

The Aminoglycosides: potential antiviral agents targeting HIV RNA sequences

Vanhaverbeke Cécile,¹ Baussanne Isabelle,¹ Ennifar Eric,²
Dumas Philippe,² and Décout Jean-Luc¹

¹Université de Grenoble I/CNRS, UMR 5063, Département de Pharmacochimie Moléculaire, ICMG FR2607, France

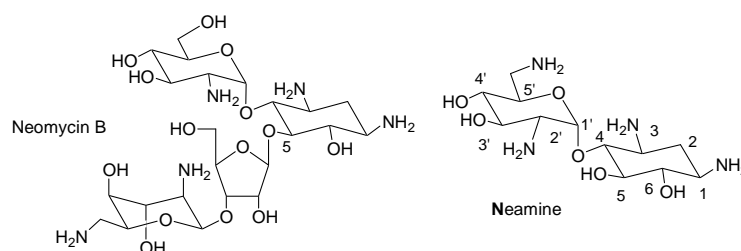
²Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, IBMC CNRS, Strasbourg, France

E-mail: Jean-Luc.Decout@ujf-grenoble.fr

Since the discovery of streptomycin in the 1940s, aminoglycosides have enjoyed widespread applications as chemotherapeutic agents in the treatments of many types of bacterial infections, including both Gram-positive and Gram-negative pathogens.¹ Their antibacterial mechanism of action has been shown to be linked to the aminoglycoside molecular interaction with the 16S rRNA subunit of the 30S bacterial ribosome that disturbs protein synthesis.

In the family of the aminoglycosides, neomycin B has also appeared to be able to strongly inhibit the interaction between the HIV-1 TAR RNA and the transactivating protein Tat.² However, aminoglycosides have no real antiviral activity.

In the search for new antiviral agents, a small aminoglycoside, neamine, which corresponds in neomycin B to a crucial recognition element for TAR RNA interaction, has been modified selectively on different hydroxyl functions. Several derivatives able to strongly inhibit the TAR-Tat binding with submicromolar concentrations were identified using FRET experiments.³ Affinity constants for TAR of the inhibiting derivatives also were measured by SPR and microcalorimetry (ITC).



References

1. J. Zhou, G. Wang, L.-H. Zhang, X.-S. Ye, *Med. Res. Reviews*, **2007**, 27, 279-316.
2. H.-Y. Mei, A. Galan, S. Halim, P. Mack, W. Moreland, B. Sanders, H. N. Truong, A. W. Czamik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, 2755-2760.
3. E. Riguet, J. Désiré, O. Boden, V. Ludwig, M. Göbel, C. Bailly, J.-L. Décout, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 4651-4655.

SUIVI DE LA TOXICITE RENALE DE NANOPARTICULES DE SILICE PAR UN OUTIL INNOVANT : LA BIOSPECTROMETRIE IR-TF

Isabelle Passagne, Marine Rousset, Béatrice L'Azou, Emmanuelle Barron, Adrian Travo, Gérard Déléris†, Isabelle Forfar
FRE3396 CNRS Pharmacochimie - Université Bordeaux Segalen - Faculté de Pharmacie -33076 Bordeaux

Les nanoparticules de silice (Nano-SiO₂) sont utilisées dans de nombreuses applications industrielles ou biomédicales et l'étude de leur toxicité doit donc être entreprise. L'utilisation de nouvelles méthodologies permet de mieux comprendre les effets cellulaires induits par les nanoparticules et leur développement présente donc un grand intérêt. Dans cette étude, la spectrométrie infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF) a été utilisée pour suivre précocement les effets cellulaires induits par les Nano-SiO₂. Cet outil innovant permet de fournir une "empreinte digitale" globale de la composition biochimique de l'échantillon étudié, et de déterminer des signatures spectrales ou des marqueurs spectroscopiques caractéristiques. Cette méthode a l'avantage d'être simple d'utilisation, rapide et ne nécessitant ni marquage, ni réactif.

L'impact rénal des Nano-SiO₂ a été évalué car le rein peut être la cible d'effets toxiques de par son rôle dans l'élimination des xénobiotiques. Ainsi, cette technique IR-TF a permis de révéler de subtils changements de la composition moléculaire globale de l'échantillon après exposition aux Nano-SiO₂. La lignée cellulaire tubulaire proximale (HK-2) a été exposée à des Nano-SiO₂ de différentes tailles (20 nm et 100 nm) pendant des périodes variables. L'analyse chimiométrique des données spectrales révèle que les Nano-SiO₂ induisent un comportement différent en fonction de leur taille. Ces résultats sont corrélés avec ceux obtenus lors de test de toxicité *in vitro*. Les spectres IR-TF montrent des variations significatives observées particulièrement au niveau des bandes liées à la peroxydation des lipides, confirmant ainsi un stress oxydatif. En outre, des modifications sont notées au niveau de la bande amide I, traduisant un changement de la conformation des protéines. En effet, la conformation en hélices α des protéines est quantitativement plus importante dans les échantillons exposés aux Nano-SiO₂. La réalisation d'une cinétique d'exposition a permis de suivre les modifications cellulaires qui apparaissent progressivement dans le temps. L'utilisation de cet outil a ainsi permis de mettre en évidence précocement des changements dès 3h d'exposition contre 24h par des méthodes classiques de biologie.

Projet financé – 189 MEEDDM – INERIS Nanotrans

Targeting metalloprotease inhibitors to cartilage.

Vivier M.^a, Besse S.^a, Charbonnel N.^b, Vidal A.^a, Tarrit S.^a, Leal F.^a, Weber V.^a, Forestier C.^b, Miot-Noirault^a, E. Chezal J.M.^a

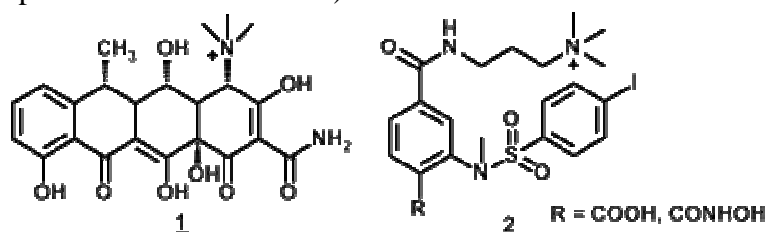
^aClermont Université, Université d'Auvergne, Imagerie moléculaire et thérapie vectorisée, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Inserm, U 990, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Centre Jean Perrin, F-63011 Clermont-Ferrand, France.

^bLaboratoire de Bactériologie, UFR Pharmacie, Université d'Auvergne Clermont1, UFR Pharmacie Bactériologie, 28 place Henri Dunant 63000 Clermont-Ferrand, France

There is a real lack of specificity of the therapy of degenerative (osteoarthritis) and tumoral pathologies of cartilage (chondrosarcoma). Osteoarthritis prevalence is considered to be approximately 10 % of the total population, with a number of cases in France being estimated between 9 and 10 millions [1]. Chondrosarcoma is an orphan disease with a bad prognosis for which the specificity of treatments have to be improved [2]. In this context, new molecules were developed to interfere with cell signaling pathway of cartilage degradation in both degenerative osteoarthritis and proliferation in the case of the chondrosarcoma [3]. Among the different targets, the metalloproteinases (MMP) are an important class of zinc-dependent metalloenzymes involved in protein metabolism of different tissues including cartilage. Inhibitors of MMP1, MMP2 and MMP9 were used for treatment of chondrosarcoma as cytotoxic drugs. The therapeutic efficacy of MMP13 inhibitors has also been demonstrated in experimental osteoarthritis [4].

However, the ubiquitous distribution of MMP limited the clinical application of these compounds with side effects being musculoskeletal and liver toxicity, thrombocytopenia ... To overcome this problem, we develop a strategy of targeting of the MMP inhibitors towards the cartilage by the ammonium quaternary function showing an affinity for the anionic groups of proteoglycans [5].

Our work focused on the targeting of two types of inhibitors: a quaternary ammonium derivative of doxycycline (**1**) as inhibitor of MMP synthesis and inhibitors of MMP catalytic activity (ie arylsulphonamide derivatives **2**).



Synthesis of these structures was undertaken and preliminary biological study was initiated. A loss of bacteriostatic activity and a decrease of MMP synthesis in presence of doxycycline AQ was observed. The synthesized compounds will be tested *in vitro* on purified proteins to verify their anti-MMP activity and *in vivo* on the unilateral partial menisectomy model in guinea pigs and the Swarm rat chondrosarcoma model. Then, the efficiency of the vectorization of these compounds will be evaluated by the biodistribution of these radiolabelled compounds.

[1] a) Claude Le Pen, Camille Reygrobellet, Isabelle Gérentes ; Les conséquences socioéconomiques de l'arthrose en France. Étude COART 1 France ; *Revue du Rhumatisme*, **2005**, 72, 1326-1330 ; b) Reginster JY ; The prevalence and burden of osteoarthritis ; *Rheumatology*, **2002**, 41 :3-6.

[2] Gelderblom H, Hogendoorn PCW, Dijkstra SD, *et al.* ; The clinical approach towards Chondrosarcoma ; *Oncologist*, **2008**, 13, 320-329.

[3] a) Per Qvist, Anne-Christine Bay-Jensen, Claus Christiansen, Erik B. Dam, Philippe Pastoureau, Morten A. Karsdal. ; The disease modifying osteoarthritis drug (DMOAD) : Is it in the horizon ? ; *Pharmacological Research* ; **2008**, 58, 1-7 ; b) Richette P, Bardin T. Structure-modifying agents for osteoarthritis : an update ; *Joint bone Spine* ; **2004**, 71, 18-23.

[4] a) Massimo Sabatini, Christophe Lesur, Marie Thomas, Agne's Chomel, Philippe Anract, Guillaume de Nanteuil, Philippe Pastoureau. Effect of Inhibition of Matrix Metalloproteinases on Cartilage Loss In Vitro and in a Guinea Pig Model of Osteoarthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* ; January **2005**, 52, 1, 171-180 ; b) Satya P. ; Gupta. Quantitative Structure-Activity Relationship Studies on Zinc-Containing Metalloproteinase Inhibitors ; *Chem. Rev.* ; **2007**, 107, 3042-3087.

[5] a) Larsson B, Nilsson M, Tjalve H. The binding of inorganic and organic cations and H+ to cartilage in vitro. *Biochem Pharmacol* ; **1981**; 30: 2963-2970. b) Aurelien Vidal, Massimo Sabatini, Gaëlle Rolland-Valognes, Pierre Renard, Jean-Claude Madelmont, Emmanuelle Mounetou ; Synthesis and in vitro evaluation of targeted tetracycline derivatives: Effects on inhibition of matrix metalloproteinases; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* ; **2007**, 15, 2368-2374.

Traceurs fluorés destinés à l'imagerie diagnostique par TEP : de la recherche à la clinique

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, Imagerie moléculaire et thérapie vectorisée, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Inserm, U 990, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Centre Jean Perrin, F-63011 Clermont-Ferrand, France.

Le fluor-18 est un radioisotope du fluor émetteur β^+ de courte période (110 min). Associé au glucose, il forme le fluorodésoxyglucose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$), radiotraceur de référence pour le diagnostic oncologique par tomographie d'émission de positons (TEP). L'accumulation de ce traceur dans les cellules hyper-métabolisant le glucose en fait tout son intérêt mais est aussi la cause de son manque de spécificité. C'est pour cela que de nombreuses autres molécules fluorées sont actuellement en cours de développement avec des applications en oncologie (FLT, FET, FES...) et également en neurologie (F-DOPA, Altansérine...)¹.

Notre laboratoire possède un savoir-faire dans le domaine du marquage radioactif avec de nombreux radioisotopes d'intérêt en médecine nucléaire (^{123}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$). Depuis 2009, nous avons acquis de nouveaux équipements dédiés à l'utilisation du fluor-18 : enceintes blindées (jusqu'à 75 mm de plomb), automate de radiosynthèse, et plateforme d'imagerie petit animal (caméra TEP et TDM). Du fait de sa période, la réalisation d'études de molécules marquées par le fluor-18 nécessite une optimisation de toutes les étapes depuis le transport du site de production (Laboratoires Cyclopharma), la synthèse, le contrôle qualité, la préparation des doses jusqu'à l'injection chez l'animal. Nous nous proposons en exemple de présenter deux études en cours :²

- 1- La radiosynthèse de la molécule $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$,³ un marqueur de l'hypoxie cellulaire, avec pour objectif une injection à l'homme sur le site clermontois (Centre Jean Perrin).
- 2- La radiosynthèse d'un arylcarboxamide ($[^{18}\text{F}]\text{ICF01006}$) ayant démontré une affinité pour le mélanome malin.⁴

1 - Fluorine-18 radiopharmaceuticals beyond $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ for use in oncology and neurosciences. Coenena *et al.*, *Nucl. Med. Biol.* **2010**, 37 (7), 727-740.

2 - Projet « TRT/PETMEL » du programme « Preuve du concept » CLARA 2009-2013.

3 - Fully automated synthesis of $[^{18}\text{F}]\text{fluoromisonidazole}$ using a conventional $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ module. Oh *et al.* *Nucl. Med. Biol.* **2005**, 32 (8), 899-905.

4 - Evaluation of radiolabeled (hetero)aromatic analogues of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for imaging and targeted radionuclide therapy of melanoma. Chezal *et al.*, *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (11), 3133-3144.

ELABORATION OF MESOSTRUCTURED SILICA NANO-OBJETCS FOR THE ENCAPSULATION OF ANTICANCER DRUGS CANDIDATES

Mathieu Varache¹, Florence Bouyer², Igor Bezverkhy¹, Florence Baras¹ and Frédéric Bouyer¹

¹Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, Département Nanosciences, UMR 5209 CNRS -Université de Bourgogne, 9 avenue Alain Savary, 21078 Dijon Cedex, France ; email : bouyerf@u-bourgogne.fr

² Université de Bourgogne, INSERM, UMR 866, Faculté de Médecine, F-21079 Dijon, France

Platinum-derivatives are widely used as antitumour drugs for the treatment of many malignancies such testicular and ovarian cancers. However, these therapies show limitations due to acquired resistance and side-effects including nephrotoxicity and neurotoxicity. In order to improve the drug efficacy and decrease side-effects, drugs delivery systems (DDSs) are developed for a few decades. These carriers enable to increase the blood circulation time and reduce non specific accumulation in the normal tissues due to EPR effect [2]. Most of these DDSs are macromolecular species such liposomes, polymeric micelles, or water-soluble polymers but less attention has been paid to inorganic systems [3]. In the present paper, the synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles (MSNs) with hexagonal porous structure (MCM-41) is presented using TEOS, CTAB and NaOH as a silica precursor, structure directing agent and catalyst, respectively [4]. Herein, the influence of $[\text{OH}^-]$ on the morphological and structural properties of MSNs as well as their functionalization by thiol groups and a fluorescent molecule using a co-condensation approach is carried out.

[1] C. Sun, J. S. H. Lee, M. Zhang, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60** (11), 1252 – 1265 (2008).

[2] D. Neri, R. Bicknell, *Nature Rev. Cancer*, **5** (6), 436 - 446 (2005).

[3] OV. Salata, *J. Nanobiotechnol.*, **2** (1), 2 – 3 (2004).

[4] V. S.-Y. Lin *et al.*, *Small.*, **6** (18), 1952 – 1967 (2010).

The Aminoglycosides: potential antiviral agents targeting HIV RNA sequences

Vanhaverbeke Cécile,¹ Baussanne Isabelle,¹ Ennifar Eric,²
Dumas Philippe,² and Décout Jean-Luc¹

¹Université de Grenoble I/CNRS, UMR 5063, Département de Pharmacochimie Moléculaire, ICMG FR2607, France

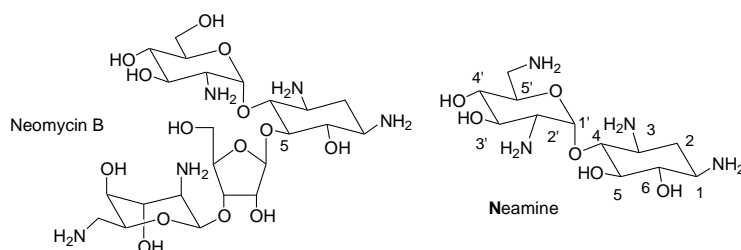
²Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, IBMC CNRS, Strasbourg, France

E-mail: Jean-Luc.Decout@ujf-grenoble.fr

Since the discovery of streptomycin in the 1940s, aminoglycosides have enjoyed widespread applications as chemotherapeutic agents in the treatments of many types of bacterial infections, including both Gram-positive and Gram-negative pathogens.¹ Their antibacterial mechanism of action has been shown to be linked to the aminoglycoside molecular interaction with the 16S rRNA subunit of the 30S bacterial ribosome that disturbs protein synthesis.

In the family of the aminoglycosides, neomycin B has also appeared to be able to strongly inhibit the interaction between the HIV-1 TAR RNA and the transactivating protein Tat.² However, aminoglycosides have no real antiviral activity.

In the search for new antiviral agents, a small aminoglycoside, neamine, which corresponds in neomycin B to a crucial recognition element for TAR RNA interaction, has been modified selectively on different hydroxyl functions. Several derivatives able to strongly inhibit the TAR-Tat binding with submicromolar concentrations were identified using FRET experiments.³ Affinity constants for TAR of the inhibiting derivatives also were measured by SPR and microcalorimetry (ITC).



References

1. J. Zhou, G. Wang, L.-H. Zhang, X.-S. Ye, *Med. Res. Reviews*, **2007**, *27*, 279-316.
2. H.-Y. Mei, A. Galan, S. Halim, P. Mack, W. Moreland, B. Sanders, H. N. Truong, A. W. Czamik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, *5*, 2755-2760.
3. E. Riguet, J. Désiré, O. Boden, V. Ludwig, M. Göbel, C. Bailly, J.-L. Décout, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 4651-4655.

SYNTHÈSE DE NOUVEAUX AMINOGLYCOSIDES : AGENTS ANTIBACTÉRIENS ISSUS DE MODIFICATIONS REGIOSELECTIVES DE LA NEAMINE

L. Zimmermann, I. Baussanne, C. Vanhaverbeke, A. Bussière,
M.-P. Mingeot-Leclercq, J.-L. Décout

Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR 5063 CNRS/Université Joseph Fourier-Grenoble I, ICMG FR 2607, Bât. E André Rassat, 470 rue de la Chimie BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France

Les aminoglycosides représentent une importante classe d'agents antibiotiques naturels utilisés contre une large gamme de microorganismes. Leur activité provient principalement de leur interaction spécifique avec le site A de l'ARN ribosomal 16S bactérien perturbant ainsi la synthèse protéique.

Cependant, il est nécessaire aujourd'hui de développer de nouveaux aminoglycosides pour diminuer leur importante toxicité (effets néphrotoxiques et ototoxiques) et lutter contre l'apparition de souches bactériennes résistantes (par exemple par modifications enzymatiques).

A cette fin, nous avons modifié chimiquement la néamine qui correspond au plus petit élément structural commun à la plupart des aminoglycosides conservant une bonne affinité pour l'ARN cible. Des méthodes de modifications sélectives des différents groupements hydroxyles de la néamine ont ainsi été mises au point^{1,2} et ont permis l'introduction de groupements alkyles (figure 1) tels que des groupements 2-pyridylméthylène, 2-quinoléinylméthylène, naphthylméthylène.... Des tests antibactériens effectués avec les différents composés synthétisés ont révélé la forte activité d'un certain nombre de ces derniers, en particulier contre les bactéries Gram (+) et Gram (-) résistantes.³ Les premières études du mécanisme de l'effet antibactérien sur *Pseudomonas aeruginosa* suggèrent un mode d'action des dérivés amphiphiles de la néamine préparés nouveau pour les aminoglycosides impliquant une dépoléarisation de la membrane de *Pseudomonas aeruginosa* a été observée.⁴

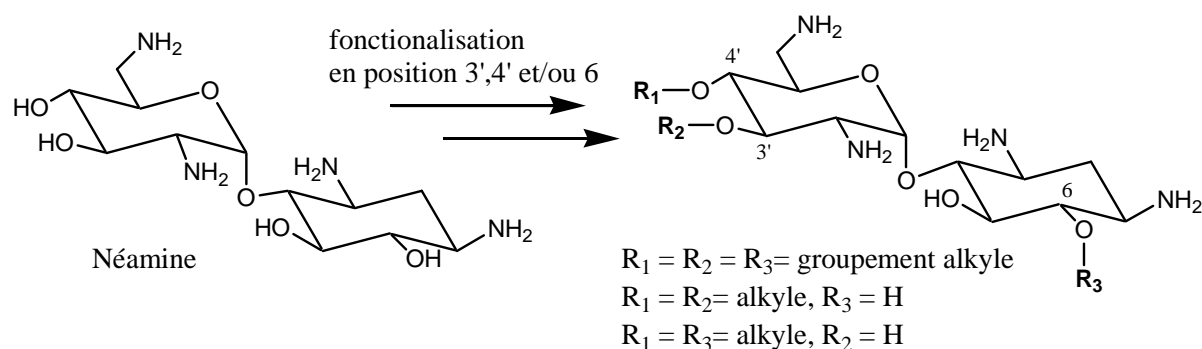


Figure 1 : Modifications régiosélectives de la néamine réalisées.

[1] A route for preparing new neamine derivatives targeting HIV-1 TAR RNA. E. Riguet, J. Désiré, C. Bailly, J.-L. Decout. Tetrahedron 2004, 60, 8053-8064.

[2] Major increases of the reactivity and selectivity in aminoglycoside O-alkylation due to the presence of fluoride ions. O. Jackowski, A. Bussière, C. Vanhaverbeke, I. Baussanne, E. Peyrin, M.-P. Mingeot-Leclercq, J.-L. Décout. Tetrahedron 2012, 68, 737-746.

[3] Synthesis and antimicrobial evaluation of amphiphilic neamine derivatives. I. Baussanne, A. Bussière, S. Halder, C. Ganem-Elbaz, M. Ouberai, M. Riou, J.-M. Paris, E. Ennifar, M.-P. Mingeot-Leclercq, J.-L. Décout. J. Med. Chem. 2010, 59, 119-127.

[4] The *Pseudomonas aeruginosa* membranes: a target for a new amphiphilic aminoglycoside derivative? M. Ouberai, F. El Garch, A. Bussière, M. Riou, D. Alsteens, L. Lins, I. Baussanne, Y. F. Dufrière, R. Brasseur, J.-L. Décout, M.-P. Mingeot-Leclercq. Biophys. Biochem. Acta Biomembranes 2011, 2011, 1808, 1716-1727.

COX-2 overexpression confers resistance to ursolic acid-induced apoptosis in human HT-29 colorectal cancer cells

**Limamy Y., Pinon A., Léger D.Y., Cook-Moreau J., Beneytout J.L., Delage C.,
Simon A., Liagre B.**

**EA 4021 « Biomolécules et thérapies anti-tumorales » - Faculté de Pharmacie
87025 - Limoges**

BACKGROUND

Colorectal cancer is a major health concern worldwide. It is one of the most common cancer types and the third leading cause of cancer-related death in the western world. Generally, colorectal cancers are resistant to anticancer drugs. Several lines of evidence support a critical role for cyclooxygenase-2 (COX-2) during colorectal tumorigenesis and its role in chemoresistance. COX-2 is progressively overexpressed in the transition from normalcy to malignancy. Given this, the comprehension of COX-2 role in resistance to apoptosis seems to be important to develop effective anticancer drugs.

AIM

In this study, we focused our interest on the role played by COX-2 in apoptosis induced in HT-29 human colorectal cancer cells by ursolic acid (UA), a triterpenoid found in a large variety of plants and vegetarian foods.

DISCUSSION

In this work, we showed that UA inhibited HT-29 cell proliferation in a dose and time-dependent manner and that inhibition of cell proliferation was correlated with an induction of an apoptotic process. Furthermore, we observed that COX-2 was overexpressed only in apoptotic cells. We, then, demonstrated the role of p38 as a COX-2 transcription factor. Indeed, inhibition of the p38 pathway in UA-treated cells led to COX-2 inhibition but led unexpectedly to an increase in apoptosis. This result suggests a role of COX-2 in resistance to apoptosis. Involvement of COX-2 in resistance to apoptosis was confirmed using COX-2-specific siRNA. In our model, these results demonstrated that COX-2 overexpression in apoptotic cells delays cell death, and support a major role for COX-2 in colorectal cancer chemoresistance.

FUTURE DIRECTIONS

Having shown that COX-2 overexpression in apoptotic cells plays a role in delaying cell death, we wish to determine whether this resistance to apoptosis *via* COX-2 is dependent on its activity.

THE TOPOLOGICAL PRESSURE - TEMPERATURE PHASE DIAGRAM OF BICALUTAMIDE: AN ENTROPY-DRIVEN MONOTROPIC PHASE RELATIONSHIP TURNING ENANTIOTROPIC UNDER PRESSURE

I. Gana^{1,2}, I. B. Rietveld^{1,*}, B. Do², R. Céolin¹

¹ EAD Physico-chimie Industrielle du Médicament, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 4, Avenue de

l'Observatoire, 75006 Paris, France

² Etablissement Pharmaceutique de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Agence Générale des Equipements et Produits de Santé, 7, rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France.

* ivo.rietveld@parisdescartes.fr

The topological approach to obtain pressure – temperature phase diagrams has been used previously to determine the phase behavior of atovaquone under temperature and pressure [1]. In the present case, data of bicalutamide have been used from literature to construct its $P - T$ diagram. Bicalutamide possesses two known polymorphs, whose specific volumes are effectively equal [2]. This implies that pressure has no influence on the solid – solid equilibrium and that the transition is mainly entropy-driven. Under ordinary pressure, the phase relationship is monotropic; nonetheless it turns enantiotropic at higher pressure, due to the fact that the two solid – liquid equilibria are not devoid of pressure influence.

[1] R. Céolin and I. B. Rietveld, **J. Therm. Anal. Calorim.**, 102(1), 357-360 (2010)

[2] D.R. Vega, G. Polla, A. Martinez, E. Mendioroz, M. Reinoso, **Int. J. Pharm.**, 328, 112-118 (2007)

THE PHASE BEHAVIOR OF BENFLUOREX-HYDROCHLORIDE: UNEXPECTED ENANTIOTROPY AT ORDINARY PRESSURE AND AN ELUSIVE SOLID – SOLID TRANSITION

Maria Barrio¹, Elisabetta Maccaroni², Ivo B. Rietveld^{3,*}, Luciana Malpezzi², Norberto Masciocchi⁴, René Céolin^{1,3}, Josep-Lluís Tamarit¹

* ivo.rietveld@parisdescartes.fr

¹ Grup de Caracterització de Materials, Departament de Física i Enginyeria Nuclear, ETSEIB, Diagonal, 647 Barcelona 08028, Catalonia, Spain

² Department of Chemistry, Materials and Chemical Engineering 'G. Natta', Politecnico di Milano, Via Mancinelli 7, I-20131 Milano, Italy

³ Laboratoire de Chimie Physique (EA4066), Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 4, Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

⁴ Dipartimento di Scienze Chimiche e Ambientali, Università dell'Insubria, via Valleggio 11, I-22100 Como, Italy

In the pharmaceutical world, benfluorex-HCl is better known as the active pharmaceutical ingredient (API) of Mediator®, recently taken out of the French market due to unacceptable side effects. Despite its outcast status, the API possesses interesting phase behavior. A stable melting transition for solid phase I and a metastable melting transition for solid phase II some 5 degrees lower together with the absence of any observed solid – solid transition seduces the investigator to judge the phase relationship between solid I and solid II as monotropic with solid I as the stable phase. Closer investigation, using the topological approach, demonstrates that this judgment is not according to the thermodynamic laws. Solid II has a higher density and a lower enthalpy than solid I [1,2], which implies that II is the highpressure, low-temperature form. Because solid I has a stable melting point, a stable solid – solid transition must exist under ordinary pressure. Extremely slow scanning by DSC (0.1 K min⁻¹) led to the elusive solid – solid transition at 395 K and allowed the construction of the complete pressure – temperature phase diagram. In addition, the resulting *P* – *T* diagram was confirmed by pressure – temperature curves of the melting transitions for both solid forms that were measured independently. The diagram reflects the paradigmatic phase diagram of sulfur, with solid form II possessing the largest stable domain and being the stable form under ordinary conditions.

[1] E. Maccaroni, L. Malpezzi, W. Panzeri, N. Masciocchi, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 53(1), 1-6 (2010)

[2] M. Barrio, E. Maccaroni, I. B. Rietveld, L. Malpezzi, N. Masciocchi, R. Céolin, J.-L. Tamarit, **J. Pharm. Sci.**, DOI: 10.1002/jps.22821 (2011)

ETUDES DES INTERACTIONS PRINCIPES ACTIFS – EXCIPIENTS PAR ANALYSES THERMIQUES, DIFFRACTION DES RAYONS X ET METHODES SPECTROSCOPIQUES
Y. Corvisi¹, P. Négrier², M. Lazerges¹, L. Bouteiller³, P. Espeau¹

¹ Laboratoire Physico-Chimie Industrielle du Médicament, EA 4066, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 Avenue de l'Observatoire, 75 006 Paris.

² Laboratoire Onde et Matière d'Aquitaine, Université de Bordeaux 1, UMR CNRS 5798, 351 cours de la Libération, 33 405 Talence Cedex.

³ UMR-CNRS 7610 Chimie des Polymères, 4 place Jussieu, Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris.

Lors de la fabrication d'un comprimé, l'addition d'un excipient à un principe actif est destinée à conférer une consistance donnée, ou d'autres caractéristiques physiques, au produit final, le médicament. Cependant, toute interaction avec le principe actif, chimique ou physique, doit être évitée. En effet, la forme active peut être altérée chimiquement mais également subir des modifications conformationnelles en présence d'une seconde molécule. L'étude de ces interactions, à l'état solide, est réalisée par l'analyse du diagramme de phases complet entre les deux entités (analyses thermiques et radiocristallographiques).

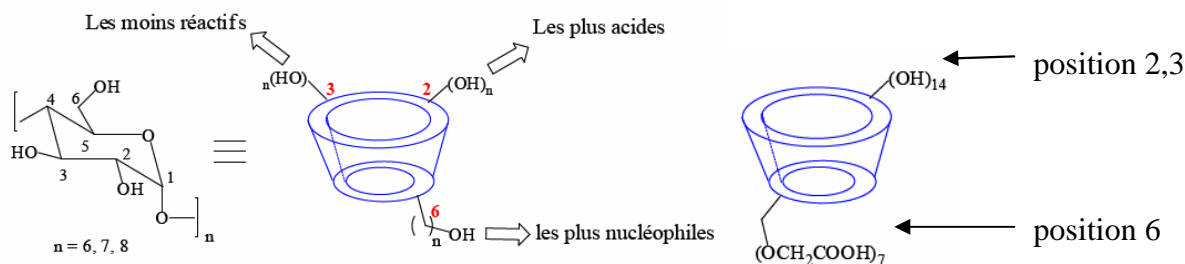
À titre d'exemples, seront présentés des cas de diagrammes de phases faisant intervenir des mélanges eutectiques, liquides à température ambiante, pour anesthésie locale à base de lidocaïne. De plus, ces études couplées à la spectroscopie Infra-Rouge en phase liquide, permettent de mettre en évidence la force des interactions croisées et non croisées entre les constituants du mélange binaire.

Seront également présentés des mélanges eutectiques pour mise en forme galénique solide. Dans ce dernier cas, la substance active visée est l'ibuprofène associé à l'acide stéarique. L'ibuprofène est généralement utilisé sous forme racémique des deux énantiomères R et S. À notre connaissance, aucune étude complète du diagramme de phases n'a été réalisée entre ces deux constituants. De plus, aucune étude comparative de comportement n'a été menée dans le cadre de l'association entre l'acide stéarique et la seule forme active de l'ibuprofène, *i.e.* l'énantiomère S. Le but du travail est de présenter une étude complète des deux systèmes binaires acide stéarique/S-ibuprofène et acide stéarique/RS-ibuprofène, réalisés à partir des dispersions solide/solide correspondantes.

Caractérisation physico-chimique de nouveaux agents de contraste à base de cyclodextrines modifiées par des fonctions carboxyliques

Cécile Barbot, Amira Chekkal, Hussein Idriss, Géraldine Gouhier

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation physico-chimique de nouveaux agents de contraste à base de β -cyclodextrines modifiées par des fonctions carboxyliques. Des études effectuées au laboratoire, ont déjà pu montrer une meilleure efficacité en IRM de ces molécules complexées par le gadolinium par rapport à celle des complexes Gd-DOTA ou Gd-DTPA actuellement utilisés dans le domaine médical.



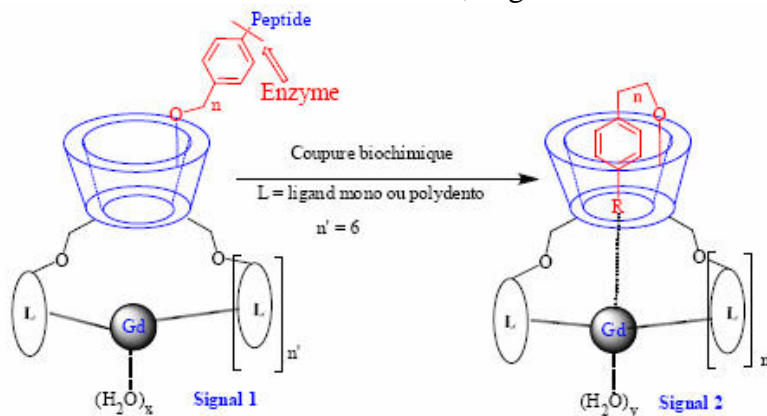
Dans un premier temps, les β -cyclodextrines ont été modifiées en position 6, sur leur face inférieure par greffage de sept groupements méthylène carboxylate.

A ce stade les caractérisations physico-chimiques ont été menées sur les cyclodextrines carboxylées protégées par des groupements méthoxy en position 2 et 3.

Les études potentiométriques ont été interprétées au moyen du programme Hyperquad afin d'évaluer les pKas des groupements carboxyliques greffés et les constantes de complexation de l'euprium ou du gadolinium avec ces ligands.

La stoechiométrie des complexes a été étudiée par spectrofluorimétrie.

Les étapes suivantes vont consister à greffer sur la face supérieure un ligand de nature peptidique dit « activable » portant un élément dit « de ciblage » pour accentuer la reconnaissance tissulaire. Une fois la cible biologique atteinte, l'action d'une enzyme permettra localement une coupure spécifique au niveau du bras espaceur reliant l'agent de ciblage à la cyclodextrine. A la suite de cette coupure, l'extrémité liée à l'oligosaccharide sera suffisamment lipophile et flexible pour venir s'inclure dans la cavité interne de la β -CD et ainsi affecter l'état de relaxation des molécules d'eau, engendrant une modification du signal.



Synthèse et évaluation de l'activité anti-biofilm d'analogues originaux des HomoSérine Lactones (HSL) de *Pseudomonas aeruginosa*.

Furiga Chusseau A., Lajoie B., El Hage S., Baziard G., Roques C.

*Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503), dép. Bioprocédés et Systèmes Microbiens, Université Paul Sabatier
Toulouse III,*

Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse cedex 9

- Objectif : *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie ubiquiste pouvant provoquer des infections pulmonaires graves et chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose, notamment en établissant au stade infectieux un biofilm difficile à éliminer. La mise en place de ce biofilm est principalement régulée par des mécanismes de Quorum-Sensing (QS), contrôlés par de petites molécules, les HomoSérine Lactones : C4-HSL et C12-HSL. Des travaux antérieurs ayant démontré que des analogues des HSL inhibaient la formation de biofilms à *P. aeruginosa*, l'objectif de notre étude est donc de concevoir et tester l'activité anti-biofilm de nouveaux analogues des HSL.

- Méthodes : Dans un premier temps, une méthode originale de criblage en microplaques a été mise au point puis validée par l'utilisation de la furanone, afin de caractériser les différentes étapes de l'adhésion à la structuration du biofilm à *P. aeruginosa*. Ensuite, une première série d'analogues, basés sur la structure de la C4-HSL et caractérisés par des modifications du cycle lactone, ont été synthétisés puis testés pour leur activité antimicrobienne, leur action inhibitrice de la formation du biofilm sur le modèle mis en place et pour leur activité cytotoxique (test au XTT).

- Résultats : Parmi cette première série d'analogues, un composé (C11, N-pyrimidyl butanamide) a montré une inhibition dose-dépendante significative de la formation du biofilm, doublée d'une absence de cytotoxicité. Une étude des relations structure-activité a ensuite été réalisée sur le composé C11 afin de synthétiser une nouvelle série d'analogues dont le criblage a permis de mettre en évidence deux nouveaux composés possédant une activité anti-biofilm significative. Le composé C11 possédant une activité sur les premières phases de formation du biofilm, nous testons actuellement différentes associations des analogues actifs afin d'obtenir une inhibition sur plusieurs stades de la formation du biofilm. En parallèle, nous avons développé la technique de PCR quantitative afin d'augmenter la rapidité et la fiabilité de la quantification de la biomasse adhérente et donc du criblage des analogues.

- Discussion et Conclusion : Afin de poursuivre nos travaux, nous proposons de réaliser la synthèse puis le criblage de nouveaux analogues basés sur la structure de la C4-HSL, puis sur celle de la C12-HSL, dans l'objectif d'associer des inhibiteurs des deux mécanismes régulateurs du QS. Nous proposons également d'analyser le ou les analogues d'intérêt en association avec des antibiotiques antipyocyaniques afin de révéler une éventuelle potentialisation. Les analogues seront ensuite étudiés sur le modèle de criblage placé dans des conditions d'anaérobiose dans l'intention de se rapprocher des conditions de colonisation de la bactérie *in vivo*. Enfin, l'absence de cytotoxicité des analogues sera contrôlée sur cellules pulmonaires en vue de sélectionner une ou plusieurs molécules candidates pour des tests sur modèle murin, première phase indispensable avant tout développement clinique chez l'homme.

Ainsi, cette étude devrait nous permettre d'identifier un ou plusieurs composés spécifiquement actifs sur le biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*, et de définir les conditions optimales pour des essais ultérieurs *in vivo* : concentration active, activité préventive et/ou curative, établissement de nouveaux schémas thérapeutiques, association aux antipyocyaniques...

Ce travail fait l'objet d'un soutien par l'Association Vaincre la Mucoviscidose.

C. Deraeve,^a V. Bernardes-Génisson,^a J.-L. Stigliani,^a A. Quémard,^b P. Constant,^b J. Bernadou^a et G. Pratiel.^a

^a Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS ^b Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale
205 route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex Email : vaniabg@lcc-toulouse.fr, celine.deraeve@lcc-toulouse.fr

Introduction

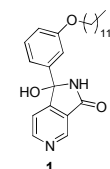
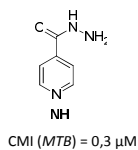
Isoniazide (INH) : antibiotique de 1^{ère} ligne dans le traitement de la tuberculose, mais pour lequel il existe des souches résistantes.

Cible : Enzyme InhA de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), qui intervient dans la biosynthèse des acides mycoliques de la paroi bactérienne.

Inhibiteurs de type azaïsoindolinone [1]

Composé " tête de série " : **1**

- ✓ 40 % d'inhibition d'InhA à 100 µM
- ✓ CMI (*M. tuberculosis*) = 156 µM
- ✓ Sélectivité pour *M. tuberculosis* par rapport à d'autres souches bactériennes (*E. Coli*)



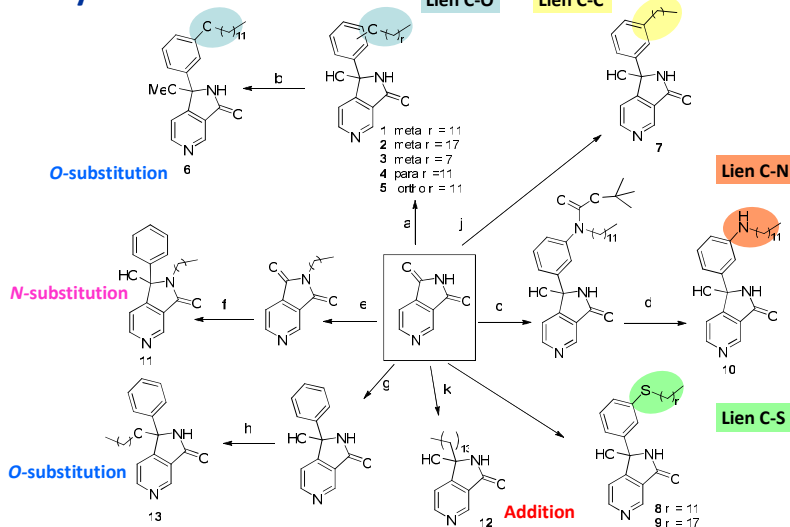
Docking: Superposition de **1** (en rouge) et du substrat (acide gras) dans le site actif d'InhA



Projet : Pharmaco-modulation de **1**

- ✓ chaîne hydrophobe : variation de la longueur et de la position
- ✓ variation de la nature du lien entre noyau aromatique et chaîne hydrophobe
- ✓ rôle du noyau phényle
- ✓ introduction de la chaîne sur le cycle hémiamidal (OH et/ou NH)

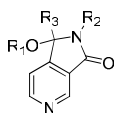
1. Synthèse [2]



a) $C_6H_4BrOC_{12}H_{25}$ or $C_6H_4BrOC_{18}H_{37}$ or $C_6H_4BrC_8H_{17}$, *n*-BuLi, THF, -78 °C; b) $SOCl_2$, CH_3OH , reflux, 90%; c) $C_6H_4BrN(C_{12}H_{25})COOC(CH_3)_3$, *n*-BuLi, -78 °C/1h; d) CF_3COOH , CH_2Cl_2 , 0 °C; e) $C_{12}H_{25}I$ or $C_{18}H_{37}I$, K_2CO_3 , DMF, 50 °C; f) $PhMgBr$, THF, -78 °C; g) $PhLi$, THF, -78 °C; h) $SOCl_2$, $C_{12}H_{25}OH$, reflux; i) $C_6H_4BrSC_{12}H_{25}$ or $C_6H_4BrSC_{18}H_{37}$, *n*-BuLi, -78 °C/1h; j) *n*-dodecylboronic acid, $Pd(dppf)Cl_2$, Ag_2O , K_2CO_3 , THF, 80 °C; k) $MgBrC_{14}H_{29}$, THF, -78 °C; .

2. Inhibition enzymatique et activité anti-mycobactérienne [2]

Pourcentage d'inhibition de l'enzyme InhA et inhibition de la croissance de *M. tuberculosis* (MTB) :



Composé	R ₃	R ₁	R ₂	Inhibition d'InhA (%)		CMI (µM)		IC ₅₀ (µM)
				100 mM	30 mM	MTB	MTB	
1	Ph- <i>m</i> OC ₁₂	H	H	27	12	156	-	
2	Ph- <i>m</i> OC ₁₈	H	H	67	28	25	12	
3	Ph- <i>m</i> OC ₈	H	H	12	-	250	-	
4	Ph- <i>p</i> OC ₁₂	H	H	16	1	>100	-	
5	Ph- <i>o</i> OC ₁₂	H	H	0	0	>100	-	
6	Ph- <i>m</i> OC ₁₂	Me	H	0	-	25	10	
7	Ph- <i>m</i> C ₁₂	H	H	4	-	9.8	7	
8	Ph- <i>m</i> SC ₁₂	H	H	66	15	12.5	6.5	
9	Ph- <i>m</i> SC ₁₈	H	H	ND*	26	> 100	-	
10	Ph- <i>m</i> NHC ₁₂	H	H	9% activation	1	> 100	-	
11	Ph	H	C ₁₂	13	0	12.5	4.5	
12	C ₁₄	H	H	10% activation	-	> 100	-	
13	Ph	C ₁₂	H	ND*	20	25	9.5	
Triclosan					37 à 10 µM		43.1	
Isoniazide						0.6		
Ciprofloxacine						2.5		

*ND : Non déterminée (problème de solubilité)

3. Relations structure – activité [2]

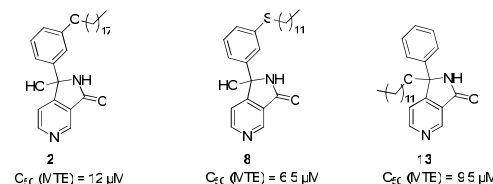
✓ présence d'un noyau phényle et d'une chaîne lipophile essentielles pour l'activité sur InhA et *M. tuberculosis*

- ✓ chaîne lipophile sur le noyau aromatique :
 - position : *mé*ta (**1**) >> *para* (**4**) >> *ortho* (**5**) sur InhA et *M. tuberculosis*
 - nature de X : S (**8**) > O (**1**) >> C (**7**) > NH (**10**) sur InhA mais S (**8**) ~ C (**7**) > O (**1**) >> NH (**10**) sur *M. tuberculosis*
 - chaînes longues favorisées : C₁₈ > C₁₂ > C₈ pour l'inhibition enzymatique

- ✓ chaîne lipophile en C₁₂ sur le cycle hémiamidal :
 - alkylation en R₁ sur l'hydroxyle tertiaire (**13**) très favorable pour l'inhibition d'InhA et de la croissance de *M. tuberculosis*
 - alkylation du N-hémiamidal en R₂ (**11**) diminue l'activité sur InhA mais est très favorable sur *M. tuberculosis*

- ✓ méthylation du OH tertiaire en R₁ (**6**) abolit l'inhibition d'InhA mais améliore l'activité anti-mycobactérienne

Meilleurs agents inhibiteurs d'InhA et anti-mycobactériens :



Conclusions

La pharmacomodulation de **1** a conduit à des inhibiteurs d'InhA plus puissants, ainsi qu'à des composés possédant une activité anti-mycobactérienne améliorée (facteur 10) sur les souches *M. tuberculosis*. Dans le cas des composés **2**, **8** ou **13** l'activité antibactérienne pourrait être associée à l'inhibition d'InhA, tandis que les composés **6**, **7** et **11**, actifs sur *M. tuberculosis* mais agissant faiblement sur InhA, semblent avoir un mécanisme d'action différent.

Perspectives

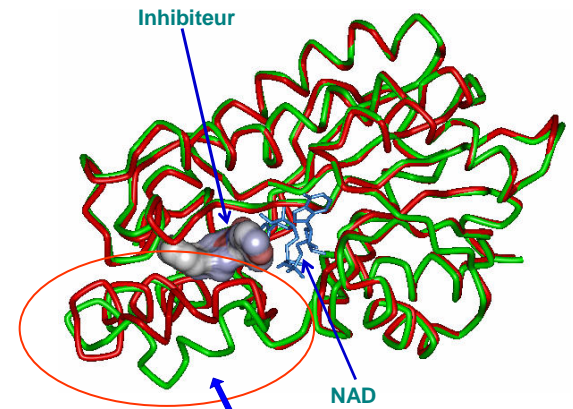
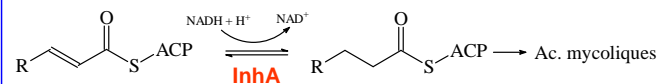
- ✓ validation du mécanisme d'action des composés **2**, **8**, et **13** (par inhibition de la biosynthèse des acides mycoliques)
- ✓ identification des cibles des molécules **6**, **7** et **11**
- ✓ mise en évidence des interactions enzyme – inhibiteur (co-cristallisation de **2** ou **8** avec InhA) dans le but de rationaliser le développement de nouveaux inhibiteurs (auxilié par des calculs de modélisation moléculaire)

Inhibiteurs de l'enzyme mycobactérienne InhA : cross-docking sur 4 structures conformationnelles d'InhA et détermination de l'énergie d'interaction par la méthode PM6-DH2.

Jean-Luc Stigliani, Vania Bernardes-Génisson, Jean Bernadou, Geneviève Prativiel
Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex 4

InhA (enoyl-acyl carrier protein reductase) :

- enzyme retrouvée chez *Mycobacterium tuberculosis*
- intervient dans la biosynthèse des acides mycoliques (constituants de la paroi bactérienne)
- cible de l'isoniazide, mais ce dernier nécessite pour agir, une activation catalysée par l'enzyme *KatG* ⇒ **apparition de résistances**
- La conception d'**inhibiteurs directs** d'InhA, ne nécessitant pas d'activation, font de cette enzyme une cible de choix.

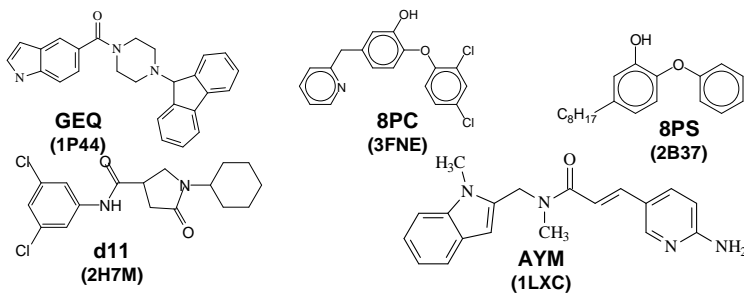


Superposition de 2 structures d'InhA (1P44 et 3FNE)

Le docking moléculaire :

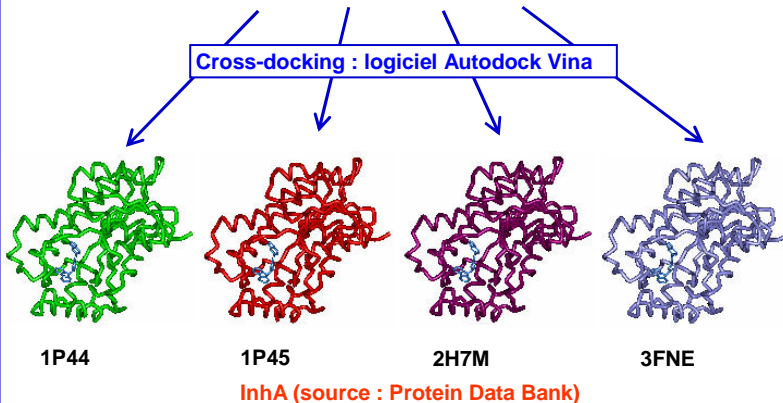
- Recherche de la conformation bio-active d'un composé et de sa meilleure orientation au sein de la cavité protéique par déplacements de ce dernier et par des rotations de liaisons (ligand flexible).
- Possibilité d'incorporer la mobilité des chaînes latérales d'acides aminés mais ne prend pas en compte la flexibilité de la chaîne principale ⇒ le docking sur une simple cible rigide réduit les chances d'aboutir à la conformation bio-active.
- Une approche pour incorporer la flexibilité du récepteur dans le docking consiste à effectuer le docking sur plusieurs conformations de ce récepteur (technique dite « ensemble docking »).

Méthodologie :



Inhibiteurs connus d'InhA (source : Protein Data Bank)
Le code des protéines correspondantes est donné entre parenthèses

Cross-docking : logiciel Autodock Vina



- Relaxation des conformations issues du docking (Vina) par mécanique moléculaire (Post-docking)
- Calcul de l'énergie d'interaction : méthode PM6-DH2 (logiciel MOPAC2009)
- Sélection des meilleurs scores et comparaisons aux conformations bioactives (RMSD)

Résultats :

GEQ	InhA	E_{vina} (rank)	PM6 (rank)	RMSD
	1P44	-10.9 (1)	-21.1 (1)	0.3
	1P45	-7.9 (10)	3.9 (5)	2.0
	2H7M	-8.3 (1)	-33.4 (1)	1.9
	3FNE	-7.9 (3)	-20.4 (1)	3.6

d11	InhA	E_{vina} (rank)	PM6 (rank)	RMSD
	1P44	-7.3 (3)	-2.7 (1)	1.1
	1P45	-7.2 (2)	-2.3 (2)	2.9
	2H7M	-8.3 (1)	-15.0 (1)	0.4
	3FNE	-7.4 (2)	-12.2 (1)	2.3

8PS	InhA	E_{vina} (rank)	PM6 (rank)	RMSD
	1P44	-3.8 (2)	-9.3 (6)	2.4
	1P45	-5.2 (1)	-30.5 (1)	2.9
	2H7M	-5.4 (1)	-27.5 (1)	2.7
	3FNE	-7.2 (2)	-26.5 (1)	2.1

superposition du meilleur résultat de docking, obtenu pour chaque conformation d'InhA, avec la structure cristalline de l'inhibiteur (représentée en gris). Le RMSD reflète la qualité du docking.

Discussion :

- La conformation correcte de l'inhibiteur est logiquement retrouvée lorsque le docking est effectué sur la protéine d'origine (GEQ/1P44, 8PC/3FNE...) et correspond au premier score calculé par Autodock Vina.
- Elle est par ailleurs retrouvée sur au moins une autre structure d'InhA et est en général classée parmi les 3 premiers scores donnés par Autodock Vina (sur 10 calculés).
- L'énergie d'interaction calculée sur les conformations issue du docking par la méthode PM6-DH2 permet, dans environ 95% des cas, de sélectionner un résultat très proche de la structure conformationnelle correcte de l'inhibiteur.
- L'une des structures d'InhA : **2H7M**, s'avère être plus discriminante que les autres. La conformation correcte est retrouvée pour les 5 inhibiteurs étudiés.

Conclusion : Cette procédure, développée avec succès dans notre laboratoire, sera appliquée dans le cadre d'un screening virtuel, en utilisant comme motif de base la structure du métabolite de l'isoniazide.