



HAL
open science

Outils moléculaires sélectifs pour la détection et la modulation de la tyrosinase humaine et de la mélanogenèse **in vivo**

Romain Haudecoeur

► To cite this version:

Romain Haudecoeur. Outils moléculaires sélectifs pour la détection et la modulation de la tyrosinase humaine et de la mélanogenèse in vivo. Sciences pharmaceutiques. Université Grenoble - Alpes, 2020. <tel-04768611>

HAL Id: tel-04768611

<https://hal.science/tel-04768611v1>

Submitted on 6 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC 4.0 - Attribution - Non-commercial use - International License

Mémoire pour l'obtention de
L'HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

Présenté par
Romain HAUDECOEUR

Préparé au sein du Département de Pharmacochimie
Moléculaire (DPM UMR 5063) et de l'UFR de Pharmacie de
l'Université Grenoble Alpes

**OUTILS MOLÉCULAIRES SÉLECTIFS POUR LA
 DÉTECTION ET LA MODULATION DE LA
 TYROSINASE HUMAINE ET DE LA
 MÉLANOGENÈSE *IN VIVO***

Soutenu publiquement le **1^{er} Octobre 2020**,
devant le jury composé de :

Dr. David MONCHAUD

Directeur de recherche, Université de Bourgogne, *Président*

Prof. Nadia WALCHSHOFER

Professeur, Université Lyon 1 Claude Bernard, *Rapporteur*

Dr. Laurent MICOUIN

Directeur de recherche, Université Paris-Descartes, *Rapporteur*

Prof. Fabrice ANIZON

Professeur, Université Clermont Auvergne, *Rapporteur*

Dr. Martine DEMEUNYNCK

Directrice de recherche, Université Grenoble Alpes, *Examinatrice*



*« D'un jeu totalement aveugle, tout, par définition, peut sortir,
y compris la vision elle-même. »*

— Jacques Monod, *Le Hasard et la Nécessité*, 1970

SOMMAIRE

Table des figures	7
Table des schémas	11
Table des tableaux	13
Table des sigles et abréviations	15
Avant-propos. De la démarche.....	19
Chapitre 1. Des contextes historique et épistémologique, et des ambitions de la chimie médicinale	21
Chapitre 2. Des travaux de recherche antérieurs, et de la production scientifique associée	25
2.1. Développement d'aurones comme sondes pour l'étude des sites actifs de différentes tyrosinases, et comme agents thérapeutiques contre la tyrosinase humaine (2008–2019, avec A. Boumendjel)	25
2.2. Conception et synthèse d'aurones comme inhibiteurs non-nucléosidiques de la polymérase à ARN ARN-dépendante NS5B du virus de l'hépatite C (2008–2011, avec A. Boumendjel) ..	32
2.3. Isolement du tramadol au sein de <i>Nauclea latifolia</i> , séparation chirale des deux énantiomères, étude d'une voie de synthèse biomimétique, et travaux bibliographiques (2010– 2019, avec A. Boumendjel)	37
2.4. Nouveaux dérivés de DOTASQ : une seconde génération de tétrades de guanines synthétiques basée sur un cœur DOTA présentant des propriétés et des applications étendues (2011–2012, avec D. Monchaud)	42
2.5. Synthèse et activité de purines fortement substituées comme potentiateurs de F508del- CFTR dans le cadre d'une thérapie de la mucoviscidose (2013–2017, avec J.-L. Décout).....	51
2.6. Développement de détergents stabilisant les protéines membranaires par réseau de ponts salins multiples pour leur étude et leur cristallisation en solution (2013–2019, avec A. Boumendjel)	58

Chapitre 3. Du projet de recherche et des développements à moyen et long termes	67
3.1. Introduction et contexte du projet	67
3.2. Premier objectif : « De ligands de TY identifiés <i>via</i> leur activité contre <i>abTY</i> à des inhibiteurs efficaces et sélectifs de <i>hsTY</i> comme candidats cliniques »	70
3.3. Deuxième objectif : « De sondes de détection générique de l'activité oxydante de TY à des biocapteurs spécifiques de la structure de <i>hsTY</i> sans marquage »	74
3.4. Troisième objectif : « Vers des photoswitchs moléculaires ciblant <i>hsTY</i> et des applications en photopharmacologie »	79
3.5. Aspects pratiques	84
Chapitre 4. Des perspectives	87
Annexe 1. Curriculum vitæ	89
Annexe 2. Références	99

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Un exemple de continuum chimie médicinale–chémobiologie : la découverte d’un inhibiteur de voie de signalisation impliquée dans le cancer mène à l’identification de sa cible moléculaire et à l’émergence d’une nouvelle sonde chimique	24
Figure 2. Structure générale des aurones ; structure et activité des aurones identifiées comme inhibiteurs de la production de mélanine au sein de mélanocytes humains	26
Figure 3. Structure du complexe modèle utilisé et modes de liaison étudiés pour le composé 3g	27
Figure 4. Position moyenne des complexes HOPNO– <i>hsTY</i> (A) et 3g – <i>hsTY</i> (B) après dynamique QM/MM.....	31
Figure 5. Évolution du taux de réponse virologique soutenue de la thérapie anti-HCV (PI : inhibiteur de protéase NS3, PolI : inhibiteur de polymérase NS5B), et prévision d’évolution (graphique de 2008).....	32
Figure 6. Structure tridimensionnelle de la protéine NS5B avec ses trois sous-domaines (« Fingers » en rouge, « Palm » en bleu et « Thumb » en vert) et ses quatre sites allostériques principaux, occupés ici par des ligands co-cristallisés ; les mutations clés associées à chaque site pour la mutagenèse sont indiquées en gras. Modification de l’IC ₅₀ par rapport à la protéine NS5B sauvage obtenue avec l’aurone 1d et les mutants P495L, H95Q, C316Y et M423T. Ces mutations sont connues pour réduire la susceptibilité des inhibiteurs des sites « Thumb I », « Palm II », « Palm I » et « Thumb II », respectivement.....	34
Figure 7. Structure des composés 4e et 31 . Prédiction des modes de fixation des composés 4e (A) et 31 (B) au sein du site Thumb I d’une structure de NS5B décrite	36
Figure 8. Photographie de l’arbuste <i>Nauclea latifolia</i> avec les structures de composants connus, en couverture de <i>Natural Product Reports</i> (Volume 33, n°9, septembre 2016). ORTEP de la structure cristallographique obtenue par diffraction des rayons X du chlorhydrate de <i>cis</i> -tramadol provenant de l’arbuste	38
Figure 9. Image illustrant les principales pathologies traitées traditionnellement par des extraits d’espèces africaines de <i>Nauclea</i> , ainsi que les molécules associées	41

Figure 10. Structure de la guanine et interactions en duplex et en tétrade (A), structures de quadruplex constitués de deux, trois, ou quatre tétrades, séquences primaires et températures de fusion associées (B)	42
Figure 11. Structure du DOTASQ de première génération, et phénomène de pré-structuration en tétrade induit par la présence d'un lanthanide au sein de la molécule : le terbium	43
Figure 12. Structure du ^{PNA} DOTASQ et phénomène de structuration en tétrade au contact d'un quadruplex	44
Figure 13. Évolution de la température de fusion de différents quadruplex et d'un duplex marqués en fonction de la concentration de ^{PNA} DOTASQ ou de ^{PNA} DOTASQ-Tb ³⁺ ajoutée	45
Figure 14. Évolution du spectre RMN ¹ H du quadruplex [T ₂ AG ₃ T] ₄ avec l'ajout de quantités croissantes de ^{PNA} DOTASQ, et interprétation des nouveaux signaux	46
Figure 15. Principe de la réaction « DNAzyme », une oxydation de l'hémine par H ₂ O ₂ catalysée par un quadruplex d'ADN, et monitorée par la transformation concomitante de la tétraméthylbenzidine (TMB) en tétraméthylbenzidine diimine fluorescente. Application du principe à une réaction « TASQzyme », catalysée par une tétrade de guanines synthétique	47
Figure 16. Vitesse initiale de la réaction « TASQzyme » en fonction de la concentration en ^{PNA} DOTASQ (en noir) ou en DOTASQ (en rouge). Illustration des concepts de site interne et de site externe permettant d'expliquer l'effet de « boost » observé en présence de quadruplex et de ^{PNA} DOTASQ	47
Figure 17. Structure du PorphySQ en formes ouverte et fermée, et effet de π -stacking. Courbes obtenues en FRET-melting pour F21T seul ou en présence d'une porphyrine analogue sans guanines (en gris), du Prot.PorphySQ (en orange), du PorphySQ (en bordeaux) ou du DOTASQ (en rouge).....	49
Figure 18. Représentation schématique de la stratégie de détection des quadruplex <i>in vitro</i> : le complexe de terbium permet l'immobilisation sur surface de graphène et la détection fluorescente des quadruplex	49
Figure 19. Structure générale de la protéine CFTR et de ses différents domaines. Structure des composés SBC. Représentation du composé SBC040 au sein du site de délétion 508.....	52
Figure 20. Modifications de courant ΔI_{sc} mesurées en chambre de Ussing en présence des composés SBC sur des cellules exprimant F508del-CFTR (fsk = forskoline, gst = génistéine)	55
Figure 21. Effet potentiateur des SBCs sur plusieurs protéines CFTR mutées (test YFP).....	55

Figure 22. Représentation des meilleures poses de SBC219 et SBC040 en dynamique moléculaire au sein des sites de fixation de l'ATP canonique et non-canonique.....	56
Figure 23. Concept de détergents à têtes carboxylates permettant la mise en place de ponts salins avec les résidus basiques des protéines membranaires à l'interface membrane–cytosol.....	59
Figure 24. Première génération de détergents formant des ponts salins multiples, basée sur un squelette de type calixarène. Différents squelettes non aromatiques envisagés comme détergents de seconde génération	59
Figure 25. Stabilité dans le temps de BmrA purifiée avec le DDM et en présence de DDM, DDM+FA3 et DDM+ 94b (A). Stabilisation thermique de BmrA (B–C) et d'A _{2A} R (D–E) en présence des détergents 94a–g et 95a–b	61
Figure 26. Expériences de cristallisation de BmrA en présence des détergents 94a–g et 95a–b , et résolutions obtenues par diffraction des rayons X	62
Figure 27. Expériences de cristallisation de BmrA en présence du détergent 97d et cristaux obtenus	63
Figure 28. Quatre inhibiteurs de <i>hsTY</i> testés contre l'enzyme isolée. Pour le thiamidol et le composé 3g , interactions avec les résidus du site actif observées lors d'expériences de modélisation moléculaire. Pour le composé 3g , numérotation des positions sur le squelette aurone	71
Figure 29. Position moyenne du complexe 3g–hsTY après dynamique QM/MM. Les surfaces vertes représentent les interactions moléculaires	71
Figure 30. Modulations chimiques envisagées en première intention pour les cycles A, B et C du squelette aurone, et résidus clés ciblés pour la mise en place d'interactions.....	72
Figure 31. Résultats d'une première série d'aurones évaluée lors d'un test d'inhibition de production de mélanine sur lysats de cellules MNT-1, et comparaison avec 3g et le rucinol comme référence. Les valeurs indiquées sont les IC ₅₀ mesurées, en µM.....	74
Figure 32. Exemples de sondes de l'activité de TY, s'appuyant sur des mécanismes d'oxydation–clivage et d'interruption de PET	75
Figure 33. Exemples de sondes sensibles à l'environnement développées pour la détection de sites hydrophobes de protéines, et stratégies employées.....	77

Figure 34. Quatre aurones décrites dans la littérature pour leurs propriétés de fluorescence sensible à l'environnement et leur potentiel pour des applications biologiques préliminaires. Intensité de fluorescence du composé 105 dans MeOH (vert), MeCN (bleu) et CHCl ₃ (rouge)....	77
Figure 35. Spectre d'émission de l'aurone 1f (0,3 μM) dans un tampon Tris (pH 7,5) à 25 °C en absence (bleu) et en présence (rouge) d' <i>abTY</i> (15 μM). Les échantillons ont été excités à 423 nm	77
Figure 36. Modulations chimiques envisagées en première intention pour les cycles A et B du squelette aurone, dédiées à l'amélioration des paramètres photophysiques importants pour des applications de détection de biomolécules ; représentation visuelle du concept de détection « turn-on » sensible à l'environnement.....	78
Figure 37. Exemples de systèmes de type photoswitch récemment décrits	80
Figure 38. Cinq composés de type HI (108, 109), HTI (110, 111) et ITI (112) décrits dans la littérature pour leurs propriétés de photoswitch, avec leurs longueurs d'onde de switch et stabilités thermiques	81
Figure 39. (A) Photoswitch de 113 , inhibiteur de la voie de la 12/15-lipoxygénase, et géométries des isomères au sein du site actif prédites par modélisation moléculaire : <i>Z-113</i> en bleu clair, <i>E-113</i> en bleu foncé ; (B) Photoswitch de 114 , inhibiteur de la polymérisation des microtubules, et microscopie des microtubules après incubation 24 h avec 1,6 μM de 114 , dans le noir (« dark ») ou sous irradiation à 410 nm (« lit »)	82
Figure 40. Exemple de molécule envisagée, qui serait stable et inactive en configuration <i>E</i> et permettrait un photoswitch en configuration <i>Z</i> active sous irradiation ; représentation visuelle de l'application potentielle de telles molécules dans le contrôle spatio-temporel de l'activité biologique et dans le traitement local du mélanome ou de l'hyperpigmentation	84
Figure 41. « Pipeline » général du projet, partant du composé 3g préalablement identifié pour atteindre les trois objectifs décrits, <i>via</i> une série d'étapes optimisées, notamment au niveau du coût	84

TABLE DES SCHÉMAS

Schéma 1. Synthèse des dérivés d'aurone polyhydroxylés	28
Schéma 2. Synthèse des dérivés d'aurone « hybrides »	30
Schéma 3. Voie de biosynthèse envisagée pour le tramadol à partir de la L-phénylalanine et de la L-lysine.....	39
Schéma 4. Synthèse de l'intermédiaire 51 et essais de cyclisation biomimétique en tramadol	40
Schéma 5. Synthèse du ^{PNA} DOTASQ et du ^{PNA} DOTASQ-Tb ³⁺	44
Schéma 6. Synthèse du PorphySQ.....	48
Schéma 7. Synthèse du Pyro-DOTASQ et du Pyro-DOTASQ-Tb ³⁺	50
Schéma 8. Synthèses privilégiées pour les composés SBC001, SBC005, SBC040, SBC068, SBC069, SBC071 et SBC219.....	53
Schéma 9. Synthèses privilégiées pour les composés SBC183, SBC200 et SBC231.....	54
Schéma 10. Réaction « one-pot » proposée et molécules préparées <i>via</i> cette méthode.....	57
Schéma 11. Adaptation de la méthode pour la synthèse de dérivés de nucléosides	58
Schéma 12. Synthèse des détergents de type sérine	60
Schéma 13. Synthèse des détergents de type DOTA/NOTA.....	63
Schéma 14. Concept de rigidification des détergents de type sérine par l'introduction du motif pipérazine. Synthèse du détergent de type pipérazine 102	64
Schéma 15. Exemples de structures de détergents ciblées. Synthèse du détergent de type morpholinone 103	65

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Comportements d'une série systématique d'aurones polyhydroxylées face à deux TY de champignon (<i>abTY</i> et <i>paTY</i>) et une TY de bactérie (<i>saTY</i>). N = Non actif, A = Activateur, I = Inhibiteur, S = Substrat. L'intensité de la couleur reflète l'intensité de l'effet. Pour les inhibiteurs et les substrats, du plus clair au plus foncé : $1 \text{ mM} \geq (\text{IC}_{50} \text{ ou } K_m) > 200 \text{ } \mu\text{M}$; $200 \text{ } \mu\text{M} \geq (\text{IC}_{50} \text{ ou } K_m) > 20 \text{ } \mu\text{M}$; $20 \text{ } \mu\text{M} \geq (\text{IC}_{50} \text{ ou } K_m) > 1 \text{ } \mu\text{M}$; $(\text{IC}_{50} \text{ ou } K_m) \leq 1 \text{ } \mu\text{M}$. Pour les activateurs, du plus clair au plus foncé : $100\% \leq \text{A.H.} < 140\%$; $140\% \leq \text{A.H.} < 180\%$; $180\% \leq \text{A.H.} < 220\%$; $220\% \leq \text{A.H.}$ (A.H. = Activation Hyperbolique).....	29
Tableau 2. Structure des composés « hybrides » 1g , 3g et 4g . Constantes d'inhibition et IC_{50} des composés « hybrides », du motif HOPNO seul et de l'acide kojique testés sur <i>hsTY</i> purifiée (K_i), lysats et cellules entières de mélanome humain MNT-1 (IC_{50}), et en cytotoxicité (IC_{50}).....	31
Tableau 3. Composés testés initialement et leurs IC_{50} mesurées contre NS5B (<i>n.d.</i> = non déterminé)	33
Tableau 4. Aurones testées contre NS5B et valeurs d' IC_{50} obtenues.....	35
Tableau 5. Quelques-unes des indolaurones testées contre NS5B et valeurs d' IC_{50} obtenues (<i>n.d.</i> = non déterminé)	37
Tableau 6. Exemples d'inhibiteur de TY fréquemment utilisés comme références	68

TABLE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A _{2A} R	Adenosine A _{2A} Receptor
AAP	Appel à projets
ABC	ATP-Binding Cassette
<i>abTY</i>	Tyrosinase (<i>Agaricus bisporus</i>)
AcrB	Acridine Resistance Protein B
ADN	Acide désoxyribonucléique
A.H.	Activation hyperbolique
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ATP	Adénosine triphosphate
BmrA	Bacillus Multidrug Resistance ATP
Bn	Benzyle
Boc	<i>t</i> -Butoxycarbonyl
BODIPY	Bore-dipyrométhène
BOP	Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxotris(diméthylamino)-phosphonium
BSA	Acide benzènesulfonique
Bz	Benzoyl
CEA	Commissariat à l'Énergie Atomique
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
<i>c</i> -Hex	Cyclohexyle
CM	Cours magistral
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
COMET	Chemobiology & Organic Chemistry for Medicinal Targets & Tools
DDM	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-maltoside
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DIBAL-H	Hydruure de diisobutylaluminium
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DOTA	Acide 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique

DOTASQ	DOTA-Templated Synthetic G-Quartet
EDCI	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ESI	Electrospray Ionization
Et	Éthyle
FA3	3 α -Hydroxy-7 α ,12 α -di-((<i>O</i> - β -D-maltosyl)-2-hydroxyethoxy)-cholane
FID	Fluorescent Intercalator Displacement
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
fsk	Forskoline
gst	Génistéine
HI	Hémiindigo
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HOPNO	2-Hydroxypyridine- <i>N</i> -oxyde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<i>hs</i> TY	Tyrosinase (<i>Homo sapiens</i>)
<i>hs</i> TYRP1	Tyrosinase-Related Protein 1 (<i>Homo sapiens</i>)
HTI	Hémithioindigo
IC ₅₀	Concentration nécessaire pour l'inhibition de 50% de l'activité
ICL	Intracellular Loop
ICMUB	Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne
<i>i</i> -Pr	Isopropyle
ITI	Iminothioindoxyle
JCJC	Jeune Chercheuse / Jeune Chercheur
<i>K</i> _i	Constante d'inhibition
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphénylalanine
LMNG	Lauryl Maltose Neopentyl Glycol
LOX	Lipoxygénase
Me	Méthyle
NBD	Nucleotide Binding Domain
NBM	Norbornane-Based Maltoside
NMO	<i>N</i> -Méthylmorpholine- <i>N</i> -oxyde
NOTA	Acide 2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacétique
NS3	Nonstructural Protein 3
NS5B	Nonstructural Protein 5B

ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
PACES	Première Année Commune aux Études de Santé
<i>pa</i> TY	Tyrosinase (<i>Polyporus arcularius</i>)
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEG	Polyéthylène glycol
PET	Photoinduced Electron Transfer
PNA	Peptide Nucleic Acid
Ppz	Pipérazinyle
QM/MM	Mécanique quantique / Mécanique moléculaire
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPE	Résonance paramagnétique électronique
<i>sa</i> TY	Tyrosinase (<i>Streptomyces antibioticus</i>)
<i>sc</i> TY	Tyrosinase (<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TASQ	Templated Synthetic G-Quartet
TBTU	Tétrafluoroborate de <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl-uronium
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyle
TD	Travaux dirigés
TFA	Acide trifluoroacétique
TFAA	Anhydride trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMB	Tétraméthylbenzidine
TMSOTf	Triflate de triméthylsilyle
TOF-MS	Time-Of-Flight Mass Spectrometry
TP	Travaux pratiques
Tris	2-Amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol
TY	Tyrosinase
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolet
VHC	Virus de l'hépatite C
YFP	Protéine fluorescente jaune (« <i>Yellow Fluorescent Protein</i> »)

DE LA DÉMARCHE

Mon parcours universitaire et mes activités de recherche m'ont toujours conduit à expérimenter les domaines d'interface. J'ai successivement découvert, au gré de mes diplômes, de mes stages puis des projets de recherche auxquels j'ai participé, des champs disciplinaires situés tout au long du continuum chimie-biologie : la chimie organique, la chimie médicinale, la chimie analytique et biophysique, la phytochimie, la biochimie. J'ai beaucoup appris, avec l'aide de mes collaborateurs et superviseurs — qu'ils en soient ici chaleureusement remerciés —, à rechercher l'ouverture et l'interdisciplinarité qui forment, j'en suis convaincu, l'essence d'une science ambitieuse.

Fort de ces expériences, j'ai le sentiment que le temps est venu d'un travail réflexif sur l'orientation future de ma carrière scientifique, et sur le moyen de tirer le meilleur parti de mes travaux et expériences passés pour concevoir aujourd'hui mes propres projets de recherche.

Cette réflexion inclut un aspect épistémologique : la chimie médicinale, domaine auquel je suis très associé, est à mon sens à un tournant de son histoire, et des possibilités s'ouvrent d'en élargir l'impact et les champs d'application, avec comme objectif principal d'étudier les mécanismes du vivant.

Je mène cette démarche en parallèle d'un investissement croissant dans la recherche de financements, comme l'attestent les récents soutiens obtenus de l'école doctorale Chimie et Sciences du Vivant et de l'Agence Nationale de la Recherche au projet qui sera présenté au sein de ce manuscrit.

La possibilité de diriger des recherches constitue le corollaire de cette volonté d'émancipation. Le présent manuscrit est ainsi également consacré à vous convaincre, Mesdames et Messieurs les membres du jury — vous qui m'avez fait l'honneur d'accepter d'étudier et de juger ce travail —, de la légitimité de cette démarche.

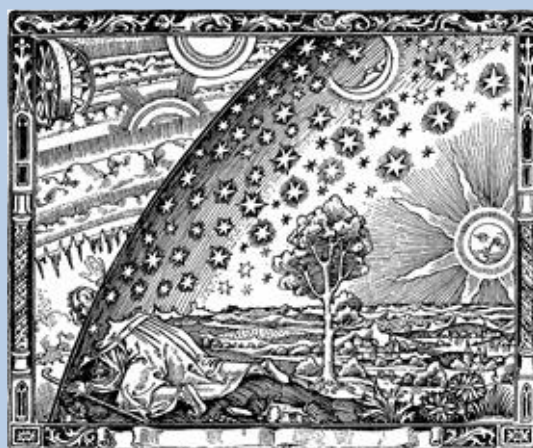
DES CONTEXTES HISTORIQUE ET ÉPISTÉMOLOGIQUE, ET DES AMBITIONS DE LA CHIMIE MÉDICINALE

Tout au long du XX^e siècle, la chimie a bénéficié d'un essor considérable et sans précédent. Son développement se mesure à l'aune des progrès techniques réalisés pendant cette période, que ce soit en termes de séparation, de caractérisation de molécules ou de synthèse à grande échelle, *via* l'apparition des techniques chromatographiques, de la résonance magnétique nucléaire, de la radiocristallographie, ou encore de la catalyse hétérogène. En parallèle, une révolution conceptuelle a émergé sous l'influence de la théorie des orbitales et de la chimie quantique, illustrée notamment en France par l'abandon progressif de la « chimie au lasso » d'Auguste Béhal au profit d'une compréhension des mécanismes réactionnels à l'échelle électronique.¹ Dans l'après seconde guerre mondiale, ces avancées techniques et conceptuelles ont ouvert la voie à un élargissement de la portée de la chimie dans les sciences connexes, comme en biologie (découverte de la structure moléculaire de l'ADN en 1953,² et de celle d'une protéine, la myoglobine, en 1958),³ en pharmacie (découverte de la première benzodiazépine en 1955,⁴ première synthèse de la morphine en 1956),⁵ ou en sciences des matériaux (grands principes de la chimie des polymères en 1953,⁶ synthèse des éthers couronne en 1967).⁷ Elles ont également conduit à un développement industriel majeur dans les domaines de la chimie fine, des matériaux, ou du médicament. Cependant, George M. Whitesides note en 2015 que progressivement, et en particulier depuis les années 1990, les chimistes académiques et industriels se sont concentrés sur de fines améliorations des concepts préétablis et sur le développement itératif de réactions et de molécules, abandonnant progressivement l'ambition des grandes découvertes du siècle à d'autres disciplines.⁸

La chimie médicinale s'est pleinement installée dans ce processus. Provenant des interactions entre la chimie et la biochimie naissante au début du XX^e siècle, cette discipline s'est construite sur une série de concepts, comme le modèle clé-serrure d'Emil Fis-

cher (1894),⁹ la notion de récepteur de Paul Ehrlich (1900),¹⁰ et plus tard, l'idée d'ajustement induit (« induced fit ») des protéines formulée par Daniel E. Koshland (1958)¹¹ suivie de celle d'effet allostérique, par Jacques Monod, Jeffries Wyman et Jean-Pierre Changeux (1965).¹² Ces concepts ont formé la clé de voûte d'un paradigme qui a longtemps permis un dialogue fructueux entre chimistes et biologistes, au cours de ce qui peut être considéré comme la « seconde ère » de la chimie médicinale (après une « première ère » dominée par la chimie organique). Mais au début des années 1990, la chimie commence à s'effacer : sa contribution est toujours reconnue mais elle n'est plus perçue comme une force motrice, et les biotechnologies apparaissent comme le nouvel horizon prometteur pour l'industrie pharmaceutique.¹³ Les plus grands espoirs des années 1990 et 2000 dans le domaine de la santé sont en effet suscités par les technologies de la biologie : citons la thérapie génique, l'utilisation des cellules souches embryonnaires (après leur découverte chez l'humain en 1998),¹⁴ ou la médecine personnalisée (en lien avec le séquençage du génome humain en 2001).^{15,16} De leur côté, les chimistes médicaux font le plus souvent preuve d'une ambition excessivement modeste, en considérant aveuglément la biologie sous-jacente à leurs projets comme un socle solide et inébranlable, sans être conscients de l'apport potentiel des petites molécules dans le déchiffrement des liens entre les pathologies et les cibles biologiques étudiées.¹⁷

Mais les efforts réalisés sur deux décennies pour développer la thérapie génique, par exemple, ont produit des résultats particulièrement décevants. Et, bien que les travaux de séquençage de l'ADN aient en effet apporté un regard nouveau sur de nombreuses pathologies, les petites molécules sont souvent évoquées comme le chaînon manquant dans la théorie fondamentale de la biologie moléculaire.¹⁸ Ce constat mène à la structuration, à l'aube des années 2000, d'une discipline nouvelle mêlant intimement la



La Gravure sur bois de Flammarion représente un missionnaire du Moyen-Âge qui, passant la tête à travers la voûte céleste, découvre le ciel empyrée. C'est aussi une allégorie du changement de paradigme : on peut y voir un chimiste médicinal dépasser les bases de la biologie qu'il utilise, pour en étudier les mécanismes sous-jacents.

Illustration issue de C. Flammarion. *L'atmosphère : météorologie populaire*. Paris, 1888.

biologie moléculaire, la biochimie et la chimie médicinale : la chémobiologie (en anglais, « chemical biology »). De nombreux journaux scientifiques sont créés à cette occasion par des éditeurs prestigieux, comme *Nature Chemical Biology* (2005) ou *ACS Chemical Biology* (2006). Cette science, qui porte en elle l'ambition de traduire les percées réalisées au niveau génétique dans la réalité de la biologie fonctionnelle,¹⁹ replace la chimie au centre de la compréhension moléculaire des systèmes vivants. Elle consiste en effet en le développement de petites molécules comme sondes, outils et effecteurs moléculaires, dont l'interaction avec les biomacromolécules, y compris dans un contexte cellulaire ou *in vivo*, est utilisée pour élucider leur structure, leur fonction, et leur rôle dans les processus biologiques et les pathologies associées. Dans cette optique, la chémobiologie s'appuie sur des concepts novateurs, comme celui de bio-orthogonalité — et sur des méthodes chimiques développées *ad hoc*, comme la ligation de Staudinger²⁰ ou la « chimie click ».^{21,22} Il devient ainsi possible de marquer sélectivement des biomolécules au sein de leur environnement natif, sans interférer avec les très nombreuses fonctions chimiques utilisées par les systèmes vivants.

La chémobiologie se présente donc comme un couteau-suisse dont les différents outils peuvent être utilisés seuls ou en combinaison, suivant les contextes et les spécificités des cibles et processus étudiés : citons pêle-mêle les sondes fluorescentes,^{23,24} les groupements photoréactifs,²⁵ les acides aminés non canoniques,^{26,27} les PNA (« Peptide Nucleic Acids »),²⁸ les fragments moléculaires,²⁹ les effecteurs immobilisés sur matrice,³⁰ ou les outils de stabilisation de biomolécules et d'interactions.^{31,32} Mentionnons également les sondes chimiques capables d'interroger le rôle d'une biomolécule en modulant sa fonction, qui se situent quant à elles au carrefour de la chémobiologie et de la chimie médicinale, puisque si les finalités divergent, l'effet recherché est souvent le même dans les deux disciplines : l'inhibition sélective de la fonction d'une cible thérapeutique. Ainsi, l'existence de ce continuum chémobiologie–chimie médicinale permet d'envisager des projets de recherche plus ambitieux, associant l'étude fondamentale des biomolécules et des processus biologiques ainsi que la validation de cible d'un côté, avec la recherche de candidats médicaments de l'autre.³³ Dans ce processus, les petites molécules et la chimie en général occupent de nouveau une place centrale : c'est le retour de la « central science » popularisée par Theodore L. Brown et H. Eugene LeMay dans les années 1970.³⁴ Plus récemment, le double rôle de la chimie dans l'élucidation des bases moléculaires de la vie et dans le « drug design » rationnel est évoqué comme l'une des opportu-

nités principales pour le futur de la discipline.⁸ Ces deux aspects peuvent — et, sans doute, doivent — constituer les deux facettes complémentaires des projets académiques de chimie médicinale dans les années à venir.

Les exemples illustrant le potentiel de cette association entre la chimie médicinale et la chémobiologie sont aujourd’hui légion. Les méthodes, conceptions et applications se confondent et se nourrissent fréquemment. Les techniques de criblage et de modulation chimique empruntées à la chimie médicinale mènent à l’observation d’un phénotype cellulaire, que les modifications et les techniques spécifiques à la chémobiologie permettent de relier à une cible (**Figure 1**).^{35–37} La conception des molécules actives peut être réalisée à partir de fragments, dont les interactions sont scrutées sur cellules, et qui conduisent ensuite à des inhibiteurs plus complexes par un savant travail de broderie moléculaire.³⁸ Des inhibiteurs peuvent être développés puis modifiés sous forme de pro-drogues fluorescentes traçables, dont l’irradiation permet la libération spatiotemporelle contrôlée du principe actif.³⁹ Dans chacun de ces exemples choisis parmi tant d’autres, le développement de petites molécules constitue une part centrale du projet, et soulève des problématiques qui font pleinement appel au savoir-faire des chimistes médicinaux : modulation chimique et diversification moléculaire, introduction d’espaceurs sans perte d’affinité, manipulation de motifs photoréactifs ou photoactivables, génération d’analogues actifs et inactifs, assemblage de fragments d’intérêt, introduction de motifs fluorescents ou fluorogéniques.

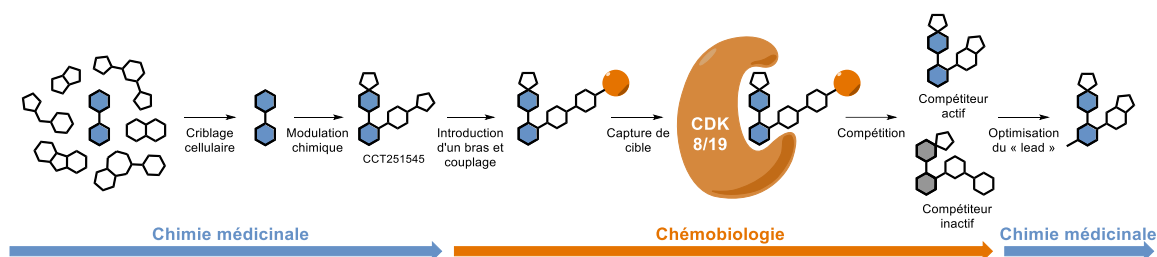


Figure 1. Un exemple de continuum chimie médicinale–chémobiologie : la découverte d’un inhibiteur de voie de signalisation impliquée dans le cancer mène à l’identification de sa cible moléculaire et à l’émergence d’une nouvelle sonde chimique.

Définitivement au centre du jeu, les chimistes ont toute latitude pour mener ces projets de rupture, laissant de côté les outils moléculaires génériques pour en créer d’autres aux propriétés innovantes, plus finement conçus et adaptés au mieux à leur cible.

DES TRAVAUX DE RECHERCHE ANTÉRIEURS, ET DE LA PRODUCTION SCIENTIFIQUE ASSOCIÉE

Dans ce chapitre, une partie seulement de mes travaux de recherche antérieurs seront présentés, de manière délibérée : il s'agit de ceux qui ont réellement permis de structurer le projet de recherche développé au chapitre 3 — pour un aperçu plus complet des travaux, le lecteur est invité à se reporter à la liste des publications fournie en annexe.

2.1. Développement d'aurones comme sondes pour l'étude des sites actifs de différentes tyrosinases, et comme agents thérapeutiques contre la tyrosinase humaine (2008–2019, avec A. Boumendjel)

Les tyrosinases (TY) sont des métalloenzymes à centre binucléaire de cuivre ubiquitaires dans le vivant, et notamment chez les mammifères, les plantes, les champignons et les bactéries, où elles jouent des rôles variés. Chez l'Homme, la tyrosinase (*hsTY*) permet les oxydations successives de la L-tyrosine et de la L-DOPA en quinones réactives, ouvrant ainsi la voie au processus de mélanogénèse par polymérisation dans l'épiderme.⁴⁰ Par conséquent, *hsTY* représente une cible de choix pour le traitement des désordres liés à la mélanine, comme les hyperpigmentations ou les lésions cutanées. De nombreux inhibiteurs de TY sont actuellement utilisés à des fins cosmétiques comme agents blanchisseurs de la peau, ou pour traiter des hyperpigmentations. C'est le cas de l'hydroquinone, l'un des premiers agents dépigmentant introduits en clinique, utilisé depuis plus de cinquante ans. Néanmoins cette utilisation s'accompagnerait d'un effet cancérogène, et son utilisation est proscrite au sein de l'Union Européenne depuis 2001. L'acide kojique est un inhibiteur également très répandu en dermocosmétique, mais son utilisation est de plus en plus controversée à cause de ses propriétés allergènes et mutagènes suspectées. Globalement, le développement d'inhibiteurs plus efficaces, sélectifs et

sans danger constitue un besoin des industries pharmaceutiques et dermocosmétiques depuis de nombreuses années.

En 2006 au Département de Pharmacochimie Moléculaire, des molécules de la famille des aurones ont été découvertes comme inhibiteurs de la TY de mélanocytes humains à l'occasion de tests cellulaires.⁴¹ Les aurones constituent une classe mineure de flavonoïdes naturels dont le potentiel en chimie médicinale, bien que prometteur,^{42,43} avait auparavant été peu étudié. La découverte initiale de leur activité anti-TY en contexte cellulaire n'a cependant pas été suivie d'une validation sur enzyme isolée (Figure 2). Dans ce contexte, mon implication dans le projet débute en 2008, avec un double objectif : (1) développer de nouveaux inhibiteurs plus efficaces grâce à l'apport de complexes biomimétiques et de la modélisation moléculaire ; et (2) explorer le degré d'homologie entre les sites actifs des différentes TYs (champignons, bactéries, humain), dont seul un représentant avait été cristallisé à l'époque, la TY de la bactérie *Streptomyces castaneoglobisporus* (*scTY*).⁴⁴ Ce projet a été mené en collaboration avec le Dr. Marius Réglie, Aix-Marseille Univ., et les Dr. Catherine Belle et Hélène Jamet, Univ. Grenoble Alpes.

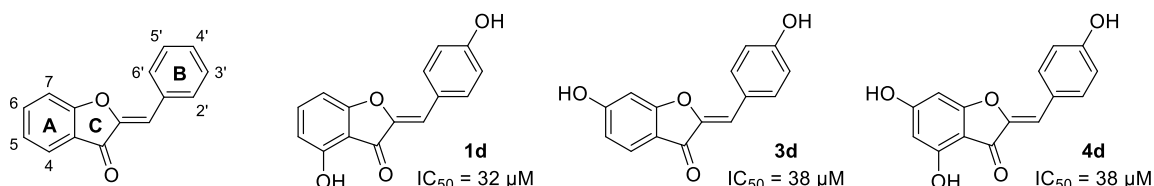


Figure 2. Structure générale des aurones ; structure et activité des aurones identifiées comme inhibiteurs de la production de mélanine au sein de mélanocytes humains.

Une première série de 6-hydroxyaurones diversement hydroxylées sur le cycle B a été préparée, afin d'évaluer l'impact de la substitution de ce cycle sur l'activité d'inhibition de la TY du champignon *Agaricus bisporus*, *abTY*.⁴⁵ De manière intéressante, les deux composés de type 4'-hydroxy et 3',4'-dihydroxy (composés **3d** et **3e**, voir [Tableau 1](#)) ont présenté des comportements de substrats coopératifs de l'enzyme, et non d'inhibiteurs comme précédemment décrit lors des tests sur mélanocytes. Ces deux composés sont en effet progressivement oxydés en quinones lors du contact avec *abTY*. Ce comportement est cohérent avec l'analogie structurale de ces deux composés avec les substrats naturels L-tyrosine et L-DOPA. En revanche, le comportement d'activateur hyperbolique des dérivés 2'-hydroxy et 3'-hydroxy (composés **3b** et **3c**, voir [Tableau 1](#)) est

plus surprenant. Enfin, un premier composé « hybride » (composé **3g**, voir [Tableau 2](#)), possédant à la place du cycle B un motif de type 2-hydroxypyridine-*N*-oxyde (HOPNO), et dont la synthèse est décrite plus bas ([Schéma 2](#)), a été identifié comme un inhibiteur mixte de l'enzyme ($IC_{50} = 1,5 \mu M$, $K_{ic} = 1,3 \mu M$ et $K_{iu} = 1,6 \mu M$). Le mode de liaison de **3g** au site binucléaire de cuivre de l'enzyme a en outre été étudié par modélisation moléculaire et RPE, à partir d'un complexe modèle de TY déjà décrit ([Figure 3](#)). Cette étude a mené à la détermination du mode chélatant comme le plus favorable d'un point de vue énergétique, par rapport au mode pontant. Pris ensemble, les effets des différentes molécules étudiées (activateur hyperbolique, substrat coopératif, inhibiteur mixte) convergent vers l'hypothèse de la présence d'un site allostérique dans la structure tridimensionnelle de *abTY*, dans lequel se fixeraient les aurones. Ce site n'a pas été identifié pour le moment.

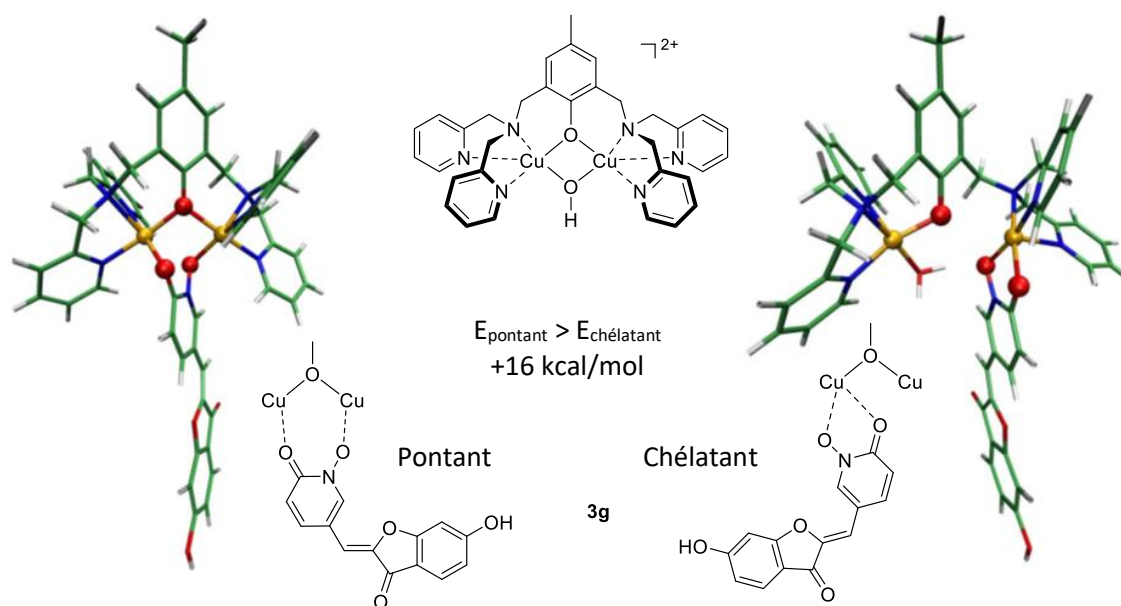


Figure 3. Structure du complexe modèle utilisé et modes de liaison étudiés pour le composé **3g**.

La synthèse de vingt-quatre analogues polyhydroxylés a ensuite été réalisée, *via* plusieurs méthodes de synthèse et des stratégies différentes, suivant le degré d'hydroxylation des cycles A et B des aurones ([Schéma 1](#)).⁴⁶ Confrontés à des TYs de deux sources différentes, l'une de champignon (*abTY*) et l'autre de bactérie (*Streptomyces antibioticus*, *saTY*), ces composés ont adopté quatre comportements différents, dans la lignée de ce qui avait été identifié lors de l'étude précédente : les dérivés de type **a** n'ont montré aucune activité sur les deux enzymes ; les dérivés de type **b** et **c** agissent en tant qu'activateurs de *abTY* et en tant qu'inhibiteurs faibles de *saTY* ; les dérivés de type

d et **e** ont été oxydés par les TYs et sont donc des substrats alternatifs ; et les dérivés de type **f** sont des inhibiteurs des deux enzymes. Le motif présent sur le cycle B de ces molécules détermine donc leur comportement face aux TYs (Tableau 1). Enfin, si le type d'effet semble lié à la position des groupes hydroxy du cycle B des auronés, l'ampleur de l'affinité des composés varie suivant la substitution du cycle A. Les écarts d'activité constatés sont parfois considérables : le déplacement du groupement 4-hydroxy du composé **1f** en position 5 (composé **2f**) mène ainsi, dans le cas de *abTY*, à une diminution de l'action inhibitrice d'un facteur supérieur à 100. Des différences très importantes sont également observées pour une même molécule entre ses effets sur *abTY* et sur *saTY* : un facteur 20 par exemple dans le cas du composé **2f**. En résumé, il semble donc que le développement d'inhibiteurs ou d'effecteurs agissant sur l'une ou l'autre enzyme requiert des éléments structuraux distincts.

Quelques représentants de cette série d'analogues polyhydroxylés, les composés **1a**, **1f**, **3c**, **3d**, **4a**, **4c** et **4d**, ont également été testés dans le cadre de la caractérisation et de la production d'une nouvelle TY de champignon, issue de *Polyporus arcularius* (*paTY*).⁴⁷ Par rapport à *abTY*, cette enzyme possède l'avantage de n'exister que sous un seul isozyme et de ne pas présenter d'activités enzymatiques annexes risquant d'interférer avec les tests d'inhibition. Par conséquent, elle peut constituer une alternative intéressante à *abTY*, dont l'emploi est controversé. De manière intéressante, si les comportements des auronés face à *paTY* sont très similaires à ceux observés lors des études sur *abTY*, les valeurs obtenues varient significativement — jusqu'à un facteur 5 —, ce qui met en lumière des différences en termes d'affinité y compris entre enzymes issues d'espèces proches. Toutes ces données incitent à une grande prudence quant à l'utilisation de modèles issus d'espèces tierces pour la conception de molécules bioactives dirigées contre la TY humaine (*hsTY*).

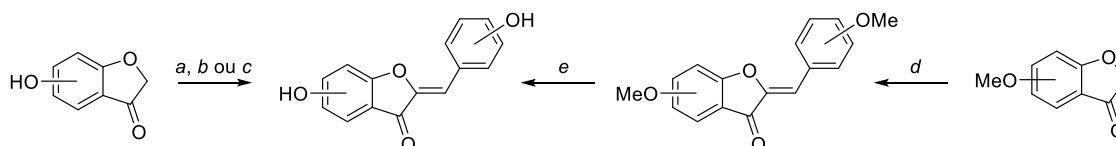


Schéma 1. Synthèse des dérivés d'aurone polyhydroxylés. Réactifs et conditions : *a.* KOH, MeOH, H₂O, dérivé de benzaldéhyde, reflux, 2–18 h, 17–86% ; *b.* KOH, EtOH, H₂O, dérivé de benzaldéhyde, reflux, 2–5 h, 26–72% ; *c.* H₂SO₄, MeOH, dérivé de benzaldéhyde, reflux, 4 h, 17% ; *d.* KOH, MeOH, H₂O, dérivé de benzaldéhyde, 25 °C, 0–2 h, 23–91% ; *e.* BBr₃, CH₂Cl₂, 25 °C, 24–72 h, 33–61%.







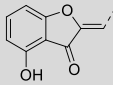
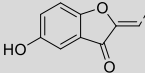
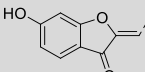
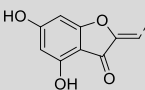
							
		a	b	c	d	e	f
	<i>abTY</i>	N	A	A	S	S	I
	<i>paTY</i>	N					I
	<i>saTY</i>	N	I	I	S		I
	<i>abTY</i>	N	A	A	S	S	I
	<i>paTY</i>						
	<i>saTY</i>	N	I	I	S		I
	<i>abTY</i>	N	A	A	S	S	I
	<i>paTY</i>			A	S		
	<i>saTY</i>	N	I	I	S	S	I
	<i>abTY</i>	N	A	A	S	S	I
	<i>paTY</i>			A	S		
	<i>saTY</i>	N	I	I	S	S	I

Tableau 1. Comportements d'une série systématique d'aurones polyhydroxylées face à deux TY de champignon (*abTY* et *paTY*) et une TY de bactérie (*saTY*). N = Non actif, A = Activateur, I = Inhibiteur, S = Substrat. L'intensité de la couleur reflète l'intensité de l'effet. Pour les inhibiteurs et les substrats, du plus clair au plus foncé : $1 \text{ mM} \geq (\text{IC}_{50} \text{ ou } K_m) > 200 \text{ } \mu\text{M}$; $200 \text{ } \mu\text{M} \geq (\text{IC}_{50} \text{ ou } K_m) > 20 \text{ } \mu\text{M}$; $20 \text{ } \mu\text{M} \geq (\text{IC}_{50} \text{ ou } K_m) > 1 \text{ } \mu\text{M}$; $(\text{IC}_{50} \text{ ou } K_m) \leq 1 \text{ } \mu\text{M}$. Pour les activateurs, du plus clair au plus foncé : $100\% \leq \text{A.H.} < 140\%$; $140\% \leq \text{A.H.} < 180\%$; $180\% \leq \text{A.H.} < 220\%$; $220\% \leq \text{A.H.}$ (A.H. = Activation Hyperbolique).

La synthèse de nouvelles molécules « hybrides » a donc été entreprise dans le but de les tester exclusivement sur des systèmes humains.⁴⁸ Constitués d'un squelette d'aurone, ces dérivés possèdent à la place du cycle B un noyau de type 2-hydroxypyridine-*N*-oxyde (HOPNO), connu pour ses propriétés de chélation des centres à cuivre. La synthèse en quatre étapes de trois analogues a été réalisée selon le [Schéma 2](#). Ces dérivés, dont un représentant avait montré un potentiel très intéressant contre *abTY*, ont été évalués sur *hsTY*. Cette enzyme, à la différence des équivalents d'autres espèces, subit une maturation très complexe nécessitant un ancrage transmembranaire, et un contrôle de l'adressage par des *N*-glycanes complexes spécifiques, inaccessible à des orga-

nismes simples comme *E. coli* pour la production d'enzyme recombinante. Pour cette raison, la production de *hsTY* est difficile, *a fortiori* en grandes quantités, et donc seuls quelques composés ont été évalués sur l'enzyme (en collaboration avec le Pr. Luigi Burbacco, Université de Padoue, Italie). Les trois molécules « hybrides » ont adopté un comportement d'inhibiteur compétitif de *hsTY*, avec des valeurs de K_i de l'ordre du micromolaire. Le composé **3g** semble le plus prometteur avec un K_i de 350 nM, ce qui en fait l'un des inhibiteurs de *hsTY* les plus efficaces connus à ce jour (Tableau 2). En outre, ce composé possède une activité plus importante pour *hsTY* que pour *abTY* ($K_i = 0,35$ vs. 1,27 μM), ce qui est rarement le cas parmi les inhibiteurs de TY. Néanmoins, si son potentiel a été confirmé sur lysats cellulaires de mélanome humain (cellules MNT-1), le composé **3g** a montré une activité bien plus faible sur cellules entières, révélant ainsi une propension limitée à pénétrer les membranes cellulaires. Ce phénomène est possiblement dû à la présence du groupement partiellement zwitterionique HOPNO. Néanmoins, le composé **3g** constitue une base structurale intéressante pour le développement d'inhibiteurs sélectifs de *hsTY*.

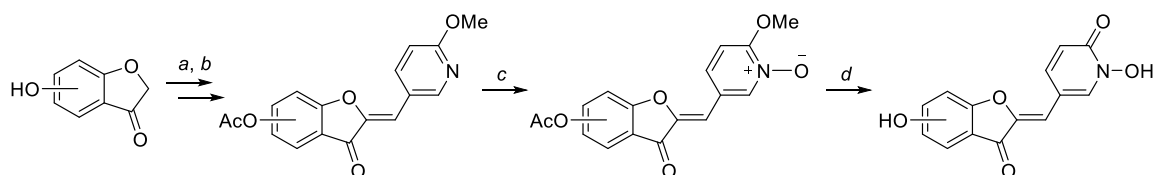
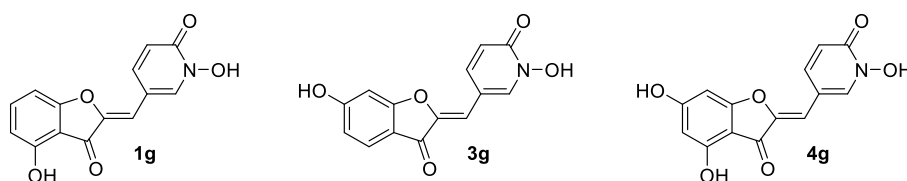


Schéma 2. Synthèse des dérivés d'aurone « hybrides ». Réactifs et conditions : *a.* KOH, MeOH, H₂O, 6-méthoxy-3-pyridinecarboxaldéhyde, reflux, 2–6 h ou KOH, EtOH, H₂O, 6-méthoxy-3-pyridinecarboxaldéhyde, reflux, 2–5 h, 93–94% ; *b.* Ac₂O, reflux, 5–16 h, 73–96% ; *c.* complexe urée–H₂O₂, TFAA, CH₂Cl₂, 25 °C, 5–16 h, 25–63% ; *d.* HCl, H₂O, MeOH, reflux, 16–40 h, 72–83%.

En effet, si la coordination au centre à cuivre reste similaire dans les deux cas, le squelette aurone, dont la contribution à l'affinité est manifeste par rapport au motif HOPNO seul ($K_i = 0,35$ –1,2 μM vs. 128 μM), semble interagir avec plusieurs résidus issus de la seconde sphère de coordination du site actif de *hsTY*, notamment His304, Lys306, Arg308 et Ile368, comme l'indiquent les poses obtenues par dynamique moléculaire QM/MM (Figure 4). Une optimisation des substituants du cycle A des aurones, ainsi que la modification du motif HOPNO pour un groupement chélateur du centre à cuivre plus propice à la pénétration cellulaire, pourraient ainsi mener à l'obtention de dérivés à fort potentiel dans un contexte cellulaire, étant donnée la faible cytotoxicité de ces molécules.



Composé	<i>hsTY</i> (K_i , μM)	MNT-1 lysats (IC_{50} , μM)	MNT-1 cellules (IC_{50} , μM)	MNT-1 cytotoxicité (IC_{50} , μM)
1g	$1,02 \pm 0,04$	30 ± 2	120 ± 10	80 ± 20
3g	$0,35 \pm 0,04$	$16,6 \pm 0,3$	$85,3 \pm 0,6$	>500
4g	$1,2 \pm 0,2$	34 ± 3	119 ± 1	>500
HOPNO	128 ± 2	1300 ± 100	150 ± 20	>200
Acide kojique	350 ± 70	2800 ± 800	15000 ± 2000	>80000

Tableau 2. Structure des composés « hybrides » **1g**, **3g** et **4g**. Constantes d'inhibition et IC_{50} des composés « hybrides », du motif HOPNO seul et de l'acide kojique testés sur *hsTY* purifiée (K_i), lysats et cellules entières de mélanome humain MNT-1 (IC_{50}), et en cytotoxicité (IC_{50}).

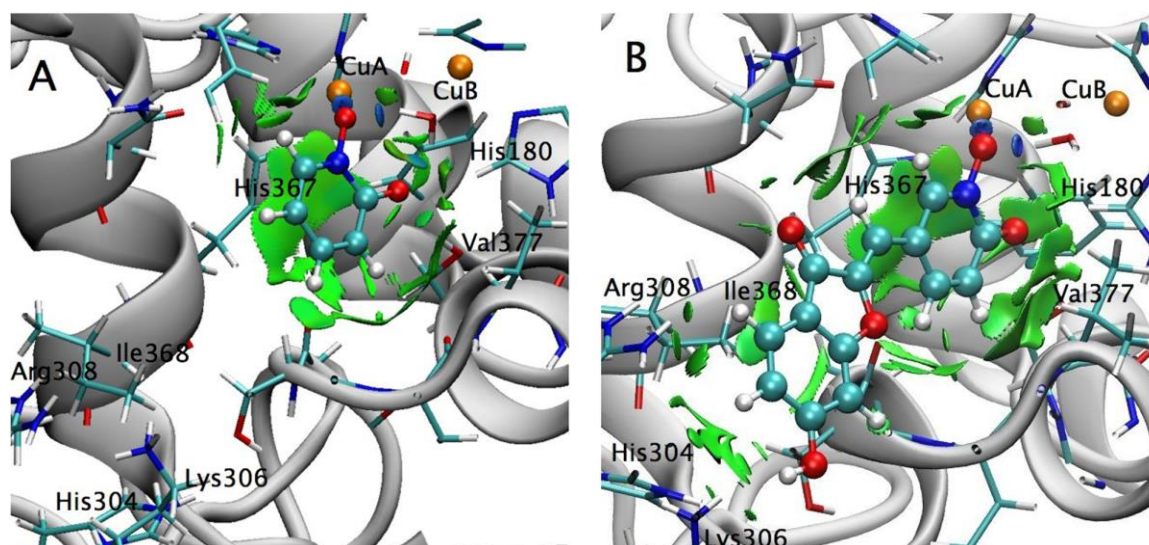


Figure 4. Position moyenne des complexes HOPNO-*hsTY* (A) et **3g**-*hsTY* (B) après dynamique QM/MM.

Ce projet a mené à la publication de six articles : *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *ChemBioChem* **2012**, *ChemBioChem* **2014**, *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, respectivement numéros 1, 3, 11, 14, 16 et 17 dans la liste des Articles.

2.2. Conception et synthèse d'aurones comme inhibiteurs non-nucléosidiques de la polymérase à ARN ARN-dépendante NS5B du virus de l'hépatite C (2008–2011, avec A. Boumendjel)

L'hépatite C est un problème majeur de santé publique. En effet, 170 millions de personnes à travers le monde sont porteurs du virus (VHC) responsable de la maladie (environ 3% de la population mondiale). L'infection par le VHC, pour lequel aucun vaccin prophylactique n'existe actuellement, provoque l'apparition de cirrhoses, de pathologies du foie, de carcinomes hépatocellulaires, et finalement de la mort des patients. En 2011, la mise sur le marché de la première génération d'inhibiteurs de la protéase NS3 du VHC (le telaprevir et le boceprevir) a conduit à une amélioration sensible des taux de réponse virologique soutenue (de 50 à 70%) des patients aux traitements anti-VHC, initialement constitués d'interféron α -pégylé et de ribavirine. Par conséquent, les efforts de recherche se sont alors focalisés sur une autre protéine virale, la polymérase à ARN NS5B. En effet, la mise en place d'une stratégie efficace d'inhibition de cette protéine, en combinaison avec le ciblage de NS3, devait permettre selon une étude de 2008 d'atteindre des taux de réponse virologique soutenue au-delà de 90%, ouvrant la voie à une complète éradication de la maladie en quelques années (Figure 5).⁴⁹

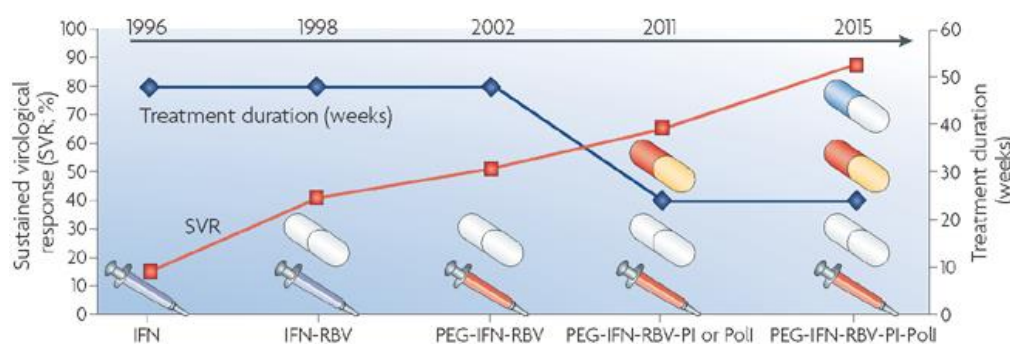


Figure 5. Évolution du taux de réponse virologique soutenue de la thérapie anti-HCV (PI : inhibiteur de protéase NS3, PolI : inhibiteur de polymérase NS5B), et prévision d'évolution (graphique de 2008).⁴⁹

De tels inhibiteurs n'existant pas sur le marché en 2008, plusieurs molécules issues du projet « Tyrosinase » précédemment décrit ont donc été testées sur NS5B afin d'évaluer leur potentiel. Certaines d'entre elles ont montré des résultats prometteurs. Plusieurs objectifs ont alors été proposés : (1) déterminer le site de fixation des aurones, NS5B présentant au minimum quatre sites allostériques déjà décrits, en plus de son site actif, (2) déterminer la géométrie de fixation des composés dans la poche identifiée, et proposer de nouvelles structures sur la base d'études de docking moléculaire, et (3) déve-

lopper des inhibiteurs plus actifs permettant d'atteindre des valeurs d'IC₅₀ submicromolaires. Ce projet a été mené en collaboration avec le Pr. Jean-Michel Pawlotsky, Hôpital Henri Mondor de Paris. La première série de molécules est décrite dans le [Tableau 3](#).⁵⁰ Elle a révélé trois composés actifs dans une fourchette 5–10 μM, les autres montrant des valeurs d'IC₅₀ supérieures à 20 μM. Ces trois composés partagent quelques éléments structuraux, et en particulier la présence du groupement OH en position 4 qui semble être cruciale. En effet, seuls des analogues de type **1** et **4** ont conduit à une inhibition significative de NS5B. Sur le cycle B des aurones, la présence d'un groupement OH en position 2' ou 4' semble favorable. Les aurones **1d** et **4d** ont en outre permis une inhibition de la réplication du VHC sur modèle cellulaire réplicon, avec des valeurs d'IC₅₀ de 18 et 40 μM respectivement.



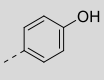
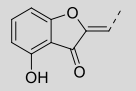
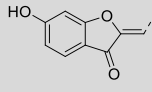
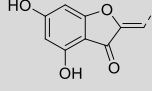
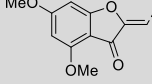
						
	Comp.	IC ₅₀ (μM)	Comp.	IC ₅₀ (μM)	Comp.	IC ₅₀ (μM)
	1b	11,1 ± 0,4	1c	>20	1d	5,9 ± 0,3
	3b	>20	3c	>20	3d	>20
	4b	>20	4c	<i>n.d.</i>	4d	9,7 ± 0,1
	5b	>20	5c	>20	5d	>20

Tableau 3. Composés testés initialement et leurs IC₅₀ mesurées contre NS5B (*n.d.* = non déterminé).

Le composé **1d** a ensuite été engagé dans une expérience de mutagenèse dirigée. Les quatre principaux sites de fixation des inhibiteurs connus de NS5B (Palm I, Palm II, Thumb I, Thumb II, [Figure 6](#)) ont ainsi été altérés pour constituer quatre mutants distincts (P495L, H95Q, C316Y, M423T) qui ont été évalués en tests d'inhibition avec **1d**. Alors que les mutants correspondant aux sites Palm I, Palm II et Thumb II ont mené à des valeurs d'IC₅₀ très proches de la protéine sauvage (facteurs 0,7 à 1,5), le mutant correspondant au site Thumb I a conduit à une diminution très nette de l'activité de **1d**, d'un facteur 6 à 7 ([Figure 6](#)). Ainsi, le composé **1d**, et par extension les aurones analogues, semblent se lier préférentiellement au site allostérique Thumb I.

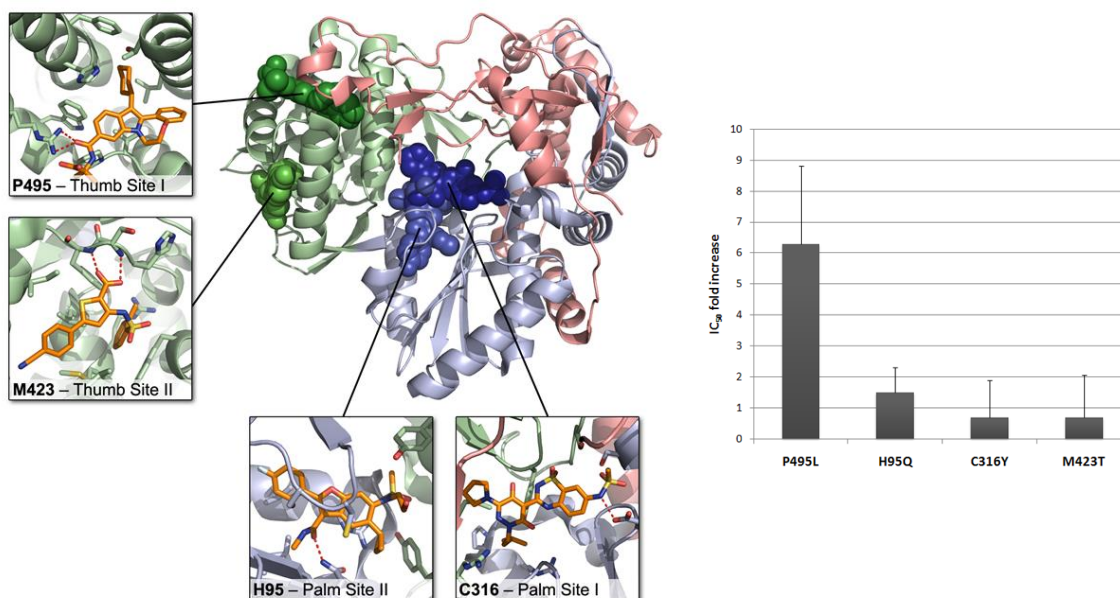
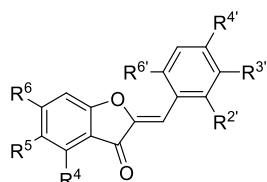


Figure 6. Structure tridimensionnelle de la protéine NS5B avec ses trois sous-domaines (« Fingers » en rouge, « Palm » en bleu et « Thumb » en vert) et ses quatre sites allostériques principaux, occupés ici par des ligands co-cristallisés ; les mutations clés associées à chaque site pour la mutagenèse sont indiquées en gras. Modification de l'IC₅₀ par rapport à la protéine NS5B sauvage obtenue avec l'aurone **1d** et les mutants P495L, H95Q, C316Y et M423T. Ces mutations sont connues pour réduire la susceptibilité des inhibiteurs des sites « Thumb I », « Palm II », « Palm I » et « Thumb II », respectivement.

Une série de 31 aurones a ainsi été conçue et synthétisée, à la fois sur la base des éléments structuraux préalablement identifiés — *e.g.* présence de groupements OH en position 4 ou 4,6 —, mais également *via* l'observation des interactions identifiées entre les inhibiteurs connus et la poche de fixation Thumb I — *e.g.* présence de groupements hydrophobes au fond de la poche. Ces molécules sont décrites dans le [Tableau 4](#). Parmi les composés actifs, la présence d'un groupement carboné volumineux en position 4' semble particulièrement favorable : les deux meilleurs inhibiteurs sont substitués dans cette position par des groupements butyle (**20**) et cyclohexyle (**21**). Les analogues éthyle (**18**), isopropyle (**19**) et *N*-méthylpipérazyle (**14**) ont montré un potentiel similaire. L'introduction de groupements OH sur le cycle B des aurones a également mené à des valeurs d'IC₅₀ proches du micromolaire, notamment pour les composés **1f**, **4e** et **4f**.

Ces composés actifs ont été soumis à des calculs de docking moléculaire impliquant une structure cristallographique de NS5B contenant un ligand co-cristallisé (PDB 2DXS). De manière générale, la géométrie de fixation des aurones au sein du site Thumb I est assez conservée. Elle inclut la formation de liaisons hydrogène entre les groupements CO et 4-OH des aurones et le résidu Arg503, ainsi qu'entre le 6-OH et Gly493.



Comp.	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ^{2'}	R ^{3'}	R ^{4'}	R ^{6'}	IC ₅₀ (μM)
1a	OH	H	H	H	H	H	H	14,6 ± 0,6
1f	OH	H	H	OH	H	OH	H	2,6 ± 0,1
2d	H	OH	H	H	H	OH	H	>20
4a	OH	H	OH	H	H	H	H	15,1 ± 0,7
4e	OH	H	OH	H	OH	OH	H	5,4 ± 0,3
4f	OH	H	OH	OH	H	OH	H	5,8 ± 0,3
6	OH	H	H	OMe	H	OMe	H	9,7 ± 0,2
7	OH	H	H	OMe	H	H	OMe	>20
8	OH	H	H	OMe	H	OMe	OMe	>20
9	OH	H	H	Me	H	Me	H	5,8 ± 0,2
10	OH	H	H	H	H	Et	H	>20
11	OH	H	H	H	H	<i>i</i> -Pr	H	>20
12	OH	H	H	H	H	Bu	H	>20
13	OH	H	H	H	H	<i>t</i> -Bu	H	>20
14	OH	H	H	H	H	<i>N</i> -Me-Ppz	H	3,8
15	OH	H	H	F	H	H	H	>20
16	OH	H	OH	OMe	OMe	H	H	>20
17	OH	H	OH	OMe	OMe	OMe	H	>20
18	OH	H	OH	H	H	Et	H	3,6 ± 0,2
19	OH	H	OH	H	H	<i>i</i> -Pr	H	3,1 ± 0,1
20	OH	H	OH	H	H	Bu	H	2,5 ± 0,1
21	OH	H	OH	H	H	<i>c</i> -Hex	H	2,3 ± 0,2
22	OH	H	OH	H	H	Morpholinyl	H	11,4 ± 0,3
23	OH	H	OH	H	H	F	H	11,2 ± 0,2
24	OMe	H	OMe	Me	H	Me	H	>20
25	OMe	H	OMe	H	H	Bu	H	>20
26	OMe	H	OMe	H	H	<i>c</i> -Hex	H	>20
27	H	H	H	H	H	Bu	H	>20
28	F	H	F	H	H	Bu	H	>20
29	F	H	H	F	H	F	H	>20
30	OBn	H	OBn	H	H	<i>c</i> -Hex	H	>20

Tableau 4. Aurones testées contre NS5B et valeurs d'IC₅₀ obtenues.

Ces interactions constituent un ancrage des molécules aux abords de la poche, tandis que le cycle B est enfoui au fond du site allostérique. Le caractère hydrophobe de cette poche, ainsi que la présence de Leu392 à proximité, permettent d'émettre l'hypothèse d'un double mode de fixation, cohérent avec les potentiels similaires des au-

rones hydroxylées et alkylées sur le cycle B. L'évaluation en docking moléculaire d'un grand nombre de structures virtuelles a ensuite conduit à l'identification d'une indolaurone, le composé **31**, comme inhibiteur potentiel de NS5B (Figure 7). Cette molécule, qui semble occuper le site allostérique de manière optimale lors des expériences de docking, a été préparée et testée, et a révélé une IC_{50} de $2,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$, similaire aux valeurs d'inhibition obtenues précédemment.

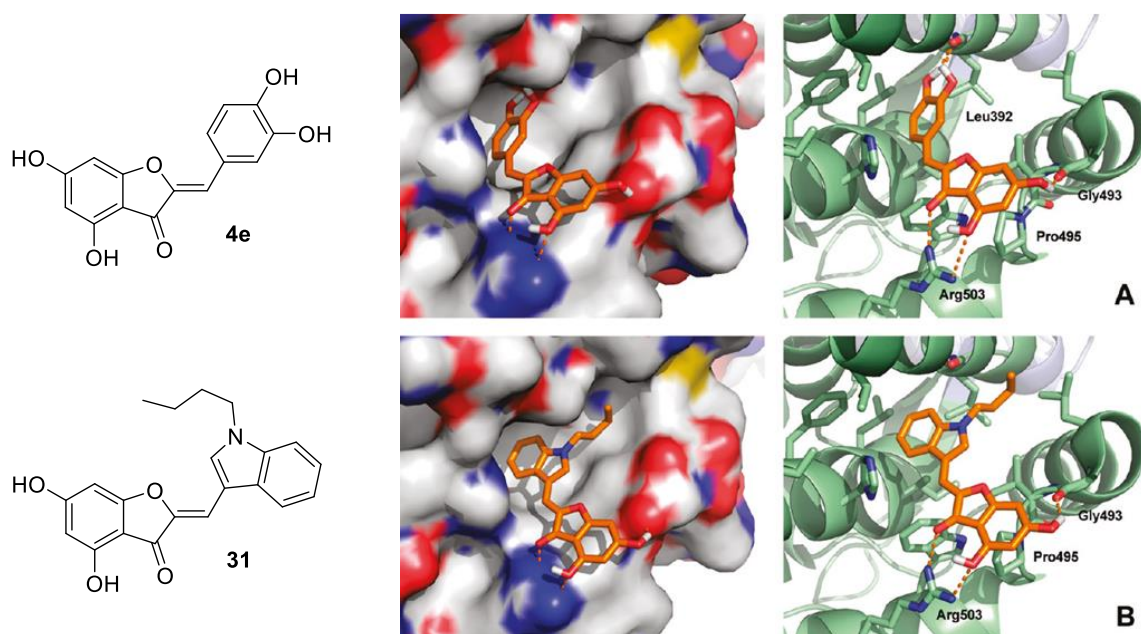
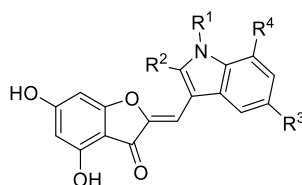


Figure 7. Structure des composés **4e** et **31**. Prédiction des modes de fixation des composés **4e** (A) et **31** (B) au sein du site Thumb I d'une structure de NS5B décrite.

La modulation de la partie indole de cette indolaurone **31** a mené à la synthèse et à l'évaluation de 22 composés, et 14 nouvelles structures ont été développées afin d'explorer le potentiel d'autres cycles aromatiques et hétérocycles (furanes, imidazoles, benzimidazoles, etc.).⁵¹ Ces travaux ont été réalisés avec les Dr. Wei Yi et Amel Meguelati. Un grand nombre d'indolaurones a conduit à des valeurs d' IC_{50} très proches du composé parent **31**, indépendamment des groupements ajoutés et de leur position ($IC_{50} = 2,0\text{--}3,5 \mu\text{M}$, Tableau 5). Cette tolérance stérique élevée indique que les interactions de van der Waals constituent l'essentiel de l'affinité de ces indolaurones pour NS5B. L'amélioration du potentiel de ces composés par la simple modulation des positions du noyau indole paraît donc difficile. En outre, la mise sur le marché d'inhibiteurs efficaces de NS5B — le sofosbuvir en 2013, le dasabuvir en 2014 — ont, comme prévu (Figure 5), mené à des taux de réponse plus élevés et ont par conséquent réduit l'intérêt pour la recherche de nouvelles molécules. Ces dérivés n'ont donc pas été développés plus avant.



Composé	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ (μM)
31	Bu	H	H	H	2,2 ± 0,2
32	Me	H	H	H	6 ± 1
33	<i>i</i> -Bu	H	H	H	8 ± 3
34	Prenyl	H	H	H	3,0 ± 0,1
35	(CH ₂) ₃ CO ₂ H	H	H	H	>20
36	CH ₂ <i>c</i> -Hex	H	H	H	3,3 ± 0,4
37	Bn	H	H	H	2,6 ± 0,6
38	(3-Me)Bn	H	H	H	2,6 ± 0,2
39	(3-OMe)Bn	H	H	H	2,70 ± 0,05
40	(3-OH)Bn	H	H	H	2,4 ± 0,2
41	(3-Br)Bn	H	H	H	2,40 ± 0,07
42	(CH ₂) ₂ Ph	H	H	H	3,2 ± 0,5
43	(CH ₂) ₃ Ph	H	H	H	2,7 ± 0,3
44	Bu	Me	H	H	<i>n.d.</i>
45	Bu	H	Me	H	<i>n.d.</i>
46	Bu	H	OMe	H	<i>n.d.</i>
47	Bu	H	OH	H	<i>n.d.</i>
48	Bu	H	H	Me	<i>n.d.</i>
49	Bu	H	H	OMe	<i>n.d.</i>
50	Bu	H	H	OH	2,3 ± 0,2

Tableau 5. Quelques-unes des indolaurones testées contre NS5B et valeurs d'IC₅₀ obtenues (*n.d.* = non déterminé).

Ce projet a mené à la publication de quatre articles : *J. Med. Chem.* **2011**, *Curr. Med. Chem.* **2012**, *Med. Res. Rev.* **2013**, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, respectivement numéros 2, 4, 8 et 10 dans la liste des Articles.

2.3. Isolement du tramadol au sein de *Nauclea latifolia*, séparation chirale des deux énantiomères, étude d'une voie de synthèse biomimétique, et travaux bibliographiques (2010–2019, avec A. Boumendjel)

Le tramadol est un médicament analgésique utilisé mondialement, qui a été mis sur le marché en 1977 par la société Grünenthal GmbH sous la forme d'un mélange racémique. En 2011, au cours d'un programme de recherche de nouveaux composés anti-

douleur d'origine naturelle, nous avons identifié et isolé de manière totalement inattendue de larges quantités de tramadol (environ 0,4% du matériel sec) présentes dans les écorces de racine d'un arbuste africain, *Nauclea latifolia* (Figure 8).⁵²

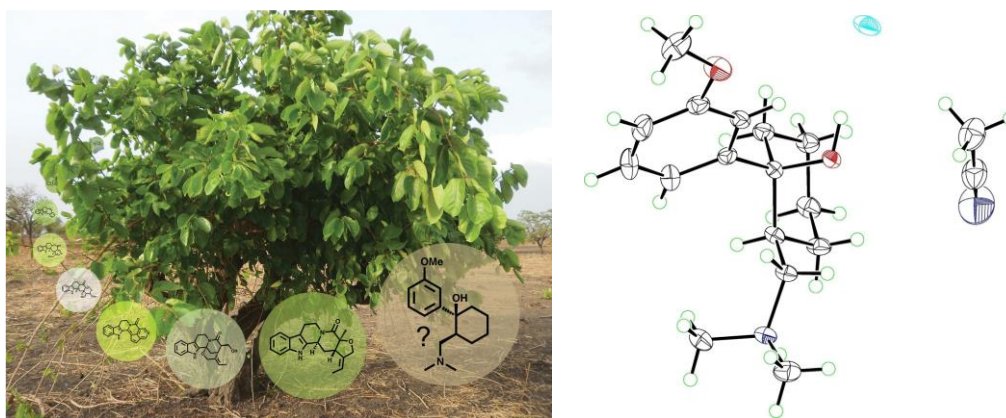


Figure 8. Photographie de l'arbuste *Nauclea latifolia* avec les structures de composants connus, en couverture de *Natural Product Reports* (Volume 33, n°9, septembre 2016). ORTEP de la structure cristallographique obtenue par diffraction des rayons X du chlorhydrate de *cis*-tramadol provenant de l'arbuste.

Cette découverte, largement couverte par les médias scientifiques et généralistes à travers le monde, a constitué le premier cas de médicament synthétique sur le marché retrouvé comme produit naturel au sein d'une plante, qui plus est à des concentrations efficaces. La présence du tramadol dans les racines a en effet permis de rapprocher ses effets analgésiques bien connus avec ceux de décoctions de *Nauclea latifolia*, utilisées en médecine traditionnelle sub-saharienne pour le traitement de la douleur (entre autres indications). De manière surprenante, le tramadol contenu dans les racines de l'arbuste est présent sous forme racémique, ce qui a été confirmé par la résolution d'une structure cristallographique (Figure 8) et par des études HPLC. La séparation chirale des deux énantiomères a également été réalisée par voie chimique, avec l'utilisation d'acide mandélique et/ou di-*O-p*-toluoyltartrique énantiopur qui ont permis l'obtention des sels diastéréoisomériques qui se sont révélés séparables par précipitation. La production des deux énantiomères optiquement purs a permis de valider leur présence dans la plante et d'attribuer les signaux HPLC.

Cependant, ces travaux ont été contestés par le Pr. Spiteller, qui a postulé une origine synthétique du tramadol isolé de *N. latifolia*. La présence de cette molécule serait selon lui le résultat d'une contamination anthropogénique environnementale à grande échelle. Le tramadol est en effet utilisé par les fermiers locaux pour permettre au bétail de

supporter de longues journées de travail sous la chaleur. Cette hypothèse a été soutenue par l'identification de traces de tramadol dans des sols et eaux du nord du Cameroun.⁵³ De plus, la culture hydroponique de *N. latifolia* en présence d'acides aminés riches en isotopes stables n'a pas conduit à la formation de tramadol, mais la plante n'a été étudiée qu'à un stade de développement très précoce. Néanmoins, si des mesures par spectrométrie de masse par accélérateur ¹⁴C de haute précision ont permis de conclure à une origine synthétique du tramadol présent dans les sols, les résultats obtenus sur le tramadol issu de *N. latifolia* sont en totale contradiction avec une telle origine.⁵⁴ De plus, les échantillons originaux de la plante ont été collectés dans la biosphère préservée de Bénoué, où les activités humaines et le pâturage sont prohibés. Enfin, une analyse isotopique spécifique de la position a été menée par un collaborateur (Pr. Richard Robins, Univ. Nantes).⁵⁵ Elle a partiellement corroboré notre hypothèse de biosynthèse (Schéma 3), le profil d'incorporation en isotopes ¹³C et ¹⁸O sur les différentes positions du tramadol « naturel » indiquant une possible implication des acides aminés L-phénylalanine et L-lysine.

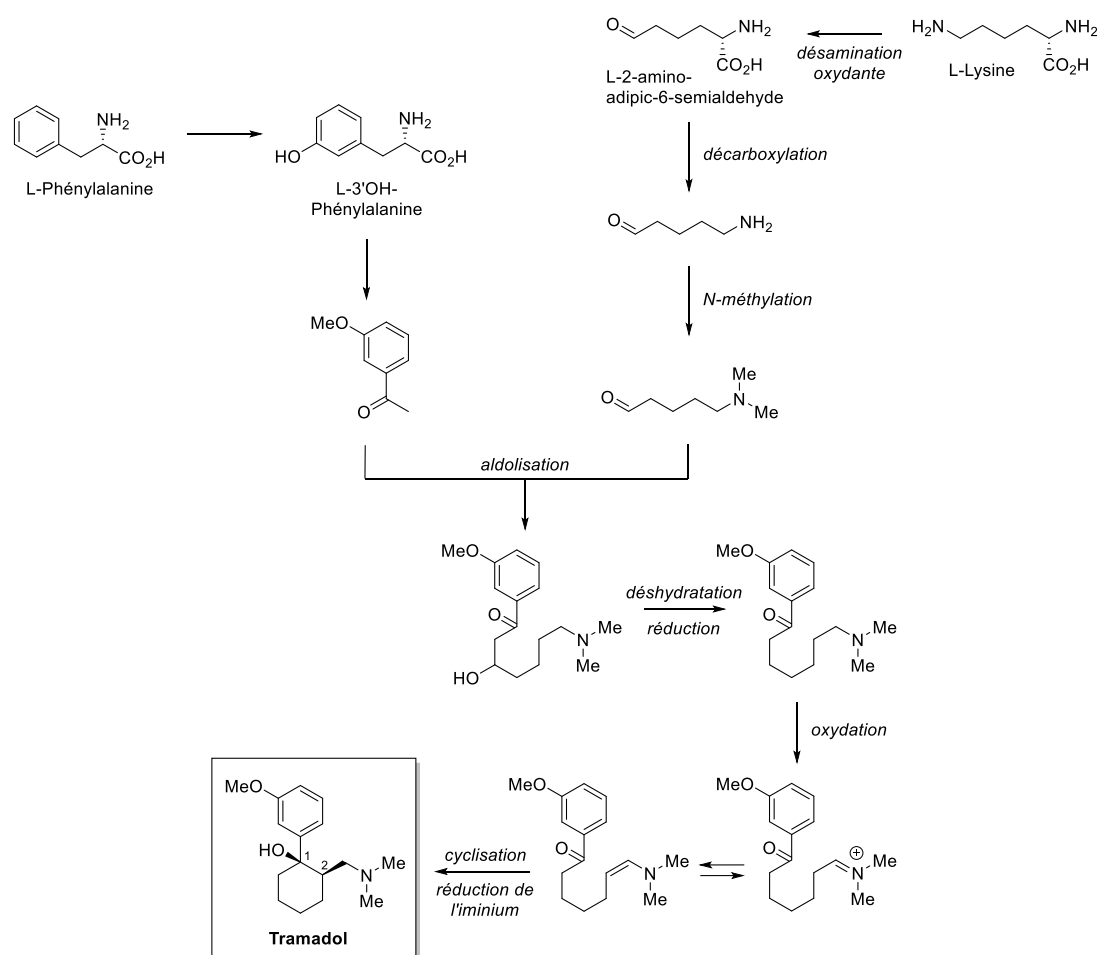


Schéma 3. Voie de biosynthèse envisagée pour le tramadol à partir de la L-phénylalanine et de la L-lysine.

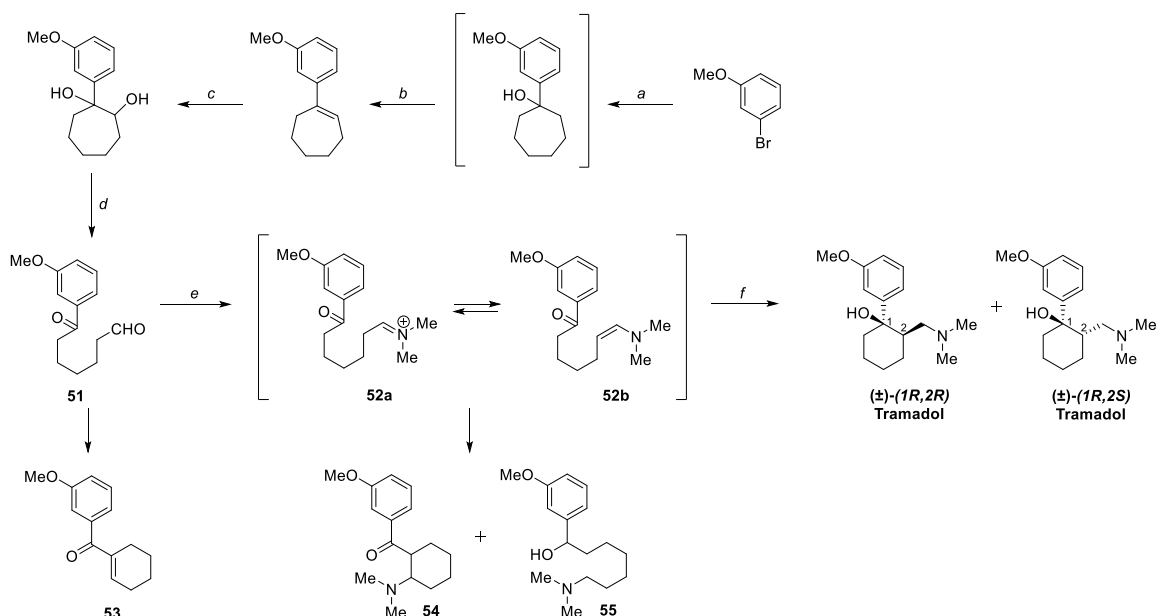


Schéma 4. Synthèse de l'intermédiaire **51** et essais de cyclisation biomimétique en tramadol. Réactifs et conditions : *a.* *n*-BuLi, THF, -78 °C, 45 min puis cycloheptanone, THF, -78 °C, 2 h, 92% ; *b.* TFAA, CH₂Cl₂, 25 °C, 1 h, 100% ; *c.* OsO₄, NMO, THF, H₂O, 25 °C, 96 h, 94% ; *d.* NaIO₄, THF, H₂O, 25 °C, 48 h, 84% ; *e.* HNMe₂, THF, 65 °C, 24 h ; *f.* NaBH₃CN, THF, 25 °C, 24 h.

Afin d'étayer l'hypothèse de cette voie de biosynthèse, nous avons entrepris de modéliser chimiquement la dernière étape correspondant à la cyclisation et à la réduction de l'iminium formé (travail réalisé avec le Dr. Florine Lecerf-Schmidt).⁵⁶ En effet, la dernière étape du schéma de biosynthèse est supposée être spontanée et ne pas reposer sur l'intervention d'enzymes, ce qui peut expliquer la présence au sein de la plante des deux énantiomères sous forme de mélange racémique. Ainsi, un intermédiaire dicarboxylé a été préparé afin de procéder aux tests de cyclisation / réduction biomimétique (Schéma 4). Une conversion en « one-pot » du composé dicarboxylé en tramadol a ainsi été tentée par traitement avec de la diméthylamine, suivi par une réduction *in situ* avec NaBH₃CN. La formation de tramadol, avec plusieurs autres composés (**53–55**), a été détectée dans ces conditions par UHPLC-TOF-MS et RMN ¹H. Elle intervient *via* l'iminium **52a** et l'isomérisation subséquente en énamine **52b**. L'addition intramoléculaire de cette énamine sur le carbonyle, suivant un mécanisme Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert de type 6-enolexo, produit un intermédiaire qui mène au tramadol par réduction (Schéma 4). Ainsi, dans des conditions douces, nous avons démontré la formation *in situ* du tramadol à partir de l'intermédiaire dicarboxylé, sans intervention d'enzymes. Cependant, si le profil d'incorporation d'isotopes stables et la synthèse biomimétique ont permis de rendre plausible la formation naturelle de tramadol, une analyse en carbone 14 reste aujourd'hui

le seul moyen d'obtenir une réponse fiable quant à l'origine réelle de la molécule identifiée au sein de *Nauclea latifolia*. Ces travaux sont actuellement en cours.

Ces études de validation de l'« hypothèse naturelle » se sont accompagnées d'un travail bibliographique concernant la phytochimie et les usages en médecine traditionnelle de *Nauclea latifolia* et des autres espèces africaines de *Nauclea* : *N. diderrichii*, *N. pobequinii*, *N. nyasica*, *N. xanthoxylon*, *N. vanderguchtii* et *N. gillettii*. En particulier, les nombreux alcaloïdes indoliques des tissus de *N. latifolia* ont été documentés dans une première revue bibliographique, parue dans *Natural Product Reports* (Figure 9), et leurs activités, notamment anti-infectieuses et neurologiques, ont été reliées à celles des extraits correspondants.⁵⁷ Une recherche exhaustive des molécules présentes dans toutes les espèces africaines, ainsi que les travaux concernant l'usage médicinal des extraits par les praticiens traditionnels dans le cadre de nombreuses pathologies ont été compilés dans une seconde revue bibliographique, parue dans le *Journal of Ethnopharmacology*.⁵⁸ Ces travaux ont été menés avec les Dr. Benjamin Boucherle, Marine Peuchmaur et Basile Pérès au laboratoire.



Figure 9. Image illustrant les principales pathologies traitées traditionnellement par des extraits d'espèces africaines de *Nauclea*, ainsi que les molécules associées.

Ce projet a mené à la publication de quatre articles : *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *Chem. Commun.* **2015**, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *J. Ethnopharmacol.* **2018**, respectivement numéros 9, 12, 15 et 20 dans la liste des Articles.

2.4. Nouveaux dérivés de DOTASQ : une seconde génération de tétrades de guanines synthétiques basée sur un cœur DOTA présentant des propriétés et des applications étendues (2011–2012, avec D. Monchaud)

La structure classique de l'ADN en double brin — ou duplex — constitue sa forme fonctionnelle pour le processus de réplication. Mais l'ADN admet localement des structures transitoires différentes, qui peuvent affecter ce processus. Le développement de petites molécules capable de promouvoir et/ou stabiliser ces structures présente un intérêt thérapeutique, notamment dans le domaine des agents anti-cancéreux. En effet, les quadruplex de guanines — ou G-quadruplex — sont des représentants emblématiques de ces structures transitoires, formés à partir de l'empilement de plusieurs tétrades de guanines (Figure 10). Ils émergent à partir de brins d'ADN riches en guanines, et en particulier dans des régions du génome liées au cancer : promoteurs d'oncogènes et télomères notamment. La stabilisation des G-quadruplex *in vivo* pourrait ainsi inhiber la transcription de ces oncogènes, ainsi que l'activité de la télomérase, une enzyme qui prévient l'érosion chromosomique au sein des cellules cancéreuses. Cependant le développement de ligands de G-quadruplex a été pour l'essentiel basé sur des squelettes plans et aromatiques, ce qui pose de nombreux problèmes de sélectivité entre les formes duplex et quadruplex.

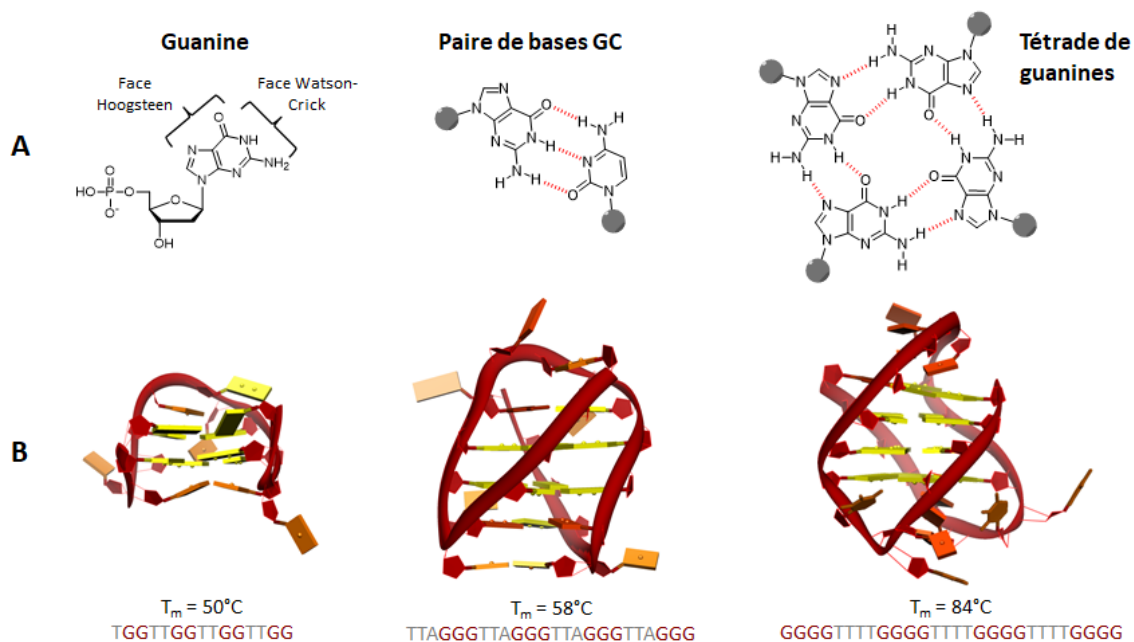


Figure 10. Structure de la guanine et interactions en duplex et en tétrade (A), structures de quadruplex constitués de deux, trois, ou quatre tétrades, séquences primaires et températures de fusion associées (B).

En 2011 à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, une approche biomimétique a été développée afin de contourner ce problème de sélectivité. L'idée était de permettre la stabilisation sélective des G-quadruplex par la mise en place d'interactions entre la tétrade externe de ces quadruplex et une tétrade de guanines synthétique, qui se structurerait au contact de sa cible. L'ajout d'une tétrade supplémentaire aurait pour effet de stabiliser l'édifice. Les quadruplex sont en effet d'autant plus stables qu'ils possèdent de tétrades empilées, comme l'attestent les températures de fusion (T_m) respectives de quadruplex à deux, trois ou quatre tétrades (Figure 10). Basée sur un noyau de type DOTA, une première génération de ligands de ce type avait été synthétisée et évaluée par le Dr. Loïc Stefan à travers des expériences de FRET-melting sur des quadruplex.⁵⁹ Ce premier composé, nommé DOTASQ, a échoué à stabiliser les quadruplex seul ($\Delta T_{1/2} \approx 2$ °C, c'est-à-dire un écart de 2 °C seulement entre les températures de fusion du quadruplex seul, et en présence du DOTASQ), mais a mené à une stabilisation plus importante ($\Delta T_{1/2} = 10,5$ °C) en présence de terbium, un lanthanide permettant de pré-structurer la tétrade synthétique (Figure 11). Ainsi, le problème semblait lié non pas au concept de départ, mais à l'incapacité du DOTASQ à se structurer au contact de sa cible.

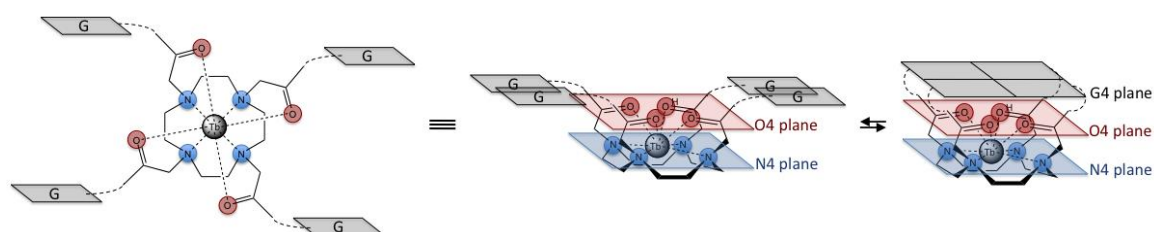


Figure 11. Structure du DOTASQ de première génération, et phénomène de pré-structuration en tétrade induit par la présence d'un lanthanide au sein de la molécule : le terbium.

Afin de favoriser cette structuration induite par la cible, un nouveau représentant de DOTASQ, nommé ^{PNA}DOTASQ, a été conçu puis synthétisé dans le cadre de mon contrat post-doctoral (Figure 12). Ce composé présente, en plus des éléments structuraux du DOTASQ original, une série de quatre bras amino, dont la présence (sous forme cationique en milieu biologique) est supposée permettre une interaction forte avec les charges négatives portées par les liaisons phosphodiester latérales des guanines impliquées dans la structure du quadruplex. Il a été préparé par le couplage de quatre unités de PNA de type guanine sur un dérivé de DOTA tétra-éthylènediamine. Un analogue comportant un atome de terbium dans la cavité du DOTA, le ^{PNA}DOTASQ-Tb³⁺, a également été synthétisé par ajout de Tb(NO₃)₃ (Schéma 5).⁶⁰

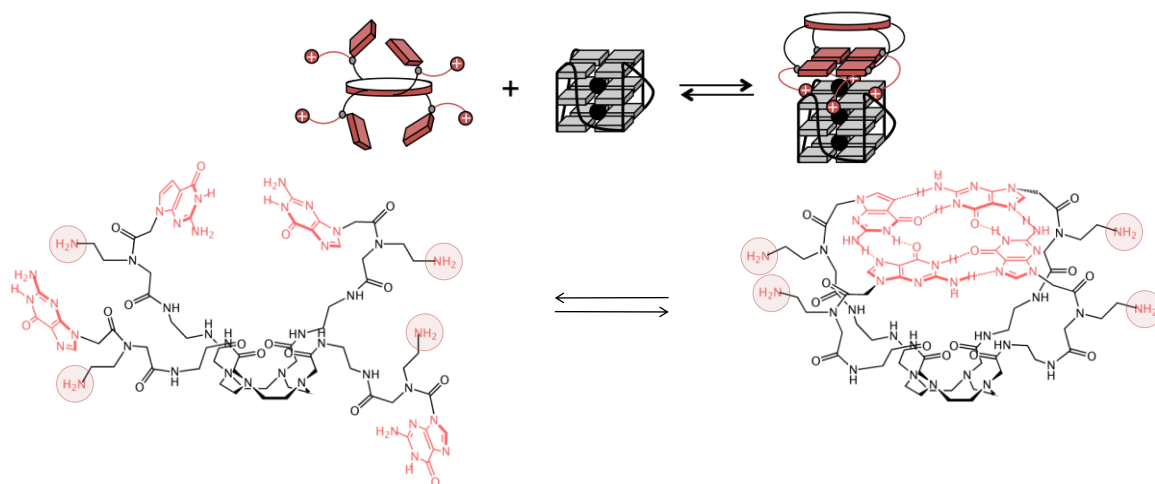


Figure 12. Structure du $\text{PNA}^{\text{A}}\text{DOTASQ}$ et phénomène de structuration en tétrade au contact d'un quadruplex.

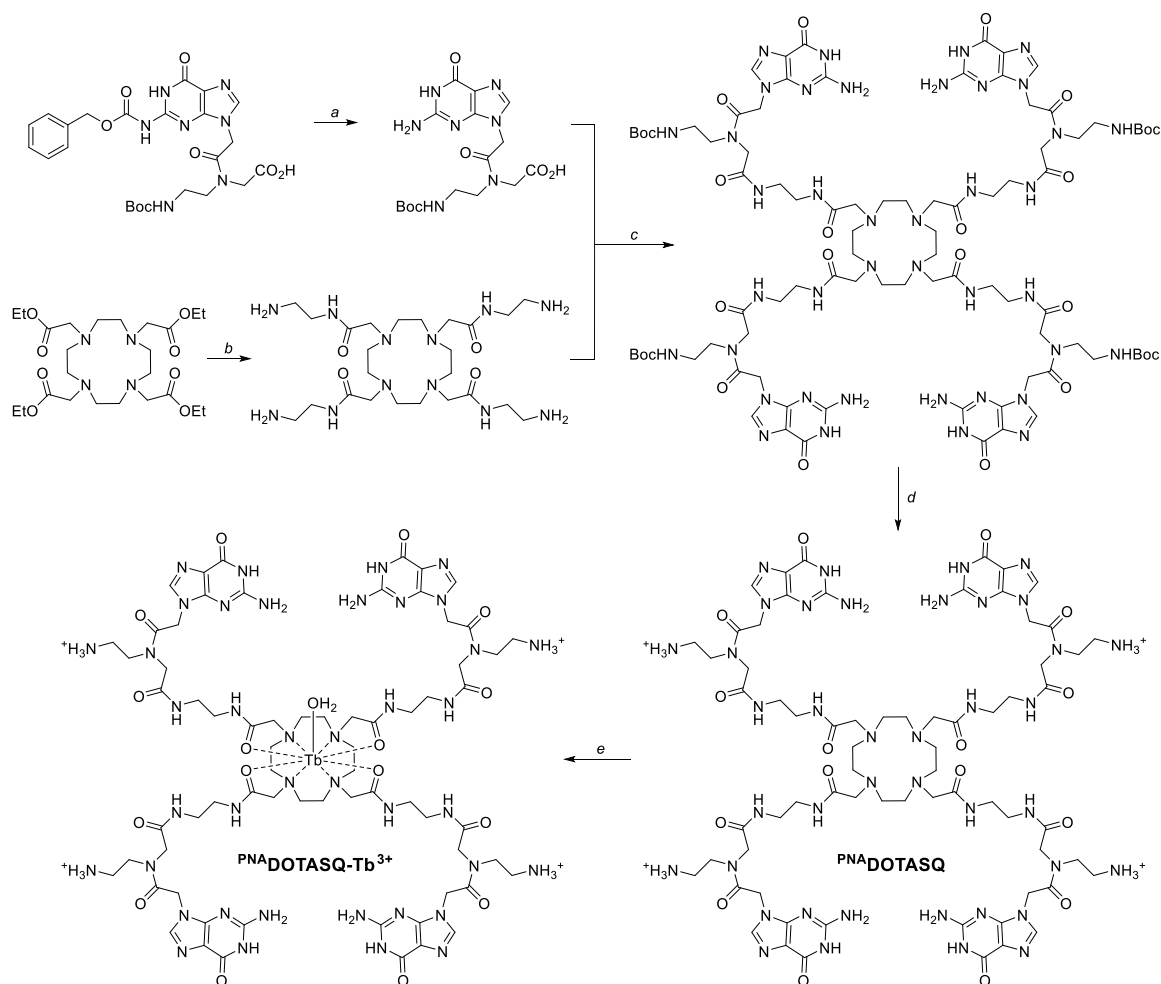


Schéma 5. Synthèse du $\text{PNA}^{\text{A}}\text{DOTASQ}$ et du $\text{PNA}^{\text{A}}\text{DOTASQ-Tb}^{3+}$. Réactifs et conditions : *a.* H_2 , Pd/C, MeOH, 25 °C, 1 h, 89% ; *b.* éthylène diamine, 25 °C, 96 h, 90% ; *c.* HOBT, EDCI, DMF, 25 °C, 144 h, 100% ; *d.* HCl, MeOH, 25 °C, 16 h, 81% ; *e.* $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MeOH, cacodylate de lithium, 55 °C, 96 h, 78%.

Les résultats obtenus lors des expériences de FRET-melting ont été effectivement probants. Ainsi, des 2 °C environ de stabilisation du quadruplex F21T dans le cas de DOTASQ simple, la présence de 1 μM de ^{PNA}DOTASQ permet d'atteindre 12,0–12,5 °C, sans ajout d'un atome de lanthanide pour pré-structurer le composé. Le ^{PNA}DOTASQ a également montré une très bonne sélectivité pour les quadruplex (F21T, F-kit2-T, F-myc-T, $\Delta T_{1/2} = 12,0\text{--}15,0$ °C) vis-à-vis des structures de type duplex (F-DS₁-T, $\Delta T_{1/2} = 0,3$ °C), et d'autres structures inhabituelles de l'ADN. En outre, l'ajout de grandes quantités de duplex non marqué comme compétiteur lors des expériences sur quadruplex modifie peu la température de fusion observée ($\Delta T_{1/2} = 10,10$ °C avec 15 équivalents du duplex non marqué ds26, contre 12,11 °C sans duplex). De manière intéressante, la synthèse et l'évaluation du ^{PNA}DOTASQ pré-structuré à l'aide d'un atome de terbium (^{PNA}DOTASQ-Tb³⁺) mène à une stabilisation des quadruplex très proche de celle observée pour le ^{PNA}DOTASQ seul. Dans le même temps, ce composé pré-structuré perd une partie de sa sélectivité vis-à-vis des duplex (Figure 13). Le potentiel du ^{PNA}DOTASQ a été confirmé par des études de déplacement de ligand fluorescent (G4-FID), qui ont conduit à des valeurs de DC₅₀ (concentration menant à 50% de déplacement du ligand de quadruplex fluorescent) de 2,9–3,2 μM dans le cas des quadruplex 22AG, c-kit2 et c-myc, contre plus de 10 μM dans le cas de ds26.

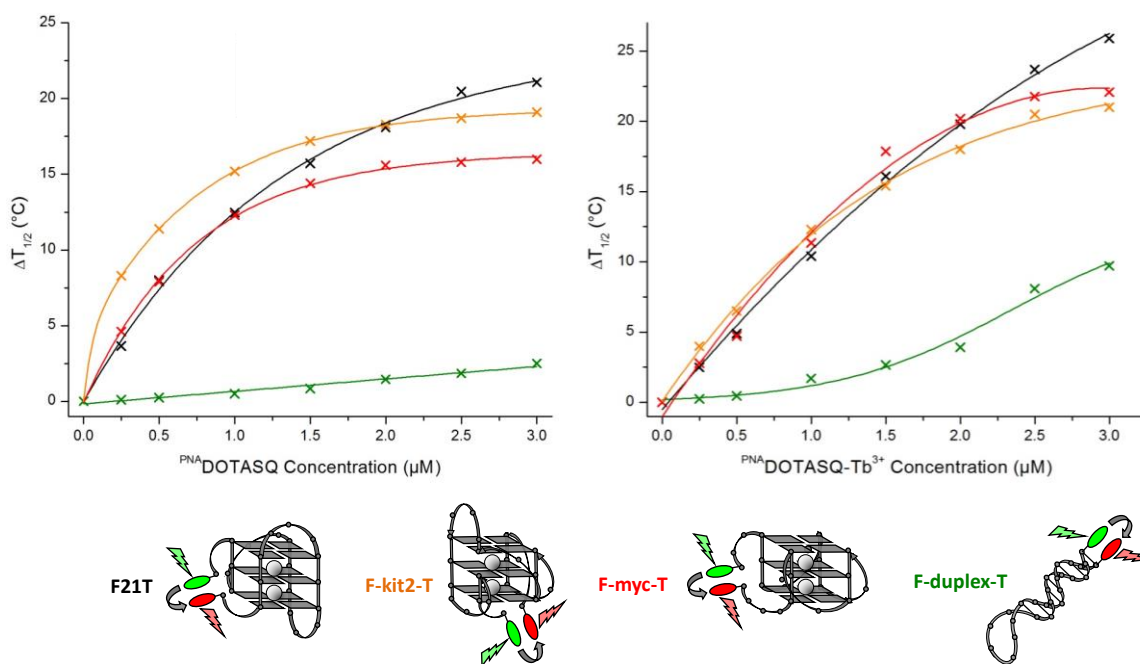


Figure 13. Évolution de la température de fusion de différents quadruplex et d'un duplex marqués en fonction de la concentration de ^{PNA}DOTASQ ou de ^{PNA}DOTASQ-Tb³⁺ ajoutée.

En outre, l'étude par RMN ^1H de l'interaction entre un quadruplex tétramoléculaire, $[\text{T}_2\text{AG}_3\text{T}]_4$, et le $^{\text{PNA}}\text{DOTASQ}$ a mis en évidence la formation de la tétrade synthétique au contact du quadruplex. L'ajout progressif de $^{\text{PNA}}\text{DOTASQ}$ à une solution de $[\text{T}_2\text{AG}_3\text{T}]_4$ mène en effet à la disparition des signaux originaux du quadruplex (trois signaux de guanines correspondant aux trois tétrades) au profit d'une nouvelle série de signaux, présentant un pic additionnel vers 11,45 ppm (étoile rouge) qui correspond à la forme structurée en tétrade du $^{\text{PNA}}\text{DOTASQ}$ (Figure 14). Le composé seul en solution mène en revanche à un spectre silencieux sur la zone considérée (ligne noire). En comparaison, aucun déplacement des signaux de guanine et de thymine n'est observé sur le spectre RMN ^1H du duplex ds12 après addition d'équivalents de $^{\text{PNA}}\text{DOTASQ}$, ce qui montre une probable absence d'interaction entre le composé et les structures de type duplex. Enfin, des expériences de spectrométrie de masse ESI ont été réalisées pour valider l'association entre le $^{\text{PNA}}\text{DOTASQ}$ et le quadruplex $[\text{TG}_4\text{T}]_4$. Une association faible a en effet été observée, sur une base 1:1 uniquement, ce qui suggère un mode de fixation du ligand bien défini, cohérent avec l'hypothèse de départ. Aucune association n'a en revanche été mesurée dans les mêmes conditions avec le duplex ds12.

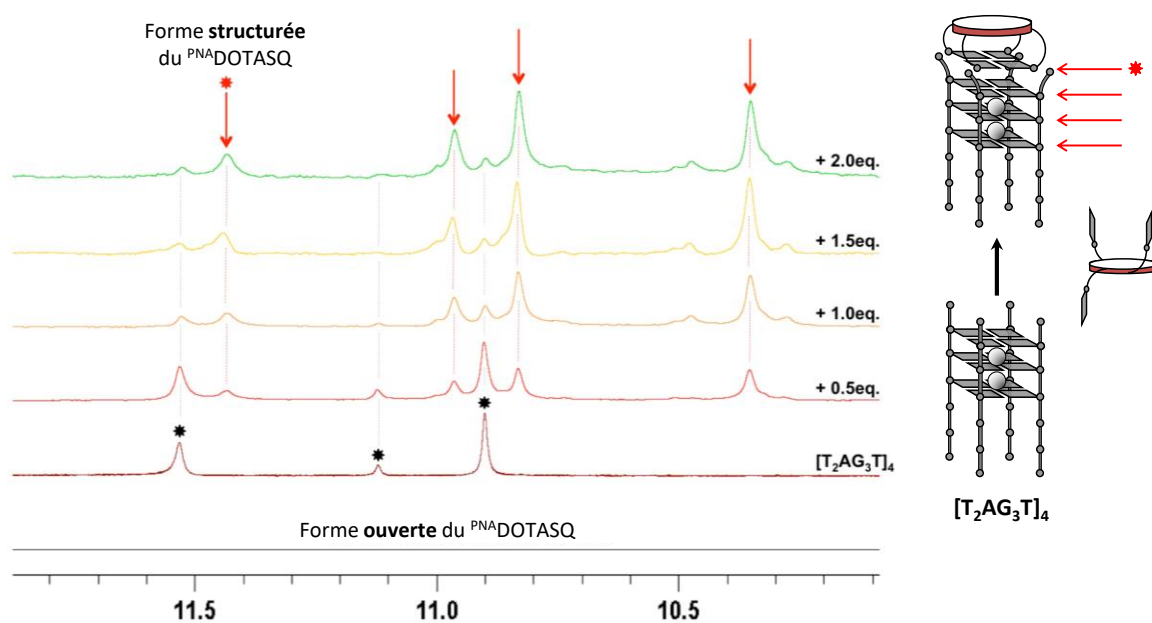


Figure 14. Évolution du spectre RMN ^1H du quadruplex $[\text{T}_2\text{AG}_3\text{T}]_4$ avec l'ajout de quantités croissantes de $^{\text{PNA}}\text{DOTASQ}$, et interprétation des nouveaux signaux.

Les quadruplex de guanines sont également capables d'adopter des propriétés catalytiques semblables à certaines protéines, et en particulier des peroxydases. En effet, ils peuvent, notamment *via* les tétrades de guanine externes, oxyder l'hémine en présence de

H_2O_2 , selon une réaction appelée « DNAzyme » (Figure 15). Le PNA^{DOTASQ} ayant la capacité de se structurer sous forme de tétrade au contact d'une cible, il pourrait constituer un mime intéressant des quadruplex dans le cadre de cette réaction, en offrant à l'hémine un site de fixation similaire, et la possibilité d'obtenir un système de type DNAzyme basé sur une petite molécule (nommé « TASQzyme », Figure 15). Cette hypothèse est renforcée par la présence sur l'hémine de charges négatives, qui pourraient interagir avantageusement avec les bras amino du PNA^{DOTASQ} .

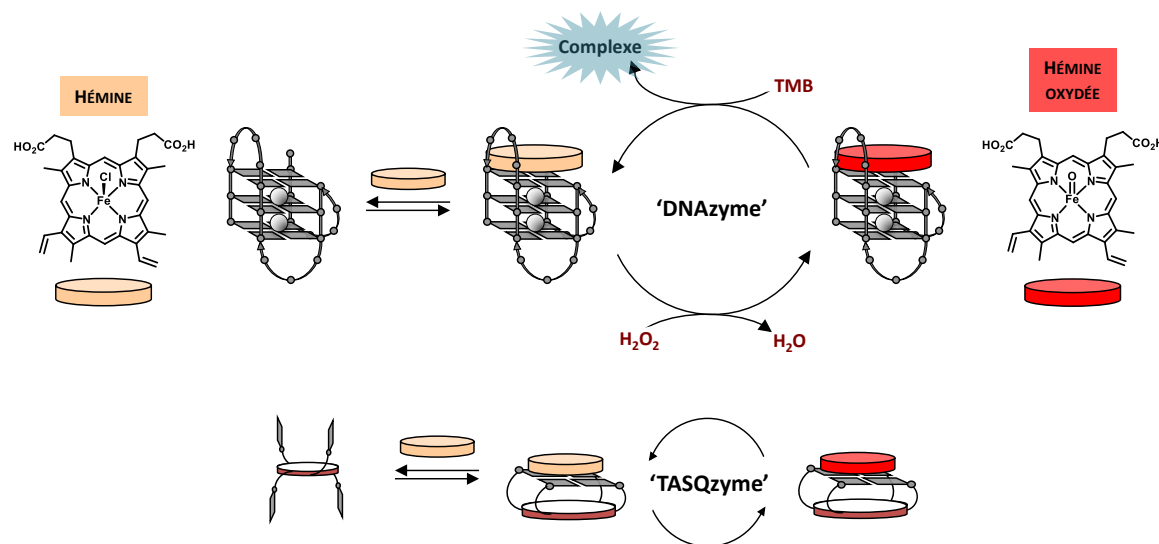


Figure 15. Principe de la réaction « DNAzyme », une oxydation de l'hémine par H_2O_2 catalysée par un quadruplex d'ADN, et monitorée par la transformation concomitante de la tétraméthylbenzidine (TMB) en tétraméthylbenzidine diimine fluorescente. Application du principe à une réaction « TASQzyme », catalysée par une tétrade de guanines synthétique.

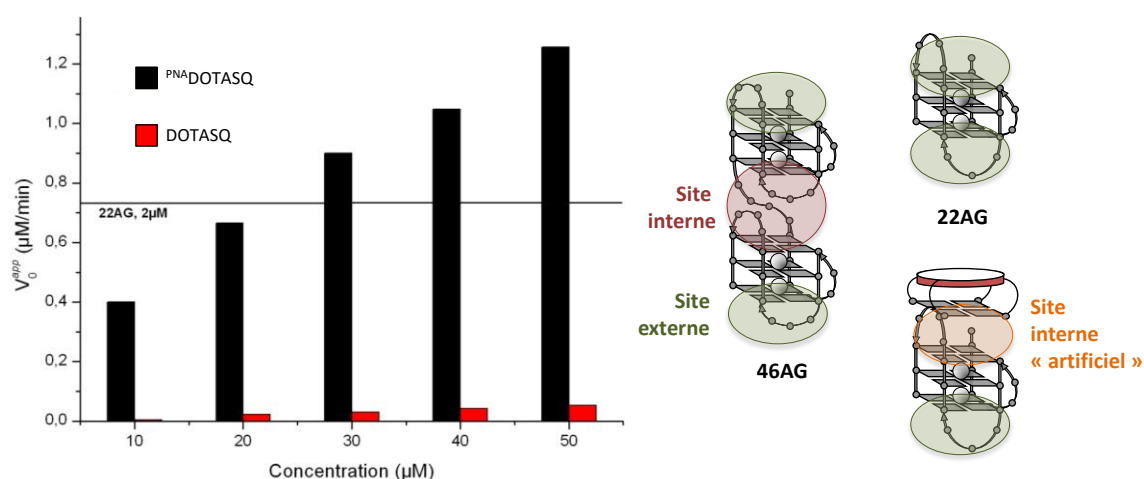


Figure 16. Vitesse initiale de la réaction « TASQzyme » en fonction de la concentration en PNA^{DOTASQ} (en noir) ou en DOTASQ (en rouge). Illustration des concepts de site interne et de site externe permettant d'expliquer l'effet de « boost » observé en présence de quadruplex et de PNA^{DOTASQ} .

L'étude des capacités du ^{PNA}DOTASQ à oxyder l'hémine a effectivement mené à l'observation d'une activité intéressante, bien qu'inférieure au quadruplex 22AG.⁶¹ De manière dose-dépendante, le ^{PNA}DOTASQ permet la mise en place d'un phénomène de TASQzyme (Figure 16). Son activité est par ailleurs bien supérieure à celle du DOTASQ original (sa vitesse initiale de réaction est en moyenne 27 fois supérieure, Figure 16),⁶² ce qui suggère encore une fois une meilleure propension à s'assembler en tétrade au contact d'une cible. Par ailleurs, les sites de fixation pour l'hémine au sein des quadruplex ne sont pas équivalents. En particulier, un site localisé entre deux quadruplex sur un même brin d'ADN (site interne) est plus performant pour l'oxydation de l'hémine qu'un site sur la tétrade externe d'un quadruplex isolé (site externe, Figure 16). En conséquence, un équivalent de 46AG mène à une activité catalytique plus importante que deux équivalents de 22AG. Or, l'addition de ^{PNA}DOTASQ au quadruplex 22AG augmente l'activité de ce dernier de près d'un facteur 2, même à des concentrations auxquelles le ^{PNA}DOTASQ seul est inactif. Cet effet de « boost » de la réaction DNAzyme peut s'expliquer par la création de nouveaux sites internes artificiellement créés par l'interaction entre les tétrades externes du 22AG et la tétrade synthétique apportée par le ^{PNA}DOTASQ (Figure 16).

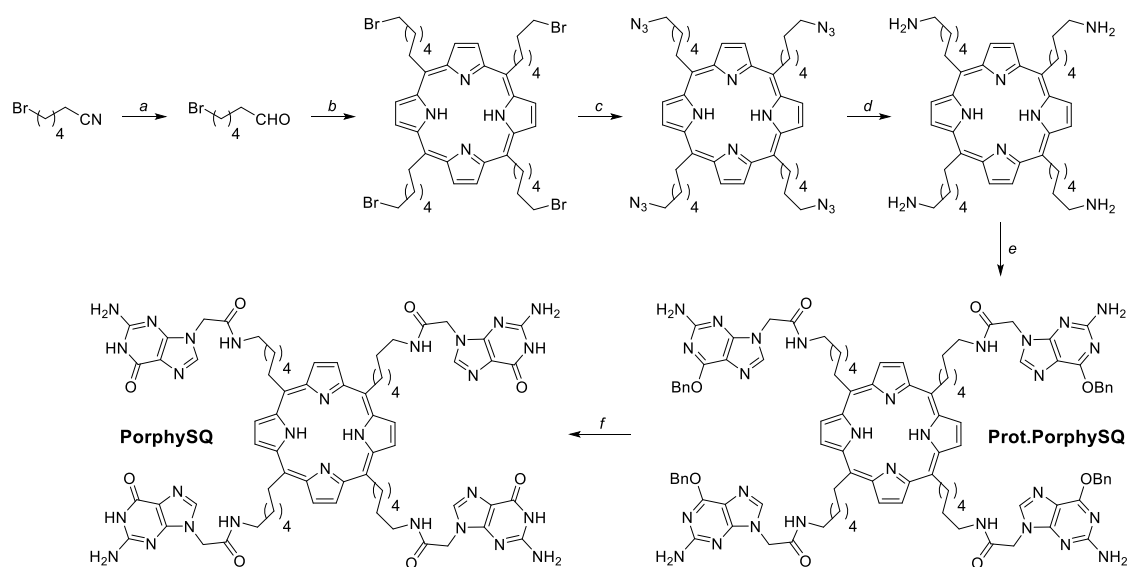


Schéma 6. Synthèse du PorphySQ. Réactifs et conditions : *a.* DIBAL-H, CH₂Cl₂, -78 °C à 25 °C, 4 h, 84% ; *b.* pyrrole, BF₃.Et₂O, CHCl₃, 25 °C, 16 h puis DDQ, 25 °C, 2 h, 15% ; *c.* NaN₃, THF, H₂O, 65 °C, 16 h, 94% ; *d.* LiAlH₄, THF, 25 °C, 6 h, non isolé ; *e.* acide 2-(2-amino-6-(benzyloxy)-9H-purin-9-yl)acétique, HOBt, EDCI, DMF, 25 °C, 96 h, 42% sur deux étapes ; *f.* HCl, MeOH, 25 °C, 1 h, 63%.

Un autre dérivé du DOTASQ, le PorphySQ, a été synthétisé par le Dr. Hai-Jun Xu (Schéma 6).⁶³ Cette molécule, construite sur un template actif de type porphyrine, a été

conçue pour permettre une structuration facilitée en tétrade (Figure 17). En effet, le cœur porphyrine permet la mise en place d'interactions de π -stacking, et ainsi de mimer l'effet d'empilement des tétrades de guanines naturelles au sein des quadruplex. Ces interactions ont été rationalisées par modélisation moléculaire, et l'évaluation du PorphySQ en FRET-melting a permis de confirmer la structuration en tétrade. Le composé mène en effet à une stabilisation de F21T plus importante que le DOTASQ ($\Delta T_{1/2} = 6,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ contre $1,7\text{ }^{\circ}\text{C}$), un effet qui n'est pas seulement dû à la contribution du squelette porphyrine, puisque des porphyrines proches n'ont pas montré d'activité (Figure 17).

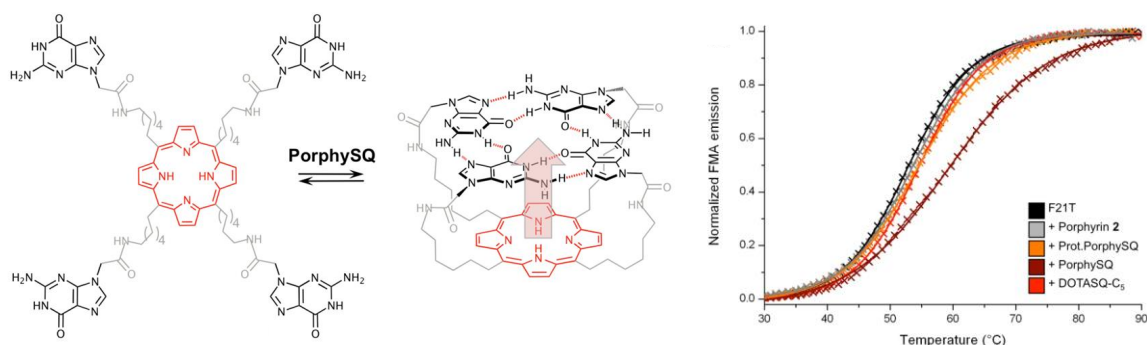


Figure 17. Structure du PorphySQ en formes ouverte et fermée, et effet de π -stacking. Courbes obtenues en FRET-melting pour F21T seul ou en présence d'une porphyrine analogue sans guanines (en gris), du Prot.PorphySQ (en orange), du PorphySQ (en bordeaux) ou du DOTASQ (en rouge).

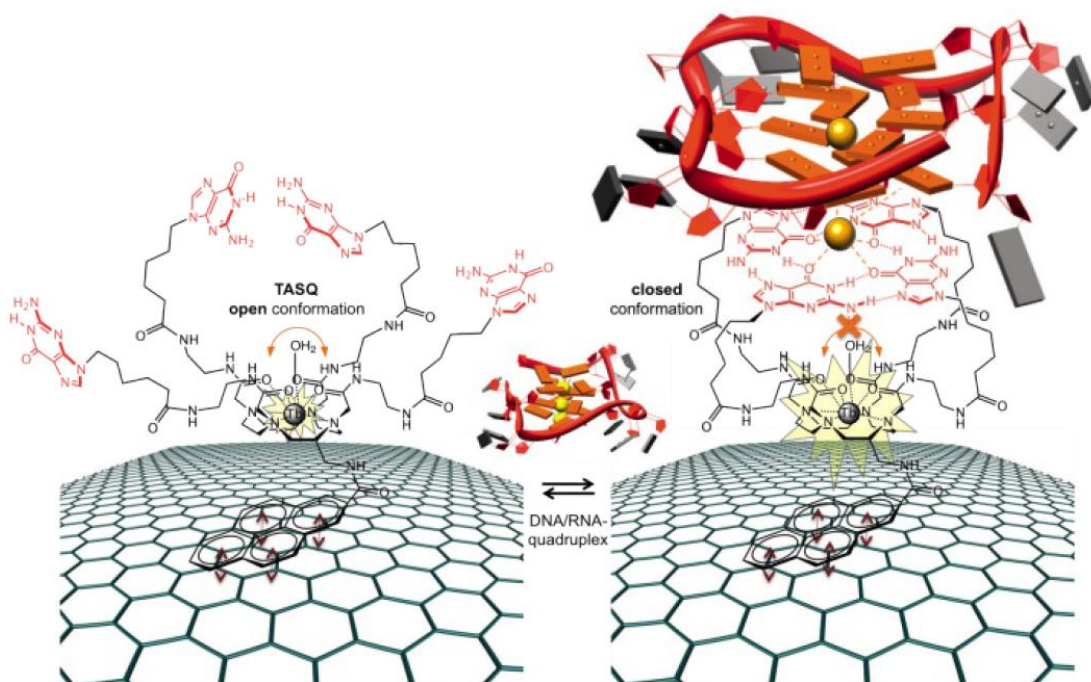


Figure 18. Représentation schématique de la stratégie de détection des quadruplex *in vitro* : le complexe de terbium permet l'immobilisation sur surface de graphène et la détection fluorescente des quadruplex.

Enfin, un composé dérivé du DOTASQ et présentant une antenne de type pyrène (Pyro-DOTASQ) permettrait de rendre possible à la fois la détection lumineuse de l'association entre la molécule et un quadruplex, et l'immobilisation du composé sur une surface de graphène pour la création d'outils moléculaires de détection et d'interaction avec les quadruplex (Figure 18). Ce composé a été synthétisé, principalement par Marine Levillain lors de stage de Master 2, selon le Schéma 7.⁶⁴

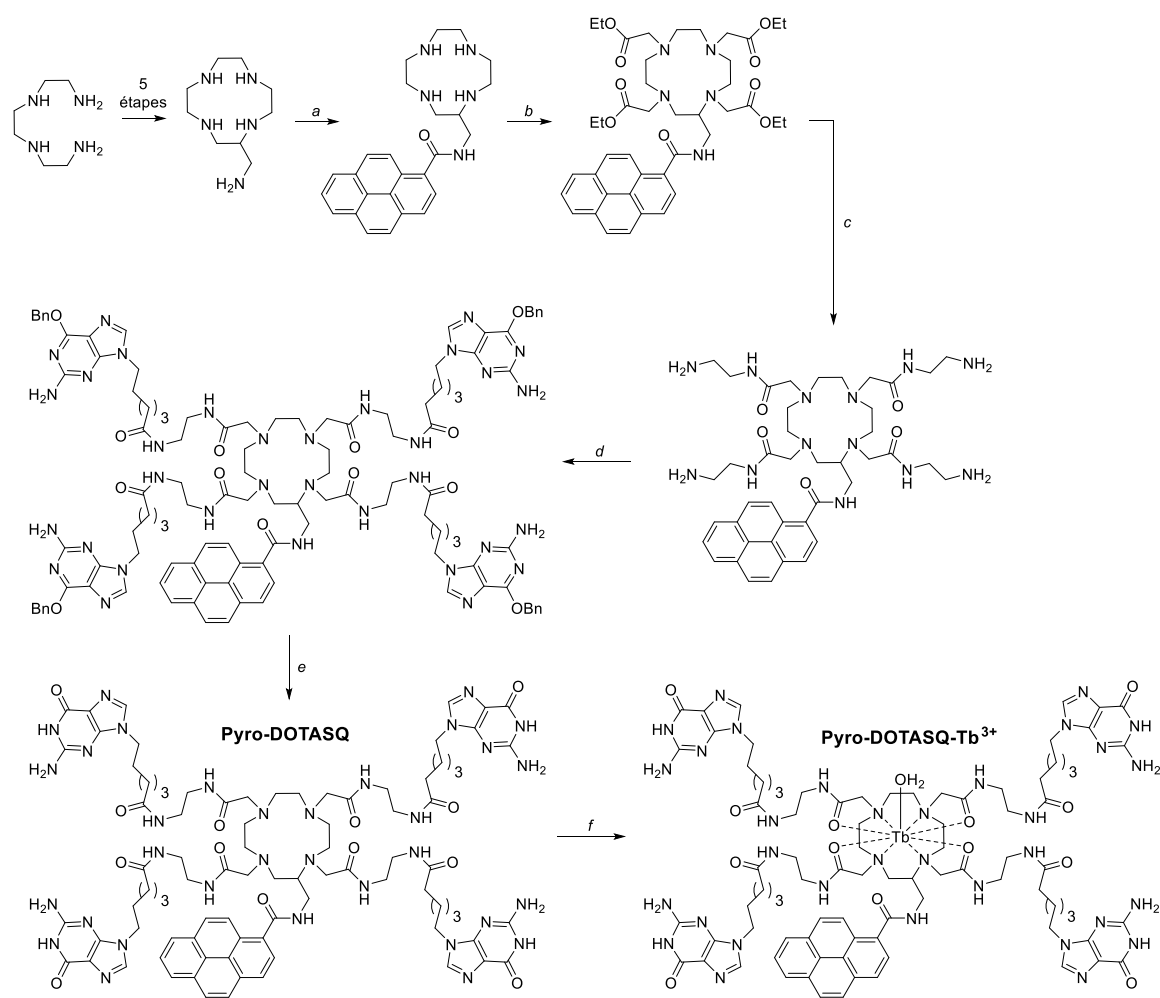


Schéma 7. Synthèse du Pyro-DOTASQ et du Pyro-DOTASQ-Tb³⁺. Réactifs et conditions : *a.* acide 1-pyrèncarboxylique, HOBT, EDCI, EtOH, 80 °C, 16 h, 43% ; *b.* bromoacétate d'éthyle, K₂CO₃, MeCN, 45 °C, 16 h, 20% ; *c.* éthylène diamine, 25 °C, 144 h, 84% ; *d.* acide 2-(2-amino-6-(benzyloxy)-9H-purin-9-yl)hexanoïque, HOBT, EDCI, DMF, 25 °C, 96 h, 98% ; *e.* HCl, MeOH, 25 °C, 1 h, 10% ; *f.* Tb(NO₃)₃.6H₂O, MeOH, cacodylate de lithium, 50 °C, 96 h, 6%.

De manière analogue au DOTASQ original, le Pyro-DOTASQ seul échoue à stabiliser les quadruplex, alors que l'équivalent contenant un atome de terbium, le Pyro-DOTASQ-Tb³⁺, mène à une très bonne stabilisation ($\Delta T_{1/2} = 15,3$ °C à 1 μ M). Comme attendu, si le Pyro-DOTASQ-Tb³⁺ seul reste silencieux en fluorescence, l'ajout d'un qua-

druplex (c-kit) mène à une augmentation significative et dose-dépendante de l'émission de fluorescence à 545 nm. Ce phénomène est issu du groupement H₂O porté par l'atome de terbium, dont la vibration dissipe l'énergie du système en évitant la fluorescence à l'état libre en solution, mais dont le blocage consécutif à la structuration en tétrade au contact d'un quadruplex mène à une augmentation de la fluorescence. Il constitue ainsi un biocapteur efficace des quadruplex, pouvant être potentiellement immobilisé sur surface de graphène pour la production de dispositifs de détection supportés.

Ce projet a mené à la publication de quatre articles : *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *Chem. Eur. J.* **2013**, *Chimia* **2015**, respectivement numéros 5, 6, 7 et 13 dans la liste des Articles.

2.5. Synthèse et activité de purines fortement substituées comme potentiateurs de F508del-CFTR dans le cadre d'une thérapie de la mucoviscidose (2013–2017, avec J.-L. Décout)

La délétion de la phénylalanine en position 508 du canal CFTR est à l'origine de 90% des cas de mucoviscidose, qui est aujourd'hui la principale maladie génétique létale, touchant une naissance sur 2500 dans la population caucasienne. Cette protéine mutée (F508del-CFTR) porte un défaut de repliement et de maturation qui affecte son adressage à la membrane et sa fonction de canal ionique, transporteur des ions chlorure, perturbant ainsi la physiologie respiratoire et digestive des patients atteints. Un médicament permettant de corriger l'adressage de la protéine, le lumacaftor (VX-809), a été mis sur le marché en 2015 en combinaison avec un potentiateur, l'ivacaftor (VX-770), qui permet de restaurer la fonction de F508del-CFTR à la membrane. Cependant, l'efficacité clinique de cette bithérapie est fortement controversée, et proviendrait d'une compétition entre le correcteur et le potentiateur. Si une trithérapie composée de l'ivacaftor avec deux nouveaux correcteurs, le tezacaftor (VX-661) et l'elexacaftor (VX-445), a été acceptée aux États-Unis très récemment, la recherche de nouveaux potentiateurs se fixant sur un site distant reste une priorité afin d'améliorer les résultats cliniques. L'absence de structures tridimensionnelles expérimentales de la protéine à l'échelle atomique au début du projet constituait un obstacle, rendant difficile le développement d'approches de « structure-based drug design ». Si plusieurs modèles de la protéine sauvage existent, construits par homologie, le premier modèle de F508del-CFTR n'a été développé que récemment, par

l'équipe du Dr. Isabelle Callebaut à l'Université de la Sorbonne à Paris, la coordinatrice du projet. Soumis à des calculs de dynamique moléculaire, ce modèle nous a permis d'identifier les modifications principales dans la conformation de la protéine, et de concevoir des molécules pouvant interagir avec elle, notamment au niveau de la zone modifiée par la délétion (en rose sur la Figure 19).

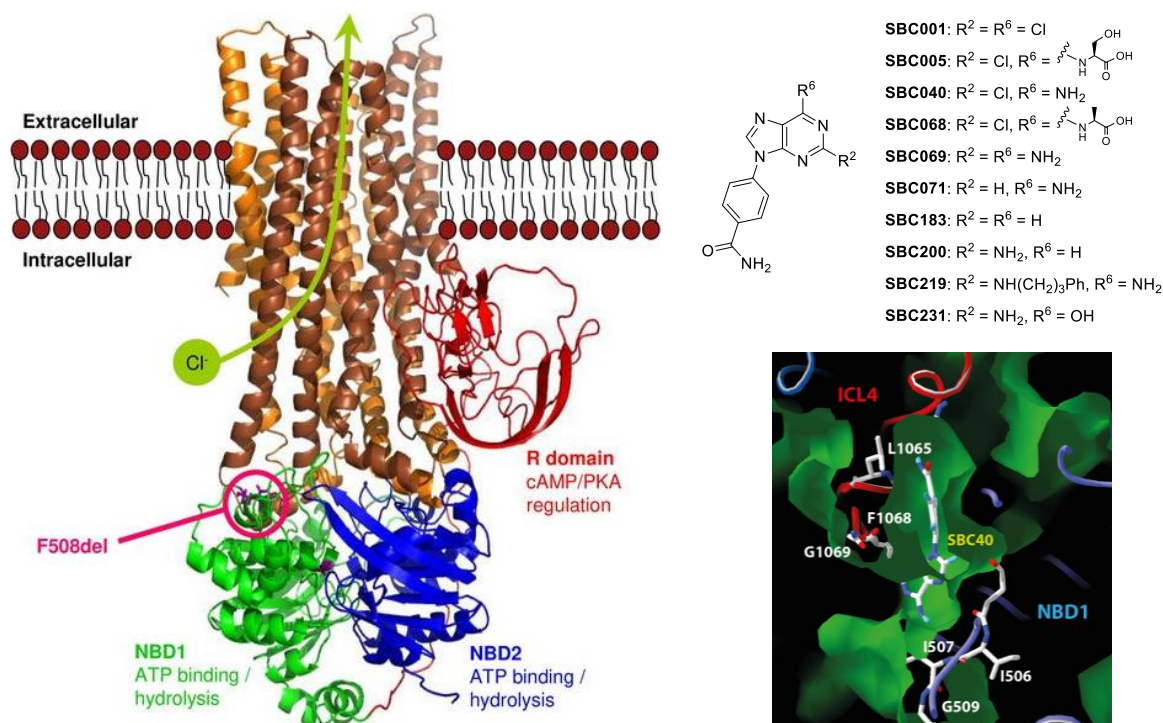


Figure 19. Structure générale de la protéine CFTR et de ses différents domaines. Structure des composés SBC. Représentation du composé SBC040 au sein du site de délétion 508.

Cette conception initiale autour du site proche de la position 508, à l'interface entre les domaines ICL4 et NBD1, a mené à la synthèse de plus de 300 composés basés sur les squelettes purine et pyrimidine, réalisée avec les Dr. Benjamin Boucherle, Julien Alliot, Renaud Zelli et Wael Zeinyeh. En particulier, dix purines comportant un motif 4'-carboxaminophényle en position 9 (Figure 19), identifié comme prometteur en modélisation moléculaire, ont été préparées et testées *via* plusieurs voies de synthèse différentes suivant leur profil de substitution (Schéma 8, Schéma 9). SBC001 a été préparé *via* une N⁹-arylation de la 2,6-dichloropurine en utilisation un couplage de Chan-Evans-Lam avec un acide boronique et du cuivre(II). La substitution du groupement chloro en position 6 de SBC001 par des dérivés d'acide aminé a ensuite permis d'obtenir les 2-chloropurines SBC005 et SBC068. Les composés SBC040 et SBC219 ont été obtenus par substitution de la 2,6-dichloropurine puis par N⁹-arylation en utilisant respectivement la même mé-

thode que précédemment, et une réaction impliquant du cuivre(I) ainsi que la 4-iodobenzamide. Des méthodes similaires ont été mises en œuvre pour la préparation de SBC069 et SBC071, directement à partir de la 2,6-diaminopurine et de la *N,N*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)adénine. Les purines SBC183, SBC200 et SBC231 ont été synthétisées à partir de la 5-amino-4,6-dichloropyrimidine et de la 2-amino-4,6-dichloro-5-formamidopyrimidine. Certaines de ces molécules ont plus tard été obtenues *via* une autre méthode développée au laboratoire dans le cadre de ce projet, et décrite plus loin.

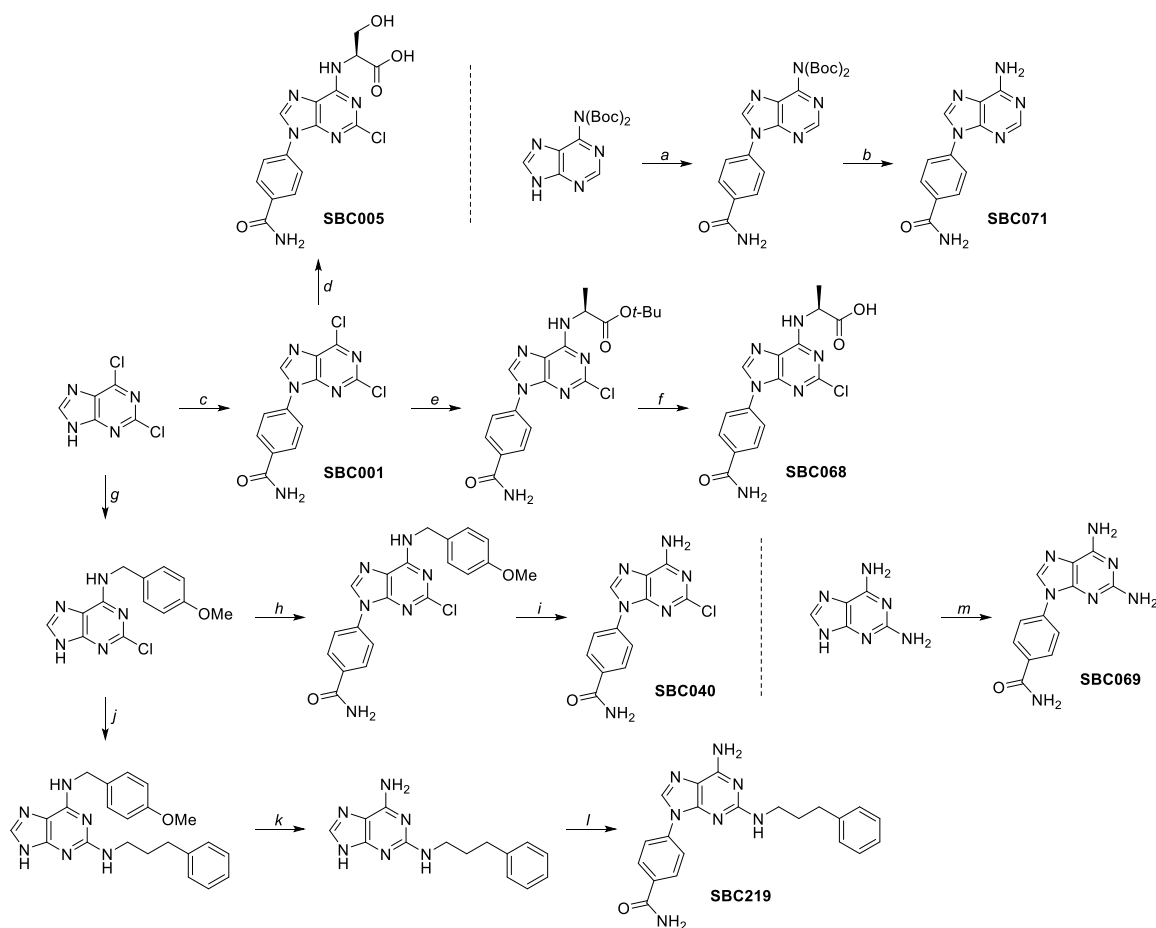


Schéma 8. Synthèses privilégiées pour les composés SBC001, SBC005, SBC040, SBC068, SBC069, SBC071 et SBC219. Réactifs et conditions : *a.* acide 4-aminocarbonylphénylboronique, Cu(OAc)₂, Et₃N, DMF, 25 °C, 96 h, 39% ; *b.* TFA, CH₂Cl₂, 25 °C, 16 h, 99% ; *c.* acide 4-aminocarbonylphénylboronique, Cu(OAc)₂, 1,10-phenantroline, DMF, 25 °C, 16 h, 16% ; *d.* L-sérine, K₂CO₃, H₂O, 70 °C, 16 h, 82% ; *e.* L-alanine *tert*-butyle ester, Et₃N, DMF, 80 °C, 16 h, 61% ; *f.* TFA, CH₂Cl₂, 25 °C, 16 h, 99% ; *g.* 4-méthoxybenzylamine, Et₃N, DMF, 80 °C, 16 h, 58% ; *h.* acide 4-aminocarbonylphénylboronique, Cu(OAc)₂, Et₃N, DMF, 25 °C, 96 h, 7% ; *i.* TFA, 70 °C, 24 h, 87% ; *j.* 3-phénylpropylamine, 180 °C, micro-ondes, 7 min, 54% ; *k.* TFA, 70 °C, 24 h, 91% ; *l.* 4-iodobenzamide, CuI, K₃PO₄, *N,N'*-diméthyléthylène diamine, DMF, 90 °C, 16 h, 42% ; *m.* 4-iodobenzamide, CuBr, KOH, *N,N'*-diméthyléthylène diamine, ascorbate de sodium, DMF, H₂O, 120 °C, 16 h, 12%.

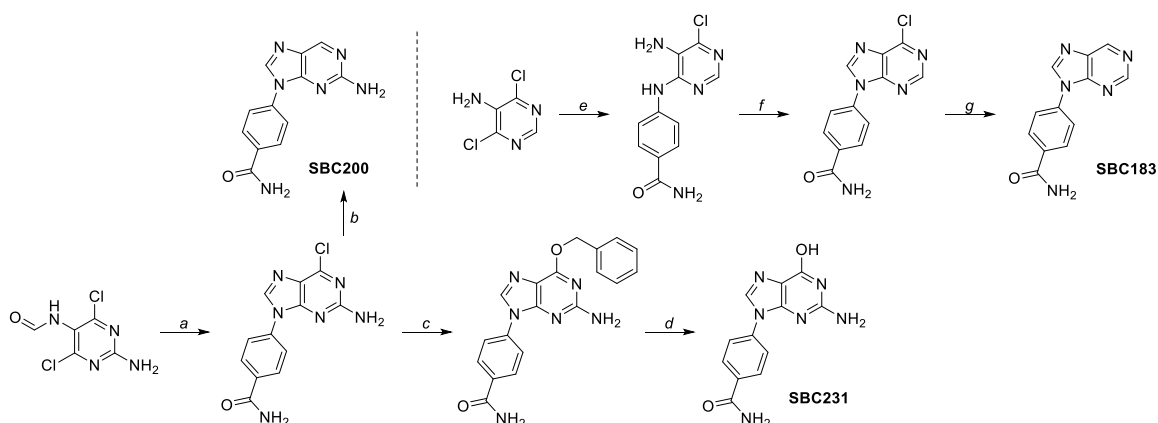


Schéma 9. Synthèses privilégiées pour les composés SBC183, SBC200 et SBC231. Réactifs et conditions : *a.* 4-aminobenzamide, DIPEA, 1,4-dioxane, 180 °C, micro-ondes, 2 h, 22% ; *b.* formiate d'ammonium, Pd/C, MeOH, 65 °C, 16 h, 77% ; *c.* alcool benzylique, NaH, 25 °C, 5 h, 27% ; *d.* H₂, Pd/C, MeOH, 25 °C, 2,5 h, 55% ; *e.* 4-aminobenzamide, BSA, EtOH, 80 °C, 48 h, 85% ; *f.* HC(OMe)₃, acide éthanesulfonique, 120 °C, micro-ondes, 1 h, 50% ; *g.* H₂, Pd/C, MeOH, 60 °C, 120 h, 6%.

Ces dix molécules ont été criblées comme possibles potentiateurs de F508del-CFTR en utilisant des expériences de chambre de Ussing, en collaboration avec le Pr. Frédéric Becq à l'Université de Poitiers. Parmi eux, deux composés, SBC040 et SBC219, ont montré des valeurs d'EC₅₀ de l'ordre du micromolaire (EC₅₀ = 1,51 et 0,87 μM pour SBC040 et SBC219 respectivement), les autres étant inactifs ou produisant des effets faibles (Figure 20). En comparaison, la valeur d'EC₅₀ mesurée pour le VX770 est 100 fois plus faible, de l'ordre de 0,012 μM, en accord avec les données de la littérature. Ces résultats ont été confirmés par des études de patch-clamp sur cellules entières exprimant F508del-CFTR, dont l'adressage a été préalablement corrigé à 27 °C. Les densités de courant enregistrées en présence de SBC040 (38,2 pA/pF) et de SBC219 (53,3 pA/pF) se sont révélées significativement plus importantes que pour le contrôle (15,6 pA/pF), ce qui a confirmé l'effet potentiateur de ces composés. En particulier, l'effet de SBC040 est similaire à celui observé dans le cas du VX770 (37,5 pA/pF), alors que SBC219 induit même une potentiation plus forte que la molécule de référence.

Les composés SBC040 et SBC219 ont ensuite été testés pour leur effet potentiateur sur deux autres mutants majeurs de CFTR : G551D et G1349D, qui sont également sensibles au VX770. Lors de tests de patch-clamp sur cellules entières comportant la protéine mutée, aucune potentiation du courant lié aux ions chlorure n'a été observée pour SBC040, et ce pour les deux mutants. En revanche, SBC219 a mené à une potentiation d'un facteur 2,6 dans les deux cas. Dans un autre test de détection des halogénures, la

potentiation de CFTR sauvage par SBC040 et SBC219, mesurée *via* l'efflux d'ions iodure YFP-dépendant, a été déterminée à un niveau légèrement inférieur à celui du VX770 (0,54 et 0,57 mM/s *vs.* 0,78 mM/s). Les mesures effectuées sur des cellules exprimant les mutants G551D et G1349D ont permis de confirmer les données précédemment obtenues, SBC040 ne présentant qu'un effet très faible et SBC219 menant à un effet bien plus prononcé — mais qui reste plus faible que le VX770. Ces données suggèrent que SBC040 et SBC219 pourraient agir selon des mécanismes légèrement différents. D'autres mutations, comme G551S, G970R, G1244E et S1255P, ont également été testées, menant à des résultats variables (Figure 21).

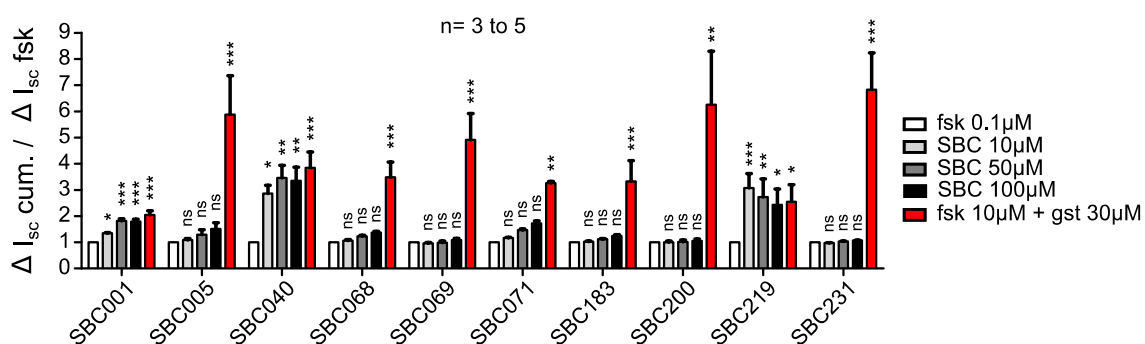


Figure 20. Modifications de courant ΔI_{sc} mesurées en chambre de Ussing en présence des composés SBC sur des cellules exprimant F508del-CFTR (fsk = forskoline, gst = génistéine).

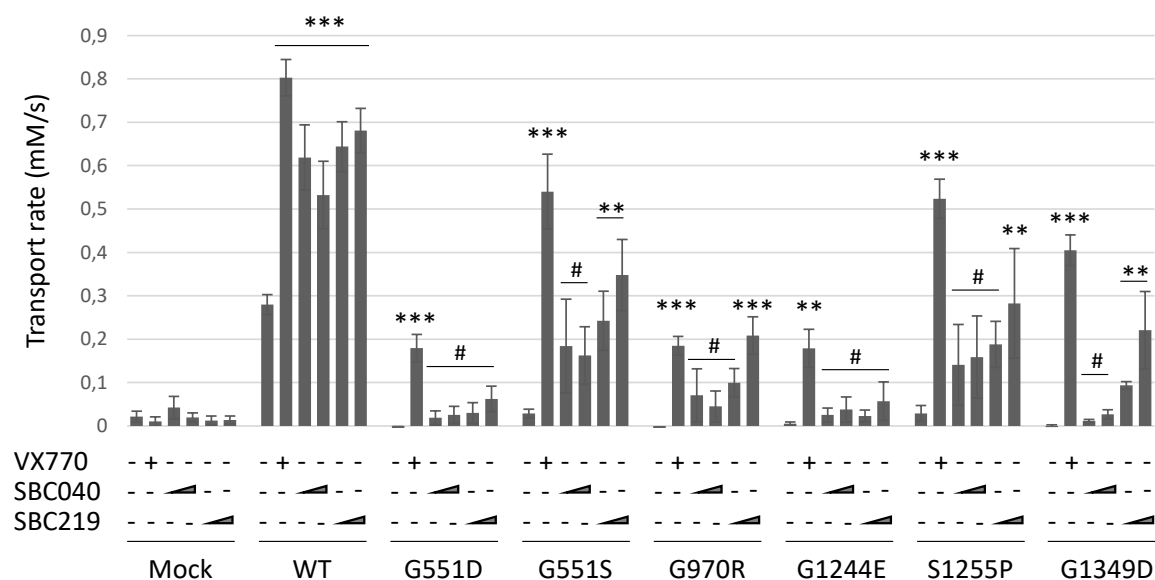


Figure 21. Effet potentiateur des SBCs sur plusieurs protéines CFTR mutées (test YFP).

De potentielles interactions entre les SBCs et d'autres potentiateurs avec des correcteurs ont également été explorées. En particulier, des expériences de chambre de Ussing en présence du correcteur VX809 et d'un potentiateur parmi SBC040, SBC219 et

VX770 ont été conduites. Lors de l'addition des SBCs, la modification du courant ΔI_{sc} est restée modérée ($\Delta I_{sc} = 1,2 \mu A/cm^2$ pour SBC040, $0,91 \mu A/cm^2$ pour SBC219), par rapport à celle observée lors de l'addition du VX770 ($3,0 \mu A/cm^2$). Cependant, lors d'un ajout séquentiel d'un SBC et du VX770, la valeur totale de ΔI_{sc} a augmenté par rapport à celle du VX770 seul ($\Delta I_{sc} = 5,1 \mu A/cm^2$ pour SBC040, $6,3 \mu A/cm^2$ pour SBC219). Ces résultats suggèrent un effet de synergie entre les SBCs et le VX770. L'hypothèse de sites de fixation distincts a donc été formulée. Dans la mesure où les SBCs sont actifs sur la protéine sauvage, une interaction avec le site de délétion à l'interface entre les domaines ICL4 et NBD1 a été écartée. En outre, étant donné le cœur purinique des SBCs, ils pourraient se lier à l'intérieur d'un ou des deux sites de fixation de l'ATP. Des études de docking et de dynamique moléculaires ont été effectuées sur ces sites, en collaboration avec le Dr. Isabelle Callebaut à Sorbonne Université, et ont montré une bonne capacité des deux molécules SBC à interagir avec les sites de fixation de l'ATP (Figure 22), ainsi qu'une évolution notable de la conformation de la protéine après fixation, ouvrant la voie à une possible régulation allostérique de l'activité. De même, l'effet synergique observé entre les SBCs et le VX770 pourrait provenir d'une modification structurale allostérique favorable pour la liaison de la seconde molécule, intervenant après fixation de la première.

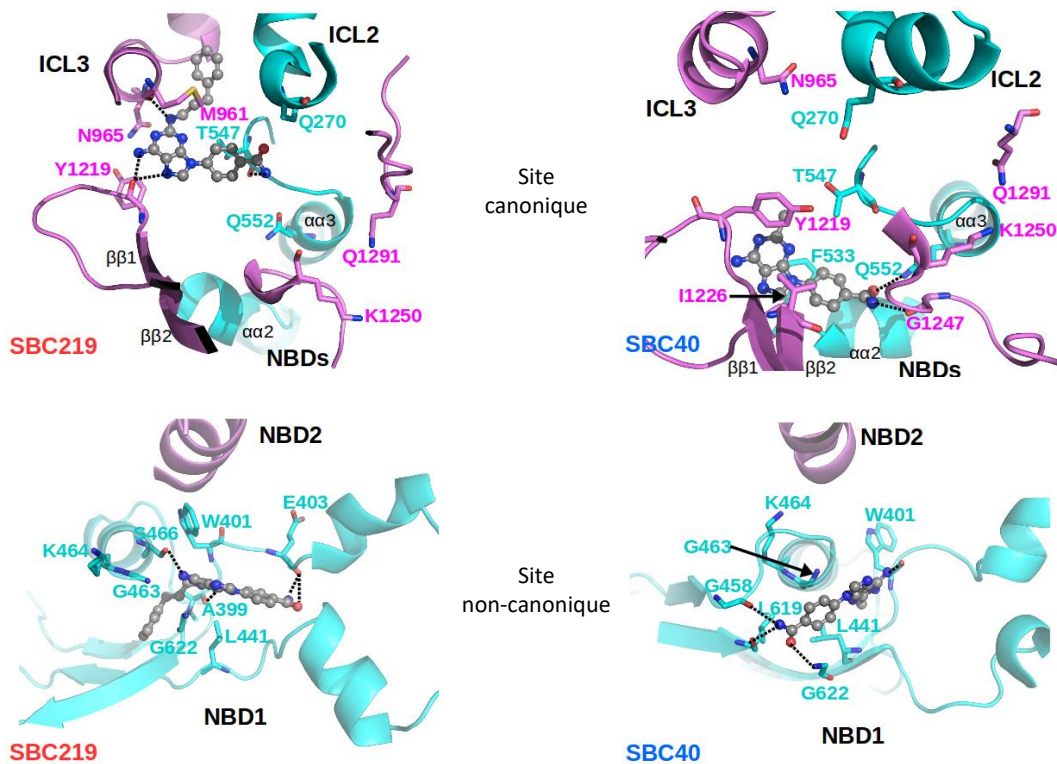


Figure 22. Représentation des meilleures poses de SBC219 et SBC040 en dynamique moléculaire au sein des sites de fixation de l'ATP canonique et non-canonique.

En outre, la production de plus de 300 composés, réalisée dans le cadre de cette étude, dont une grande part de dérivés de purine, s'est accompagnée de développements en méthodologie de synthèse afin d'atteindre des espaces chimiques peu explorés. En particulier, l'insertion d'un groupement aromatique en position 9 de la purine, qui avait été identifiée comme une modification chimique d'intérêt dans le cadre de la modulation de CFTR, a souvent été rapportée comme complexe et inefficace dans la littérature (réactif de Chan-Evans-Lam notamment). Nous avons donc développé une nouvelle voie d'accès aux purines fortement substituées basée sur l'utilisation de réactifs de type Vilsmeier, en mettant l'accent sur la création d'une liaison entre l'azote 9 et des motifs aromatiques.⁶⁵ En partant d'une 5-amino-4,6-dichloropyrimidine judicieusement substituée en position 2, une amine, aromatique ou non, est introduite en position 4, puis la cyclisation est réalisée par le réactif de Vilsmeier ou un réactif analogue préalablement préparé. L'enchaînement des deux étapes « one-pot » permet d'obtenir une variété de purines totalement substituées (positions 2, 6, 8 et 9) et d'une grande diversité (Schéma 10).

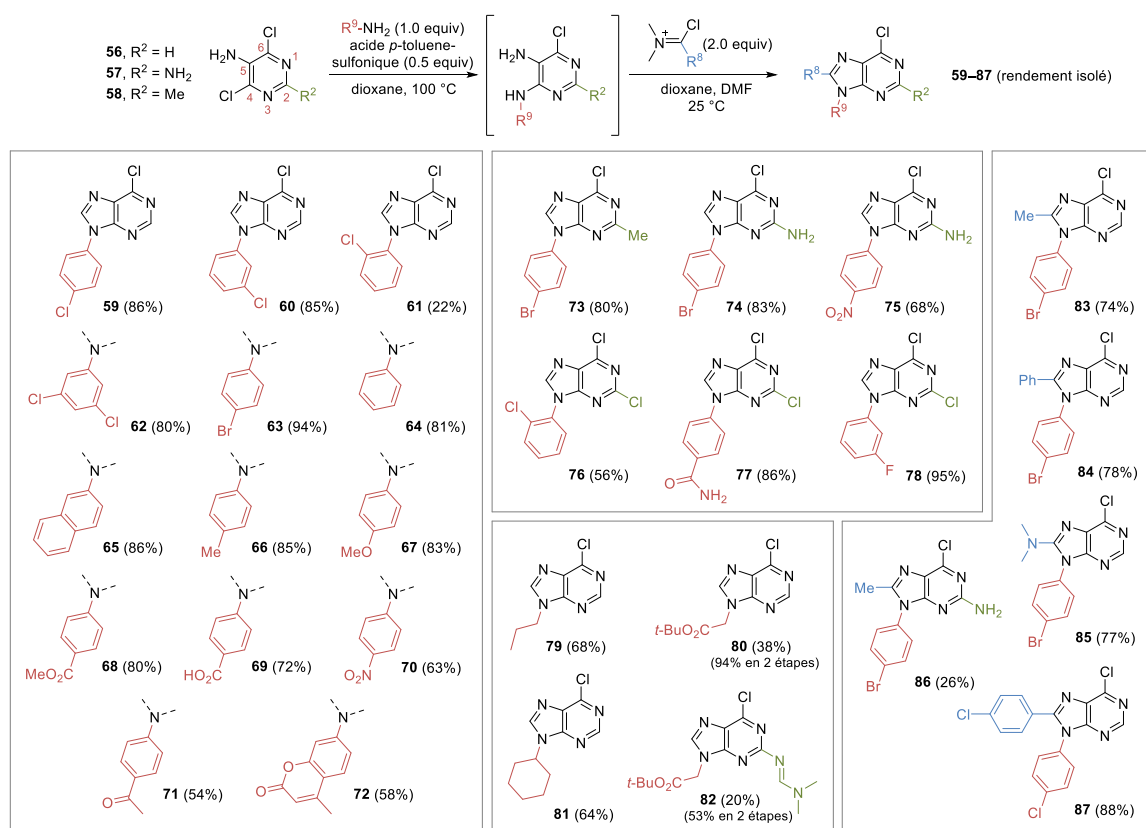


Schéma 10. Réaction « one-pot » proposée et molécules préparées *via* cette méthode.

Cette séquence réactionnelle a montré une grande tolérance à la présence de traces d'eau et d'oxygène lors d'expériences réalisées avec des solvants non-anhydres et à l'air

ambiant, qui n'ont mené à aucune baisse de rendement. Des tests réalisés à partir de 50 mg à 1 g de pyrimidine de départ ont également démontré l'efficacité de la réaction à différentes échelles. En outre, l'approche a mené à la production de 9-arylpurines portant des groupements très variés sur le motif aromatique introduit : substituants électro-donneurs (**66**, **67**), électro-attracteurs (**68–71**) ou positionnés en *ortho* (**61**), ainsi que des dérivés hétérocycliques (**72**). L'introduction concomitante de substituants variés en position 8 des purines (**83–87**) a mené à une diversité potentielle très importante et particulièrement intéressante dans l'optique de préparer des analogues bioactifs. L'approche a également été modifiée afin de permettre la production de nucléosides modifiés. Une variante de la méthodologie développée précédemment a donc été proposée et des précurseurs de l'adénosine (**91**), de l'ascamycine (**92**) et de la guanosine (**93**) ont été synthétisés avec des rendements corrects (Schéma 11). La méthode permet l'introduction rapide d'un groupement d'intérêt en position 8.

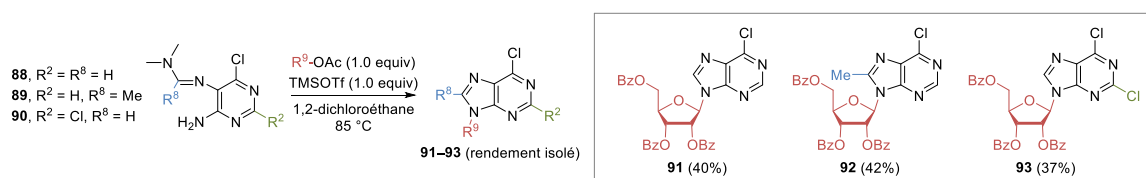


Schéma 11. Adaptation de la méthode pour la synthèse de dérivés de nucléosides.

Ce projet a mené à la publication de deux articles : *Org. Lett.* **2017** et *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, respectivement numéros 19 et 24 dans la liste des Articles.

2.6. Développement de détergents stabilisant les protéines membranaires par réseau de ponts salins multiples pour leur étude et leur cristallisation en solution (2013–2019, avec A. Boumendjel)

Les détergents constituent des composés cruciaux dans la biologie structurale et la biochimie des protéines membranaires. Ils sont en général requis pour extraire ces protéines et les maintenir sous une conformation active en solution, en particulier dans l'optique de permettre leur cristallisation ou le criblage de ligands. Mais malgré l'apport de ces molécules, seules 1% des protéines cristallisées à ce jour sont membranaires, alors qu'elles représentent environ 30% des protéines totales, et jusqu'à 60% des cibles thérapeutiques identifiées. Il existe donc un besoin important de développer de nouveaux détergents ayant une efficacité accrue, et jouant un rôle aussi bien dans l'extraction et la

solubilisation des protéines, que dans leur stabilisation et leur cristallisation. La grande majorité des protéines membranaires possède un enrichissement très net en résidus basiques à l'interface membrane–cytoplasme. Cette particularité structurale peut être exploitée afin de développer des détergents ciblant ces résidus chargés positivement, dans le but de créer un réseau de ponts salins multiples ceinturant les protéines (Figure 23).

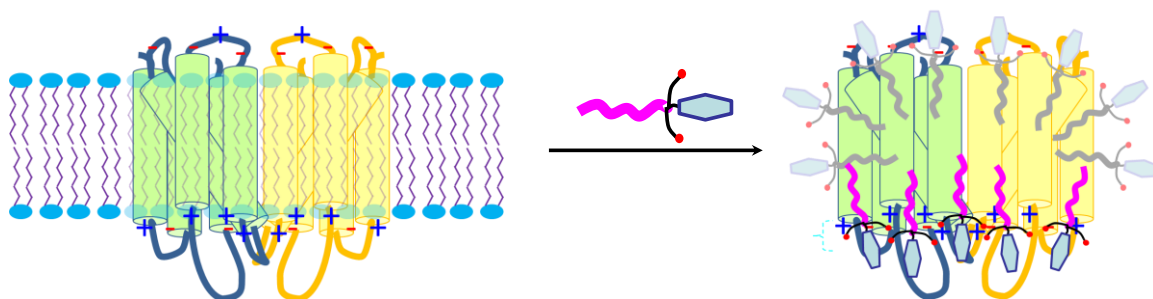


Figure 23. Concept de détergents à têtes carboxylates permettant la mise en place de ponts salins avec les résidus basiques des protéines membranaires à l'interface membrane–cytosol.

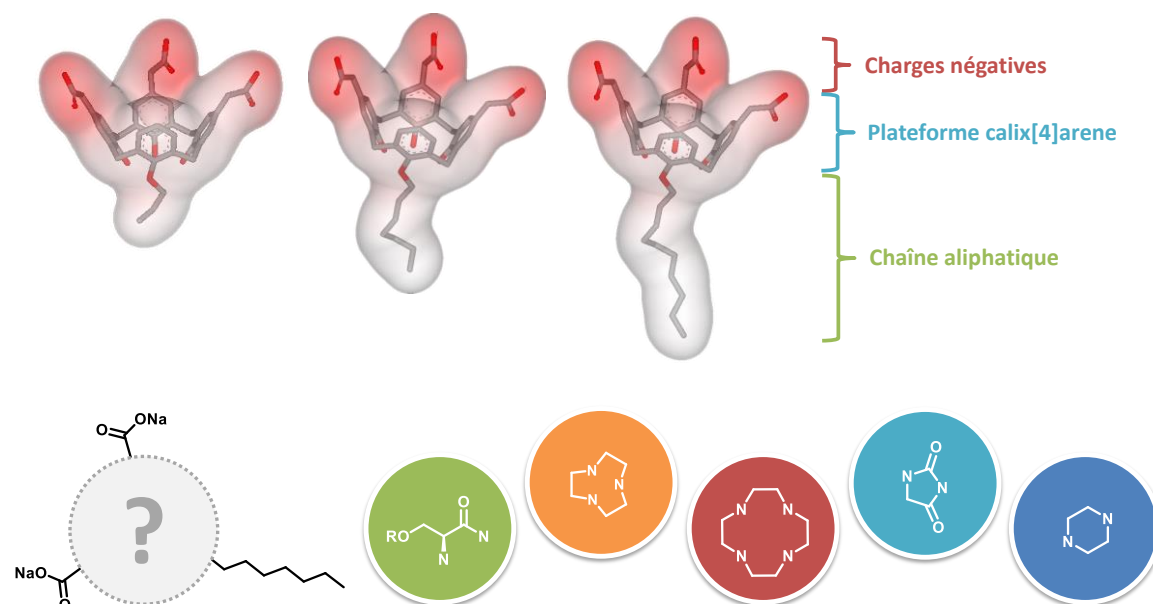


Figure 24. Première génération de détergents formant des ponts salins multiples, basée sur un squelette de type calixarène. Différents squelettes non aromatiques envisagés comme détergents de seconde génération.

Des composés de type calixarène ont déjà été développés afin de cibler spécifiquement ces résidus, avec un succès mitigé (Figure 24). En effet, la présence de groupes polyaromatiques au sein des composés et la forte absorption UV-visible associée a limité à la fois les possibilités d'étude (tests UV-visibles) et la solubilité des molécules. Ainsi, nous nous sommes proposés de concevoir plusieurs séries de détergents originaux, présentant des caractéristiques plus favorables, en nous appuyant sur des plateformes non-

aromatiques de type sérine, DOTA, NOTA, pipérazine, pipérazinone, morpholinone et hydantoïne. Ce projet a été mené en partenariat avec le Dr. Pierre Falson, Univ. Lyon, et avec le Dr. Marine Peuchmaur au laboratoire.

Une première série de détergents a été conçue par assemblage de la sérine avec un résidu d'acide glutamique, suivi de l'introduction d'une chaîne aliphatique de longueur variable sur l'amine de la sérine, ainsi que d'une unité de glucose ou saccharose, couplée par une réaction de type « click » de Huisgen (Schéma 12).⁶⁶ Cette voie de synthèse a été appliquée à la préparation d'une dizaine de molécules, présentant des chaînes linéaires, ramifiées ou portant un cycle saturé, un travail réalisé par le Dr. Kim-Anh Nguyen. La capacité de ces molécules à extraire des pompes d'efflux membranaires, BmrA et AcrB, a été évaluée. En présence de ces détergents, ces deux protéines ont été retrouvées dans les surnageants après centrifugation et analyse par SDS-PAGE, dans des quantités significatives et dépendantes de la concentration en détergent, alors que seules des traces avaient été détectées en l'absence d'additifs. En outre, certaines molécules ont permis d'extraire complètement BmrA dans sa forme active, laissant intacte l'activité ATPasique de la protéine, alors que des détergents plus classiques comme le DDM ont mené à jusqu'à 85% de perte de fonction dans des concentrations propices à une extraction complète.

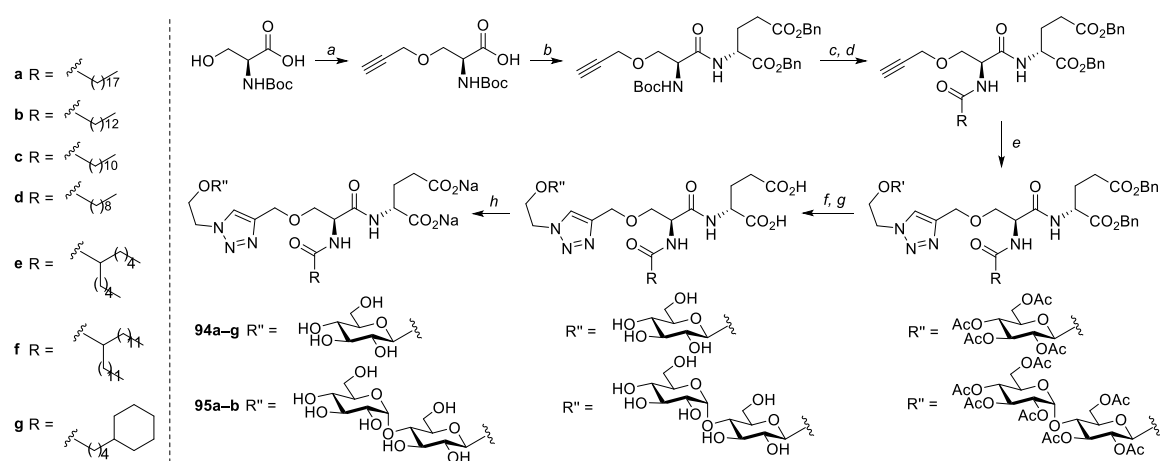


Schéma 12. Synthèse des détergents de type sérine. Réactifs et conditions : *a.* bromure de propargyle, NaH, DMF, 25 °C, 18 h, non isolé ; *b.* H-D-Glu(OBn)-OBn, TBTU, DIPEA, DMF, 25 °C, 3 h, 77% sur deux étapes ; *c.* TFA, CH₂Cl₂, 0 °C, 4–5 h, non isolé ; *d.* RCOCl, DMAP, pyridine, CH₂Cl₂, 25 °C, 18 h, 40–84% sur deux étapes ; *e.* glucosyl/maltosyl-OCH₂CH₂N₃, CuSO₄, ascorbate de sodium, DMF, 140 °C, micro-ondes, 30–60 min, 38–90% ; *f.* MeONa, MeOH, 25 °C, 18 h, non isolé ; *g.* LiOH, THF, H₂O, 25 °C, 4 h, 46–100% sur deux étapes ; *h.* MeONa, MeOH, 25 °C, 18 h, 100%.

Cette activité ATPasique est également très conservée dans le temps, en particulier lors du traitement de BmrA par un mélange de DDM et de détergent **94b** (Figure 25A). En effet, après 40 jours, l'activité mesurée est très proche de l'activité initiale. Au contraire, la présence de DDM seul mène à une diminution notable de l'activité ATPasique dès 20 jours environ. La stabilité thermique a également été mesurée pour les détergents **94a**, **94b**, **94f**, **95a** et **95b** sur BmrA et A_{2A}R, en présence de DDM (Figure 25B–E). Les valeurs de T_m — la température de fusion apparente, à laquelle 50% de la protéine a été dénaturée — sont modifiées de 20 à 29 °C pour BmrA et de 13 à 21 °C pour A_{2A}R en présence des cinq molécules, tandis que les autres composés de la série ont produit des résultats bien plus modestes. De manière intéressante, une tendance semble se dessiner, favorable aux chaînes aliphatiques les plus longues. Globalement, ces résultats placent les molécules de type sérine au premier plan, parmi les détergents capables de générer une augmentation de T_m de plus d'une unité de log, comme le LMNG, le FA3 ou les malto-sides basés sur un template norbornane (NBMs).

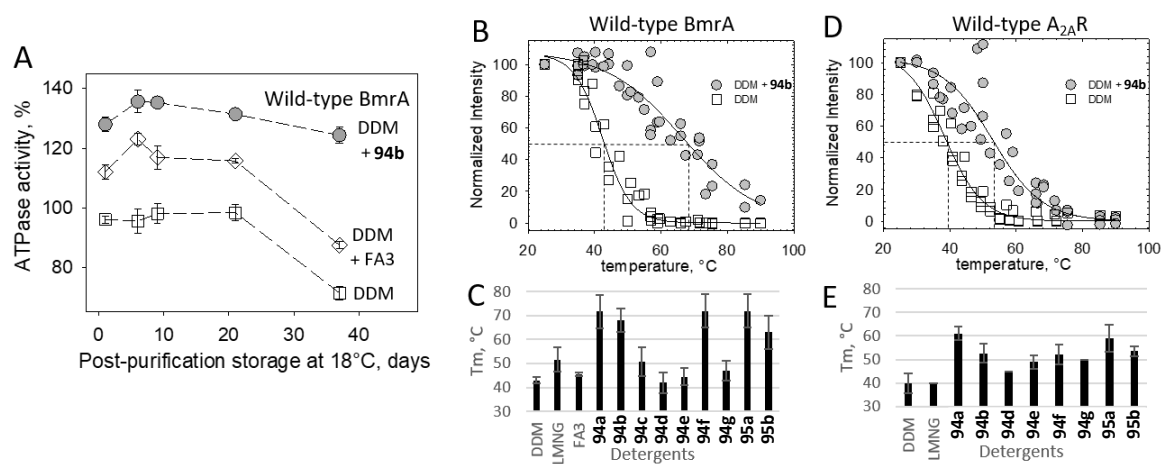


Figure 25. Stabilité dans le temps de BmrA purifiée avec le DDM et en présence de DDM, DDM+FA3 et DDM+**94b** (A). Stabilisation thermique de BmrA (B–C) et d'A_{2A}R (D–E) en présence des détergents **94a–g** et **95a–b**.

Enfin, l'effet des détergents de type sérine sur la cristallisation de BmrA a été étudié. La cristallisation en routine de BmrA en présence de PEG 1000 mène à l'obtention de cristaux qui diffractent à une résolution de 6–8 Å. Après traitement par **94f**, des cristaux bien organisés ont été observés, qui ont mené à une diffraction à une résolution de 4 Å et à un spectre de diffraction de meilleure qualité (Figure 26). Des études supplémentaires sont menées pour atteindre des cristaux d'une qualité suffisante pour permettre la résolution de structures à l'échelle atomique.

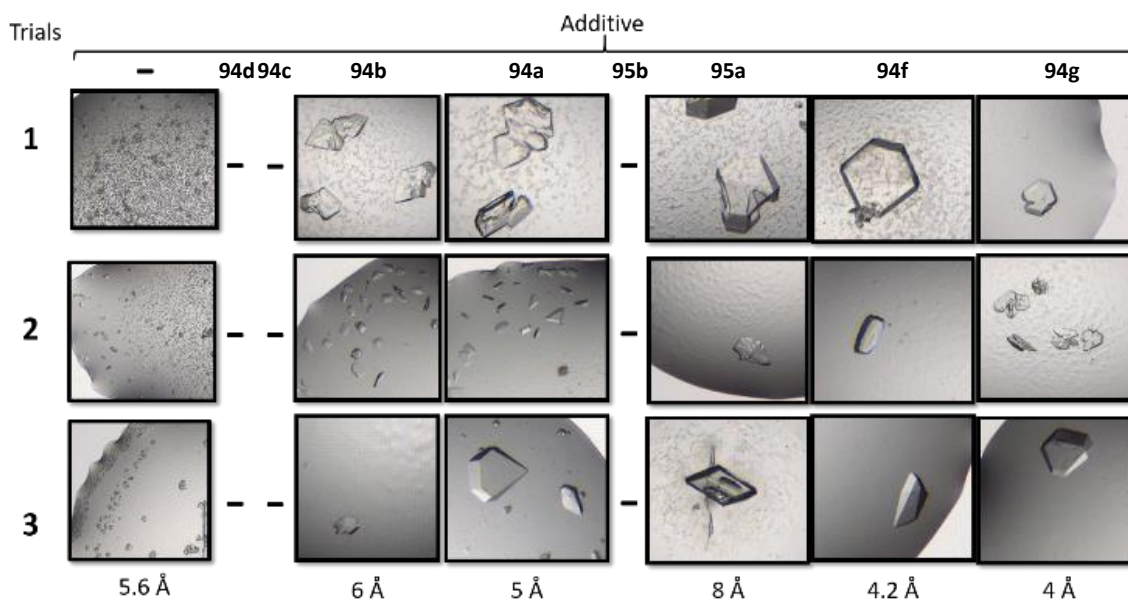


Figure 26. Expériences de cristallisation de BmrA en présence des détergents **94a–g** et **95a–b**, et résolutions obtenues par diffraction des rayons X.

Une seconde série a été conçue sur la base d'une plateforme de type DOTA. Cette plateforme présente l'avantage de promouvoir intrinsèquement la solubilité aqueuse des détergents, et ainsi de pouvoir s'affranchir de l'introduction de groupements polaires comme des unités de sucre ou des chaînes de type PEG. En outre, le DOTA est capable d'accueillir des ions lanthanide, qui pourraient s'avérer utiles comme cristallographes pour les expériences de cristallisation. Plusieurs molécules, présentant des groupements de type acide acétique sur trois des quatre amines du motif DOTA, et une chaîne aliphatique couplée par le biais d'un lien amido sur la quatrième amine, ont été conçues et synthétisées, avec des longueurs de chaîne différentes (**97a–e**). En outre, des dérivés possédant deux chaînes aliphatiques (**101d–e**), quatre acides carboxyliques (**100**), ou basés sur un motif NOTA (**99d–e**), ont été préparés, ainsi que deux analogues de DOTA comportant un atome de gadolinium (**98d–e**). Au total, 12 composés ont été obtenus (**Schéma 13**). Lors des premiers tests, certaines de ces molécules, notamment **97c**, **97d** et **97e**, ont montré une capacité intéressante à extraire BmrA et à maintenir une bonne activité ATPasique. En outre, le composé **97d** a notamment mené à des résultats préliminaires prometteurs lors de tests de cristallisation de BmrA (**Figure 27**). Des évaluations plus poussées sont maintenant nécessaires afin de déterminer plus précisément le potentiel des détergents de type DOTA.

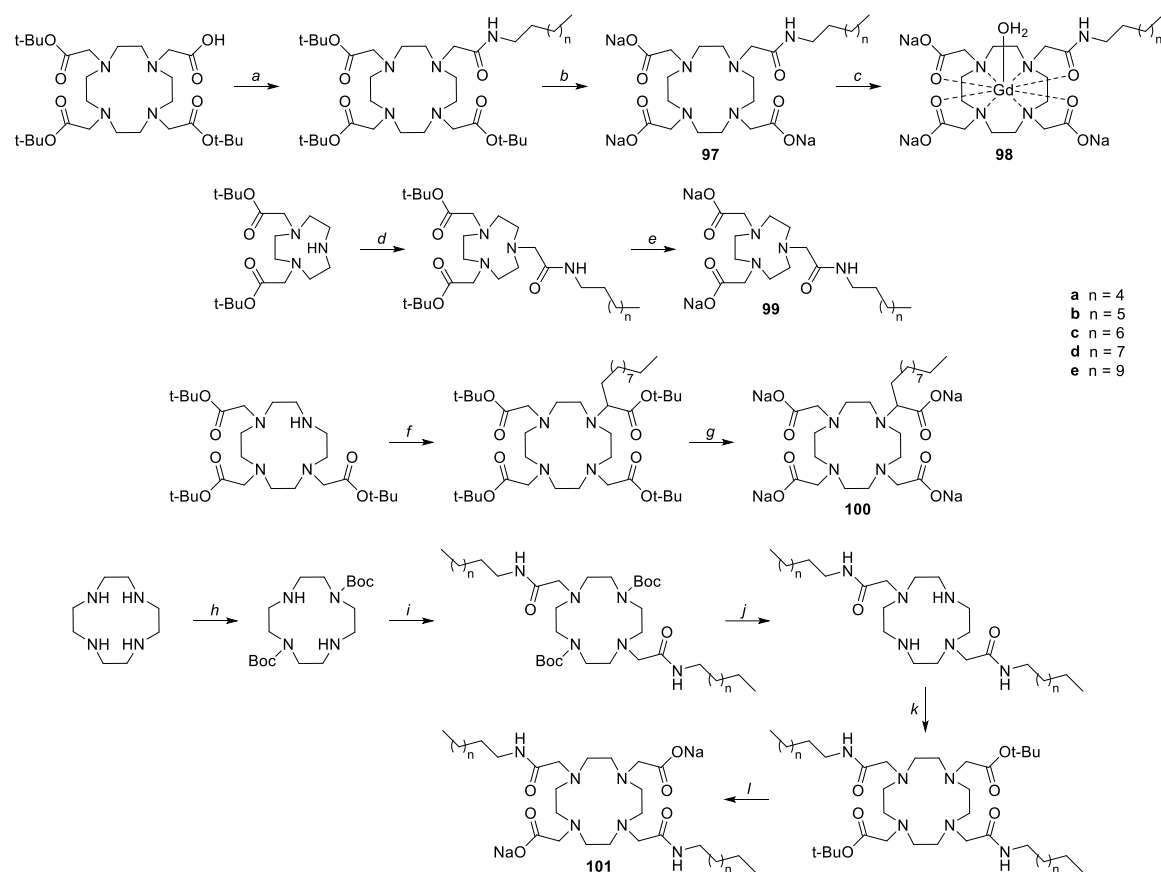


Schéma 13. Synthèse des détergents de type DOTA/NOTA. Réactifs et conditions : *a.* alkylamine, BOP, DIPEA, CH₂Cl₂, 25 °C, 16 h, 70–99% ; *b.* TFA, 25 °C, 2,5 h puis NaOMe, MeOH, 25 °C, 1 h, 83–99% ; *c.* GdCl₃·6H₂O, H₂O, 25 °C, pH 7, 16 h, 92% ; *d.* 2-bromo-*N*-alkylacétamide, K₂CO₃, DMF, 25 °C, 16 h, 74–85% ; *e.* TFA, 25 °C, 2,5 h puis NaOMe, MeOH, 25 °C, 1 h, 66–88% ; *f.* 2-bromododécanoate de *tert*-butyle, K₂CO₃, DMF, 25 °C, 16 h, 66% ; *g.* TFA, 25 °C, 3 h puis NaOMe, MeOH, 25 °C, 1 h, 51% ; *h.* Boc-succinimide, CH₂Cl₂, 25 °C, 24 h, 100% ; *i.* 2-bromo-*N*-alkylacétamide, K₂CO₃, DMF, 25 °C, 16 h, 40–72% ; *j.* TFA, 25 °C, 3 h, 70–82% ; *k.* bromoacétate de *tert*-butyle, K₂CO₃, DMF, 25 °C, 48 h, 20–62% ; *l.* TFA, 25 °C, 2,5 h puis NaOMe, MeOH, 25 °C, 1 h, 36–100%.



Figure 27. Expériences de cristallisation de BmrA en présence du détergent **97d** et cristaux obtenus.

Une troisième série a été conçue sur la base du squelette pipérazine. Il s'agit en particulier des travaux d'Oliver White, en stage de Master au laboratoire (2017–2018). Le développement de cette nouvelle série s'appuie sur l'observation que les détergents présentant une flexibilité conformationnelle restreinte mènent souvent à des propriétés pro-

metteuses, notamment par une meilleure pré-organisation des structures de type micelle, et par une réduction de la pénalité entropique associée à la formation de complexes détergent–protéine. Ainsi, une façon de rigidifier la structure des détergents de type sérine présentés précédemment serait de transformer le motif $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ de la sérine en motif pipérazine, pour produire des détergents analogues mais moins flexibles (Schéma 14).

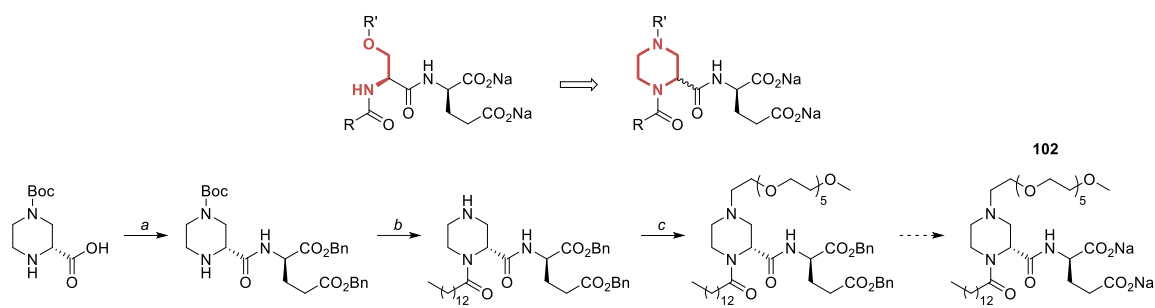


Schéma 14. Concept de rigidification des détergents de type sérine par l'introduction du motif pipérazine. Synthèse du détergent de type pipérazine **102**. Réactifs et conditions : *a.* H-D-Glu(OBn)OBn, TBTU, DIPEA, DMF, 25 °C, 16 h, 50% ; *b.* chlorure de tétradécanoyle, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 25 °C, 16 h puis TFA, CH₂Cl₂, 0 °C, 4 h, 63% ; *c.* PEG-tosylate, K₂CO₃, MeCN, 80 °C, 2 h, 8%.

Après introduction de la chaîne aliphatique et du groupement polaire permettant de promouvoir la solubilité dans l'eau — ici un groupement PEG —, le composé **102** n'a pour le moment pas été obtenu, à cause de difficultés dans la caractérisation de son pré-curseur dibenzylé. En effet, la présence de multiples diastéréoisomères — liés notamment à une épimérisation en milieu basique *via* la formation d'un intermédiaire cyclique — et/ou rotamères — les liaisons de type amide revêtent un caractère de double liaison, et plusieurs conformères peuvent être observés, en particulier pour les amides tertiaires comme celui présent sur la pipérazine — a considérablement complexifié les spectres RMN. Ainsi, les conditions d'obtention du composé **102** nécessitent à ce jour un important travail d'optimisation supplémentaire.

Enfin, des travaux ont été entrepris autour d'une quatrième série de détergents rigides, basés sur des squelettes de type pipérazinone, morpholinone et hydantoïne. En particulier, la synthèse du dérivé **103**, basé sur un cycle morpholinone, a été étudiée (Schéma 15). Si l'intermédiaire avancé diester a été produit sans problème, à partir d'un dérivé du malonate d'éthyle et d'un aminoalcool comportant une chaîne aliphatique, la dernière étape de déprotection a mené jusqu'ici à une dégradation du produit. Une étude approfondie est donc là encore nécessaire afin de mener la synthèse de **103** à son terme dans le but d'évaluer son potentiel comme détergent.

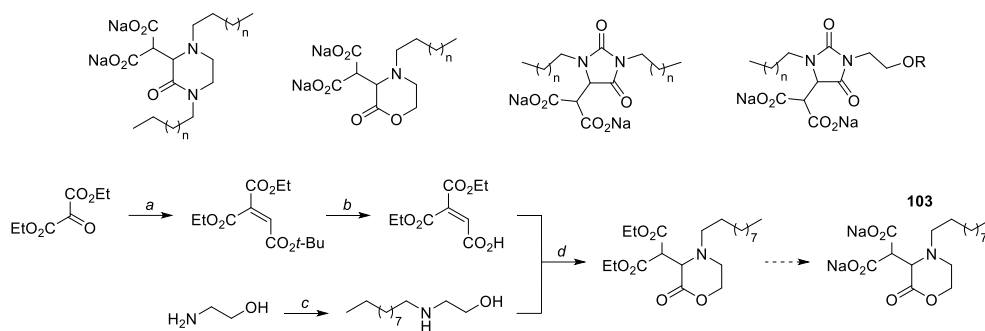


Schéma 15. Exemples de structures de détergents ciblés. Synthèse du détergent de type morpholinone **103**. Réactifs et conditions : *a.* $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CO}_2t\text{-Bu}$, PhMe , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h, 79% ; *b.* TFA, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 45 min, 100% ; *c.* 1-bromodécane, EtOH, $65\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h, 7% ; *d.* EDCI, HOBt, THF, $25\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h, 26%.

Ce projet a mené à la publication d'un article : *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, numéro 21 dans la liste des Articles.

DU PROJET DE RECHERCHE ET DES DÉVELOPPEMENTS À MOYEN ET LONG TERMES

3.1. Introduction et contexte du projet

La peau constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les agressions environnementales. Par conséquent, elle bénéficie de plusieurs mécanismes protecteurs. Parmi eux, les mélanines, les principaux pigments de la peau humaine, jouent un rôle crucial contre les radiations UV et les radicaux libres nocifs. Mais la production de ces pigments (la mélanogénèse) peut aussi induire une accumulation de mélanines à des niveaux anormaux, menant à des hyperpigmentations, mélasma et lésions cutanées, et provoquant au final des problèmes de santé et des préjudices esthétiques parfois sévères.⁶⁷ En outre, le mélanome est lié à une synthèse anarchique des mélanines, qui permettent l'émergence de résistances à presque toutes les thérapies anti-cancéreuses classiques.^{68,69} Par conséquent le mélanome est le cancer de la peau le plus meurtrier (75% des décès liés aux cancers de la peau), alors que son incidence reste faible (2% des cancers de la peau).⁷⁰ Cette multi-résistance peut être contournée par l'administration d'inhibiteurs de la mélanogénèse comme adjuvants en chimio-, radio-, ou immunothérapie pour sensibiliser le mélanome, conduisant ainsi à une amélioration du pronostic de la maladie.^{71,72} De plus, il existe une demande exponentielle pour de tels inhibiteurs dans le cadre du blanchiment de la peau en cosmétique. En effet, les agents actuellement utilisés contiennent souvent des molécules toxiques et/ou inefficaces, ce qui a mené à l'interdiction d'un grand nombre d'entre eux dans les pays Européens notamment, alors que le marché associé à ces agents pourrait atteindre 23 milliards de dollars en 2020.

Le développement d'agents efficaces et sélectifs pour la modulation de la mélanogénèse est donc nécessaire. La tyrosinase (TY), qui est une métalloenzyme à centre binucléaire de cuivre, apparaît comme une cible attractive.⁷³ Chez l'humain, elle catalyse en effet les deux premières étapes-clés qui initient la mélanogénèse : les oxydations succes-

sives de la L-tyrosine et de la L-DOPA.⁴⁰ L'inhibition de TY est donc une stratégie bien établie et documentée pour supprimer la mélanogénèse *in vivo*, et en conséquence de nombreux inhibiteurs ont été développés pour des applications thérapeutiques et/ou dermocosmétiques.^{74,75} Néanmoins, dans la plupart des cas ces études se sont appuyées uniquement sur des tests *in vitro* réalisés sur la TY de champignon (*abTY*) facilement accessible commercialement, malgré une faible homologie avec la TY humaine (*hsTY*) et des interactions avec les inhibiteurs décrites comme très différentes. Ainsi, même l'inhibiteur d'*abTY* le plus connu et le plus utilisé en dermocosmétique — et l'une des références les plus testées dans les études liées à TY —, l'acide kojique, a été trouvé 100 fois moins actif contre *hsTY* que contre *abTY* ($K_i = 350$ contre $4,3 \mu\text{M}$).⁷⁶ Cette inefficacité mène à l'utilisation de fortes concentrations de produit en cosmétique, induisant des effets secondaires nocifs, comme des dermatites et des érythèmes, ainsi qu'un caractère cancérigène démontré. Une telle différence d'activité est par ailleurs observée pour presque tous les inhibiteurs de référence de TY (Tableau 6).⁷⁷ Le développement d'agents adaptés pour des applications humaines, dont l'activité est correctement évaluée contre *hsTY*, est donc aujourd'hui urgent.⁷⁸

Inhibiteur de référence	Activité contre <i>abTY</i> (μM)	Activité contre <i>hsTY</i> (μM)
Acide kojique	$4,3^a$; $6,0^b$	350^a ; 500^b
Hydroquinone	$1,1^b$	$>4000^b$
Arbutine	40^b	$>4000^b$
Acide benzoïque	$4,6^a$	520^a

Tableau 6. Exemples d'inhibiteur de TY fréquemment utilisés comme références.^{76,77} ^aValeur de K_i . ^bValeur d' IC_{50} .

Cependant, la maturation de *hsTY* est un processus complexe qui implique un ancrage transmembranaire et un trafic à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, contrôlé par des N-glycanes spécifiques, qui sont inaccessibles à des organismes simples comme *E. coli* pour la production d'enzyme recombinante. Pour cette raison, produire *hsTY* en grandes quantités est un défi, ce qui compromet largement le criblage d'inhibiteurs et les études structurales.⁷⁶ Ainsi, si plusieurs TYs de champignons,^{79,80} bactéries^{81,82} et plantes⁸³ ont été cristallisées durant la dernière décennie, l'élucidation structurale de *hsTY* est toujours attendue. Cependant, récemment, de nouveaux protocoles de production de *hsTY* recombinante à plus large échelle ont été publiés,^{76,84,85} l'un d'entre eux menant à l'obtention de données cristallographiques prélimi-

naires.⁸⁶ En outre, la structure de *hsTYRP1*, une enzyme très proche de *hsTY*, a été résolue,⁸⁷ et deux modèles d'homologie robustes de *hsTY* ont été mis à disposition de la communauté.^{88,89} À la lumière de ces nouveaux développements, la conception rationnelle d'inhibiteurs évalués sur *hsTY* peut être envisagée plus sereinement.⁹⁰ Le projet EPIDERMIS a pour objectif d'investir pleinement ces nouvelles possibilités de recherche prometteuses pour développer des inhibiteurs de *hsTY* efficaces et sélectifs, testés en contexte humain uniquement (*hsTY*, lysats cellulaires humains, cellules de mélanome humain, modèle pré-clinique de peau humaine).

Enfin, *hsTY* est reconnu comme un biomarqueur important du mélanome, dans la mesure où la sensibilité et la sélectivité de l'enzyme approche 100% dans les stades précoces de la maladie.^{91,92} Si le taux de survie à un mélanome précoce non métastatique après ablation chirurgicale est de 97%, le mélanome est connu pour son évolution rapide et ses métastases, qui mènent à un taux beaucoup plus faible pour les stades plus tardifs (15% de survie à cinq ans après métastases).⁹¹ Dans ce contexte, *hsTY* fournit la précision et la fiabilité requises pour un diagnostic différentiel aussi précoce que possible, l'accumulation de l'enzyme précédant le développement du mélanome malin. La détection et la quantification de *hsTY* en milieu biologique constitue donc une opportunité d'assurer une prise en charge rapide de la maladie. Historiquement, plusieurs études se sont focalisées sur la mise en place de protocoles pour la détection de l'activité de TY, basés sur des méthodes colorimétriques,⁹³ électrochimiques,⁹⁴ électrophorétiques⁹⁵ ou radiométriques.⁹⁶ Ces méthodes sont aujourd'hui reconnues comme fastidieuses, lentes et invasives, alors que de nouvelles techniques basées sur la fluorescence permettent de s'affranchir de ces limitations. Ainsi, de nombreuses sondes fluorescentes ont été explorées plus récemment, basées sur des fluorophores moléculaires, des points quantiques, des nanoclusters ou des nanoparticules,⁹⁷⁻⁹⁹ souvent associés à des synthèses, des séparations et des purifications longues et complexes, ainsi qu'à l'émergence de problématiques de cytotoxicité. De plus, détecter l'activité générique des TYs soulève fréquemment des problèmes d'interférences. Mis ensemble, ces inconvénients limitent fortement les applications potentielles de ces sondes. Nous proposons donc de nous appuyer sur les avancées réalisées pour le développement de ligands spécifiques de *hsTY* (dans la littérature et dans le cadre de ce projet) pour concevoir pour la première fois un biocapteur réagissant au contact de la structure spécifique de *hsTY* (et non à son activité catalytique).

3.2. Premier objectif : « De ligands de TY identifiés via leur activité contre *abTY* à des inhibiteurs efficaces et sélectifs de *hsTY* comme candidats cliniques »

Si la littérature dédiée aux inhibiteurs d'*abTY* est foisonnante, l'état de l'art concernant les inhibiteurs de *hsTY* isolé est seulement naissant, et seule une poignée d'études récentes s'est effectivement appuyée sur ce type d'évaluation. Un travail pionnier de Kolbe *et al.* en 2013 a mené à l'identification du rucinol (4-*tert*-butylrésorcinol) comme inhibiteur de *hsTY* avec un IC₅₀ de 21 μM ($K_i = 9,1 \mu\text{M}$, Figure 28),¹⁰⁰ une valeur bien plus faible en comparaison de celles obtenues pour les références classiquement testées (acide kojique, hydroquinone, arbutine, Tableau 6). Une autre étude a identifié la 3-hydroxycoumarine, avec des valeurs proches.¹⁰¹ Globalement, seuls deux composés ont à ce jour atteint une valeur de K_i dans l'ordre de grandeur submicromolaire : le thiamidol, développé par la compagnie Beiersdorf,⁷⁷ et le composé **3g**, développé au laboratoire⁴⁸ ($K_i = 0,25 \mu\text{M}$ et $0,35 \mu\text{M}$ respectivement, Figure 28). Ces deux composés ont été décrits comme des inhibiteurs compétitifs dont le site de fixation est le site actif de *hsTY* contenant les atomes de cuivre. Le thiamidol a été identifié à travers un criblage à haut débit d'une grande chimiothèque, suivi d'un processus d'optimisation du « hit ».¹⁰² La rationalisation de sa liaison avec *hsTY* par la modélisation moléculaire, en utilisant un modèle d'homologie de *hsTY*, a conduit à la détermination des interactions clés de la molécule avec des résidus de la seconde sphère de coordination qui ne sont pas conservés parmi les autres TYs et les enzymes reliées, comme Ile368 ou Ser375 (Figure 28). Au contraire, le composé **3g** a été conçu au laboratoire par l'incorporation du motif 2-hydroxypyridine-*N*-oxyde (HOPNO, un chélateur connu et efficace des centres à cuivre) sur un squelette de type aurone, de manière rationnelle. Nous avons auparavant observé que les auronones sont de bons ligands de différentes TYs,⁴⁶ et qu'elles adoptent différents comportements : inhibiteurs, substrats ou activateurs. Pour éviter toute oxydation par TY (comportement de substrat) et toute incapacité de fixation sur le centre à cuivre (comportement d'activateur), nous avons introduit le motif HOPNO sur le cycle B, afin d'induire un ancrage solide des composés dans le site actif. Cette stratégie a produit trois composés, dont **3g**, qui montre la meilleure activité contre *hsTY* de la série. La géométrie proposée par les expériences de modélisation moléculaire inclut des interactions avec Ile368, et avec des résidus éloignés du centre à cuivre (et spécifiques à *hsTY*) comme His304, Lys306 et Arg308, tous localisés au sein de la boucle distante et flexible 302–310 (Figure 29).

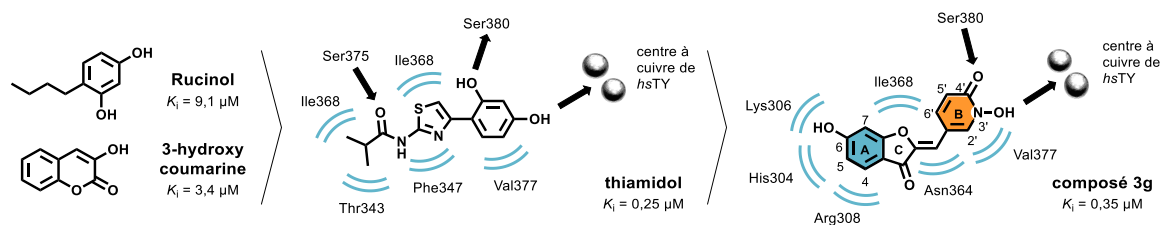


Figure 28. Quatre inhibiteurs de *hsTY* testés contre l'enzyme isolée. Pour le thiamidol et le composé **3g**, interactions avec les résidus du site actif observées lors d'expériences de modélisation moléculaire. Pour le composé **3g**, numérotation des positions sur le squelette aurone.

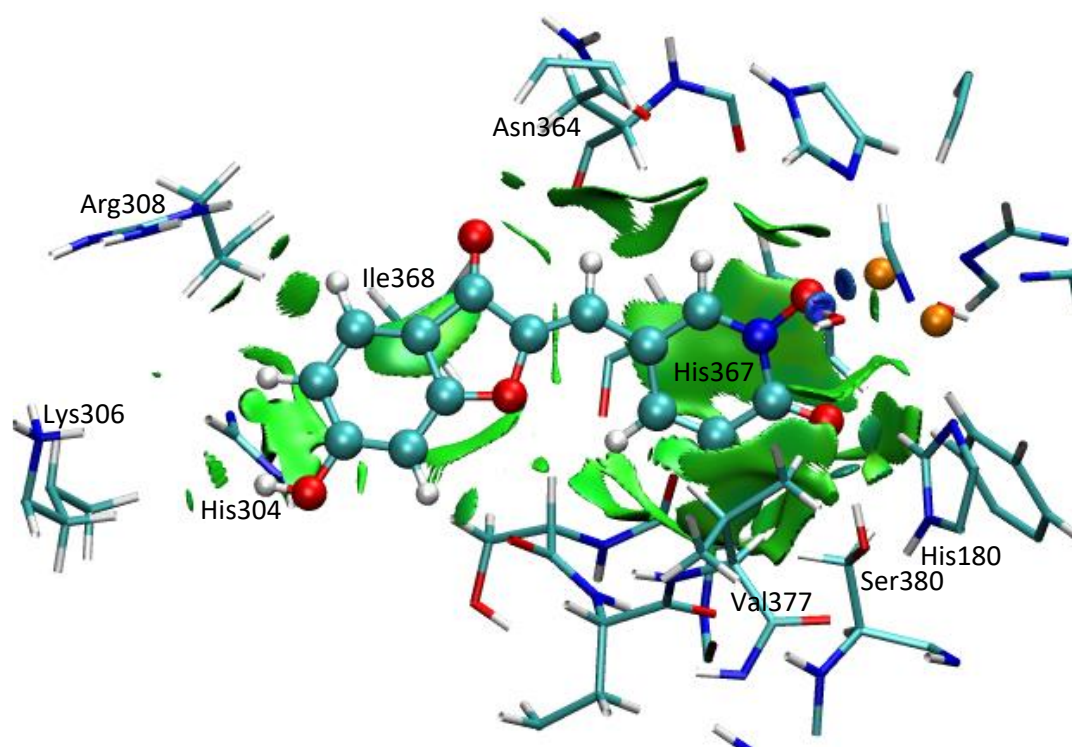


Figure 29. Position moyenne du complexe **3g**-*hsTY* après dynamique QM/MM. Les surfaces vertes représentent les interactions moléculaires.

Cependant, si le composé **3g** présente une meilleure activité contre *hsTY* que contre *abTY* ($K_i = 0,35 \mu\text{M}$ contre $1,27 \mu\text{M}$), ce qui est rarement le cas parmi les inhibiteurs connus, un effort supplémentaire doit être réalisé afin d'atteindre une exigence d'activité et de sélectivité compatible avec un développement ultérieur. Plusieurs options de modulation chimique seront donc envisagées, basées sur le squelette aurone comme point de départ, et avec l'aide des résultats précédemment obtenus et de nouveaux protocoles de modélisation moléculaire mis en place au laboratoire. Les modèles d'homologie de *hsTY* précédemment mentionnés, et notamment un modèle récent construit à partir des données structurales issues de la résolution de la structure de *hsTYR1*,⁸⁹ seront pleine-

ment mobilisés pour les calculs de docking moléculaire. Les interactions potentielles du cycle A des aurones avec les résidus de la seconde sphère de coordination seront des cibles prioritaires, comme His304, Lys306 et Arg308. Dans la mesure où ces résidus ne sont pas conservés dans les autres TYs et dans *hsTYRPI*, des analogues appropriés interagissant avec eux pourraient assurer une sélectivité accrue, tout en augmentant l'affinité globale des composés. Par ailleurs, des études précédentes ont mis l'accent sur le rôle de contrôleur de ces résidus, localisés autour du centre à cuivre (5,5–16 Å), dans l'activité et la spécificité de l'enzyme, ainsi que dans le guidage du substrat.^{83,103,104} Des modulations fines seront ainsi proposées et entreprises à la lumière des données fournies par la modélisation moléculaire. En première intention, les groupements chimiques capables de former des liaisons hydrogène avec les résidus polaires décrits précédemment seront introduits. Des substituants méthoxyl, diméthylamino (et les homologues supérieurs), amino ou hydroxyl seront ciblés, ainsi que des groupements carboxylate, préférentiellement en position 6, afin d'évaluer la flexibilité de la boucle 302–310 de *hsTY* et de rechercher des interactions optimales. Des transformations plus ambitieuses du cycle A des aurones seront également entreprises, comme l'introduction d'un cycle additionnel fusionné de type furane, dont la synthèse est déjà documentée.^{105,106} La présence d'un groupe de type morpholino ayant été identifiée comme un élément intéressant pour le ciblage des mélanosomes, où leurs propriétés de protonation permettent une accumulation spécifique,¹⁰⁷ des analogues portant ce motif seront préparés. Par ailleurs, des modifications chimiques du cycle C seront réalisées pour renforcer les interactions avec Ile368. De nouvelles voies de synthèse sont d'ores et déjà en cours d'exploration pour obtenir un accès fiable à des dérivés d'hémiindigo (HI), d'hémiithioindigo (HTI) ou d'indanone (hémiindigoïdes) judicieusement substitués (Figure 30).

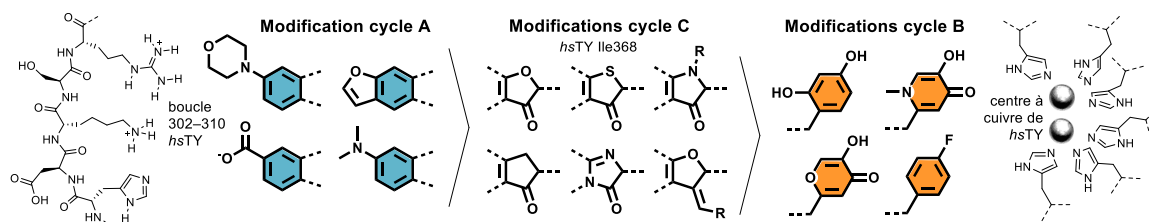


Figure 30. Modulations chimiques envisagées en première intention pour les cycles A, B et C du squelette aurone, et résidus clés ciblés pour la mise en place d'interactions.

En outre, la transposition d'une inhibition de *hsTY* à un effet anti-mélanogénique dans des contextes cellulaire ou *in vivo* nécessite la considération d'autres paramètres. Le

composé **3g** souffre en premier lieu d'une très faible solubilité dans l'eau. De plus, le motif HOPNO existe probablement sous la forme d'un équilibre tautomérique entre les formes *N*-hydroxy-2-pyridinone et 2-hydroxypyridine-*N*-oxyde, générant un caractère partiellement zwitterionique. Ces paramètres induisent une capacité limitée de **3g** à inhiber la production de mélanine au sein de lysats de cellules de mélanome humain MNT-1 ($IC_{50} = 16,6 \mu M$) mais également à franchir les membranes cellulaires, ce qui conduit à une perte supplémentaire d'activité lors des tests sur cellules entières ($IC_{50} = 85,3 \mu M$). Ainsi, la seconde priorité en termes de modulation chimique sera dédiée à une amélioration des propriétés physicochimiques de **3g**, en particulier sa solubilité aqueuse, sa balance hydrophile–lipophile et son état de charge. Le remplacement du motif HOPNO par un autre groupement non-oxydable chélateur du centre à cuivre sur le cycle B, comme un groupe phényl substitué (*e.g.* un motif résorcinol inspiré du thiamidol, ou avec un groupement de reconnaissance 4'-fluorophényl,¹⁰⁸ comme récemment suggéré) ou un cycle insaturé alternatif (*e.g.* inspirés de l'acide kojique, de la mimosine, de la tropolone ou de l'hydroxyquinoline) pourrait permettre d'améliorer la solubilité dans l'eau et les propriétés de pénétration cellulaire (Figure 30). En effet, une série d'aurones et dérivés, notamment de type résorcinol, préparée par Brayan Roulier (doctorant travaillant sur le projet), a d'ores et déjà fourni des résultats prometteurs, avec des valeurs bien meilleures obtenus lors de tests sur lysats de cellules MNT-1 (Figure 31).

De plus, le composé EPI001 a montré une activité plus importante sur les cellules MNT-1 entières (collaboration avec le Dr. Marc Maresca à l'Université Aix-Marseille). Ces résultats tendent à confirmer le lien entre la présence du motif HOPNO et les problèmes de solubilité et de franchissement de membrane rencontrés. Ils constituent une base solide pour des efforts supplémentaires de synthèse chimique. Il est important de noter que les aurones en général et les composés testés en particulier ne sont pas cytotoxiques, ou à fortes concentrations. En outre, une étude antérieure réalisée dans le cadre d'un partenariat avec la société BASF sur plusieurs dérivés d'aurone n'a révélé aucun effet nocif lors de tests de toxicité orale chez le rat, ni lors de tests d'irritation oculaire et d'irritation/corrosion dermatologique aiguë chez le lapin.⁴¹ Globalement, le squelette aurone peut donc être considéré comme une plate-forme sûre pour des applications dermatologiques.

Ce projet de recherche et l'étude préliminaire sur **3g** sont parmi les seuls exemples de développement d'inhibiteurs totalement orienté sur des systèmes humains. Le projet

porte donc un important facteur de nouveauté par le ciblage de *hsTY* et l'abandon des évaluations non pertinentes sur *abTY*. De plus, la conception rationnelle d'inhibiteurs de *hsTY* apparaît comme totalement originale, dans la mesure où la seule étude de docking moléculaire rapportée à ce jour (réalisée sur des thiazolyl résorcinols, et notamment sur le thiamidol) a été conduite *a posteriori*, et n'a pas revêtu de vocation prédictive.

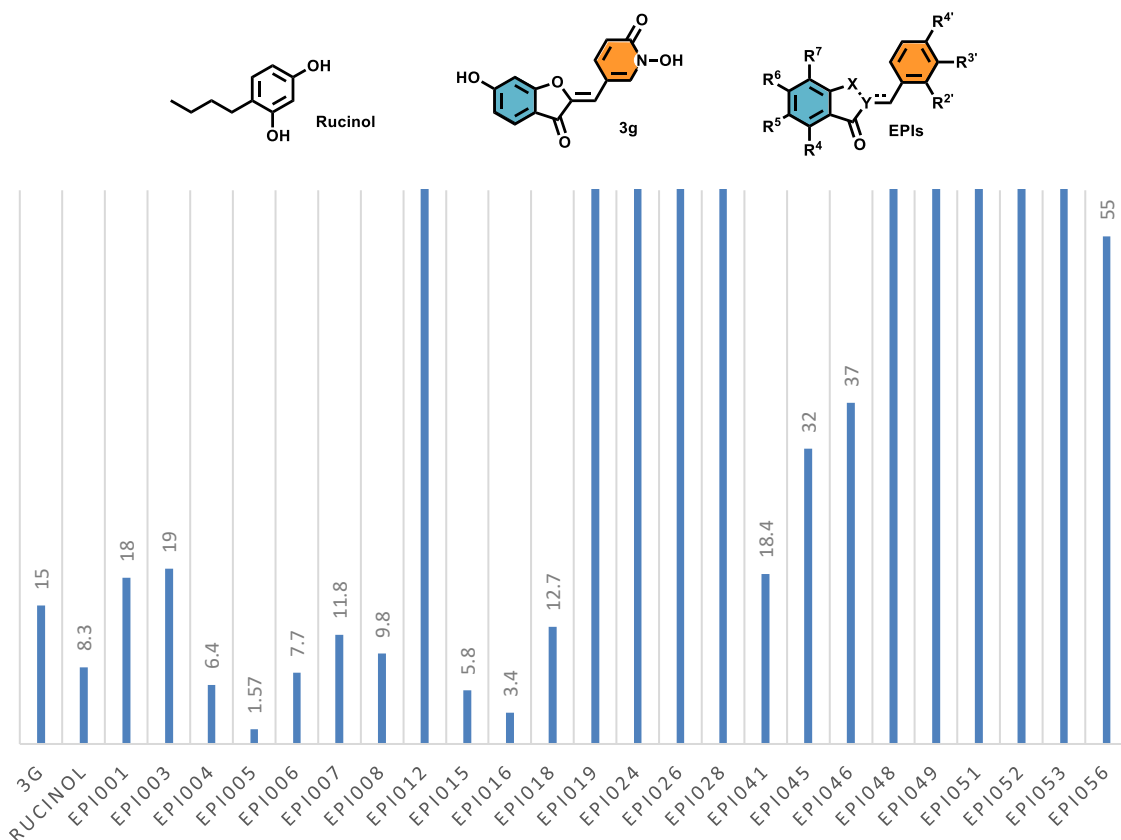


Figure 31. Résultats d'une première série d'aurones et dérivés évaluée lors d'un test d'inhibition de production de mélanine sur lysats de cellules MNT-1, et comparaison avec **3g** et le rucinol comme référence. Les valeurs indiquées sont les IC₅₀ mesurées, en µM.

3.3. Deuxième objectif : « De sondes de détection générique de l'activité oxydante de TY à des biocapteurs spécifiques de la structure de *hsTY* sans marquage »

La détection fluorescente de l'activité de TY a été très étudiée ces dernières années, incluant une majorité de travaux sur des capteurs basés sur des fluorophores organiques. L'approche la plus utilisée s'appuie sur le lien entre un groupement fluorogénique et un substrat de TY, typiquement un groupement phénol ou catéchol.¹⁰⁹ Cette stratégie a mené au développement de nombreuses sondes. Une proportion significative d'entre elles

a été construite sur la base de propriétés de « turn-off » de la fluorescence, c'est-à-dire sur l'extinction de la fluorescence par l'activité de TY, ce qui a soulevé des problèmes sérieux de sensibilité faible et d'importante fluorescence résiduelle.⁹⁷⁻⁹⁹ La recherche s'est donc concentrée sur des propriétés plus adaptées de « turn-on » (la fluorescence apparaît avec l'activité de TY), selon deux stratégies principales : (a) un mécanisme d'oxydation-clivage déclenché par TY qui libère un fluorophore et augmente la fluorescence mesurée, et (b) une interruption de l'effet PET (« Photoinduced Electron Transfer ») du groupement hydroxyphényl vers un autre motif lors de sa conversion en *ortho*-quinone catalysée par TY (Figure 32). Cependant, une grande partie de ces outils a été conçue autour de motifs oxydables de type 4-hydroxyphényl ou 3,4-dihydroxyphényl,¹¹⁰⁻¹¹² ce qui pose des problèmes d'interférence par rapport aux ROS. En effet, les espèces ONO_2^- ,¹¹³ O_2^- ,¹¹⁴ ou H_2O_2 ,¹¹⁵ par exemple, qui sont présentes notamment dans des contextes cancéreux, sont fréquemment détectées par des sondes basées sur les mêmes groupes réactifs. Les meilleurs résultats en termes de sélectivité et de sensibilité ont à ce jour été atteints en utilisant le motif 3-hydroxyphényl récemment décrit, avec une stratégie de « turn-on », qui permet d'éviter la plupart des écueils mentionnés. Néanmoins, deux limitations subsistent pour des applications humaines. Premièrement, une compétition potentielle pourrait persister entre l'oxydation de la partie substrat des sondes par *hsTY*, et par d'autres enzymes de type oxydase à l'activité proche (par exemple la tyrosine hydroxylase, la glucose oxydase, la xanthine oxydase ou *hsTYRPI*). Deuxièmement, les TYs, et en particulier celles de mammifères, sont des enzymes inefficaces de manière inhérente. Les constantes catalytiques pour l'oxydation de la L-tyrosine et de la L-DOPA, mais aussi celles des autres phénols et catéchols comme substrats non-naturels, sont ainsi particulièrement faibles dans le cas de *hsTY*, comparé à *abTY*.⁷⁶ En conséquence, les temps d'incubation nécessaires en système humain pourraient être significativement supérieurs à ceux attendus, et constituer un obstacle pour l'implémentation de processus d'analyse rapide.

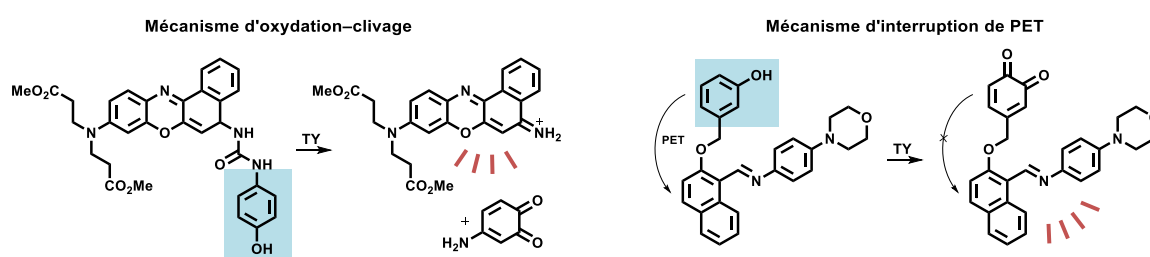


Figure 32. Exemples de sondes de l'activité de TY, s'appuyant sur des mécanismes d'oxydation-clivage et d'interruption de PET.

Par ailleurs, les sondes fluorescentes sensibles à l'environnement subissent un changement d'intensité de fluorescence et/ou de couleur lorsqu'elles sont confrontées à des modifications de leur microenvironnement local, sans intervention d'une réaction chimique ou enzymatique.¹¹⁶ Certaines de ces sondes sont sensibles aux modifications de polarité, et sont ainsi parfaitement adaptées pour la détection de poches hydrophobes au sein de biomolécules, et particulièrement de protéines, dans la mesure où une interaction sonde-biomolécule suffisamment forte est capable de déclencher un mécanisme de « turn-on » de la fluorescence. Ce « turn-on » provient souvent d'un transfert de charge, qui mène à un état excité hautement dipolaire à partir d'une structure de type « push-pull » comprenant des groupes électro-donneur et électro-accepteur conjugués. Si cet état est rapidement quenché dans un solvant polaire protique comme l'eau, il mène à l'émission de fluorescence lors de son retour à l'état fondamental dans un environnement hydrophobe. Le contraste entre les intensités de fluorescence respectives peut fournir un moyen de détection précis, fiable et non-invasif. Ainsi, la liaison de telles sondes fluorogéniques sensibles à l'environnement avec des ligands de hautes affinité et sélectivité peut ouvrir de nouvelles pistes pour la production de biocapteurs de protéines, comme en témoignent quelques exemples de la littérature (Figure 33).^{117,118} En outre, des études récentes ont montré que le motif fluorogénique lui-même peut former des interactions hydrophobes avec une cible, maximisant par là même l'effet de sensibilité à l'environnement.^{119,120} Cependant, le marquage des inhibiteurs par des fluorophores classiques entraîne souvent des problèmes collatéraux, comme une perte d'affinité, une mauvaise pénétration cellulaire ou une cytotoxicité. Nous proposons donc de nous appuyer sur la fluorescence intrinsèque du squelette aurone pour concevoir de nouvelles sondes chimiques originales pour la détection spécifique de *hsTY* basée sur la structure de l'enzyme. En effet, deux séries d'aurones ont d'ores et déjà été rapportées avec des profils de substitution variés (Figure 34),^{121,122} et leurs propriétés solvatochromiques marquées, leurs hauts rendements quantiques et leurs larges déplacements de Stokes ont validé l'utilisation de dérivés d'aurones comme biocapteurs photophysiques de biomolécules, parmi d'autres applications.¹²³⁻¹²⁷ En pratique, la fluorescence des aurones est seulement résiduelle dans l'eau et les solvants polaires, et augmente considérablement en milieu apolaire, et ces molécules apparaissent donc comme totalement adaptées pour une détection sensible à l'environnement et sans utilisation de marquage de cibles biologiques. En outre, en comparaison avec des fluorophores classiques comme la fluorescéine, la rhodamine, les cyanines ou les BODIPYs, les aurones décrites sont de plus petite taille (masse

molaire de 250–300 contre 330–570) et présentent de bien meilleurs déplacements de Stokes (75–150 nm contre 5–40 nm),¹²⁸ un élément crucial pour éviter les phénomènes d’auto-quenching.

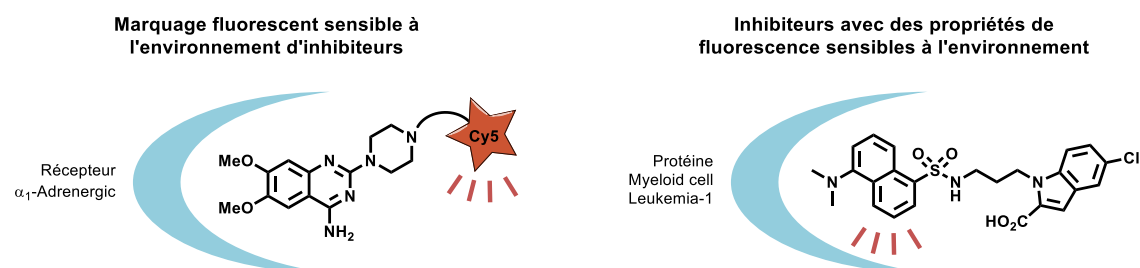


Figure 33. Exemples de sondes sensibles à l’environnement développées pour la détection de sites hydrophobes de protéines, et stratégies employées.

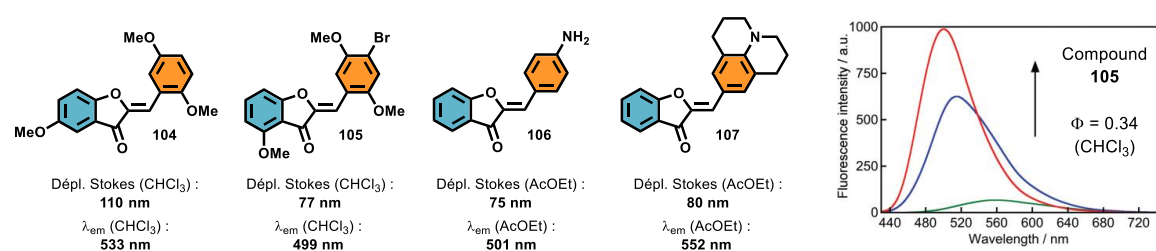


Figure 34. Quatre aurones décrites dans la littérature pour leurs propriétés de fluorescence sensible à l’environnement et leur potentiel pour des applications biologiques préliminaires. Intensité de fluorescence du composé **105** dans MeOH (vert), MeCN (bleu) et CHCl₃ (rouge).

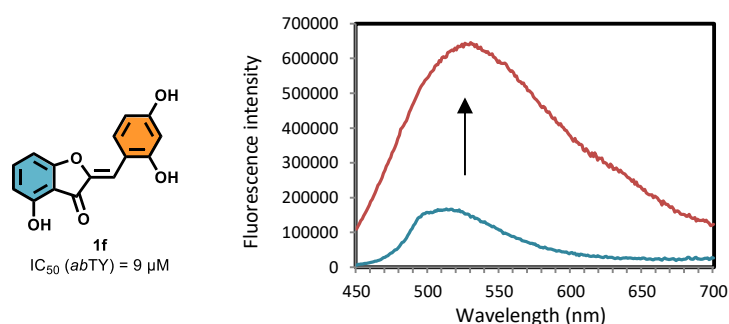


Figure 35. Spectre d’émission de l’aurone **1f** (0,3 μ M) dans un tampon Tris (pH 7,5) à 25 °C en absence (bleu) et en présence (rouge) d’*abTY* (15 μ M). Les échantillons ont été excités à 423 nm.

Nous avons réalisé une expérience préliminaire afin d’illustrer notre concept de sonde fluorescente « turn-on » capable de détecter *hsTY*, en utilisant l’enzyme de champignon facilement accessible *abTY*. Le composé **1f** est un inhibiteur d’*abTY* publié, qui présente une valeur d’ IC_{50} de 9 μ M.⁴⁶ De manière intéressante, si la fluorescence de cette aurone (à 0,3 μ M) dans un tampon Tris a été mesurée à une faible intensité, une augmen-

tation significative de cette fluorescence (d'un facteur $\sim 4,5$ à 530 nm, et d'un facteur ~ 10 à 600 nm) a été observée après addition d'*abTY* (15 μM , Figure 35). De manière intéressante, l'effet « turn-on » a donc fonctionné même lors d'une expérience réalisée avec un inhibiteur de structure très classique, sans aucune optimisation des substituants pour favoriser les propriétés photophysiques des aurones pour des applications biologiques. Ainsi, cette preuve de concept suggère qu'une amélioration considérable pourrait être obtenue par une conception appropriée de structures dédiées à la fluorescence. La substitution des sondes fluorogéniques basées sur le squelette aurone et déjà décrites sera pour nous une source d'inspiration majeure dans l'optique de concevoir une première génération.

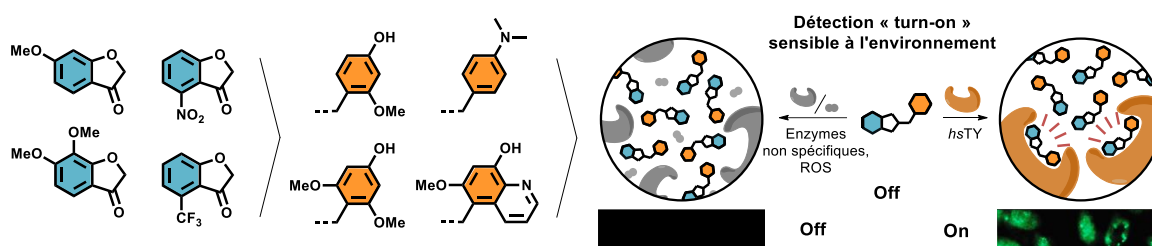


Figure 36. Modulations chimiques envisagées en première intention pour les cycles A et B du squelette aurone, dédiées à l'amélioration des paramètres photophysiques importants pour des applications de détection de biomolécules; représentation visuelle du concept de détection « turn-on » sensible à l'environnement.

En particulier, la présence de groupements amino en position 4' a été mentionnée comme favorable.^{121,129,130} Plus généralement, une étude théorique a mentionné le rôle crucial de la présence d'un group électro-donneur dans cette position, capable de générer le motif classique donneur- π -accepteur qui permet le phénomène de type « push-pull » recherché.¹³¹ Ainsi, nous émettons l'hypothèse que la présence d'un groupement phénol non-oxydable en position 4' permettrait de conserver le potentiel des analogues de type amino, tout en améliorant les interactions avec le centre à cuivre. Pour aller plus loin, la déprotonation du groupe hydroxyl situé en position 4', qui intervient lors de la liaison aux atomes de cuivre, pourrait promouvoir la délocalisation électronique et mener à une augmentation de la fluorescence en l'absence d'un environnement polaire. En conséquence, une variété de composés incluant des groupements hydroxyl et amino en position 4' sera synthétisé. Par ailleurs, le motif benzofuranone jouant le rôle d'accepteur, des calculs théoriques ont révélé le potentiel important de certains groupes électro-accepteurs spécifiques en position 4.¹³¹ L'introduction d'un substituant CF₃ ou NO₂ à cette position devrait ainsi conduire à un déplacement des longueurs d'onde d'excitation et d'émission

vers le rouge. La présence de multiples groupes méthoxyl sur les cycles A et B a également été associée à un déplacement bathochrome de la longueur d'onde d'absorption maximale,¹²² une modification souhaitable dans le cadre d'applications biologiques. Nous prévoyons donc de nous concentrer sur les structures décrites dans la [Figure 36](#) en première intention. Le principal défi sera d'améliorer les paramètres photophysiques des sondes tout en maintenant leur affinité pour le site actif de *hsTY*, et plusieurs générations successives de molécules seront donc nécessaires afin d'atteindre des propriétés adaptées en termes d'affinité et de fluorescence.

Le projet de recherche a donc pour deuxième objectif de produire des sondes fluorescentes capables de détecter la structure spécifique de *hsTY*, au lieu de détecter une activité oxydante générique de type TY, suivant une stratégie totalement originale dans le domaine des biocapteurs de TY qui devrait circonscrire les problèmes classiquement rencontrés et décrits ci-dessus. De plus, le ligand lui-même sera conçu pour induire une fluorescence intrinsèque au contact du site actif de *hsTY*, sans intervention d'un marquage extérieur avec des fluorophores classiques. Là encore, ce concept innovant pourrait permettre de lever un certain nombre de limitations fréquemment liées au domaine des sondes fluorescentes.

3.4. Troisième objectif : « Vers des photoswitchs moléculaires ciblant *hsTY* et des applications en photopharmacologie »

L'interaction entre les petites molécules et les biomolécules d'intérêt thérapeutique est à la base de nombreux projets de chimie médicinale, et en particulier du drug design rationnel. L'un des défis majeurs de ces disciplines reste néanmoins le contrôle de l'activité de ces petites molécules, dans l'espace et dans le temps : en effet, les composés administrés *in vivo*, même très efficaces et sélectifs, interfèrent inévitablement avec des cibles et des processus non désirés, ou distants de la zone d'intérêt, et selon des durées d'effet difficilement contrôlables. La capacité de pouvoir modifier de manière dynamique la structure des petites molécules en utilisant un stimulus externe, permettant d'activer ou d'inactiver son effet, apparaît alors comme un moyen séduisant de contrôler l'activité biologique avec une grande précision spatiotemporelle.¹³² L'utilisation de la lumière dans ce cadre revêt de multiples avantages : son effet est non invasif, instantané, précis, modulable facilement et souvent réversible. Durant les dernières années, l'utilisation de la lu-

mière en pharmacologie — nommée la photopharmacologie — a ainsi connue une croissance considérable, avec une grande place accordée aux petites molécules de type photoswitch, dont l'irradiation à une longueur d'onde donnée modifie la géométrie, et donc l'affinité pour une cible d'intérêt.¹³³ Le groupement chimique le plus employé pour la génération de tels photoswitchs est sans conteste l'azobenzène (Figure 37), dont la modification de géométrie sous l'effet de la lumière est connue depuis 1937 et les travaux d'Hartley.¹³⁴ L'intérêt pour les azobenzènes dans le cadre du contrôle des molécules bioactives est très marqué, car ce motif regroupe plusieurs aspects remarquables, comme une grande facilité de synthèse, un changement important de géométrie sous l'effet de la lumière (transitions entre les formes *cis* et *trans*), une modulation assez facile de la longueur d'onde de switch (notamment par la substitution des deux unités phényle), une photochimie efficace ou une absence de toxicité.^{135,136} Néanmoins, la plupart des azobenzènes montrent également une tendance à être réduits en présence de glutathion, ce qui limite leur champ d'application. Ainsi, une importante expansion de l'espace chimique des photoswitchs a débuté récemment, avec le développement de nouveaux motifs comme le métronidazole, les arylazopyrazoles, les hydrazones ou les complexes radicaux phénoxy-imidazolyl (Figure 37), permettant dans certains cas des applications plus adaptées et sur mesure que l'utilisation d'azobenzènes génériques.¹³⁷ Cette diversification des systèmes et des applications a été très récemment illustrée par la parution d'une issue spéciale dans le journal *ChemPhotoChem* (volume 3, issue 6, juin 2019).

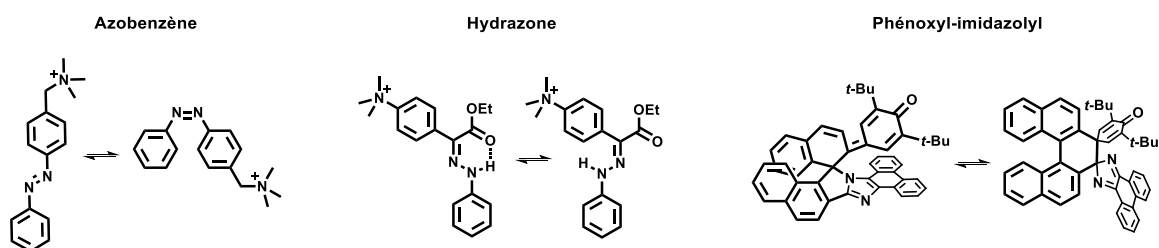


Figure 37. Exemples de systèmes de type photoswitch récemment décrits.^{138–140}

Parmi ces nouveaux systèmes, la famille des indigoïdes génère depuis quelques années un intérêt croissant. Composé des indigos, thioindigos, hémithioindigos (HIs), héliindigos (HTIs) et iminothioindoxyles (ITIs), cet ensemble de molécules possède plusieurs intérêts parmi les photoswitchs, comme une structure rigide permettant une modification de géométrie précisément contrôlable, et des photoréactions rapides et efficaces. En particulier, les HIs et les HTIs présentent un avantage crucial, puisqu'ils par-

viennent à combiner un switch des deux isomères dans le visible avec une très bonne bistabilité thermique,¹⁴¹ une association aussi rare que précieuse, notamment dans le cadre biologique — où les UV endommagent les tissus alors que les longueurs d’onde proches du rouge les traversent plus facilement,¹³⁶ et où la réversibilité thermique limite les champs d’application. De nombreuses études récentes se sont concentrées sur ces deux structures et sur leurs possibilités de changements de géométrie avancés sous l’effet de la lumière.^{142–146} Ainsi, les composés **108** et **110** ont par exemple été décrits comme capables de passer de la forme *Z* à la forme *E* et inversement, sous irradiation de lumière visible, parfois proche du rouge (> 600 nm, **Figure 38**).^{147,148} La métastabilité des formes *Z* et leurs importantes demi-vies limitent également fortement le switch thermique, en particulier par rapport aux photoswitchs classiques, azobenzènes compris. Le composé **109** illustre également le potentiel de ces molécules en milieu aqueux.¹⁴⁹ Le composé **111** possède des propriétés similaires, mais la présence d’une liaison hydrogène entre le noyau pyrrole et la cétone fait de l’isomère *E* le plus stable thermiquement (**Figure 38**).¹⁵⁰ Enfin, la famille des ITIs, développée très récemment et illustrée ici par le composé **112** (**Figure 38**),¹⁵¹ possède un potentiel certain en particulier en milieu aqueux, mais l’isomère *E* apparaît extrêmement instable quelle que soit la substitution en position 4’.

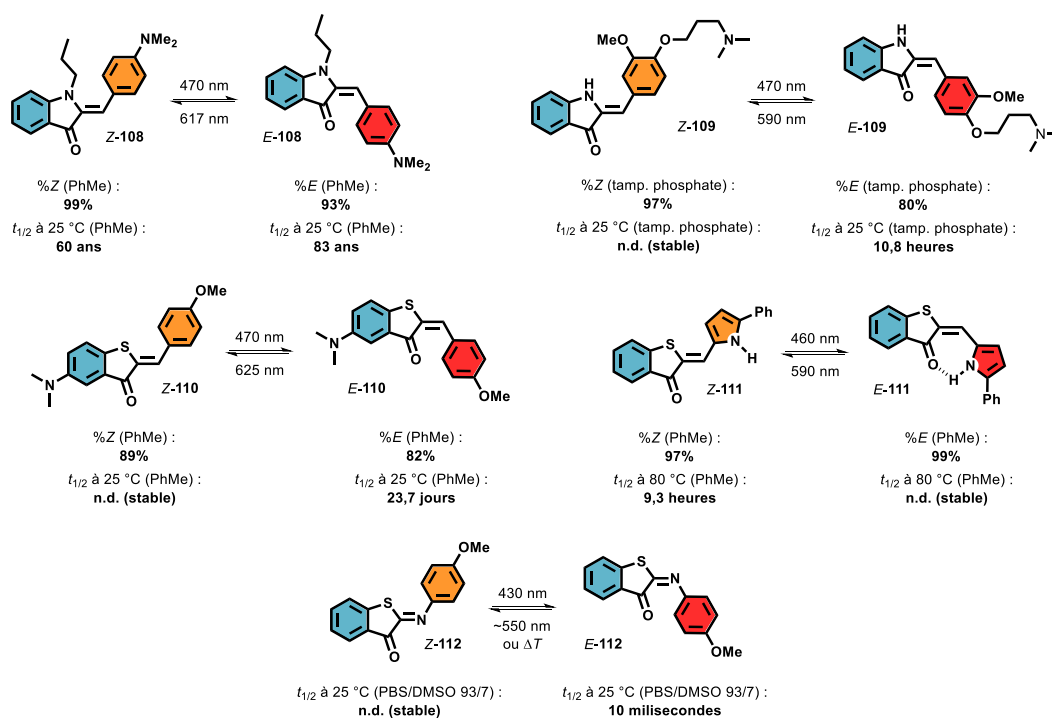


Figure 38. Cinq composés de type HI (**108**, **109**), HTI (**110**, **111**) et ITI (**112**) décrits dans la littérature pour leurs propriétés de photoswitch, avec leurs longueurs d’onde de switch et stabilités thermiques.

Tous ces éléments ouvrent la voie à des applications potentielles en milieu biologique. Un exemple de telles applications a été fourni en 2006 *via* la publication d'une étude sur l'inhibition de la voie de la 12/15-lipoxygénase (12/15-LOX) par le composé **113**, basé sur un squelette HTI (Figure 39A).¹⁵² Cette molécule, dont les propriétés de switch n'ont pas du tout été optimisées, est peu active contre 12/15-LOX dans sa forme stable, de géométrie *Z* ($IC_{50} = 700 \mu\text{M}$). En revanche, sous irradiation à 405 nm, elle subit une isomérisation partielle et produit un mélange *Z/E* de ratio 38/62 à l'état photostationnaire. De manière intéressante, la forme *E* purifiée est bien plus active contre la cible, avec un IC_{50} de 21 μM . Cette différence d'activité a été rationalisée par modélisation moléculaire (Figure 39A). Plus récemment, le switch **114** a été conçu comme un analogue de la colchicine pour l'inhibition de la polymérisation des microtubules.¹⁵³ Initialement pensé comme un inhibiteur « switch-on » en présence de lumière, il s'est finalement avéré plus actif dans le noir (« dark », forme *Z* majoritaire, $EC_{50} = 1 \mu\text{M}$) que sous irradiation (« lit », forme *E* majoritaire, $EC_{50} = 4 \mu\text{M}$, Figure 39B). Néanmoins cette étude précieuse démontre pour la première fois le potentiel des HTI en milieu cellulaire. Par ailleurs, d'autres travaux ont confirmé la capacité de structures HI et HTI à produire un photoswitch efficace et rapide en milieu aqueux et dans un environnement biochimique complexe.^{154–158}

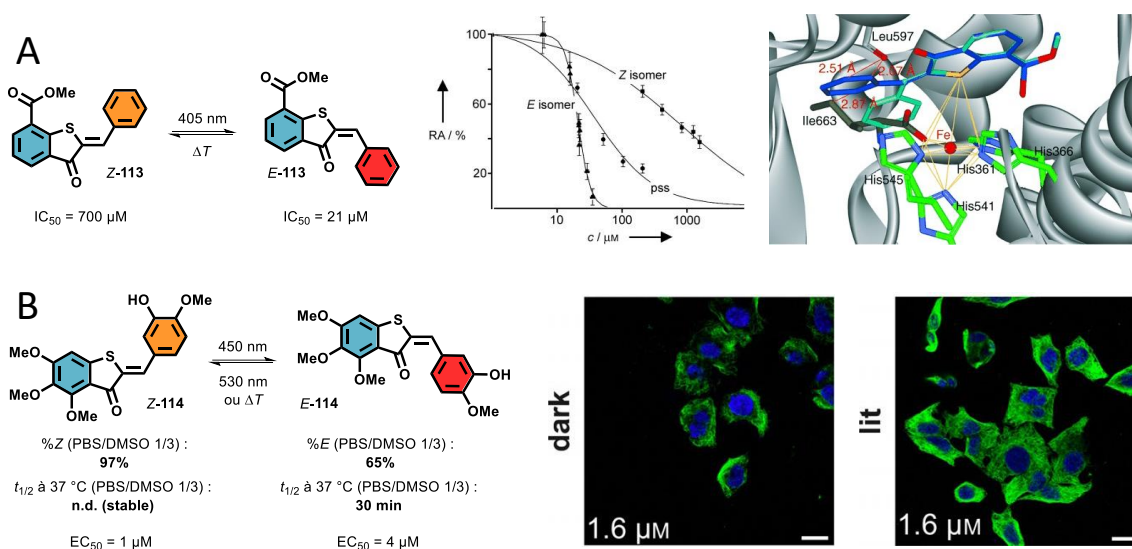


Figure 39. (A) Photoswitch de **113**, inhibiteur de la voie de la 12/15-lipoxygénase, et géométries des isomères au sein du site actif prédites par modélisation moléculaire : *Z*-**113** en bleu clair, *E*-**113** en bleu foncé ; (B) Photoswitch de **114**, inhibiteur de la polymérisation des microtubules, et microscopie des microtubules après incubation 24 h avec 1,6 μM de **114**, dans le noir (« dark ») ou sous irradiation à 410 nm (« lit »).

Ces molécules de type HI et HTI présentent une forte analogie structurale avec les aurones et avec les nouveaux composés envisagés dans le cadre de ce projet et présentés précédemment. Cette proximité permet d'imaginer l'application d'un photoswitch réversible, rendu possible par les systèmes HI et HTI, à l'inhibition de *hsTY*, d'autant plus propice dans un contexte cutané. En effet, la peau est particulièrement accessible par la lumière, et a par conséquent été catégorisée en organe de classe 1 (« Class 1, easily accessible: skin, eyes ») par une revue fondatrice de 2016 traitant du potentiel des nouvelles cibles en photopharmacologie.¹⁵⁹ En outre, la mélanogénèse est un processus très localisé pouvant facilement bénéficier d'un photocontrôle spatiotemporel. Ainsi, l'application d'un composé inactif pourrait être suivie d'une irradiation locale du mélanome ou de l'hyperpigmentation à une longueur d'onde précise, si possible proche du rouge (> 600 nm). La molécule active serait ainsi générée *in situ*, avec une grande précision, et ne viendrait pas perturber la mélanogénèse et les processus biologiques impliquant *hsTY* par ailleurs. En première intention, dans la mesure où les aurones ont été identifiées comme actives dans leur configuration *Z*, il semble judicieux de développer des molécules stables dans la configuration *E*, isomérisées en *Z* sous irradiation. À cet effet, la présence d'un donneur potentiel de liaison hydrogène sur le cycle B, de manière analogue au composé **111**, peut par exemple être envisagée avec la synthèse d'un dérivé possédant un motif L-mimosine, un groupement chélateur du cuivre déjà évoqué précédemment (Figure 40). En outre, les propriétés de switch seront optimisées *via* l'introduction de groupements adéquats, notamment sur le cycle A. Les travaux précédemment décrits ont déjà mentionné l'apport bénéfique de substituants de type diméthylamino, par exemple, permettant un déplacement de la longueur d'onde de switch vers le rouge. C'est notamment le cas pour le switch *E*→*Z* du composé **110**, fixée à 625 nm, contre 530 nm pour les analogues 5-méthoxy et 5-méthyl, et 505 nm pour l'analogue non substitué. Ce déplacement vers le rouge, important dans tout contexte *in vivo*, est rendu encore plus crucial par la forte absorption photonique de la mélanine sous 500 nm. D'autres analogues et modifications pourront être envisagés à partir des résultats obtenus dans le cadre des premier et deuxième objectifs.

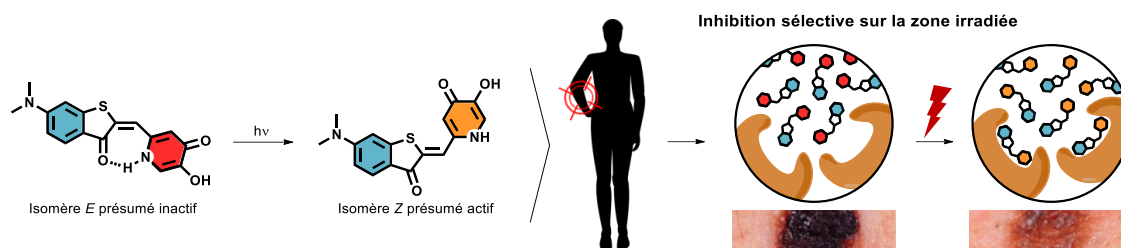


Figure 40. Exemple de molécule envisagée, qui serait stable et inactive en configuration *E* et permettrait un photoswitch en configuration *Z* active sous irradiation ; représentation visuelle de l'application potentielle de telles molécules dans le contrôle spatio-temporel de l'activité biologique et dans le traitement local du mélanome ou de l'hyperpigmentation.

Le projet de recherche a donc pour troisième objectif de produire des molécules inactives contre *hsTY*, pouvant être isomérisées sous irradiation en inhibiteurs efficaces, dont l'activité biologique serait contrôlable avec une grande précision spatiotemporelle. Cette propriété, particulièrement adaptée au contexte cutané, permettrait de lever d'éventuelles réserves concernant l'impact de composés anti-*hsTY* au-delà de la zone à traiter, l'enzyme étant un élément essentiel pour maintenir une pigmentation normale sur le reste de la peau.

3.5. Aspects pratiques

Le projet scientifique sera organisé en « pipeline » de type go-no-go, permettant d'assurer une conception des molécules, une exécution des expériences et une validation optimisées (Figure 41). Des collaborateurs scientifiques interviendront à différentes étapes du projet pour apporter un support expérimental et des expertises complémentaires.

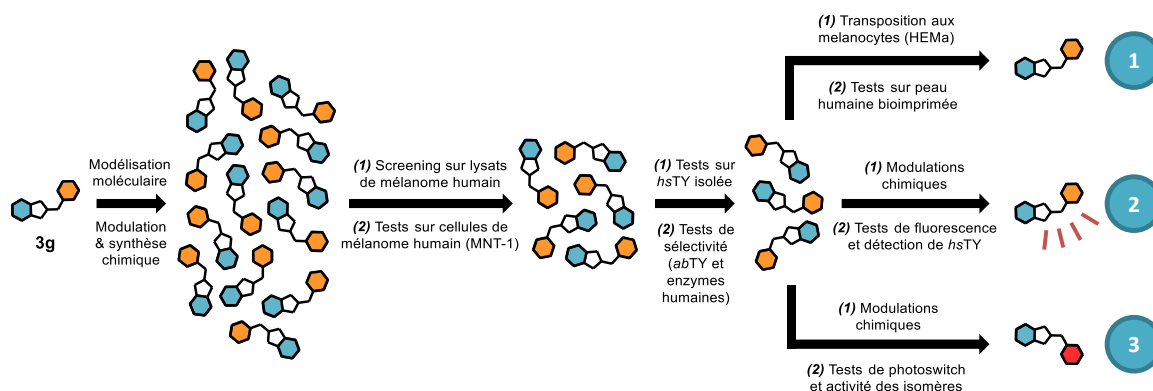


Figure 41. « Pipeline » général du projet, partant du composé **3g** préalablement identifié pour atteindre les trois objectifs décrits, *via* une série d'étapes optimisées, notamment au niveau du coût.

Globalement, après une conception rationnelle s'appuyant sur des outils de modélisation moléculaire, et une étape de diversification moléculaire par synthèse (commencée en 2019), les inhibiteurs potentiels seront en premier lieu testés sur des lysats de cellules de mélanome humain MNT-1, et sur les cellules entières correspondantes (en réduction de la mélanogenèse et en cytotoxicité). Ces tests sont peu onéreux et constitueront un premier filtre rapide. Les composés les plus actifs seront ensuite évalués lors de tests impliquant *hsTY* isolée, une enzyme chère pour les raisons évoquées en introduction, et leur sélectivité sera estimée lors de tests réalisés sur des enzymes proches, comme *abTY*. Les meilleurs inhibiteurs de *hsTY* seront ensuite engagés dans des études précliniques, en utilisant des modèles de peaux humaines pigmentées. L'effet anti-mélanogenèse sera mesuré par la quantification de la mélanine produite dans ces peaux, et par des analyses immunohistochimiques de *hsTY* (premier objectif). En parallèle, des inhibiteurs sélectionnés seront modifiés chimiquement pour atteindre les propriétés photophysiques requises pour une utilisation comme sonde fluorescente. La capacité de ces molécules à détecter et à quantifier *hsTY* sera testée, d'abord en utilisant l'enzyme isolée pour établir une preuve de concept, puis en milieu intracellulaire par le biais de la microscopie de fluorescence (deuxième objectif). Enfin, des dérivés spécifiques seront générés pour obtenir des propriétés de photoswitch compatibles avec une utilisation en milieu biologique. Chacun des isomères sera évalué sur l'enzyme isolée, puis des expériences de photoswitch *in situ* seront menées (troisième objectif).

Deux sources de financement ont d'ores et déjà été acquises pour ce projet :

- Un financement sur 36 mois a été obtenu auprès de l'École Doctorale « Chimie et Sciences du Vivant » en juin 2018 : thèse de Brayan Roulier (2018–2021, directeur : Basile Pérès, co-encadrant : Romain Haudecoeur).
- Un financement sur 48 mois a été obtenu auprès de l'ANR en juillet 2019, adossé aux premier et deuxième objectifs du projet : financement d'un post-doctorat (2021–2023) et ~100 000 € d'équipement et fonctionnement (ANR JCJC, proposition « EPIDERMIS », coordinateur : Romain Haudecoeur).

DES PERSPECTIVES

La conception et le développement de ligands de *hsTY* et d'outils permettant de quantifier sa présence ou d'inhiber son action avec une grande précision spatiotemporelle peuvent rendre possible une détection et une modulation faciles de son action, en milieu biologique et *in vivo*. Outre l'intérêt de ce type d'agent dans le cadre des hyperpigmentations cutanées et du mélanome, l'existence de sondes chimiques efficaces et sélectives pourraient conduire à déchiffrer le rôle de *hsTY* dans d'autres contextes et pathologies. En effet, plusieurs hypothèses sont aujourd'hui proposées quant à l'implication de l'enzyme, par exemple dans l'ochronose associée à l'alkaptonurie,¹⁶⁰ ou dans la maladie de Parkinson.¹⁶¹ En particulier, dans le cadre de cette dernière pathologie, une étude très récente a permis le développement d'un modèle murin de neurodégénérescence par l'injection d'un vecteur de type virus adéno-associé exprimant *hsTY*.¹⁶² Ce travail a permis de relier la présence de *hsTY* dans la *substantia nigra* à la synthèse de neuromélanine — potentiellement *via* une catalyse de l'oxydation de la dopamine, qui s'effectue également spontanément —, puis à l'apparition d'un phénotype classique associé aux symptômes de la maladie de Parkinson. En outre, l'enzyme a été plusieurs fois détectée en faible quantité dans le cerveau humain — *via* la détection de la protéine elle-même, de son ARNm, et de son activité enzymatique.^{163–165} Ainsi, des inhibiteurs de *hsTY* pourraient retarder la synthèse de neuromélanine et donc l'apparition des symptômes de neurodégénérescence, ouvrant la voie à un nouvel axe de recherche sur la maladie.

Dans un autre registre, la production de mélanine a lieu également au sein d'autres organismes, comme les bactéries et les champignons. Si la structure de cette mélanine varie, elle est connue pour jouer un rôle important dans la virulence et dans la résistance à l'action de molécules antimicrobiennes,¹⁶⁶ de manière assez analogue à la résistance du mélanome évoquée au chapitre précédent. Ainsi, réduire la production de mélanine dans ces pathogènes pourrait constituer un axe de recherche pertinent et novateur. Chez le champignon en particulier, la mélanine est générée par deux voies principales : la

voie du 1,8-dihydroxynaphthalène (DHN), qui est formé par l'action de polycétide synthases, et dont la polymérisation mène à la formation de mélanine ; et la voie du L-DOPA, similaire à son équivalent chez les mammifères.¹⁶⁷ Dans ce contexte, l'inhibition des TYs de champignon présente un intérêt potentiel au niveau de cette seconde voie puisque, comme chez l'Homme, TY est partie prenante dans la biosynthèse de la mélanine. De la même manière, TY intervient dans la biosynthèse de la mélanine bactérienne, et un parallèle a été dressé récemment entre l'inhibition de TY et l'action antibactérienne de certains composés.¹⁶⁸ En particulier, une TY issue de *Pseudomonas aeruginosa*, nommée PvdP, a récemment été caractérisée. Son implication dans la biosynthèse de la pyoverdine, le principal sidérophore de la bactérie, permet de la considérer comme une cible potentielle, les mutants déficients en pyoverdine étant non infectieux.¹⁶⁹ Ainsi, le développement d'inhibiteurs spécifiques de TYs de champignon et/ou de bactérie contribuerait à une meilleure compréhension des modalités de production et des rôles des mélanines microbiennes, qui restent très mal connues aujourd'hui, tout en ouvrant de nouvelles perspectives dans la recherche d'agents anti-infectieux.

CURRICULUM VITÆ



ROMAIN HAUDECOEUR

Docteur en Chimie-Biologie

Nationalité : Française

Date de naissance : 4 Janvier 1985

Lieu de naissance : Reims, France

Adresse professionnelle :

Bâtiment E Pôle Chimie
BP 53 – 38041 Grenoble Cedex 9, France
+33 (0)4 76 63 53 09
Romain.Haudecoeur@univ-grenoble-alpes.fr

Adresse personnelle :

8 chemin Thiers
38100 Grenoble, France
+33 (0)4 76 42 29 92

FORMATION

2008–2011. Doctorat de Chimie-Biologie en cotutelle internationale, Université de Grenoble, France et Université de Genève, Suisse.

Mention très honorable.

2006–2008. Master « Chimie et procédés », spécialité « Synthèse Organique pour les Industries Pharmaceutiques et Agrochimiques », Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Principaux cours suivis : Synthèse asymétrique, stratégies de synthèse, chimie verte, hétérocycles, biocatalyse, techniques spectroscopiques.

2005–2006. Licence 3 « Chimie » Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

2003–2005. DEUG « Sciences de la Vie dominante Chimie », Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France.

2003. Baccalauréat série Scientifique, option Physique-Chimie, Lycée Franklin Roosevelt, Reims, France.

EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES

Depuis 2012. Ingénieur de Recherche en Élaboration de Biomolécules, Université Grenoble-Alpes, Grenoble, France.

Contexte : Département de Pharmacochimie Moléculaire.

Thématiques : Détergents stabilisant les protéines membranaires par réseau de ponts salins multiples ; potentiateurs de $\Delta 508$ -CFTR dans le cadre du traitement de la mucoviscidose ; nouveaux inhibiteurs de la tyrosinase humaine.

Autres activités : Enseignement en chimie organique et *drug design* (UFR Pharmacie et Chimie).

2011–2012. Post-doctorant, Université de Bourgogne, Dijon, France.

Contexte : Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB), sous la supervision du Dr D. Monchaud.

Thématiques : Développement de tétrades de guanine synthétiques hydrosolubles comme ligands de G-quadruplexes et catalyseurs de réactions de type DNAzyme.

2008–2011. Doctorant en Chimie-Biologie, Université de Grenoble, France et Université de Genève, Suisse.

Contexte : Département de Pharmacochimie Moléculaire et École de Pharmacie Genève-Lausanne, sous la supervision du Prof. A. Boumendjel et du Prof. P.-A. Carrupt.

Thématiques : Inhibition de la polymérase NS5B du virus de l'hépatite C par les auronés ; modulation de l'activité de tyrosinases de différentes sources par des auronés ; développement d'une synthèse biomimétique du tramadol et séparation de ses énantiomères.

Autres activités : Moniteur d'initiation à l'enseignement supérieur (UFR Pharmacie).

2008 (6 mois). Stage de Master 2, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Contexte : Département de Pharmacochimie Moléculaire et Département de Chimie Moléculaire, sous la supervision du Prof. A. Boumendjel et du Dr. C. Belle.

Thématiques : Inhibition de la tyrosinase par la famille des aurones : de l'étude des interactions avec des complexes modèles biomimétiques à la synthèse de nouveaux motifs d'intérêt.

2007 (4 mois). Stage de Master 1, CEA, Grenoble, France.

Contexte : Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, sous la supervision du Dr. O. Hamelin.

Thématiques : Catalyse énantiosélective de cyclopropanations et d'aziridinations par des complexes de ruthénium chiraux sur le métal.

2006 (2 mois). Stage de Licence 3, Université de Zurich, Zurich, Suisse.

Contexte : Département de Chimie, sous la supervision du Prof. Stefan Bienz.

2005 (1 mois). Stage de Licence 2, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Contexte : Laboratoire d'Études Dynamiques et Structurales de la Sélectivité, sous la supervision du Dr. Sandrine Py.

PUBLICATIONS

Articles

- [24] L. Froux, A. Elbahnsi, B. Boucherle, A. Billet, N. Baatallah, B. Hoffmann, J. Alliot, R. Zelli, W. Zeinyeh, R. Haudecoeur, B. Chevalier, A. Fortuné, S. Mirval, C. Simard, P. Lehn, J.-P. Mornon, A. Hinzpeter, F. Becq, I. Callebaut, J.-L. Décout. Targeting different binding sites in the CFTR structures allows to synergistically potentiate channel activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *190*, 112116 (I.F. 4,816).
- [23] H. Olleik, S. Yahiaoui, B. Roulier, É. Courvoisier-Dezord, J. Perrier, B. Pérès, A. Hijazi, E. Baydoun, J. Raymond, A. Boumendjel, M. Maresca, R. Haudecoeur. Aurone derivatives as promising antibacterial agents against resistant Gram-positive pathogens. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *165*, 133–141 (I.F. 4,816).
- [22] C. Dumontet, G. Beck, F. Gardebien, R. Haudecoeur, D. Mathé, E.-L. Matera, A. Tournette, E. Mattei, J. Esmenjaud, C. Boyère, A. Nurisso, M. Peuchmaur, B. Pérès, G. Bouchaud, A. Magnan, G. Monneret, A. Boumendjel. Piperidinyl-embedded chalcones possessing anti PI3K δ inhibitory properties exhibit anti-atopic properties in preclinical models. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 405–413 (I.F. 4,816).
- [21] K.-A. Nguyen, M. Peuchmaur, S. Magnard, R. Haudecoeur, C. Boyère, S. Mounien, I. Benammar, V. Zampieri, S. Igonet, V. Chaptal, A. Jawhari, A. Boumendjel, P. Falson. Glycosyl-substituted dicarboxylates as detergents for the extraction, overstabilization, and

- crystallization of membrane proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2948–2952 (I.F. 12,102).
- [20] R. Haudecoeur, M. Peuchmaur, B. Pérès, M. Rome, G. Sotoing Taiwe, A. Boumendjel, B. Boucherle. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of African *Nauclea* species: a review. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *212*, 106–136 (I.F. 3,115).
- [19] R. Zelli, W. Zeinyeh, R. Haudecoeur, J. Alliot, B. Boucherle, I. Callebaut, J.-L. Décout. A one-pot synthesis of highly functionalized purines. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 6360–6363 (I.F. 6,492).
- [18] B. Boucherle, M. Peuchmaur, A. Boumendjel, R. Haudecoeur. Occurrences, biosynthesis and properties of auronones as high-end evolutionary products. *Phytochemistry* **2017**, *142*, 92–111 (I.F. 3,186)
→ Couverture de *Phytochemistry*, Octobre 2017, volume 142 (doi : 10.1016/S0031-9422(17)30270-4).
- [17] R. Haudecoeur, M. Carotti, A. Gouron, M. Maresca, E. Buitrago, R. Hardré, E. Bergantino, H. Jamet, C. Belle, M. Réglier, L. Bubacco, A. Boumendjel. 2-Hydroxypyridine-*N*-oxide-embedded auronones as potent human tyrosinase inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 55–60 (I.F. 3,794).
→ Couverture de *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 12 Janvier 2017, volume 8, issue 1.
- [16] E. Buitrago, R. Hardré, R. Haudecoeur, H. Jamet, C. Belle, A. Boumendjel, L. Bubacco, M. Réglier. Are human tyrosinase and related proteins suitable targets for melanoma therapy? *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 3033–3047 (I.F. 3,374).
- [15] B. Boucherle, R. Haudecoeur, E. Ferreira Queiroz, M. De Waard, J.-L. Wolfender, R. J. Robins, A. Boumendjel. *Nauclea latifolia*: biological activity and alkaloid phytochemistry of a West African tree. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 1034–1043 (I.F. 11,406).
→ Couverture de *Natural Product Reports*, 01 Septembre 2016, volume 33, issue 9 (doi : 10.1039/C6NP90036D).
- [14] E. Markova, M. Kotik, A. Krenkova, P. Man, R. Haudecoeur, A. Boumendjel, R. Hardré, Y. Mekmouche, É. Courvoisier-Dezord, M. Réglier, L. Martinkova. Recombinant tyrosinase from *Polyporus arcularius*: Overproduction in *Escherichia coli*, characterization and use in a study of auronones as tyrosinase effectors. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 2925–2931 (I.F. 3,412).
- [13] A. Laguerre, M. Levillain, L. Stefan, R. Haudecoeur, F. Katranji, M. Pirrotta, D. Monchaud. Synthetic G-quartet as versatile nanotools for the luminescent detection of G-quadruplexes. *Chimia* **2015**, *69*, 530–536 (I.F. 1,245).

- [12] F. Lecerf-Schmidt, R. Haudecoeur, B. Pérès, M. Marçal Ferreira Queiroz, L. Marcourt, S. Challal, E. Ferreira Queiroz, G. Sotoing Taiwe, T. Lomberget, M. Le Borgne, J.-L. Wolfender, M. De Waard, R. J. Robins, A. Boumendjel. Biomimetic synthesis of Tramadol. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 14451–14453 (I.F. 6,290).
- [11] R. Haudecoeur, A. Gouron, C. Dubois, H. Jamet, M. Lightbody, R. Hardré, A. Milet, E. Bergantino, L. Bubacco, C. Belle, M. Réglie, A. Boumendjel. Investigation of binding-site homology between mushroom and bacterial tyrosinases by using auronones as effectors. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1325–1333 (I.F. 2,774).
- [10] A. Meguellati, A. Ahmed-Belkacem, W. Yi, R. Haudecoeur, M. Crouillère, R. Brillet, J.-M. Pawlowsky, A. Boumendjel, M. Peuchmaur. B-ring modified auronones as promising allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 579–592 (I.F. 4,816).
- [9] A. Boumendjel, G. Sotoing Taiwe, E. Ngo Bum, T. Chabrol, C. Beney, V. Sinniger, R. Haudecoeur, L. Marcourt, S. Challal, E. Ferreira Queiroz, F. Souard, M. Le Borgne, T. Lomberget, A. Depaulis, C. Lavaud, R. J. Robins, J.-L. Wolfender, B. Bonaz, M. De Waard. Occurrence of the synthetic analgesic tramadol in an African medicinal plant. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11780–11784 (I.F. 12,102).
- Résumé dans “African tree gets to the root of pain”. *Nature* **2013**, *501*, 285 (doi : 10.1038/501285b).
- [8] R. Haudecoeur, M. Peuchmaur, A. Ahmed-Belkacem, J.-M. Pawlowsky, A. Boumendjel. Structure-activity relationships in the development of allosteric hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase inhibitors: Ten years of research. *Med. Res. Rev.* **2013**, *33*, 934–984 (I.F. 8,290).
- [7] R. Haudecoeur, L. Stefan, D. Monchaud. Multitasking water-soluble synthetic G-quartets: From preferential RNA-quadruplex interaction to biocatalytic activity. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 12739–12747 (I.F. 5,160).
- [6] R. Haudecoeur, L. Stefan, F. Denat, D. Monchaud. A model of smart G-quadruplex ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 550–553 (I.F. 14,357).
- Recommandé par la F1000 Faculty (doi : 10.3410/f.717968847.793468493).
- [5] H.-J. Xu, L. Stefan, R. Haudecoeur, S. Vuong, P. Richard, F. Denat, J.-M. Barbe, C. P. Gros, D. Monchaud. Porphyrin-templated synthetic G-quartet (PorphySQ): A second prototype of G-quartet-based G-quadruplex ligand. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5212–5218 (I.F. 3,423).

- [4] R. Haudecoeur, A. Boumendjel. Recent advances in the medicinal chemistry of aurones. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2861–2875 (I.F. 3,469).
- [3] C. Dubois, R. Haudecoeur, M. Orio, C. Belle, C. Bochot, A. Boumendjel, R. Hardré, H. Jamet, M. Réglie. Versatile effect of aurone structure on mushroom tyrosinase activity. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 559–565 (I.F. 2,774).
- [2] R. Haudecoeur, A. Ahmed-Belkacem, W. Yi, A. Fortuné, R. Brillet, C. Belle, E. Nicolle, C. Pallier, J.-M. Pawlowsky, A. Boumendjel. Discovery of naturally occurring aurones that are potent allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5395–5402 (I.F. 6,253).
- [1] W. Yi, C. Dubois, S. Yahiaoui, R. Haudecoeur, C. Belle, H. Song, R. Hardré, M. Réglie, A. Boumendjel. Refinement of arylthiosemicarbazone pharmacophore in inhibition of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4330–4335 (I.F. 4,816).

Actes de conférences

- [7] B. Hoffmann, J.-P. Mornon, B. Boucherle, A. Fortuné, R. Haudecoeur, C. Boinot, M. Jolivet, J.-L. Décout, F. Becq, P. Lehn, I. Callebaut. *J. Cyst. Fibros.* **2014**, *13*, S43 (37th European Cystic Fibrosis Conference, June 11–14, 2014, Gothenburg, Sweden).
- [6] C. Belle, A. Vuillamy, G. Serratrice, W. Yi, A. Boumendjel, R. Haudecoeur, C. Dubois, R. Hardré, M. Réglie. Exploring N/S compound interactions with dicopper center: from model studies to new inhibitors of type 3 copper enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19*, S678 (16th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, July 22–26, 2013, Grenoble, France).
- [5] A. Gouron, C. Belle, A. Milet, H. Jamet, R. Haudecoeur, A. Boumendjel. A QM/MM study of the binding of aurones to bacterial and mushroom Ty. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19*, S252 (16th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, July 22–26, 2013, Grenoble, France).
- [4] R. Hardré, M. Réglie, C. Dubois, C. Belle, R. Haudecoeur, A. Boumendjel. New insights in tyrosinase inhibition. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19*, S196 (16th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, July 22–26, 2013, Grenoble, France).
- [3] L. Stefan, R. Haudecoeur, F. Denat, D. Monchaud. ^{PNA}DOTASQ as a model of multitasking intramolecular synthetic G-quartet. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2013**, 246 (246th American Chemical Society National Meeting & Exposition, September 8–12, 2013, Indianapolis, U.S.).

- [2] A. Ahmed-Belkacem, R. Haudecoeur, W. Yi, A. Fortuné, R. Brillet, C. Belle, E. Nicolle, C. Pallier, J.-M. Pawlotsky, A. Boumendjel. Discovery of naturally occurring aurones that are potent allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Hepatology* **2011**, *54*, 538A (18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, September 8–12, 2011, Seattle, U.S.).
- [1] R. Haudecoeur, C. Dubois, A. Boumendjel, C. Belle, M. Réglie. N-oxyde aurones as new, potent and non-toxic Tyrosinase inhibitors. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2010**, *240* (240th American Chemical Society National Meeting & Exposition, August 22–26, 2010, Boston, U.S.).

Brevets

- [3] J.-L. Décout, R. Zelli, W. Zeinyeh, B. Boucherle, R. Haudecoeur. Methods for synthesizing diversely substituted purines. PCT WO2018203099, 8 Novembre 2018.
- [2] I. Callebaut, J.-P. Mornon, J.-L. Décout, F. Becq, P. Lehn, B. Hoffmann, B. Boucherle, R. Haudecoeur, A. Fortuné, C. Boinot, J. Alliot. Compounds for treating cystic fibrosis. PCT WO2016087665, 9 Juin 2016.
- [1] A. Boumendjel, R. Haudecoeur, A. Ahmed-Belkacem, J.-M. Pawlotsky, R. Brillet, C. Belle. Nouveaux dérivés hétérocycliques, pour leur activité antivirale, en particulier pour le traitement du VHC. FR 1056035, 23 Juillet 2010.

Données bibliométriques (au 10/06/2020)

Web of Science : 30 documents, 493 citations, *h*-index de 14.

Google Scholar : 35 documents, 667 citations, *h*-index de 15.

SciVerse Scopus : 24 documents, 511 citations, *h*-index de 14.

ORCID : 0000-0002-6271-4717.

ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT

Tableau des enseignements

Le tableau suivant indique la répartition des 385,5 heures effectuées entre 2008 et 2020. Ces heures s'entendent en équivalents Travaux Dirigés (TD). Une heure de Travaux Pratiques (TP) et une heure de Cours Magistral (CM) correspondent respectivement à une heure et une heure et demi équivalent TD.

Module	Filière	Monitorat (Doctorat)			Vacations (IR)			Total
		08-09	09-10	10-11	13-15	15-17	17-20	
CM Chimie Organique	PACES	–	–	–	48	–	–	48
	4 ^e année Pharmacie	–	–	–	12,5	12,5	–	25
TD Chimie Organique	1 ^e année Pharmacie	34,5	–	–	–	–	–	34,5
	4 ^e année Pharmacie	–	–	–	9	8	–	17
	Licence 2 Biotechnol.	–	–	6	1,5	–	–	7,5
	Licence 3 Biotechnol.	–	–	–	–	12	6	18
	Licence 3 Chimie	–	–	–	–	–	13,5	13,5
TP Chimie Organique	2 ^e année Pharmacie	40	64	50	20	–	–	174
	Licence 2 Chimie	–	–	–	–	16	19,5	35,5
TP Drug Design	Master 2 Chimie Médicinale	–	–	–	–	2,5	7,5	10
	4 ^e année Pharmacie	–	–	–	–	–	2,5	2,5
Total des enseignements		74,5	64	56	91	51	49	385,5

ACTIVITÉS D'ENCADREMENT

Encadrement d'étudiants de Licence / Master 1

- Oliver White (ERASMUS Royaume-Uni niveau M1, Septembre 2017 à Mars 2018) : Voies d'accès à une nouvelle série de détergents hétérocycliques pour la cristallisation de protéines membranaires (50% d'encadrement).
- Patrick Tordjman (L3 Biotechnologies, Juin et Juillet 2015) : Synthèse de flavonoïdes bioactifs de type aurone et chalcone (100% d'encadrement).
- Mark Lightbody (ERASMUS Écosse niveau M1, Septembre et Octobre 2011) : Synthèse de dérivés d'aurone comme inhibiteurs de tyrosinases (50% d'encadrement). **Publication d'un article commun, numéro 11 dans la liste des Articles.**

- Benjamin Canard (3^e année de Pharmacie, Juin et Juillet 2010) : Nouvelles voies d'accès à des inhibiteurs de l'enzyme NS5B (100% d'encadrement).
- Anne Bossow (ERASMUS Allemagne niveau L3, Mai et Juin 2010) : Nouvelles voies d'accès à des inhibiteurs de l'enzyme NS5B (100% d'encadrement).

Encadrement d'étudiants de Master 2

- Tuán Tàì Phàm (Master 2 Chimie Médicinale et Innovation Pharmacologique, Janvier à Juin 2018) : Synthèse de détergents dicarboxylates basés sur la sérine pour la cristallisation de protéines membranaires (50% d'encadrement).
- Léonie Pellissier (5^e année de Pharmacie, Janvier à Avril 2015) : Synthèse et extraction de produits naturels (50% d'encadrement).
- Marine Levillain (Master 2 Chimie, Février à Juillet 2012) : Synthèse et évaluation d'une tétrade de guanine synthétique pour la détection luminescente des G-quadruplex (50% d'encadrement). **Publication d'un article commun, numéro 13 dans la liste des Articles.**

Encadrement de doctorants

- Brayan Roulier (Doctorat de Chimie-Biologie, depuis Octobre 2018) : Synthèse et évaluation d'inhibiteurs et de sondes sélectifs de la tyrosinase humaine (50% d'encadrement). **Publication d'un article commun, numéro 23 dans la liste des Articles.**

RESPONSABILITÉS

Responsabilités scientifiques

- Coordinateur du contrat ANR JCJC « EPIDERMIS : Vers des sondes et inhibiteurs conçus pour interagir avec *hsTY* : une voie vers la suppression de la mélanogenèse *in vivo* » (ANR-19-CE44-0002, 2019–2023, 184 960 €). Participation à hauteur de 36 personne.mois (75%).
- Participant au contrat ANR « CLAMP2 : Stabilisateurs moléculaires des protéines membranaires pour leur étude structurale en solution » (ANR-18-CE11-0002, 2018–2022, 434 078 €). Participation à hauteur de 26 personne.mois (72%).

- Participant au contrat ANR « NAUTRAM : Caractérisation de la production des composés thérapeutiques et du tramadol naturel par les arbustes *Nauclea latifolia* : voies de biosynthèse, impacts génétiques et environnementaux, et recherche de composés bioactifs analogues » (ANR-16-CE20-0005, 2016–2020, 532 239 €). Participation à hauteur de 18 personne.mois (37,5%).
- « Task Leader » au sein du contrat ANR « CLAMP : Détergents stabilisants des protéines membranaires par réseau de ponts salins multiples pour leur étude et cristallisation en solution. Application aux pompes ABC d’efflux de multiples médicaments » (ANR-13-BSV5-0001, 2013–2017, 330 000 €). Participation à hauteur de 18 personne.mois (50%).
- Reviewer pour une quinzaine d’articles dans les journaux suivants : *J. Med. Chem.*, *Eur. J. Med. Chem.*, *Molecules*, *ChemMedChem*, *Bioorg. Med. Chem.*, *Int. J. Mol. Sci.*
- Évaluateur de propositions scientifiques dans le cadre de différents appels à projets (AAP « Biomimétisme » 2019 du CNRS ; AAP « Personal Research Grant » 2019 de l’« Israel Science Foundation »).
- Membre de jury de thèse (examineur, thèse de Hamza Olleik, Marseille, 12 Décembre 2019).

Autres responsabilités

- Co-organisateur des Journées Scientifiques du Médicament : programmation scientifique, refonte et administration du site web, communication, gestion des inscriptions et accueil des participants (éditions 2018 et 2019).
- Membre nommé au Conseil de Laboratoire du Département de Pharmacochimie Moléculaire (depuis 2016).
- Pilote principal pour la mise en place d’une démarche qualité au laboratoire (depuis 2015).
- Membre du comité de pilotage pour la mise en place d’une chimiothèque au laboratoire (2015–2016).
- Co-responsable de la gestion des stocks et commandes de produits chimiques au laboratoire (depuis 2013).
- Responsable de la gestion des stocks et commandes de solvants et consommables de l’équipe « MedChem » au laboratoire (depuis 2012).

RÉFÉRENCES

- [1] L. Leclercq. La chimie française vers les mécanismes réactionnels (1800-1930). *L'Act. Chim.* **2009**, 329, 42–50.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [3] J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature* **1958**, 181, 662–666.
- [4] L. H. Sternbach. The benzodiazepine story. *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 1–7.
- [5] M. Gates, G. Tschudi. The synthesis of morphine. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 1380–1393.
- [6] P. J. Flory. *Principles of polymer chemistry*. Cornell University Press, **1953**.
- [7] C. J. Pedersen. Synthesis and characterization of crown ethers. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 7017–7036.
- [8] G. M. Whitesides. Reinventing chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 3196–3209.
- [9] E. Fischer. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985–2993.
- [10] P. Ehrlich, J. Morgenroth. Über Haemolysine. Dritte Mittheilung. *Berl. Klin. Wschr.* **1900**, 37, 453–458.
- [11] D. E. Koshland. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, 44, 98–104.
- [12] J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **1965**, 12, 88–118.
- [13] G. Wess, M. Urmann, B. Sickenberger. Medicinal chemistry: challenges and opportunities. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3341–3350.
- [14] J. A. Thompson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, J. M. Jones. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **1998**, 282, 1145–1147.

- [15] International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860–921.
- [16] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton *et al.* The sequence of the human genome. *Science* **2001**, *291*, 1304–1351.
- [17] R. F. Sweis. Target (in)validation: a critical, sometimes unheralded, role of modern medicinal chemistry. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 618–621.
- [18] S. L. Schreiber. Small molecules: the missing link in the central dogma. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 64–66.
- [19] An emerging role for chemical biology. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 121.
- [20] M. Köhn, R. Breinbauer. The Staudinger ligation—a gift to chemical biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106–3116.
- [21] P. Thirumurugan, D. Matosiuk, K. Jozwiak. Click chemistry for drug development and diverse chemical-biology applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905–4979.
- [22] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272–1279.
- [23] L. D. Lavis, R. T. Raines. Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142–155.
- [24] L. D. Lavis, R. T. Raines. Bright building blocks for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 855–866.
- [25] D. J. Lapinsky, D. S. Johnson. Recent developments and applications of clickable photoprobes in medicinal chemistry and chemical biology. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 2143–2171.
- [26] J. A. Johnson, Y. Y. Liu, J. A. Van Deventer, D. A. Tirrell. Residue-specific incorporation of non-canonical amino acids into proteins: recent developments and applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 774–780.
- [27] N. Krall, F. P. da Cruz, O. Boutureira, G. J. L. Bernardes. Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 103–113.
- [28] P. E. Nielsen. Peptide Nucleic Acids (PNA) in chemical biology and drug discovery. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 786–804.
- [29] D. E. Scott, A. G. Coyne, S. A. Hudson, C. Abell. Fragment-based approaches in drug design and chemical biology. *Biochemistry* **2012**, *51*, 4990–5003.
- [30] U. Rix, G. Superti-Furga. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *9*, 616–624.
- [31] L. K. Henchey, A. L. Jochim, P. S. Arora. Contemporary strategies for the stabilization of peptides in the α -helical conformation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 692–697.

[32] D. Bier, P. Thiel, J. Briels, C. Ottmann. Stabilization of protein–protein interactions in chemical biology and drug discovery. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2015**, *119*, 10–19.

[33] A. T. Plowright, C. Ottmann, M. Arkin, Y. P. Auberson, H. Timmerman, H. Waldmann. Joining forces: the chemical biology–medicinal chemistry continuum. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 1058–1065.

[34] T. L. Brown, H. E. LeMay. *Chemistry: The Central Science*. Prentice Hall, **1977**.

[35] A. Mallinger, S. Crumpler, M. Pichowicz, D. Waalboer, M. Stubbs, O. Adeniji-Popoola, B. Wood, E. Smith, C. Thai, A. T. Henley, K. Georgi, W. Court, S. Hobbs, G. Box, M.-J. Ortiz-Ruiz, M. Valenti, A. De Haven Brandon, R. TePoele, B. Leuthner, P. Workman, W. Aherne, O. Poeschke, T. Dale, D. Wienke, C. Esdar, F. Rohdich, F. Raynaud, P. A. Clarke, S. A. Eccles, F. Stieber, K. Schiemann, J. Blagg. Discovery of potent, orally bioavailable, small-molecule inhibitors of WNT signaling from a cell-based pathway screen. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1717–1735.

[36] T. Dale, P. A. Clarke, C. Esdar, D. Waalboer, O. Adeniji-Popoola, M.-J. Ortiz-Ruiz, A. Mallinger, R. S. Samant, P. Czodrowski, D. Musil, D. Schwarz, K. Schneider, M. Stubbs, K. Ewan, E. Fraser, R. TePoele, W. Court, G. Box, M. Valenti, A. de Haven Brandon, S. Gowan, F. Rohdich, F. Raynaud, R. Schneider, O. Poeschke, A. Blaukat, P. Workman, K. Schiemann, S. A. Eccles, D. Wienke, J. Blagg. A selective chemical probe for exploring the role of CDK8 and CDK19 in human disease. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 973–980.

[37] A. Mallinger, K. Schiemann, C. Rink, F. Stieber, M. Calderini, S. Crumpler, M. Stubbs, O. Adeniji-Popoola, O. Poeschke, M. Busch, P. Czodrowski, D. Musil, D. Schwarz, M.-J. Ortiz-Ruiz, R. Schneider, C. Thai, M. Valenti, A. de Haven Brandon, R. Burke, P. Workman, T. Dale, D. Wienke, P. A. Clarke, C. Esdar, F. I. Raynaud, S. A. Eccles, F. Rohdich, J. Blagg. Discovery of potent, selective, and orally bioavailable small-molecule modulators of the mediator complex-associated kinases CDK8 and CDK19. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1078–1101.

[38] C. G. Parker, A. Galmozzi, Y. Wang, B. E. Correia, K. Sasaki, C. M. Joslyn, A. S. Kim, C. L. Cavallaro, R. M. Lawrence, S. R. Johnson, I. Narvaiza, E. Saez, B. F. Cravatt. Ligand and target discovery by fragment-based screening in human cells. *Cell* **2017**, *168*, 527–541.

[39] A. Shao, C. W. Kang, C.-H. A. Tang, C. F. Cain, Q. Xu, C. M. Phoumyvong, J. R. Del Valle, C.-C. A. Hu. Structural tailoring of a novel fluorescent IRE-1 RNase inhibitor to precisely control its activity. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 5404–5413.

[40] S. Ito. A chemist’s view of melanogenesis. *Pigm. Cell Res.* **2003**, *16*, 230–236.

[41] S. Okombi, D. Rival, S. Bonnet, A.-M. Mariotte, E. Perrier, A. Boumendjel. A. Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2*H*)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 329–333.

- [42] A. Boumendjel. Aurones: a subclass of flavones with promising biological potential. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2621–2630.
- [43] R. Haudecoeur, A. Boumendjel. Recent advances in the medicinal chemistry of aurones. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2861–2875.
- [44] Y. Matoba, T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitsu, M. Sugiyama. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8981–8990.
- [45] C. Dubois, R. Haudecoeur, M. Orio, C. Belle, C. Bochot, A. Boumendjel, R. Hardré, H. Jamet, M. Réglie. Versatile effect of aurone structure on mushroom tyrosinase activity. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 559–565.
- [46] R. Haudecoeur, A. Gouron, C. Dubois, H. Jamet, M. Lightbody, R. Hardré, A. Milet, E. Bergantino, L. Bubacco, C. Belle, M. Réglie, A. Boumendjel. Investigation of binding-site homology between mushroom and bacterial tyrosinases by using aurones as effectors. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1325–1333.
- [47] E. Markova, M. Kotik, A. Krenkova, P. Man, R. Haudecoeur, A. Boumendjel, R. Hardré, Y. Mekmouche, E. Courvoisier-Dezord, M. Réglie, L. Martinkova. Recombinant tyrosinase from *Polyporus arcularius*: Overproduction in *Escherichia coli*, characterization and use in a study of aurones as tyrosinase effectors. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 2925–2931.
- [48] R. Haudecoeur, M. Carotti, A. Gouron, M. Maresca, E. Buitrago, R. Hardré, E. Bergantino, H. Jamet, C. Belle, M. Réglie, L. Bubacco, A. Boumendjel. 2-Hydroxypyridine-*N*-oxide-embedded aurones as potent human tyrosinase inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 55–60.
- [49] I. Melnikova. Hepatitis C therapies. *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 799–800.
- [50] R. Haudecoeur, A. Ahmed-Belkacem, W. Yi, A. Fortuné, R. Brillet, C. Belle, E. Nicolle, C. Pallier, J.-M. Pawlotsky, A. Boumendjel. Discovery of naturally occurring aurones that are potent allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5395–5402.
- [51] A. Meguellati, A. Ahmed-Belkacem, W. Yi, R. Haudecoeur, M. Crouillère, R. Brillet, J.-M. Pawlotsky, A. Boumendjel, M. Peuchmaur. B-ring modified aurones as promising allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 579–592.
- [52] A. Boumendjel, G. Sotoing Taiwe, E. Ngo Bum, T. Chabrol, C. Beney, V. Sinniger, R. Haudecoeur, L. Marcourt, S. Challal, E. Ferreira Queiroz, F. Souard, M. Le Borgne, T. Lomberget, A. Depaulis, C. Lavaud, R. J. Robins, J.-L. Wolfender, B. Bonaz, M. De Waard. Oc-

currence of the synthetic analgesic tramadol in an African medicinal plant. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11780–11784.

[53] S. Kusari, S. J. N. Tatsimo, S. Zühlke, F. M. Talontsi, S. F. Kouam, M. Spitteller. Tramadol—A true natural product? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12073–12076.

[54] S. Kusari, S. J. N. Tatsimo, S. Zühlke, M. Spitteller. Synthetic origin of tramadol in the environment. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 240–243.

[55] K. M. Romek, P. Nun, G. S. Remaud, V. Silvestre, G. Sotoing Taiwe, F. Lecerf-Schmidt, A. Boumendjel, M. De Waard, R. J. Robins. A retro-biosynthetic approach to the prediction of biosynthetic pathways from position-specific isotope analysis as shown for tramadol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, *112*, 8296–8301.

[56] F. Lecerf-Schmidt, R. Haudecoeur, B. Pérès, M. M. Ferreira Queiroz, L. Marcourt, S. Challal, E. Ferreira Queiroz, G. Sotoing Taiwe, T. Lomberget, M. Le Borgne, J.-L. Wolfender, M. De Waard, R. J. Robins, A. Boumendjel. Biomimetic synthesis of Tramadol. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 14451–14453.

[57] B. Boucherle, R. Haudecoeur, E. Ferreira Queiroz, M. De Waard, J.-L. Wolfender, R. J. Robins, A. Boumendjel. *Nauclea latifolia*: biological activity and alkaloid phytochemistry of a West African tree. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 1034–1043.

[58] R. Haudecoeur, M. Peuchmaur, B. Pérès, M. Rome, G. Sotoing Taiwe, A. Boumendjel, B. Boucherle. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of African *Nauclea* species: a review. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *212*, 106–136.

[59] L. Stefan, A. Guédin, S. Amrane, N. Smith, F. Denat, J.-L. Mergny, D. Monchaud. DOTASQ as a prototype of nature-inspired G-quadruplex ligand. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4992–4994.

[60] R. Haudecoeur, L. Stefan, F. Denat, D. Monchaud. A model of smart G-quadruplex ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 550–553.

[61] R. Haudecoeur, L. Stefan, D. Monchaud. Multitasking water-soluble synthetic G-quartets: From preferential RNA-quadruplex interaction to biocatalytic activity. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 12739–12747.

[62] L. Stefan, F. Denat, D. Monchaud. Deciphering the DNAzyme activity of multimeric quadruplexes: insights into their actual role in the telomerase activity evaluation assay. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20405–20415.

[63] H.-J. Xu, L. Stefan, R. Haudecoeur, S. Vuong, P. Richard, F. Denat, J.-M. Barbe, C. P. Gros, D. Monchaud. Porphyrin-templated synthetic G-quartet (PorphySQ): A second prototype of G-quartet-based G-quadruplex ligand. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5212–5218.

- [64] A. Laguerre, M. Levillain, L. Stefan, R. Haudecoeur, F. Katranji, M. Pirrotta, D. Monchaud. Synthetic G-quartet as versatile nanotools for the luminescent detection of G-quadruplexes. *Chimia* **2015**, *69*, 530–536.
- [65] R. Zelli, W. Zeinyeh, R. Haudecoeur, J. Alliot, B. Boucherle, I. Callebaut, J.-L. Décourt. A one-pot synthesis of highly functionalized purines. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 6360–6363.
- [66] K.-A. Nguyen, M. Peuchmaur, S. Magnard, R. Haudecoeur, C. Boyère, S. Mounien, I. Benammar, V. Zampieri, S. Igonet, V. Chaptal, A. Jawhari, A. Boumendjel, P. Falson. Glycosyl-substituted dicarboxylates as detergents for the extraction, overstabilization, and crystallization of membrane proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2948–2952.
- [67] M. Yaar. Cutaneous pigmentation in health and disease: novel and well-established players. *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133*, 11–13.
- [68] A. A. Brozyna, W. Jozwicki, J. A. Carlson, A. T. Slominski. Melanogenesis affects overall and disease-free survival in patients with stage III and IV melanoma. *Hum. Pathol.* **2013**, *44*, 2071–2074.
- [69] E. Buitrago, R. Hardré, R. Haudecoeur, H. Jamet, C. Belle, A. Boumendjel, L. Bubacco, M. Réglier. Human tyrosinase and related proteins, are they targets for melanoma therapy? *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 3033–3047.
- [70] M. Rastrelli, S. Tropea, C. R. Rossi, M. Alaibac. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo* **2014**, *28*, 1005–1011.
- [71] A. A. Brozyna, L. VanMiddlesworth, A. T. Slominski. Inhibition of melanogenesis as a radiation sensitizer for melanoma therapy. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 1448–1456.
- [72] A. T. Slominski, B. Zbytek, R. Slominski. Inhibitors of melanogenesis increase toxicity of cyclophosphamide and lymphocytes against melanoma cells. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 1470–1477.
- [73] T. Pillaiyar, M. Manickam, S.-H. Jung. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options. *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 282–298.
- [74] T. Pillaiyar, V. Namasivayam, M. Manickam, S.-H. Jung. Inhibitors of melanogenesis: an updated review. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 7395–7418.
- [75] T. Pillaiyar, M. Manickam, V. Namasivayam. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 403–425.
- [76] S. Fogal, M. Carotti, L. Giarretta, F. Lanciai, L. Nogara, L. Bubacco, E. Bergantino. Human tyrosinase produced in insect cells: a landmark for the screening of new drugs addressing its activity. *Mol. Biotechnol.* **2015**, *57*, 45–57.

- [77] T. Mann, W. Gerwat, J. Batzer, K. Eggers, C. Scherner, H. Wenck, F. Stäb, V. J. Hearing, K.-H. Röhme, L. Kolbe. Inhibition of human tyrosinase requires molecular motifs distinctively different from mushroom tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* **2018**, *138*, 1601–1608.
- [78] T. J. Hornyak. Next time, save mushrooms for the pizza! *J. Invest. Dermatol.* **2018**, *138*, 1470–1472.
- [79] W. T. Ismaya, H. J. Rozeboom, A. Weijn, J. J. Mes, F. Fusetti, H. J. Wichers, B. W. Dijkstra. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* **2011**, *50*, 5477–5486.
- [80] N. Fujieda, S. Yabuta, T. Ikeda, T. Oyama, N. Muraki, G. Kurisu, S. Itoh. Crystal structures of copper-depleted and copper-bound fungal pro-tyrosinase: insights into endogenous cysteine-dependent copper incorporation. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 22128–22140.
- [81] Y. Matoba, T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitsu, M. Sugiyama. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8981–8990.
- [82] M. Sendovski, M. Kanteev, V. S. Ben-Yosef, N. Adir, A. Fishman. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J. Mol. Biol.* **2011**, *405*, 227–237.
- [83] A. Bijelic, M. Pretzler, C. Molitor, F. Zekiri, A. Rompel. The structure of a plant tyrosinase from walnut leaves reveals the importance of “substrate-guiding residues” for enzymatic specificity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14677–14680.
- [84] M. B. Dolinska, E. Kovaleva, P. Backlund, P. T. Wingfield, B. P. Brooks, Y. V. Sergeev. Albinism-causing mutations in recombinant human tyrosinase alter intrinsic enzymatic activity. *PLoS One* **2014**, *9*, e84494.
- [85] N. J. Kus, M. B. Dolinska, K. L. Young II, E. K. Dimitriadis, P. T. Wingfield, Y. V. Sergeev. Membrane-associated human tyrosinase is an enzymatically active monomeric glycoprotein. *PLoS One* **2018**, *13*, e0198247.
- [86] X. Lai, M. Soler-Lopez, H. J. Wichers, B. W. Dijkstra. Large-scale recombinant expression and purification of human tyrosinase suitable for structural studies. *PLoS One* **2016**, *11*, e0161697.
- [87] X. Lai, H. J. Wichers, M. Soler-Lopez, B. W. Dijkstra. Structure of human Tyrosinase Related Protein 1 reveals a binuclear zinc active site important for melanogenesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *129*, 9944–9947.
- [88] E. Favre, A. Daina, P.-A. Carrupt, A. Nurisso. Modeling the met form of human tyrosinase: a refined and hydrated pocket for antagonist design. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2014**, *84*, 206–215.
- [89] <http://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P14679>.

- [90] X. Lai, H. J. Wichers, M. Soler-Lopez, B. W. Dijkstra. Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 47–55.
- [91] A. Mohammadpour, M. Derakhshan, H. Darabi, P. Hedayat, M. Momeni. Melanoma: where we are and where we go. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 3307–3320.
- [92] B. Ciui, A. Martin, R. K. Mishra, B. Brunetti, T. Nakagawa, T. J. Dawkins, M. Lyu, C. Cristea, R. Sandulescu, J. Wang. Wearable wireless tyrosinase bandage and microneedle sensors: toward melanoma screening. *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, *7*, 1701264.
- [93] C. Lei, X.-E. Zhao, J. Sun, X. Yan, Y. Gao, H. Gao, S. Zhu, H. Wang. A simple and novel colorimetric assay for tyrosinase and inhibitor screening using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a chromogenic probe. *Talanta* **2017**, *175*, 457–462.
- [94] H. B. Yildiz, R. Freeman, R. Gill, I. Willner. Electrochemical, photoelectrochemical, and piezoelectric analysis of tyrosinase activity by functionalized nanoparticles. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2811–2816.
- [95] K. Nellaiappan, A. Vinayagam. A rapid method for detection of tyrosinase activity in electrophoresis. *Stain Technol.* **1986**, *61*, 269–272.
- [96] Y. M. Chen, W. Chavin. Radiometric assay of tyrosinase and theoretical considerations of melanin formation. *Anal. Biochem.* **1965**, *13*, 234–258.
- [97] X. Liu, F. Wang, A. Niazov-Elkan, W. Guo, I. Willner. Probing biocatalytic transformations with luminescent DNA/silver nanoclusters. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 309–314.
- [98] X. Li, W. Shi, S. Chen, J. Jia, H. Ma, O. S. Wolfbeis. A near-infrared fluorescent probe for monitoring tyrosinase activity. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2560–2562.
- [99] L. Chai, J. Zhou, H. Feng, C. Tang, Y. Huang, Z. Qian. Functionalized carbon quantum dots with dopamine for tyrosinase activity monitoring and inhibitor screening: in vitro and intracellular investigation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 23564–23574.
- [100] L. Kolbe, T. Mann, W. Gerwat, J. Batzer, S. Ahlheit, C. Scherner, H. Wenck, F. Stäb. 4-*n*-Butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2013**, *27*, 19–23.
- [101] M. Schlich, M. Fornasier, M. Nieddu, C. Sinico, S. Murgia, A. Rescigno. 3-Hydroxycoumarin loaded vesicles for recombinant human tyrosinase inhibition in topical applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *171*, 675–681.
- [102] T. Mann, C. Scherner, K.-H. Röhm, L. Kolbe. Structure-activity relationships of thiazolyl resorcinols, potent and selective inhibitors of human tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 690.
- [103] M. Kanteev, M. Goldfeder, A. Fishman. Structure-function correlations in tyrosinases. *Prot. Sci.* **2015**, *24*, 1360–1369.

- [104] B. Deri, M. Kanteev, M. Goldfeder, D. Lecina, V. Guallar, N. Adir, A. Fishman. The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34993.
- [105] F. A. Ragab, T. A. A. Yahya, M. M. El-Naa, R. K. Arafa. Design, synthesis and structure-activity relationship of novel semi-synthetic flavonoids as antiproliferative agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *82*, 506–520.
- [106] G. S. Hassan, H. H. Georgey, R. F. George, E. R. Mohammed. Construction of some cytotoxic agents with aurone and furoaurone scaffolds. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 27–52.
- [107] J. Zhou, W. Shi, L. Li, Q. Gong, X. Wu, X. Li, H. Ma. Detection of misdistribution of tyrosinase from melanosomes to lysosomes and its upregulation under psoralen/ultraviolet A with a melanosome-targeting tyrosinase fluorescent probe. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 4557–4564.
- [108] S. Ferro, B. Deri, M. P. Germano, R. Gitto, L. Ielo, M. R. Buemi, G. Certo, S. Vittorio, A. Rapisarda, Y. Pazy, A. Fishman, L. De Luca. Targeting tyrosinase: development and structural insights of novel inhibitors bearing arylpiperidine and arylpiperazine fragments. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 3908–3917.
- [109] H. W. Liu, L. Chen, C. Xu, Z. Li, H. Zhang, X. B. Zhang, W. Tan. Recent progresses in small-molecule enzymatic fluorescent probes for cancer imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 7140–7180.
- [110] C. Zhan, J. Cheng, B. Li, S. Huang, F. Zeng, S. Wu. A fluorescent probe for early detection of melanoma and its metastasis by specifically imaging tyrosinase activity in a mouse model. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 8807–8815.
- [111] Q. Li, C. Yan, Z. Guo, W.-H. Zhu. Ratiometric and light-up near-infrared fluorescent DCM-based probe for real-time monitoring endogenous tyrosinase activity. *Dyes Pigments* **2019**, *162*, 802–807.
- [112] Z. Li, Y.-F. Wang, C. Zeng, L. Hu, X.-J. Liang. Ultrasensitive tyrosinase-activated turn-on near-infrared fluorescent probe with a rationally designed urea bond for selective imaging and photodamage to melanoma cells. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 3666–3669.
- [113] T. Peng, N.-K. Wong, X. Chen, Y.-K. Chan, D.H.-H. Ho, Z. Sun, J. J. Hu, J. Shen, H. El-Nezami, D. Yang. Molecular imaging of peroxynitrite with HKGreen-4 in live cells and tissues. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11728–11734.
- [114] W. Zhang, P. Li, F. Yang, X. Hu, C. Sun, W. Zhang, D. Chen, B. Tang. Dynamic and reversible fluorescence imaging of superoxide anion fluctuations in live cells and in vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14956–14959.
- [115] F. Yu, P. Li, P. Song, B. Wang, J. Zhao, K. Han. Facilitative functionalization of cyanine dye by an on-off-on fluorescent switch for imaging of H₂O₂ oxidative stress and thiols reducing repair in cells and tissues. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4980–4982.

- [116] A.S. Klymchenko. Solvatochromic and fluorogenic dyes as environment-sensitive probes: design and biological applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 366–375.
- [117] Y.-D. Zhuang, P.-Y. Chiang, C.-W. Wang, K.-T. Tan. Environment-sensitive fluorescent turn-on probes targeting hydrophobic ligand-binding domains for selective protein detection. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8124–8128.
- [118] Z. Ma, Y. Lin, Y. Cheng, W. Wu, R. Cai, S. Chen, B. Shi, B. Han, X. Shi, Y. Zhou, L. Du, M. Li. Discovery of the first environment-sensitive near-infrared (NIR) fluorogenic ligand for α 1-adrenergic receptors imaging in vivo. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2151–2162.
- [119] T. Liu, Y. Gao, X. Zhang, Y. Wan, L. Du, H. Fang, M. Li. Discovery of a turn-on fluorescent probe for myeloid cell leukemia-1 protein. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 11173–11177.
- [120] Z. Liu, T. Jiang, B. Wang, B. Ke, Y. Zhou, L. Du, M. Li. Environment-sensitive fluorescent probe for the human ether-a-go-go-related gene potassium channel. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 1511–1515.
- [121] N. Shanker, O. Dilek, K. Mukherjee, D. W. McGee, S. L. Bane. Aurones: small molecule visible range fluorescent probes suitable for biomacromolecules. *J. Fluoresc.* **2011**, *21*, 2173–2184.
- [122] C. Espinosa-Bustos, D. Cortes-Arriagada, M. A. Soto-Arriaza, J. Robinson-Duggon, N. Pizarro, A. R. Cabrera, D. Fuentealba, C. O. Salas. Fluorescence properties of aurone derivatives: an experimental and theoretical study with some preliminary biological applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2017**, *16*, 1268–1276.
- [123] A. Lim, N. T. R. N. Kumara, A. L. Tan, A. H. Mirza, R. L. N. Chandrakanthi, M. I. Petra, L. C. Ming, G. K. R. Senadeera, P. Ekanayake. Potential natural sensitizers extracted from the skin of *Canarium odontophyllum* fruits for dye-sensitized solar cells. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *138*, 596–602.
- [124] N. T. R. N. Kumara, A. Lim, C. M. Lim, M. I. Petra, P. Ekanayake. Recent progress and utilization of natural pigments in dye sensitized solar cells: a review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2017**, *78*, 301–317.
- [125] Y. Xu, Y. Wang, S. Zhao, R. Guan, D. Cao, Q. Wu, X. Yu, Y. Sun. A novel fluorescence chemodosimeter for fluoride anions in aqueous solution based on siloxane-aurone moiety. *Inorg. Chem. Commun.* **2017**, *78*, 52–55.
- [126] H. Chen, Y. Sun, C. Zhou, D. Cao, Z. Liu, L. Ma. Three hydroxy aurone compounds as chemosensors for cyanide anions. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *116*, 389–393.

- [127] H. Chen, Z. Liu, D. Cao, S. Lu, J. Pang, Y. Sun. Two new fluorescence turn-on chemosensors for cyanide based on dipyridylamine and aurone moiety. *Sensors Actuators B Chem.* **2014**, *199*, 115–120.
- [128] Y. Fu, N. S. Finney. Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 29051–29061.
- [129] L. Ma, Y. Sun, D. Cao, H. Chen, Z. Liu, Q. Fang. Synthesis, crystal structure and two-photon excited fluorescence properties of three aurone derivatives. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *103*, 120–124.
- [130] Y. Xue, Y. Dou, L. An, Y. Zheng, L. Zhang, Y. Liu. Electronic structure and spectral properties of aurones as visible range fluorescent probes: a DFT/TDDFT study. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 7002–7010.
- [131] K. Munoz-Becerra, N. Villegas-Escobar, C. Zuniga-Loyola, D. Cortes-Arriagada, A. Toro-Labbé. Substituent effects on the photophysical properties of amino-aurone-derivatives. *Mol. Phys.* **2019**, *117*, 1451–1458.
- [132] C. L. Fleming, M. Grotli, J. Andréasson. On-command regulation of kinase activity using photonic stimuli. *ChemPhotoChem* **2019**, *3*, 318–326.
- [133] K. Hüll, J. Morstein, D. Trauner. *In vivo* pharmacology. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 10710–10747.
- [134] G. S. Hartley. The cis-form of azobenzene. *Nature* **1937**, *140*, 281.
- [135] A. A. Beharry, G. A. Woolley. Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437.
- [136] M. Dong, A. Babalhavaeji, S. Samanta, A. A. Beharry, G. A. Woolley. Red-shifting azobenzene photoswitches for *in vivo* use. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2662–2670.
- [137] H. Dube, I. Aprahamian, N. Tamaoki. Photoresponsive molecular switches and machines. *ChemPhotoChem* **2019**, *3*, 266–267.
- [138] M. A. Strauss, H. A. Wegner. Influence of an ammonium tag on the switching dynamics of azobenzenes in polar solvents. *ChemPhotoChem* **2019**, *3*, 392–395.
- [139] B. Shao, I. Aprahamian. pH-induced fluorescence and thermal relaxation rate modulation in a hydrazone photoswitch. *ChemPhotoChem* **2019**, *3*, 361–364.
- [140] T. Tamaguchi, Y. Kobayashi, J. Abe. Fast negative photochromism of 1,1'-binaphthyl-bridged phenoxyl-imidazolyl radical complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 906–913.
- [141] C. Petermayer, H. Dube. Indigoid photoswitches: visible light responsive molecular tools. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1153–1163.
- [142] S. Wiedbrauk, H. Dube. Hemithioindigo—an emerging photoswitch. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 4266–4274.

[143] S. Wiedbrauk, B. Maerz, E. Samoylova, A. Reiner, F. Trommer, P. Mayer, W. Zinth, H. Dube. Twisted hemithioindigo photoswitches: solvent polarity determines the types of light-induced rotations. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12219–12227.

[144] C. Petermayer, H. Dube. Circular dichroism photoswitching with a twist: axially chiral hemiindigo. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 13558–13561.

[145] A. Gerwien, M. Schildhauer, S. Thumser, P. Mayer, H. Dube. Direct evidence for hula twist and single-bond rotation photoproducts. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2510.

[146] G. Monceli, P. Ballester. Photoswitchable host-guest systems incorporating hemithioindigo and spiropyran units. *ChemPhotoChem* **2019**, *3*, 304–317.

[147] C. Petermayer, S. Thumser, F. Kink, P. Mayer, H. Dube. Hemiindigo: highly bistable photoswitching at the biooptical window. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15060–15067.

[148] F. Kink, M. P. Collado, S. Wiedbrauk, P. Mayer, H. Dube. Bistable photoswitching of hemithioindigo with green and red light: entry point to advanced molecular digital information processing. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 6237–6243.

[149] D. V. Berdnikova. Visible-range hemi-indigo photoswitch: ON–OFF fluorescent binder for HIV-1 RNA. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 8402–8405.

[150] J. E. Zweig, T. R. Newhouse. Isomer-specific hydrogen bonding as a design principle for bidirectionally quantitative and redshifted hemithioindigo photoswitches. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10956–10959.

[151] M. W. H. Hoorens, M. Medved, A. D. Laurent, M. Di Donato, S. Fanetti, L. Slappendel, M. Hilbers, B. L. Feringa, W. J. Buma, W. Szymanski. Iminothioindoxyl as a molecular photoswitch with 100 nm band separation in the visible range. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2390.

[152] S. Herre, T. Schadendorf, I. Ivanov, C. Herrberger, W. Steinle, K. Rück-Braun, R. Preissner, H. Kuhn. Photoactivation of an inhibitor of the 12/15-lipoxygenase pathway. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1089–1095.

[153] A. Sailer, F. Ermer, Y. Kraus, F. H. Lutter, C. Donau, M. Bremerich, J. Ahlfeld, O. Thorn-Seshold. Hemithioindigos for cellular photopharmacology: desymmetrised molecular switch scaffolds enabling design control over the isomer-dependency of potent antimetabolic bioactivity. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1305–1314.

[154] I. Masashi, A. Tatsuo. Photochromic and fluorescence properties of a hemiindigo in the presence of bovine serum albumin. *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 492–493.

[155] T. Loughheed, V. Borisenko, T. Hennig, K. Rück-Braun, G. A. Woolley. Photomodulation of ionic current through hemithioindigo-modified gramicidin channels. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2798–2801.

- [156] T. Corbes, B. Heinz, N. Regner, C. Hoppmann, T. E. Schrader, W. Summerer, K. Rück-Braun, W. Zinth. Photochemical $Z \rightarrow E$ isomerization of a hemithioindigo/hemistilbene ω -amino acid. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 1713–1721.
- [157] T. Cordes, C. Elsner, T. T. Herzog, C. Hoppmann, T. Schadendorf, W. Summerer, K. Rück-Braun, W. Zinth. Ultrafast hemithioindigo-based peptide-switches. *Chem. Phys.* **2009**, *358*, 103–110.
- [158] D. V. Berdnikova. Design, synthesis and investigation of water-soluble hemi-indigo photoswitches for bioapplications. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 2822–2829.
- [159] M. M. Lerch, M. J. Hansen, G. M. van Dam, W. Szymanski, B. L. Feringa. Emerging targets in photopharmacology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10978–10999.
- [160] A. M. Taylor, V. Kammath, A. Bleakley. Tyrosinase, could it be a missing link in ochronosis in alkaptonuria? *Med. Hypothesis* **2016**, *91*, 77–80.
- [161] I. Tessari, M. Bisaglia, F. Valle, B. Samori, E. Bergantino, S. Mammi, L. Bubacco. The reaction of α -synuclein with tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 16808–16817.
- [162] I. Carballo-Carbajal, A. Laguna, J. Romero-Gimenez, T. Cuadros, J. Bové, M. Martínez-Vicente, A. Parent, M. Gonzalez-Sepulveda, N. Peñuelas, A. Torra, B. Rodriguez-Galvan, A. Ballabio, T. Hasegawa, A. Bortolozzi, E. Gerpi, M. Vila. Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 973.
- [163] M. Miranda, D. Botti, A. Bonfigli, T. Ventura, A. Arcadi. Tyrosinase-like activity in normal human substantia nigra. *Gen. Pharmacol.* **1984**, *15*, 541–544.
- [164] Y. Xu, A. H. Stokes, W. M. Freeman, S. C. Kumer, B. A. Vogt, K. E. Vrana. Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra. *Mol. Brain Res.* **1997**, *45*, 159–162.
- [165] E. Greggio, E. Bergantino, D. Carter, R. Ahmad, G.-E. Costin, V. J. Hearing, J. Clarimon, A. Singleton, J. Eerola, O. Hellström, P. J. Tienari, D. W. Miller, A. Beilina, L. Bubacco, M. R. Cookson. Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **2005**, *93*, 246–256.
- [166] J. D. Nosanchuk, A. Casadevall. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 3519–3528.
- [167] H. C. Eisenman, A. Casadevall. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 931–940.
- [168] Y. Yuan, W. Jin, Y. Nazir, C. Fercher, M. A. T. Blaskovich, M. A. Cooper, R. T. Barnard, Z. M. Ziora. Tyrosinase inhibitors as potential antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *187*, 111892.

[169] J. P. Wibowo, F. A. Batista, N. van Oosterwijk, M. R. Groves, F. J. Dekker, W. J. Quax. A novel mechanism of inhibition by phenylthiourea on PvdP, a tyrosinase synthesizing pyoverdine of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *146*, 212–221.