>32, 33</sup>. La famille GH 13, qui regroupe beaucoup de glycosidases a été subdivisée en 40 sous-familles, dont 13 appartenant à la famille des  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1) et 4 appartenant à la famille des  $\alpha$ -glucosidases (EC 3.2.1.20)<sup>25</sup>.

### 1.3.2.2. Les glycosidases responsables de la digestion des carbohydrates :

Chez les mammifères, six types de glycosidases sont impliquées dans la digestion complète des polysaccharides de l'alimentation, dont deux  $\alpha$ -amylases et quatre  $\alpha$ -glucosidases, en permettant la dégradation de ceux-ci en monosaccharides pour être ensuite véhiculés par le sang vers les organes (Schéma 5).



**Schéma I. 5.** Processus d'hydrolyse lors de la digestion des carbohydrates.

Les deux enzymes de type  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1), salivaire et pancréatique, sont des iso-enzymes endohydrolases appartenant à la famille GH13 et réagissant avec un mécanisme de rétention de configuration<sup>34, 35</sup>. Ces enzymes assurent une pré-hydrolyse des carbohydrates par le clivage des liaisons interne  $\alpha$ -1,4 de l'amylose et de l'amylopectine (les liaisons  $\alpha$ -1,6 de l'amylopectine ne s'hydrolysent pas avec les  $\alpha$ -amylases) pour générer des dextrines linaires et des dextrines branchées.

Les dextrines résultantes sont ensuite dégradées par le biais de quatre  $\alpha$ -glucosidase exohydrolases localisées à la surface des cellules épithéliales qui tapissent l'intestin grêle, dont deux maltase-glucoamylase (MGAM; EC 3.2.1.20 et 3.2.1.3) et deux sucrase-isomaltase (SI; EC 3.2.148 et 3.2.10), appartenant à la famille GH31. Ces enzymes jouent un rôle critique pour la production des unités du glucose qui seront ensuite absorbés et véhiculés par le sang vers les organes<sup>36</sup>. Par contre, les carbohydrates et les fibres résistants qui ne peuvent pas être dégradés au niveau des intestins grêles sont dégradés par les bactéries du colon telles que *Bacteroides thetaiotaomicron* qui agissent sur certains carbohydrates et la cellulose<sup>37</sup>.

## 4. Inhibition enzymatique :

### 4.1. Bref rappel sur la cinétique enzymatique :

Il existe plusieurs mécanismes enzymatiques différents pouvant décrire la réaction catalysée par les enzymes. En 1913, Leonor Michaëlis et Maud Menten ont proposé un modèle simple, dans lequel les enzymes, dites Michaëlinnes, fonctionnent selon le mode suivant : un substrat (S) se lie avec une enzyme (E) pour donner un complexe dissociable (ES), cet intermédiaire se dissocie pour donner un produit (P) avec régénération de l'enzyme (E)<sup>27, 38</sup>.