

Nouveaux inhibiteurs macrocycliques de InhA de *Mycobacterium tuberculosis* obtenus par chimie combinatoire dynamique

Encadrants de thèse : Christian Lherbet¹ et Lionel Mourey²

¹ Equipe Produits Naturels et Analogues : Synthèse et Mécanisme (PNASM, LSPCMIB, Toulouse) : lherbet@chimie.ups-tlse.fr

² Equipe Biophysique structurale (IPBS, Toulouse) : lionel.mourey@ipbs.fr

Mots clés : Macrocycles, enzyme, InhA, *in situ*, cristallographie des rayons X, enzymologie

Nous cherchons à recruter un étudiant très motivé pour une thèse qui démarrera le 1^{er} Octobre 2020 et sera effectuée dans l'équipe PNASM au LSPCMIB (partenaire 1) et l'équipe Biophysique structurale à l'IPBS (partenaire 2). Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la découverte de nouveaux agents antituberculeux.

Selon le dernier rapport de l'Organisation Mondiale pour la Santé, la tuberculose touche près de 10 millions de personnes dans le monde. L'émergence de souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes aux médicaments augure d'une incidence croissante, conduisant à une augmentation du nombre de victimes. Au cours des 40 dernières années, peu de médicaments antituberculeux, notamment la bédaquiline, le délamanide et le prétomanide, ont été approuvés par l'U.S. Food and Drug Administration, mais déjà des résistances apparaissent. C'est pourquoi il est nécessaire d'identifier d'autres molécules capables d'éradiquer la tuberculose. Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides mycoliques représentent des cibles privilégiées pour la découverte de nouveaux antituberculeux, en particulier les protéines appartenant au système de synthèse des acides gras de type II (FAS-II), qui n'est pas présent chez les humains. L'une d'entre elles, l'enzyme InhA, essentielle à la survie de *M. tuberculosis*, catalyse la réduction du substrat 2-trans-énoyl-ACP. L'isoniazide (INH), un médicament antituberculeux de première ligne, est un des composés les plus efficaces pour traiter la tuberculose et inhibe indirectement InhA. En effet, INH agit comme une prodrogue nécessitant une activation par KatG, une catalase peroxydase pour générer le radical isonicotinoyle. Cette espèce radicale réagit par covalence avec le NAD, ce qui produit un adduit isonicotinoyl-NADH (INH-NADH), agissant comme inhibiteur réel de l'enzyme InhA. Différentes classes d'inhibiteurs directs d'InhA ont été étudiées comme les biaryl ethers représentés par le triclosan (TCL) et ses dérivés. La protéine InhA possède un site actif relativement vaste, mais étonnamment il existe très peu d'inhibiteurs macrocycliques de cette enzyme. La chimie combinatoire dynamique (DCC) est une stratégie puissante pour découvrir de nouveaux inhibiteurs de cibles protéiques. Elle consiste à auto-assembler réversiblement des réactifs de départ pour obtenir une bibliothèque combinatoire dite dynamique (DCL). Cette réversibilité permet la variation des proportions entre les composants de la bibliothèque et leur adaptation à une cible biologique. Cette cible aura pour rôle de stabiliser la molécule ayant la plus forte affinité et jouera alors le rôle de "template" (matrice). Pour découvrir de nouveaux inhibiteurs d'InhA, nous proposons d'utiliser un nouveau concept de macrocyclisation basé sur cette stratégie puissante qu'est la DCC en utilisant InhA comme matrice. Cette stratégie est inédite pour des réactions de macrocyclisation et pourrait être appliquée à d'autres systèmes biologiques.

Mise en œuvre

Phase 1 (partenaire 1). Construction de la bibliothèque. Deux types de réactifs de départ seront combinés pour donner une bibliothèque de molécules. Le premier type sera basé sur le triclosan qui comportera deux fonctions réactives, typiquement aldéhyde ou amine. Le second type correspondra à des ligands hydrophobes comportant des parties réactives complémentaires au premier type.

Phase 2 (partenaires 1 et 2). Identification d'inhibiteurs potentiels de InhA. La bibliothèque de molécules obtenue lors de la phase 1 sera mise en présence de la protéine InhA afin de stabiliser le(s) macrocycle(s) formé(s). La réaction sera arrêtée par réduction et le mélange chimique résultant sera analysé par chromatographie (HPLC/MS). Ces analyses se feront au sein de la plateforme intégrée de criblage de Toulouse (PICT, IBiSA). Cette bibliothèque pourra aussi être mise en présence de la protéine InhA en vue de sa cristallisation avec un ou plusieurs ligands macrocycliques.

Phase 3 (partenaires 1 et 2). Optimisation chimique des ligands. Les inhibiteurs identifiés lors de la phase 2 seront optimisés en s'appuyant sur les données issues de la biologie structurale et les activités biologiques des molécules. En perspective, les molécules macrocycliques présentant une très bonne activité contre InhA seront évaluées pour leur potentiel d'inhibition de la croissance des souches mycobactériennes.

L'étudiant.e en thèse :

- (i) synthétisera les précurseurs acycliques ainsi que des produits cycliques correspondants et les caractérisera par des techniques classiques de caractérisation structurale (spectroscopies IR et RMN / spectrométrie de masse) ;
- (ii) produira et purifiera la protéine InhA ;
- (iii) caractérisera l'interaction des molécules synthétisées avec InhA par différentes techniques : fluorométrie différentielle à balayage (DSF), titration calorimétrique isotherme (ITC), thermophorèse microéchelle (MST), etc. ;
- (iv) déterminera des structures haute-résolution de complexes InhA/ligands en utilisant la radiocristallographie des rayons X.

Références

- 1) Chollet, A.; Mourey, L.; Lherbet, C.; Delbot, A.; Julien, S.; Baltas, M.; Bernadou, J.; Pratviel, G.; Maveyraud, L.; Bernardes-Génisson, V. *J. Struct. Biol.* **2015**, *190*, 328-337.
- 2) Chollet, A.; Mori, G.; Menendez, C.; Rodriguez, F.; Fabing, I.; Pasca, M.R.; Madacki, J.; Kordulakova, J.; Constant, P.; Quémar, A.; Bernardes-Génisson, V.; Lherbet, C.; Baltas, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 218-235.
- 3) Chollet, A.; Maveyraud, L.; Lherbet, C.; Bernardes-Génisson, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 318-343 (Review).

Le candidat retenu acquerra des compétences dans les domaines suivants : synthèse organique en plusieurs étapes, outils analytiques pour la chimie (RMN, IRTF, spectrométrie de masse, cristallographie), production et purification des protéines, essais enzymatiques, bio-cristallographie. Le salaire de trois ans, entièrement financé, s'étendra de 2020 à 2023.