

# La multivalence, une voie à explorer pour l'inhibition d'enzymes ?

Sébastien Guoin

**Résumé** Le concept « clé-serrure » proposé à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle par Emil Fischer illustre bien la stratégie actuelle du ciblage enzymatique, où des molécules synthétiques sont façonnées pour interagir avec leurs récepteurs de façon complémentaire. Des travaux récents suggèrent une autre possibilité pour gagner en affinité et en sélectivité. La clé fait maintenant place à un trousseau, composé de ligands identiques greffés sur une charpente chimique commune.

**Mots-clés** **Multivalence, glycosidases, iminosucres, enzymes, inhibition.**

**Abstract** **Multivalent ligands for enzyme inhibition**

Current strategies for enzyme inhibition mainly consist in developing monovalent drugs with high complementarities for their targets according to the « lock and key » concept proposed by Emil Fischer in the late 19<sup>th</sup> century. Recent results suggest that developing multivalent inhibitors is an appealing alternative to increase affinity and selectivity for specific enzymes.

**Keywords** **Multivalency, glycosidases, enzymes, iminosugars, inhibitors.**

## La multivalence, c'est quoi ?

Le greffage chimique de plusieurs ligands de même nature sur une charpente commune réserve parfois de bonnes surprises sur l'interaction avec une protéine cible. Connectez par exemple cinq ligands entre eux (*figure 1*) ; vous pourriez, contrairement à votre attente statistiquement justifiée, observer un gain d'affinité bien supérieur à un facteur 5. Cet effet mathématiquement incorrect, baptisé « effet multivalent ou cluster », a été particulièrement décrit sur des interactions sucres-protéines où il a été observé pour la première fois par Lee en 1995 [1]. Les sucres et leurs récepteurs (lectines) étant notamment présents à la surface des cellules, ces interactions multivalentes gouvernent un grand nombre de processus biologiques allant de la communication à l'adhésion cellulaire. De nombreuses équipes travaillent donc sur la conception de ligands multivalents synthétiques pour étudier,

promouvoir ou inhiber ces phénomènes [2]. Un champ de recherche prometteur consiste notamment à bloquer la fixation cellulaire de virus et bactéries par des leurres multivalents mimant les séquences spécifiques de sucres membranaires qui servent de point d'ancrage à ces pathogènes [3].

## Comment expliquer le gain d'affinité ?

Il convient de bien différencier l'effet multivalent de la notion de coopérativité positive, où la première interaction influence favorablement les interactions successives [4]. En effet, ce type de phénomène synergique est souvent absent des effets multivalents rapportés. Ces derniers peuvent résulter de différents mécanismes d'interaction entre les ligands et les protéines. Une vue simplifiée de ces modes d'interaction qui peuvent se produire de façon indépendante ou synchrone est présentée dans la *figure 2*. Le mécanisme

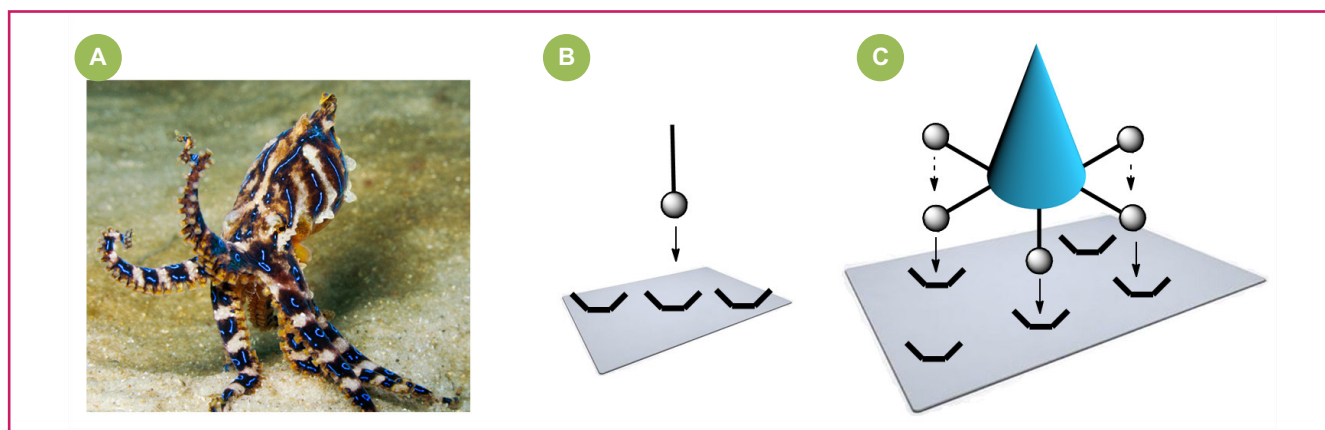


Figure 1 - Illustration du concept de multivalence. A) Les interactions multivalentes à notre échelle conduisent à l'additivité des forces. Poulpe *Hapalochlaena fasciata*, © Brian Mayes. B) Interaction monovalente d'un ligand sur un support. C) Les interactions multivalentes à l'échelle moléculaire peuvent conduire à des affinités bien supérieures à la somme des interactions constitutives.

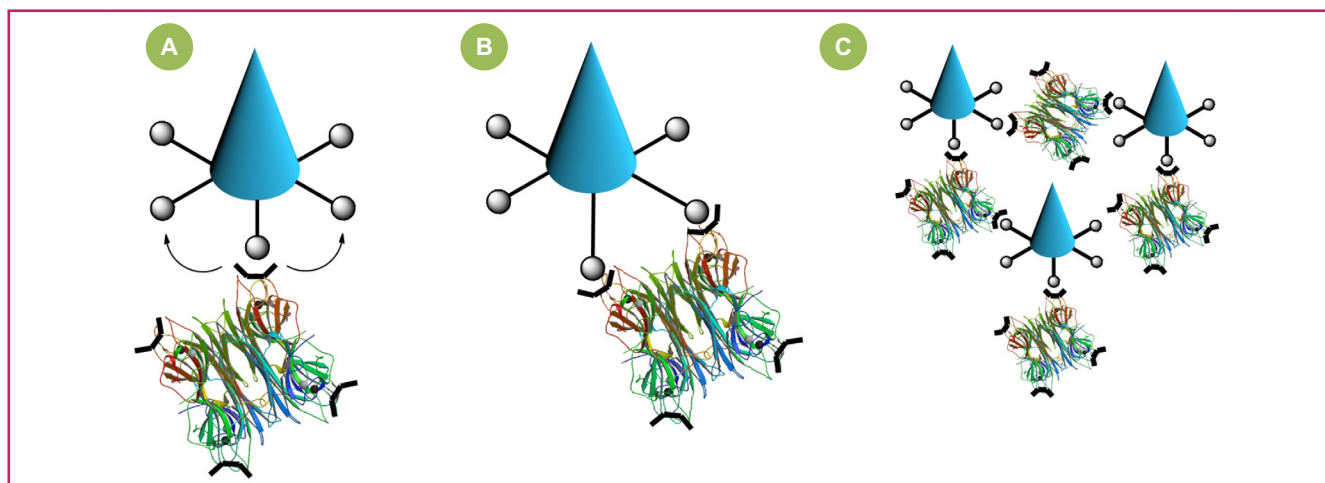


Figure 2 - Mécanismes d'interaction ligands-protéines pouvant conduire à un effet multivalent. A) Mécanisme de glissement ; B) interaction chélate ; C) formation de réseaux supramoléculaires.

de glissement correspond à une diffusion interne de la protéine le long du ligand, qui capture successivement les ligands adjacents (figure 2A) [5]. Ce phénomène de recapture induit par la multivalence est favorisé par la forte concentration en ligands à proximité du site de reconnaissance. Les gains d'affinité peuvent être importants avec des ligands polymères mais restent modérés avec les conjugués à faible valence. Ces derniers demeurent néanmoins des inhibiteurs redoutables lorsqu'ils interagissent avec une protéine multimérique par effet chélate (figure 2B). Des gains d'affinité allant jusqu'au million par rapport aux références monovalentes ont notamment été observés avec des ligands pentavalents, inhibiteurs de toxines pentavalentes [6]. Ces effets spectaculaires sont principalement d'origine entropique, et à ce titre, l'interaction chélate ligand-protéine possède des similitudes avec la chélation d'un métal. Dans l'effet chélate, une partie importante du coût entropique (conformationnel et rotationnel) est absorbée lors de la première interaction. Les autres ligands se retrouvent alors préorganisés dans l'espace, et l'interaction intramoléculaire avec un site adjacent est favorisée. Si les contraintes stériques et géométriques sont trop importantes pour générer ce mode de liaison intramoléculaire, le ligand multivalent peut encore interagir de façon intermoléculaire. Dans ce cas, il se formera des agrégats protéines-ligands de plus ou moins grande taille et des réseaux réticulés plus ou moins structurés dans l'espace (figure 2C). Des interactions intermoléculaires supplémentaires (protéines-protéines) peuvent alors conduire à une stabilisation en solution de ces agrégats. Ces entités supramoléculaires peuvent aussi s'avérer insolubles et précipiter, ce qui déplacera artificiellement l'équilibre réactionnel au profit du ligand complexé par la loi d'action de masse.

## L'inhibition multivalente d'enzymes, une réalité ?

Si les ligands multivalents de lectines décrits dans la littérature se comptent par centaines, voire par milliers, un nombre très restreint de ligands multivalents de glycosidases a été reporté. Ces enzymes ubiquitaires, qui catalysent la rupture des liaisons osidiques, ont pourtant un rôle biologique tout aussi fondamental que les lectines, en permettant notamment l'assimilation nutritionnelle des

sucres complexes et la modulation du glycome cellulaire. La quasi-absence de ligands multivalents de glycosidases contraste donc avec l'afflux scientifique vers l'inhibition multivalente de lectines. Ce constat s'explique probablement par la nature souvent monomérique de ces enzymes, qui ne peuvent alors pas interagir par effet chélate ou former des réseaux supramoléculaires. D'autre part, la synthèse chimique de ligands multivalents de glycosidases est nettement plus compliquée, puisque plusieurs étapes délicates sont souvent nécessaires pour la conception du motif inhibiteur [7], alors que les éléments constitutifs des ligands multivalents de lectines sont généralement des monosaccharides commerciaux.

Les deux premiers exemples d'inhibiteurs multivalents de glycosidases de la littérature n'ont pas montré des affinités supérieures pour les récepteurs ciblés [8]. Ces travaux n'ayant pas pour but premier d'étudier l'effet de la multivalence, les expériences de contrôle permettant de mettre en évidence des effets de valence (par exemple en comparant un composé multivalent à son homologue monovalent) n'ont pas été réalisées dans cette étude, et il est donc difficile d'attribuer l'affinité mesurée à la valence plutôt qu'à des interactions additionnelles non spécifiques.

Pour étudier les effets de la valence sur les glycosidases, nous avons donc entrepris de synthétiser des inhibiteurs mono-, di- et trivalents possédant une charpente de nature similaire (figure 3) [9]. Nous avons sélectionné la déoxynojirymycine (DNJ) comme ligand ; cet iminosucre est capable d'inhiber de nombreuses glycosidases, ce qui augmente donc le champ d'action de notre étude. Des analogues fonctionnalisés de la DNJ sont notamment utilisés dans le

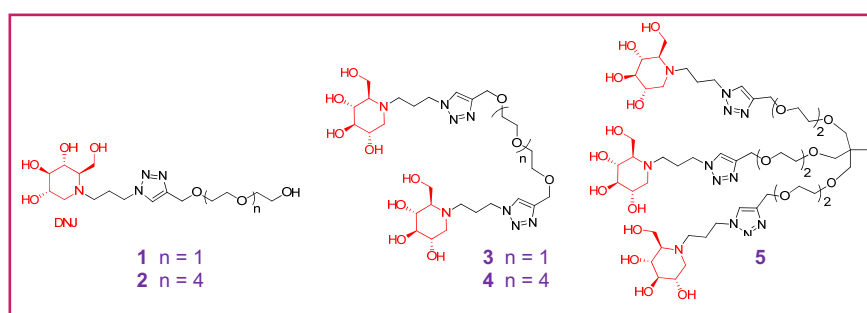


Figure 3 - Inhibiteurs de glycosidases mono-, di- et trivalents développés pour étudier les effets de la valence sur les glycosidases.

traitement du diabète de type 2 (Glyset®) ou de la maladie de Gaucher (Zavesca®). Les ligands mono- et divalents ont été conçus avec deux tailles d'espacesur différents afin d'estimer la sensibilité des glycosidases testées à ce paramètre. Les tests d'inhibition de l'activité enzymatique effectués sur neuf glycosidases commerciales n'ont pas révélé d'effets positifs généraux de la multivalence, contrairement à ce qui est observé pour les lectines. Nous avons néanmoins observé un gain d'affinité modéré mais significatif sur une  $\alpha$ -mannosidase, ce qui constitue le premier effet multivalent reporté pour une glycosidase (figure 4). Ces résultats ont ensuite été confortés par une étude plus récente où le motif DNJ a été greffé en plus grand nombre (douze unités) sur une charpente chimique de type fullerène. Les auteurs ont observé sur cette même enzyme un gain d'affinité important, supérieur de trois ordres de grandeur à la référence monovalente [10].

Si l'affinité est une notion primordiale pour l'inhibition de protéines, la sélectivité l'est tout autant pour permettre un ciblage efficace du récepteur et limiter au maximum les effets secondaires d'un traitement potentiel. Dans ce cadre, les premiers résultats suggèrent que la multivalence peut s'avérer particulièrement efficace, non seulement pour augmenter l'affinité, mais aussi la sélectivité d'inhibiteurs (figure 4).

Enzyme	1	2	3	4	5
$\beta$ -glucosidase (almonds)	47 ± 2	100 ± 5	70 ± 2	70 ± 2	400 ± 10
$\alpha$ -mannosidase (Jack bean)	<b>230 ± 10</b>	<b>265 ± 10</b>	<b>120 ± 5</b>	<b>90 ± 3</b>	<b>35 ± 2</b>
Naringinase (P. decumbens)	80 ± 3	95 ± 5	60 ± 3	55 ± 2	75 ± 3

Gain d'affinité

Gain de sélectivité

Figure 4 - Le ciblage d'une enzyme répondant à la multivalence ( $\alpha$ -mannosidase dans cette étude) peut permettre à la fois un gain d'affinité et un gain de sélectivité. La sélectivité de l'inhibiteur monovalent 1 sur les trois enzymes représentées s'inverse pour le ligand trivalent 5. Activités inhibitrices  $K_i$  exprimées en  $\mu$ M.

Il reste maintenant à déterminer si l'effet multivalent observé sur l' $\alpha$ -mannosidase est l'exception qui confirme la règle, ou si d'autres enzymes peuvent effectivement être inhibées de façon multivalente. Une étude récente collaborative entre les équipes des professeurs Jean-François Nierengarten et Stéphane Vincent répond clairement à cette question. Les auteurs ont en effet observé un effet multivalent significatif sur une heptosyltransférase bactérienne avec des fullerènes décorés par des heptoses modifiés (figure 5) [11]. D'autres enzymes d'intérêt thérapeutique comme la  $\beta$ -glucocérébrosidase impliquée dans la maladie de Gaucher [12] ou des neuraminidases virales [13] ont également montré une réponse positive aux ligands multivalents. À l'inverse, d'autres exemples d'inhibition multivalente enzymatique n'ont pas montré d'effets significatifs [14].

## Quel avenir pour les inhibiteurs enzymatiques multivalents ?

La multiplication récente des travaux sur l'inhibition multivalente enzymatique, suite à la première preuve de concept, est de bon augure pour le développement futur de ce mode d'inhibition, même s'il faut garder à l'esprit que cet effet ne s'est manifesté que sur un nombre limité d'enzymes et qu'il est donc prématuré de parler de stratégie générale de

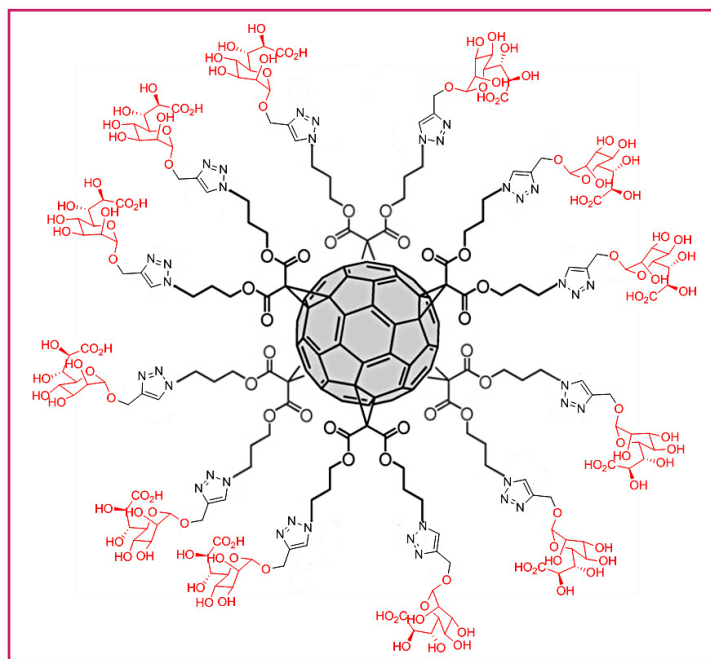


Figure 5 - Fullerène dodécavalent décoré par des heptosides et montrant un effet multivalent sur une glycosyltransférase bactérienne.

l'inhibition enzymatique. Cette spécificité est toutefois doublement profitable dans le cas des réponses positives. En effet, la force et la sélectivité de l'interaction peuvent alors être augmentées par la simple multiplication du nombre de ligands sur la charpente. S'il est vraisemblable que de nouveaux effets multivalents enzymatiques continuent à être répertoriés dans un futur proche, la question primordiale du mode d'action des inhibiteurs reste actuellement en suspens. Pourquoi certaines enzymes sont sensibles à la multivalence et d'autres non ? La conception de nouvelles sondes chimiques et l'utilisation de

protocoles analytiques inspirés de la bibliographie luxuriante portant sur les études multivalentes glycoclusters-lectines devraient permettre d'apporter des éléments de réponse.

## Références

- [1] Lee Y.C., Lee R.T., Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology, *Acc. Chem. Res.*, **1995**, *28*, p. 321.
- [2] Revues : a) Deniaud D., Julienne K., Gouin S.G., Insights in the rational design of synthetic multivalent glycoconjugates as lectin ligands, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, p. 966 ; b) Chabre Y.M., Roy R., Chapter 6: Design and creativity in synthesis of multivalent neoglycoconjugates, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **2010**, *63*, p. 165.
- [3] Revue : Bernardi A. et al., Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, DOI: 10.1039/c2cs35408j.
- [4] Revue sur la coopérativité : Hunter C.A., Anderson H.L., What is cooperativity?, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, *48*, p. 7488.
- [5] a) Almant M., Mastouri A., Gallego-Yerga L., García Fernández J.M., Ortiz Mellet C., Kovensky J., Morandat S., El Kirat K., Gouin S.G., Probing the nature of the cluster effect observed with synthetic multivalent galactosides and peanut agglutinin lectin, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, p. 729 ; b) Dam T.K., Gerken T.A., Brewer C.F., Thermodynamics of multivalent carbohydrate-lectin cross-linking interactions: importance of entropy in the bind and jump mechanism, *Biochemistry*, **2009**, *48*, p. 3822.
- [6] Kitov P.I., Sadowska J.M., Mulvey G., Armstrong G.D., Ling H., Pannu N.S., Read R.J., Bundle D.R., Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands, *Nature*, **2000**, *403*, p. 669.
- [7] Lillelund V.H., Jensen H.H., Liang X., Bols M., Recent developments of transition-state analogue glycosidase inhibitors of non-natural product origin, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, p. 515.

- [8] Lohse A., Jensen K.B., Lundgren K., Bols M., Synthesis and deconvolution of the first combinatorial library of glycosidase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, p. 1965 ; b) McCort I., Sanière M., Le Merrer Y., Synthesis and enzymatic evaluation of pseudo-di (or tri-)saccharides, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, p. 2693.
- [9] Diot J., Garcia-Moreno M.I., Gouin S.G., Ortiz Mellet C., Haupt K., Kovensky J., Multivalent iminosugars to modulate affinity and selectivity for glycosidases, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, p. 357.
- [10] Compain P., Decroocq C., Lehl J., Holler M., Hazelard D., Mena Barragán T., Ortiz Mellet C., Nierengarten J.-F., Glycosidase inhibition with fullerene iminosugar balls: A dramatic multivalent effect, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, p. 5753.
- [11] Durka M., Buffet K., Lehl J., Holler M., Nierengarten J.-F., Vincent S.P., The inhibition of liposaccharide heptosyltransferase WaaC with multivalent glycosylated fullerenes: A new mode of glycosyltransferase inhibition, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, p. 641.
- [12] Decroocq C., Rodriguez-Lucena D., Ikeda K., Asano N., Compain P., Cyclodextrin-based iminosugar click clusters: The first examples of multivalent pharmacological chaperones for the treatment of lysosomal storage disorders, *ChemBioChem*, **2012**, *13*, p. 661.
- [13] Watson K.G. *et al.*, Highly potent and long-acting trimeric and tetrameric inhibitors of influenza virus neuraminidase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, p. 1589.
- [14] a) Cecioni S., Argintaru O.-A., Docsa T., Gergely P., Praly J.-P., Vidal S., Probing multivalency for the inhibition of an enzyme: Glycogen phosphorylase as a case study, *New J. Chem.*, **2009**, *33*, p. 148 ; b) Wennekes T., van den Berg R.J.B.H.N., Bongers K.M., Donker-Koopman W.E., Ghisaidoobe A., van der Marel G.A., Strijland A., Aerts J.M.F.G., Overkleef H.S., Synthesis and evaluation of dimeric lipophilic iminosugars as inhibitors of glucosylceramide metabolism, *Tetrahedron: Asymmetr.*, **2009**, *20*, p. 836.



#### Sébastien Gouin

est chargé de recherche CNRS au Laboratoire CEISAM (UMR 6230), UFR des Sciences et des Techniques de Nantes\*.

\* Laboratoire CEISAM, UMR 6230, Groupe Corail, UFR des Sciences et des Techniques de Nantes, 2 rue de la Houssinière, F-44322 Nantes Cedex 3. Courriel : sebastien.gouin@univ-nantes.fr



L'Institut Galien Paris-Sud - UMR CNRS 8612, fondée en 1986, joue un rôle central dans le domaine des nano et microtechnologies appliquées au médicament et au diagnostic. Dirigée par le professeur Elias FATTAL, elle est aujourd'hui structurée autour de 8 équipes : trois équipes de Physico-chimistes dirigées respectivement par Véronique ROSILIO, Florence AGNELY et Sylviane LESIEUR, quatre équipes de Galénistes dirigées respectivement par Patrick COUVREUR, Elias FATTAL, Gillian BARRATT et Gilles PONCHEL et une équipe d'analystes spécialisée dans les nanotechnologies dans les sciences séparatives dirigée par Myriam TAVERNA. Fort de sa multidisciplinarité, l'Institut Galien Paris-Sud dispose d'atouts considérables pour aborder les différentes thématiques de recherche autour des nano ou micromédicaments. Elle est constituée de chercheurs et d'enseignants chercheurs provenant de différentes disciplines (chimie, physico-chimie, galénique, analytique et biologie), ce qui lui permet d'envisager non seulement la formulation mais la caractérisation physico-chimique et biologique des médicaments nano et microparticulaires. L'Institut Galien Paris-Sud est riche de plusieurs plates-formes qui sont pilotées par des ingénieurs/assistants-ingénieurs (analyse chromatographique, culture cellulaire, manipulation de radio éléments, atelier d'instrumentation, informatique). Installée à l'UFR de Pharmacie de l'Université Paris-Sud, à Châtenay-Malabry, elle attire un grand nombre de doctorants et post doctorants dont une forte proportion provient de différents pays et continents.

**Mr Elias FATTAL**  
Directeur UMR CNRS 8612

☎ 01 46 83 55 82  
fax : 01 46 83 59 46

E-mail : elias.fattal@u-psud.fr

UNIVERSITE PARIS-SUD

FACULTE DE PHARMACIE

INSTITUT GALIEN PARIS-SUD – UMR CNRS 8612

5, rue Jean-Baptiste Clément  
92296 CHATENAY-MALABRY cedex - FRANCE