

Conception rationnelle de nouveaux médicaments contre la maladie du sommeil

Frederik R. Opperdoes

Les trypanosomatidés sont responsables de maladies redoutables, très répandues dans les pays tropicaux, dont les traitements actuels sont peu efficaces et dangereux. La recherche visant à la mise au point de nouveaux médicaments s'appuie sur une propriété très particulière du trypanosome : toute sa fourniture d'énergie repose sur la glycolyse, qui a lieu dans un organite très spécialisé, le glycosome. Arrêter la glycolyse du trypanosome permettrait de le détruire. Les enzymes glycolytiques trypanosomiales diffèrent de celles de l'hôte et la connaissance de leur structure tridimensionnelle permet aujourd'hui de modéliser des analogues de substrats ou de cofacteurs bloquant l'activité enzymatique. L'enzyme la mieux connue est la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. L'inhibition du cofacteur NAD⁺ par des analogues de nucléosides sur lesquels sont greffées diverses chaînes latérales semble prometteuse.

Dans le passé, la mise au point des médicaments était surtout fondée sur des essais non dirigés, qui peuvent uniquement être réalisés par des firmes pharmaceutiques, lesquelles ont à leur disposition les moyens humains et financiers indispensables. On estime qu'il faut entre 100 et 200 millions US \$ pour le développement d'un composé rentable, après qu'environ 100 000 composés ont été synthétisés et testés. Cela illustre l'ampleur du problème du développement des médicaments pour les maladies tropicales. Les populations cibles sont en général parmi les plus pauvres du monde et ne sont pas capables de payer leurs médicaments. Un cas typique est

celui de la trypanosomiase humaine ou maladie du sommeil. Un nombre très limité de médicaments sont efficaces contre cette maladie qui, non traitée, est toujours fatale. Ces médicaments ont tous été introduits dans la première moitié de ce siècle et ne sont pas sans de sérieux effets secondaires. Ainsi, l'Arsobal, introduit en 1947, est toujours le médicament de choix pour le traitement des stades ultimes de la maladie du sommeil, malgré le fait qu'un tel traitement mène à une encéphalopathie fatale dans 5 % des cas. La situation pour la leishmaniose, maladie causée par un organisme très proche, le parasite *Leishmania*, n'est pas plus brillante. Ici, les médicaments disponibles sont tous des composés toxiques à base

ADRESSE

F.R. Opperdoes : docteur en mathématiques et sciences physiques et naturelles, responsable de l'Unité de recherches sur les maladies tropicales de l'Institut international de pathologie cellulaire et moléculaire (ICP) et de l'Unité de chimie physiologique de l'université catholique de Louvain ; Research unit for tropical diseases, International institute of cellular and molecular pathology, 74, avenue Hippocrate, B-1200 Bruxelles, Belgique.

d'antimoine, contre laquelle les parasites ont souvent acquis une résistance.

Nouvelles approches pour la conception des médicaments

Il est donc de première importance que les médicaments pour le traitement des maladies tropicales soient à la fois peu coûteux et plus efficaces. L'avènement de nouvelles techniques qui vont de la technologie de l'ADN recombinant à la cristallographie par rayons X, et à la modélisation moléculaire, rendent possible la conception de nouveaux médicaments fondée sur la structure tridimensionnelle des protéines cibles. Cependant, cela implique toujours quelques essais avec risque d'erreurs, car (1) le mode de liaison du composé nouvellement synthétisé à la protéine cible peut être inattendu; (2) un médicament potentiel peut ne pas atteindre la protéine cible *in vivo*; (3) un processus métabolique peut inactiver le médicament ou (4) celui-ci

peut être toxique, tératogène, mutagène ou cancérigène. On doit donc considérer un cycle de conception de médicaments qui augmenterait graduellement notre compréhension de la liaison d'une série de composés à la protéine cible (figure 1). Une telle banque de données devrait comprendre les informations tridimensionnelles sur le mode de liaison de médicaments potentiels à leur protéine cible, les constantes de liaison, les effets métaboliques, les sélectivités, les toxicités, etc. Le criblage de médicaments, leur co-cristallisation avec leur cible et la détermination des structures tridimensionnelles nécessitent des cibles bien définies telles que les enzymes parasitaires ou des protéines de surface, plutôt que le parasite en entier et exige une connaissance génétique suffisante du parasite. On y arrive par le clonage de gènes et la surexpression de protéines dans des systèmes hétérologues, tels que bactéries, levures, baculovirus et cellules d'insectes, ou cellules de mammifères. Toutefois, pour l'identification

RÉFÉRENCES

1. WHO Technical Reports Series n° 739. 1986. Epidemiology and control of African trypanosomes.
2. Fairlamb AH, Opperdoes FR. Carbohydrate metabolism in African trypanosomes, with special reference to the glycosome. In: Morgan AM, ed. *Carbohydrate metabolism in cultured cells*. Plenum Publishing Corporation, 1986: 183-224.
3. Opperdoes FR, Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 127-51.
4. Clarkson AB, Brohn FH. Trypanosomiasis, an approach in chemotherapy by inhibition of carbohydrate metabolism. *Science* 1976; 194: 204-6.
5. Van der Meer C, Versluijs-Broers JAM, Opperdoes FR. *Trypanosoma brucei*: trypanocidal effect of salicyl hydroxamic acid plus glycerol in infected rats. *Exp Parasitol* 1979; 48: 126-34.
6. Opperdoes FR, Borst P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* 1977; 80: 360-4.
7. Osinga KA, Van Beeumen J, Wierenga RK, Borst P, Opperdoes FR. Two tandemly linked identical genes for the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 1986; 5: 1049-56.

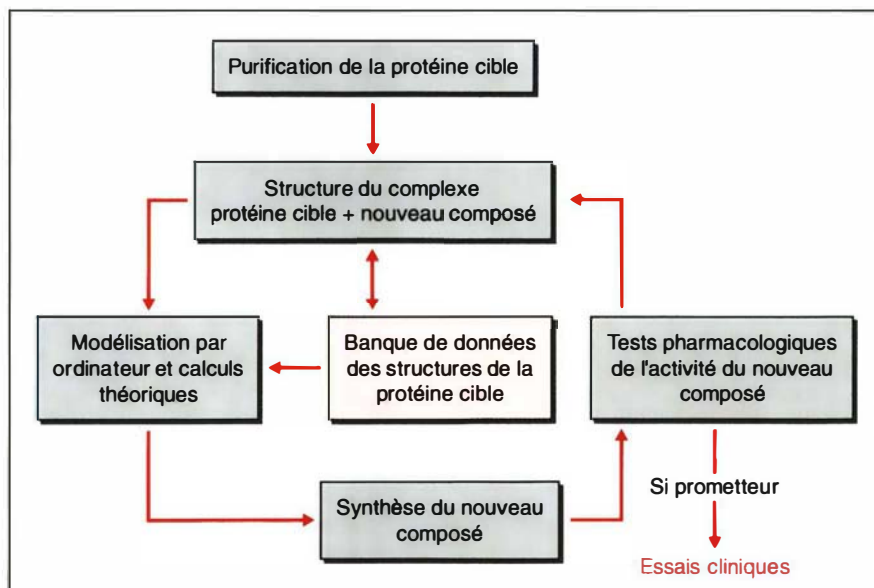


Figure 1. Cycle de conception de médicaments. Il conduit aujourd'hui à graduellement mieux comprendre les mécanismes de liaison d'une série de composés à la protéine cible. Au cœur du dispositif se trouve la structure tridimensionnelle de la protéine cible que la technologie de l'ADN permet d'avoir en quantité importante. La co-cristallisation avec l'antagoniste, les tests pharmacologiques d'activité, permettent d'explorer de manière très fine les mécanismes de liaison et de modéliser les antagonistes de génération ultérieure.

des cibles spécifiques, des études biochimiques de base du parasite doivent d'abord être réalisées et celles-ci doivent être complétées par une connaissance détaillée des différences entre le parasite et l'hôte.

Développement rationnel de composés pour le traitement de la trypanosomiase et de la leishmaniose. Identification de la cible

Notre unité de recherche sur les maladies tropicales de l'ICP a choisi comme cible des enzymes de la glycolyse du trypanosome. Environ 50 millions de personnes dans 34 pays africains sont à risque pour la maladie du sommeil [1]. Entre 20 000 et 25 000 nouveaux cas sont rapportés chaque année, mais le nombre réel de nouvelles victimes se situe plus probablement entre 200 000 et 300 000 par an. Cette parasitose est presque toujours mortelle en l'absence de traitement. Deux sous-espèces des *Trypanosoma brucei*, *T.b. gambiense*

et *T.b. rhodesiense*, sont les agents responsables de la maladie. Les trypanosomes causent aussi une zoonose, appelée nagana, qui entraîne la mort de trois millions de têtes de bétail chaque année et est donc en partie responsable de la malnutrition protéique qui prévaut dans ces régions. Après avoir envahi le système circulatoire de l'hôte mammifère via la morsure infectieuse d'une mouche tsé-tsé, le trypanosome se développe dans ce milieu riche en glucose. En effet, le trypanosome sanguicole a cessé toute activité mitochondriale, le glucose servant de seule source d'énergie et de carbone pour le parasite. Ainsi, la consommation de glucose est extrêmement élevée et, faute d'autre source d'énergie, l'inhibition de la glycolyse mène au manque immédiat d'ATP pour le trypanosome [2, 3]. Ainsi, tout médicament qui inhiberait la glycolyse du trypanosome aurait le même effet sur le trypanosome que le cyanure de potassium sur l'homme. La combinaison d'acide salicylhydroxamique et de glycérol élimine les trypanosomes du

sang de rat et de souris infectés en trois minutes par inhibition de la glycolyse [4, 5]. Dans la plupart des cellules d'eucaryotes, la glycolyse qui assure la conversion du glucose en pyruvate est catalysée par un total de 10 enzymes. Elle s'effectue dans le cytosol, la partie soluble de la cellule. Dans le trypanosome, quelque 20 enzymes dont les 7 premières enzymes de la glycolyse, de l'hexokinase (HK) à la phosphoglycérate kinase (PGK) ainsi que deux enzymes impliquées dans le métabolisme du glycérol (glycérol kinase et glycérol-3-phosphate déshydrogénase) sont localisées à l'intérieur d'un organe que nous avons appelé «glycosome» [6] (figure 2). La présence d'un tel organe subcellulaire aussi spécialisé dans les trypanosomes leur permet de réaliser la glycolyse à une vitesse extrêmement élevée [3]. Par conséquent, les glycosomes sont d'importance vitale pour ces parasites.

Le fait que dans les trypanosomes les enzymes glycolytiques sont séquestrées à l'intérieur d'un organe nous

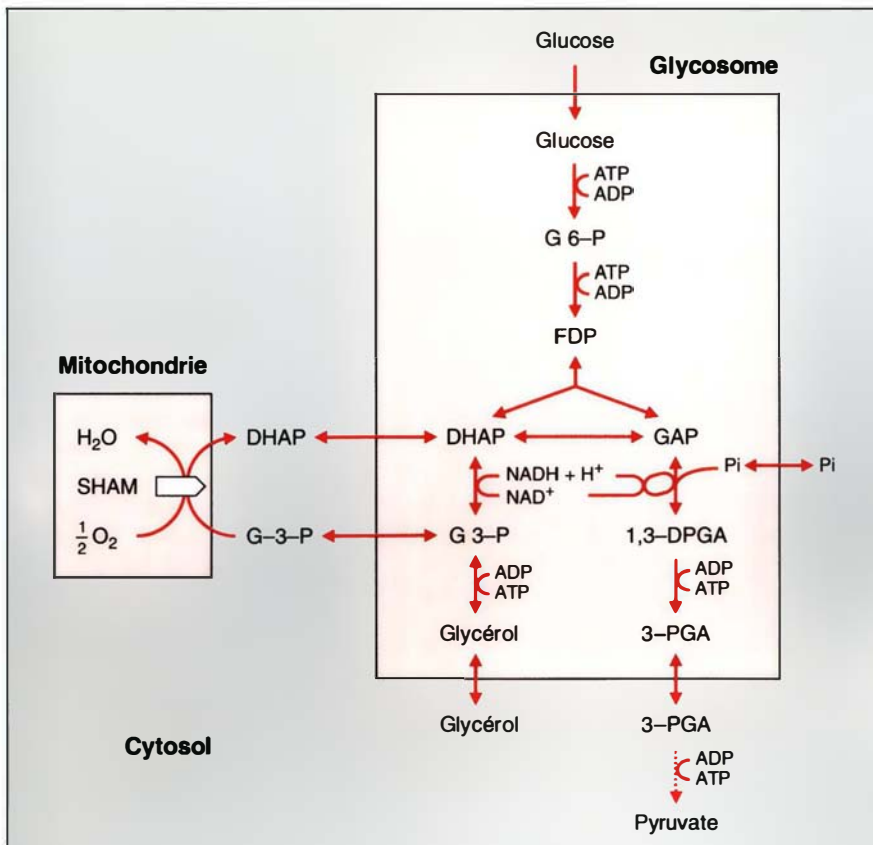


Figure 2. Représentation schématique de la compartimentation de la glycolyse chez *Trypanosoma brucei*. Les enzymes de la glycolyse sont séquestrées à l'intérieur d'un organe spécialisé, le glycosome, où a lieu une glycolyse très rapide fournissant au parasite l'essentiel de son énergie. G 6-P, glucose 6-phosphate; FDP, fructose 1,6-bisphosphate; DHAP, dihydroxyacétone phosphate; GAP, glyceraldéhydephosphate; 1,3-DPGA, 1,3-bisphosphoglycérate; 3-PGA, 3-phosphoglycérate; G 3-P, glycérol 3-phosphate; SHAM, acide salicylhydroxamique.

RÉFÉRENCES

8. Michels PAM, Poliszczak A, Osinga KA, Van Beeumen J, Wierenga RK, Borst P, Opperdoes FR. Two tandemly linked identical genes for the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 1986; 5: 1049-56.
9. Wierenga RK, Swinkels B, Michels PAM, Osinga K, Misset O, Van Beeumen J, Gibson WC, Postma JPM, Borst P, Opperdoes FR, Hol WGJ. Common elements on the surface of glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei* may serve as topogenic signals for import into glycosomes. *EMBO J* 1987; 6: 215-21.
10. Opperdoes FR, Michels PAM. The glycosome of the Kinetoplastida. *Biochimie* 1993; 75: 231-4.
11. Misset O, Bos OJM, Opperdoes FR. Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. *Eur J Biochem* 1986; 157: 441-53.
12. Wierenga RK, Kalk KH, Hol WGJ. Structure determination of the glycosomal triose-phosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* 1987; 198: 109-21.
13. Borchert TV, Pratt K, Zeelen JPh, Callens M, Noble MEM, Opperdoes FR, Michels PAM, Wierenga RK. Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterization of a dimer-interface mutant. *Eur J Biochem* 1993; 211: 703-10.
14. Kohl L, Callens M, Wierenga RK, Opperdoes FR, Michels PAM. Triosephosphate isomerase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and characterization of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and analysis of the protein. *Eur J Biochem* 1994; 220: 331-8.

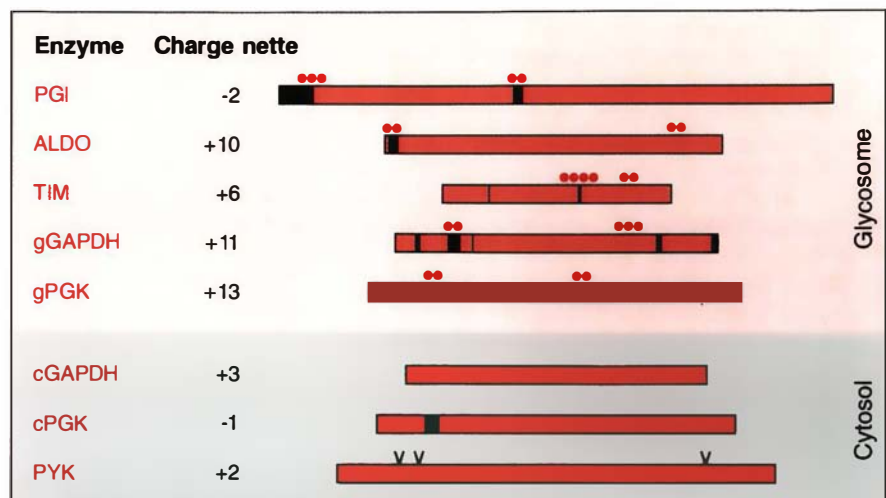


Figure 3. **Représentation schématique des caractéristiques des enzymes glycolytiques de *T. brucei*.** Les barres représentent les séquences en acides aminés des enzymes respectives et leur taille est proportionnelle à la longueur de la chaîne polypeptidique. Les blocs noirs indiquent la position et la taille des insertions et extensions en acides aminés spécifiques du trypanosome. Les points représentent les résidus chargés positivement. Les têtes de flèche indiquent la position des délétions.

a fait supposer que certaines caractéristiques de ces enzymes devaient être différentes de celles des enzymes homologues présentes dans les autres organismes, y compris l'hôte humain. Pendant les dix dernières années, nous avons rassemblé une quantité importante de données au sujet de ces enzymes trypanosomiales. Ce travail a mené à l'isolement et à la caractérisation de neuf enzymes glycosomales et de plusieurs enzymes cytosoliques, à la fois de *T. brucei* et du parasite proche *Leishmania mexicana*. Ces enzymes ont été comparées avec leur équivalent chez d'autres organismes. Avec P. Michels à l'ICP nous avons cloné et séquencé les gènes codant pour six enzymes glycosomales – phosphoglucose isomérase (PGI), aldolase (ALDO), triosephosphate isomérase (TIM), glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (gGAPDH), glycérol 3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) et phosphoglycérate kinase (gPGK) – et deux de leurs isoenzymes cytosoliques (cGAPDH et cPGK), ainsi que la pyruvate kinase (PK), qui est exclusivement présente dans le cytosol du trypanosome. Avec les données déjà disponibles sur les enzymes glycolytiques d'autres organismes, ces résultats

ont permis d'identifier les propriétés qui différencient les enzymes glycosomales de leurs équivalents non glycosomales d'autres organismes. De telles différences pourraient être des cibles attrayantes pour la conception de médicaments hautement spécifiques contre les trypanosomes.

Propriétés spécifiques particulières des enzymes glycolytiques des trypanosomes

La plupart des autres enzymes glycosomales ressemblent à leurs homologues d'autres organismes, tant dans la taille que dans la composition des sous-unités. Malgré cette ressemblance, la plupart des sous-unités des protéines glycosomales ont une masse moléculaire un peu plus élevée (entre 0 et 5 kDa) et un point isoélectrique beaucoup plus élevé que leurs équivalents provenant d'autres organismes (figure 3).

A l'examen de leurs séquences, on note que presque toutes les enzymes glycosomales portent, soit des extensions spécifiques amino- ou carboxy-terminales, soit des insertions caractéristiques, soit les deux.

Ces caractéristiques sont absentes des isoenzymes cytosoliques du trypanosome ou des enzymes glycolytiques d'autres organismes [7-9]. En outre, on trouve une abondance de résidus lysine et arginine dans ou près des insertions de ces enzymes glycosomales. La fonction de ces résidus, responsables de la charge positive élevée de ces protéines glycosomales, n'est pas claire. Les enzymes glycosomales sont synthétisées dans le cytosol puis transférées dans le glycosome sans aucun signe de modification secondaire. Les protéines natives doivent donc porter le signal responsable de leur importation dans le glycosome. Certaines des extensions

ont, en effet, été identifiées comme signaux topogéniques [10]. D'autres éléments spécifiques remplissent probablement un rôle essentiel dans l'assemblage et le fonctionnement correct d'un complexe glycolytique multienzymatique à l'intérieur du glycosome. Les charges positives additionnelles pourraient, par exemple, neutraliser les charges négatives des métabolites glycolytiques phosphorylés, présents en grande quantité à l'intérieur du glycosome [11]. La modélisation tridimensionnelle des séquences polypeptidiques des protéines glycosomales TIM, gGAPDH et gPGK, à partir des structures cristallines connues des

enzymes respectives d'autres organismes, a révélé que les charges supplémentaires trouvées dans chacune des enzymes glycosomales étaient concentrées à leur surface, dans des *hot spots* positifs, distants d'approximativement 40 Å [9].

Vers la conception rationnelle d'inhibiteurs sélectifs

La résolution de la structure cristallographique des enzymes glycosomales est la première étape vers la conception rationnelle d'inhibiteurs sélectifs de la glycolyse des trypanosomes. Pour cela, beaucoup d'efforts ont été investis dans la cristallisation de protéines glycosomales. La TIM glycosomale a été cristallisée par R. Wierenga au *European Molecular Biology Laboratory* à Heidelberg et la GAPDH glycosomale de trois trypanosomides *T. brucei*, *T. cruzi* et *L. mexicana*, a été cristallisée par W. Hol (université de Washington, Seattle) et G. Oliva (université de Sao Paulo, Brésil).

Triosephosphate isomérase glycosomale

Les cristaux de TIM glycosomale sont assez stables aux rayons X et diffractent jusqu'à 1,8 Å de résolution [12]. Un ensemble de données à haute résolution a été utilisé pour le raffinement des structures de cette enzyme par Wierenga *et al.* La surexpression de l'enzyme de *T. brucei* [13] et de *Leishmania* [14], suivie de l'étude de liaison cristallographique à des analogues de substrats, a permis de mieux comprendre la flexibilité et des changements conformationnels possibles du site actif de l'enzyme. Toutefois, la structure du site actif de TIM est trop bien conservée, dans un rayon de 11 Å, pour être exploitée dans la conception de nouveaux médicaments.

Composés anti-hot spots

La suramine, un médicament trypanocide utilisé depuis 1916 pour le traitement de la maladie du sommeil humaine, est capable d'inhiber la glycolyse du trypanosome [15]. C'est un dérivé symétrique naphthyl-amine polysulphoné qui, à pH physiologique, porte trois charges négatives

Tableau I

INHIBITION D'ENZYMES GLYCOLYTIQUES PAR LE MÉDICAMENT TRYPANOCIDE SURAMINE

Enzyme	Source	I ₅₀ (µM)
Hexokinase	<i>T. brucei</i>	24
	Levure	220
	Cerveau humain	210
Glucose 6-phosphate isomérase	<i>T. brucei</i>	60
Phosphofructokinase	<i>T. brucei</i>	3
	Muscle de lapin	0.6
Triosephosphate isomérase	<i>T. brucei</i>	100
	Muscle de lapin	100
	Levure	100
Aldolase	<i>T. brucei</i>	17
	Muscle de lapin	44
Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase	<i>T. brucei</i> glycosome	23
	<i>T. brucei</i> cytosol	418
	Erythrocytes humains	74
	Levure	3
Phosphoglycérate kinase	<i>T. brucei</i> glycosome	8
	<i>T. brucei</i> cytosol	20
	Muscle de lapin	55
	Levure	167
Glycérol 3-phosphate déshydrogénase	<i>T. brucei</i>	3-10
	Muscle de lapin	40
Glycérol kinase	<i>T. brucei</i>	35
	<i>Candida mycoderma</i>	120-140
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	130

I₅₀: concentration nécessaire pour inhiber l'activité enzymatique de 50%

RÉFÉRENCES

15. Fairlamb AH, Bowman IB. Uptake of the trypanocidal drug suramin by blood-stream forms of *Trypanosoma brucei* and its effects on respiration and growth rate *in vivo*. *Mol Biochem Parasitol* 1980; 1: 315-33.
16. Willson M, Callens M, Kuntz DA, Perié J, Opperdoes FR. Synthesis and activity of inhibitors highly specific for the glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasit* 1993; 59: 201-10.
17. Mercer WD, Winn I, Watson, HC. Twinning in crystals of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biochem* 1976; 250: 277-83.
18. Vellieux FMD, Hadju D, Verlinde CLM, Groendijk H, Read RJ, Greenhough TJ, Campbell JW, Kalk KH, Littlechild JA, Watson HC, Hol WGJ. Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from Laue data. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2355-9.
19. Hannaert V, Callens M, Opperdoes FR, Michels PAM. Purification of the native and the recombinant *Leishmania mexicana* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 1994; 225: 143-9.
20. Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PAM. Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of the enzymes. *Protein Express Purif*, sous presse.
21. Verlinde CLM, Callens M, Van Calenberg S, Van Aerschot A, Herdewijn P, Hannaert V, Michels PAM, Opperdoes FR, Hol WGJ. Selective inhibition of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: towards new drugs for the treatment of sleeping sickness. *J Med Chem* 1994; 37: 3605-13.

aux deux extrémités. Nous avons étudié si ce médicament pouvait interagir avec des *hot spots* chargés positivement, présents sur les protéines glycosomales (voir ci-dessus). Le *Tableau 1* montre que la suramine a une forte affinité pour la plupart des enzymes glycosomales (dans l'ordre de 10-40 μ M), tandis que l'affinité pour les enzymes équivalentes mais d'une autre origine est nettement moindre. La spécificité remarquable de la suramine pour la majorité des protéines glycosomales indique que l'excès de charges positives à leur surface joue, très certainement, un rôle important dans les interactions enzyme-médicament. Il est ainsi possible qu'après 80 ans on ait enfin élucidé le mode d'action de cet important médicament trypanocide. Encouragés par ces résultats obtenus avec la suramine et en collaboration avec le Professeur Perié de l'université Paul-Sabatier à Toulouse, nous avons

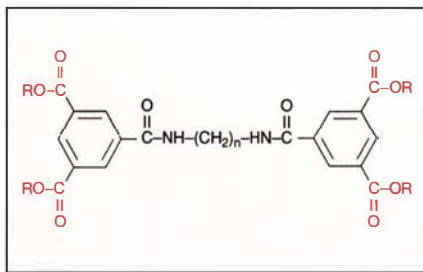


Figure 4. Composé anti-hot spot, comprenant deux groupes de charges négatives, séparées par un espaceur de longueur variable.

entrepris la synthèse d'une série de composés contenant chacun deux groupes de charges négatives séparées par un espaceur de taille variable (figure 4). L'effet de chacun de ces composés a ensuite été testé sur huit des enzymes glycosomales purifiées [16]. Les résultats sont montrés sur la figure 5. Il est frappant d'observer que pour presque toutes les enzymes, la meilleure inhibition est observée pour une longueur d'espaceur égale à 14 groupements méthylènes. Elle correspond à une distance approximative de 40 Å entre les deux groupes de charges négatives, distance voisine de celle observée entre les *hot spots* de plusieurs de ces enzymes (voir ci-dessus). L'inhibi-

tion des enzymes glycosomales était spécifique. Les enzymes correspondantes de muscle de lapin et de levure étaient en effet beaucoup moins ou pas du tout inhibées, excepté pour la gGAPDH. L'inhibition de cette dernière ne semble pas dépendre de la longueur de l'espaceur.

Glyceraldéhyde-phosphate déshydrogénase

La conception d'inhibiteurs du site actif qui fonctionnent comme des analogues du substrat et interfèrent ainsi avec le fonctionnement de l'enzyme est une tâche difficile. En effet, le site actif est en général la partie de la protéine qui est la mieux conservée, en particulier pour les enzymes glycolytiques, qui sont des protéines d'évolution lente. Une inhibition sélective peut être plus facile si une enzyme utilise un cofacteur de taille importante, tel le NAD⁺, comme c'est le cas pour la GAPDH. Une partie importante d'un tel cofacteur n'est pas directement impliquée dans la réaction catalytique et son environnement protéique est donc moins bien conservé. En suivant ce principe, nous avons concentré nos efforts sur la GAPDH glycosomale de *T. brucei*.

L'affinité de l'isoenzyme glycosomale pour le NAD⁺ est moins forte que celle de l'isoenzyme cytosolique du trypanosome et que celle des GAPDH d'autres organismes. Cela suggère d'importantes différences dans le domaine de liaison du NAD⁺ à l'enzyme glycosomale. L'existence de telles différences a été confirmée par des données cristallographiques (voir ci-dessus).

H.C. Watson (université de Bristol, GB), nous a fourni des cristaux et des données sur la GAPDH humaine, permettant ainsi l'amélioration de la structure obtenue antérieurement à basse résolution [17]. Une structure tridimensionnelle complète de l'enzyme est maintenant disponible (Read RJ, non publié).

La GAPDH glycosomale des trois organismes trypanosomidés (*T. brucei*, *T. cruzi* et *Leishmania*) est une enzyme homotétramérique, avec une sous-unité de masse molaire 38 000 kDa. Nous avons cristallisé l'enzyme de *T. brucei* et résolu la structure tridi-

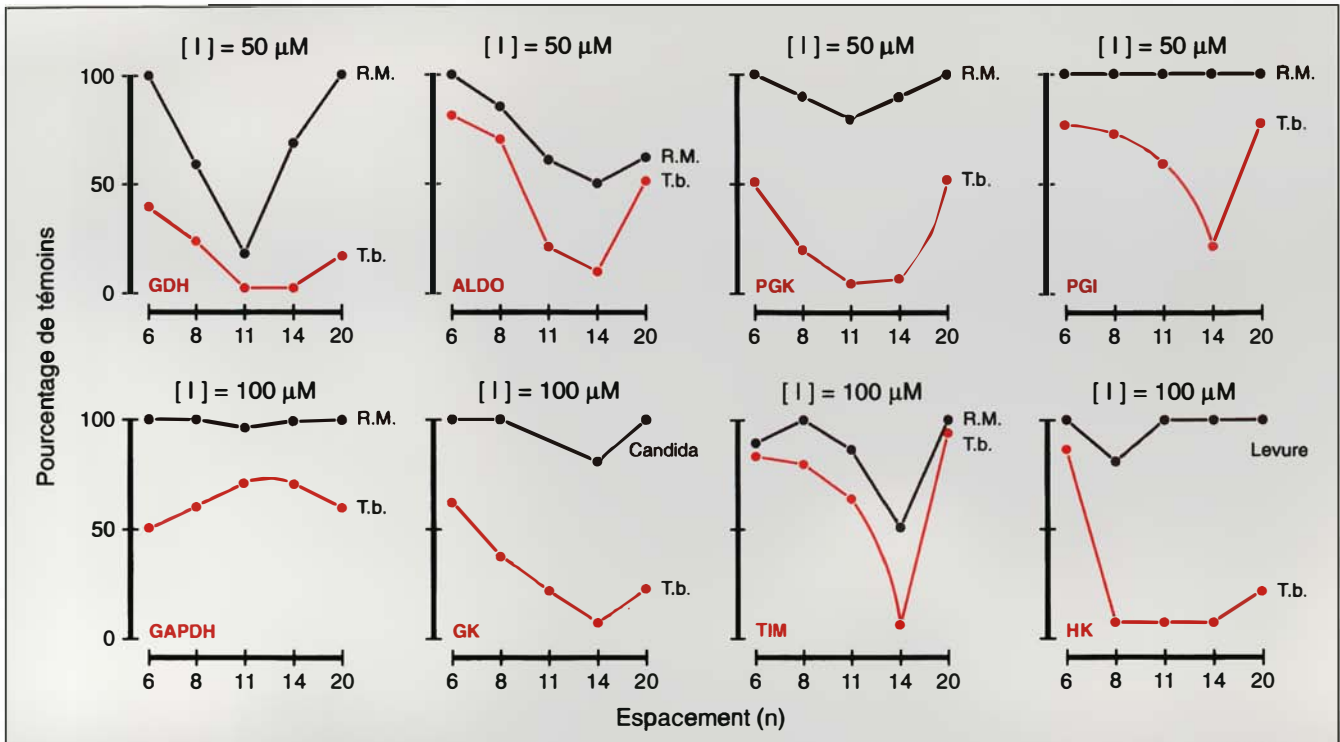


Figure 5. **Inhibition d'enzymes glycolytiques par des composés anti-hot spot avec des longueurs d'espaceur variables n.** Des enzymes purifiées de *Trypanosoma brucei* (T.b.), de muscle de lapin (R.M.), de *Candida mycodermis* et de levure ont été incubées, soit avec 50 μM (panneaux supérieurs), soit avec 100 μM (panneaux inférieurs) des composés illustrés sur la figure 4, avec des longueurs n d'espaceur variables et l'activité enzymatique résiduelle mesurée. Symboles rouges, enzymes de *T. brucei*; symboles bistres, enzymes d'autres origines.

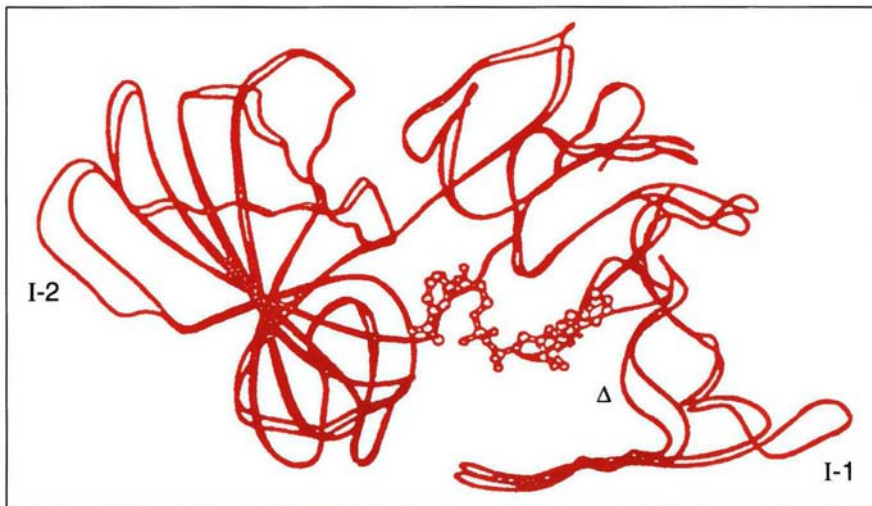


Figure 6. **Superposition de GAPDH trypanosomiale et humaine.** Le squelette carboné (liaison des carbones α) d'une seule sous-unité de l'enzyme homotétramérique est montré. Le cofacteur NAD^+ est modélisé (traits et cercles) lié à la GAPDH trypanosomiale. A l'exception des deux insertions, marquées I-1 et I-2, la différence majeure entre les deux enzymes se situe au niveau d'une boucle près de la partie adénosine du cofacteur NAD^+ , notée Δ .

mensionnelle à 3,2 Å [18]. Les gènes codant pour la gGAPDH de *T. brucei*, *L. mexicana* et *T. cruzi* ont été clonés et séquencés, et les protéines respectives ont été exprimées dans *E. coli* afin de produire des quantités de protéines pures pour d'autres expériences de cristallisation [19, 20]. W.G.J. Hol a résolu la structure tridimensionnelle de l'enzyme de *Leishmania* et G. Oliva a récemment obtenu des cristaux diffractant les rayons X pour gGAPDH de *T. cruzi*. Les trois enzymes des trypanosomatidés sont très proches, avec des identités de séquence comprises entre 80 % et 90 %, contre 55 % d'identité avec l'enzyme humaine. L'enzyme trypanosomiale a adopté le même repliement que la GAPDH humaine (figure 6). La comparaison des structures tridimensionnelles de GAPDH humaine et trypanosomiale a révélé que le domaine de liaison du NAD^+ est bien conservé autour de la partie nicotinamide du cofacteur, les

différences d'acides aminés les plus proches de ce domaine étant situées à 7,5 et 14,5 Å du radical ribose de la nicotinamide. Toutefois, la région de liaison de l'adénosine montre des différences structurales entre les enzymes du parasite et de l'homme beaucoup plus près du cofacteur. En outre, le squelette de la protéine adopte une disposition assez différente dans le voisinage immédiat du ribose O2' (figure 6). La structure tridimensionnelle de la GAPDH de *T. brucei* révèle la présence d'une cavité hydrophobe dans la poche de liaison de NAD⁺, qui est absente de la poche correspondante de l'enzyme humaine; elle pourrait expliquer l'affinité dix fois plus faible pour NAD⁺ de la GAPDH glycosomale. Le groupement phosphate attaché au radical adénosine du NAD⁺, lorsqu'il est lié à la GAPDH, pointe avec ses oxygènes libres vers le solvant. On ne peut donc attendre une inhibition supérieure de la GAPDH de *T. brucei* par des analogues de l'AMP que par des analogues de l'adénosine. De plus, l'introduction d'un groupement phosphate chargé peut empêcher le médicament de traverser les membranes et d'atteindre la GAPDH glycosomale. On peut contourner ce problème en utilisant les adénosines pour lesquelles les trypanosomes possèdent des transporteurs spécifiques. Sur cette base, nous avons conçu des analogues de l'adénosine [21]. La modélisation des analogues d'une nucléotide-adénine à l'intérieur de cette poche par le groupe de W.G.J. Hol a suggéré que des analogues possédant un substitut hydrophobe en position C2 ou C8 de l'anneau adénine, ou une chaîne latérale hydrophobe et encombrante en position C2' de l'anneau ribose, pourraient mieux s'ajuster à l'enzyme du trypanosome qu'à l'enzyme humaine. Plusieurs composés synthétisés par P. Herdewijn (université de Louvain, Belgique) ont été testés pour leur capacité d'inhiber les GAPDH surexprimées des *Leishmania*. Quand des substituants hydrophobes ont été introduits en position C2 et C8, une augmentation significative de l'affinité du composé pour l'enzyme a été obtenue par rapport à l'adénosine de départ, mais malheureusement cela n'a mené à aucune sélectivité. La greffe d'une chaîne

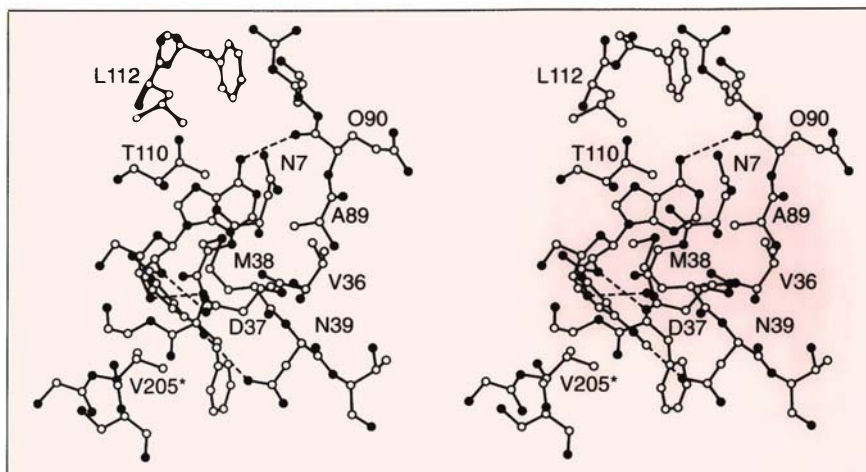


Figure 7. Figure en stéréoscopie montrant le mode de liaison du 2'-désoxy-2'-(3-méthoxybenzamido) adénosine à la GAPDH trypanosomiale de *T. brucei*, obtenu par modélisation.

latérale hydrophobe et encombrante en position 2' de l'anneau ribose rend l'adénosine 2'-désoxy-2'-benzamido adénosine dix fois plus active sur l'enzyme des *Leishmania* que l'adénosine elle-même, tandis que son activité par rapport à l'enzyme du muscle de lapin reste inchangée. Lorsque l'anneau phényl hydrophobe a été étendu à la position méta avec un groupement méthoxy supplémentaire, le composé résultant (2'-désoxy-2'-(m-méthoxy benzamido) adénosine) s'est révélé 167 fois plus actif ($IC_{50} = 0.3$ mM) que l'adénosine ($IC_{50} = 50$ mM) elle-même, mais a montré trois fois moins d'activité avec l'enzyme de mammifère. Le gain en sélectivité est ainsi de 500 fois (figure 7). Un groupement méthoxy à la position para n'entraîne pas de gain supplémentaire, pas plus que le remplacement de l'anneau phényl par un anneau 2'-thiophène. Le remplacement de l'anneau phényl par un groupement plus large, tel qu'un benzyl ou un méthoxy phényl, détruit complètement l'activité, illustrant les exigences structurales précises de l'inhibiteur pour s'ajuster dans la cavité hydrophobe des gGAPDH des trypanosomatidés [21]. Lorsque les composés les plus prometteurs ont été testés dans un système de culture *in vitro* de trypanosomes vivants, il en est ressorti qu'il existait une corrélation entre l'inhibition de l'activité de la GAPDH et cel-

le de la croissance cellulaire. Le composé le plus efficace inhibait la croissance cellulaire à une concentration de 0,1 mM. Ces résultats suggèrent que, malgré la résolution relativement faible (3,2 Å) des cristaux de GAPDH de trypanosome, il devrait être possible de réaliser la modélisation de l'inhibiteur d'une manière fiable. En outre, ces résultats montrent clairement que la GAPDH glycosomale a des caractéristiques intéressantes qui peuvent aisément être exploitées pour la conception des médicaments. L'approche suivie ici pour la trypanosomiase africaine peut également être appliquée pour d'autres maladies tropicales importantes. On pense en particulier à la trypanosomiase sud-américaine ou maladie de Chagas et à la leishmaniose, deux maladies également causées par des trypanosomatidés. En effet, comme nous l'avons mentionné, les séquences et les données cristallographiques ont révélé de grandes similitudes entre leurs GAPDH respectives. Le fait que les parasites responsables des deux dernières maladies soient intracellulaires ne doit pas nécessairement constituer un obstacle. L'avantage d'utiliser des analogues de nucléosides réside dans le fait qu'aussi bien les parasites que les cellules hôtes possèdent, dans leurs membranes plasmiques, des transporteurs spécifiques conduisant les nucléosides vers

l'enzyme cible. Beaucoup de chemin reste toutefois à parcourir avant la mise au point d'un trypanocide utilisable. Premièrement, l'affinité du médicament pour son enzyme cible doit être accrue de plusieurs ordres de grandeur, par exemple grâce à la stratégie décrite ici; deuxièmement, le médicament doit être pris en charge par le transporteur de l'hôte ainsi que par celui du parasite; enfin, la toxicité, la demi-vie, la pharmacocinétique, etc., du composé doivent toutes être favorables. Le développement d'un nouveau médicament est un investissement en moyens humains et matériels qui ne peut être réalisé qu'avec l'appui de l'industrie pharmaceutique ■

*** ABRÉVIATIONS ***

HK: Hexokinase.
PGI: Phosphoglucose isomérase.
PFK: Phosphofructokinase.
ALDO: Aldolase.
TIM: Triosephosphate isomérase.
GAPDH: Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.
PGK: Phosphoglycérate kinase.
GK: Glycérol kinase.
GPDH: Glycérol 3-phosphate déshydrogénase.
PK: Pyruvate kinase.

Je remercie chaleureusement Linda Kohl qui a traduit mon texte anglais en français. Le travail réalisé dans les laboratoires de l'auteur a été en partie financé par un subside de l'État belge – Bureau du Premier ministre – Programme de la Politique Scientifique n° 88/93-122, par le Programme spécial UNDP/Banque mondiale/OMS pour la Recherche et l'Enseignement dans les Maladies tropicales et par la Commission de l'Union Européenne, Programme Science et Technologie pour le Développement.

TIRÉS À PART

F.R. Opperdoes.

Summary

The rational design of new drugs for sleeping sickness

In the Trypanosomatidae, contrary to all other organisms, the glycolytic enzymes are located inside a microbody-like organelle called glycosome. These glycosomal enzymes play an essential role in the energy metabolism of the parasites, and because of their unique location in the cell they are attractive targets for new chemotherapeutic approaches. Most of the glycosomal enzymes and several of their cytosolic isoenzymes from *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana* have been purified to homogeneity or have been over-expressed. Two of the glycosomal enzymes have been crystallized and their three-dimensional structure solved. Some characteristics common to the majority of the glycosomal enzymes and absent from all other glycolytic enzymes have been identified and studied. One typical aspect is the existence of unique peptide insertions or of N- and C-terminal extensions in the glycosomal proteins. These peptides are often characterized by an abundance of the positively charged amino acids: arginine and lysine. Three-dimensional modelling has revealed that these positively charged amino acids cluster on the surface of the proteins in two so-called hot spots that are about 40 Å apart. Another important structural difference has been found in the NAD-binding region of the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase. We have exploited some of these differences and this has resulted in the synthesis of compounds that specifically inhibit glycosomal enzymes and leave the glycolytic enzymes from other organisms unharmed.