

J. QUETIN-LECLERCQ(1)
L. DUPONT(2)
C.W. WRIGHT(3)
J.D. PHILLIPSON(3)
D.C. WARHURST(4)
L. ANGENOT(1)

(1) Service de Pharmacognosie
Institut de Pharmacie, Université de Liège
rue Fusch 5, B-4000 Liège, Belgium
(2) Unité de Cristallographie
Institut de Physique, Université de Liège
Allée du 6 Août 17, 4000 Liège, Belgium
(3) Department of Pharmacognosy
The School of Pharmacy, University of London
29/39 Brunswick Square, London WC1N 1AX
(4) Department of Medical Parasitology
The London School of Hygiene and Tropical Medicine
Keppel Street, London WC1E 7HT

Modélisation moléculaire de l'usambarensine, de la tubulosine et de l'émétine, alcaloïdes cytotoxiques et anti-amibiens

RESUME

Les études des différentes conformations possibles de l'usambarensine, la tubulosine et l'émétine, substances possédant des propriétés cytotoxiques et anti-amibiennes intéressantes, nous indiquent qu'elles ne peuvent pas prendre en solution la conformation plane proposée pour expliquer l'activité de ce type de molécules sur la synthèse des protéines. Il existe cependant une conformation commune, non plane,

où les angles entre les deux plans contenant les cycles aromatiques sont assez proches dans les trois molécules. Cette conformation pourrait confirmer l'hypothèse d'un récepteur commun. Celui-ci devrait être légèrement différent chez les amibes; ce qui expliquerait sa plus grande sensibilité à l'usambarensine.

SUMMARY

Molecular modelling of usambarensine, tubulosine and emetine, three cytotoxic amoebicide alkaloids.

The analyses of the different possible conformations of usambarensine, tubulosine and emetine, which possess interesting cytotoxic and amoebicide properties showed us that they cannot take the planar conformation proposed to explain the activity of this type of molecules on protein synthesis.

Nevertheless, a common (non planar) conformation exists where the angles between the two planes containing the aromatic rings are nearly the same for the three compounds. This fact could confirm the hypothesis of a common receptor which would be slightly different in amoebae because of its higher sensitivity to usambarensine.

INTRODUCTION

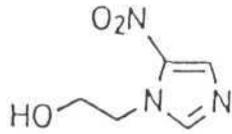
La dysenterie amibienne, dont l'agent responsable est *Entamoeba histolytica*, sévit principalement sous les Tropiques où l'on estime que 42 millions de cas se déclarent chaque année. Sans traitement approprié, la maladie se développe et peut provoquer, entre autres complications, une amibiase hépatique responsable d'environ 75.000 décès chaque année(1).

L'agent thérapeutique le plus couramment utilisé pour traiter la forme aiguë est le métronidazole 1. Ce produit a des effets mutagènes chez les bac-

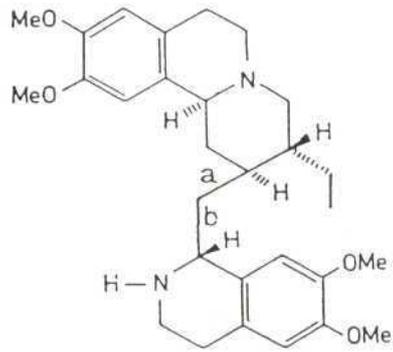
téries et est carcinogène chez les rongeurs(2). De plus, ce médicament est peu efficace contre les infections asymptomatiques du lumen intestinal; des effets secondaires, nausées et interactions avec l'alcool, peuvent réduire la tolérance manifestée par les patients. De surcroît, les amibes peuvent développer une résistance aux agents thérapeutiques, comme on l'a déjà constaté auprès de certains mutants isolés en laboratoire(3).

C'est pourquoi, puisqu'aucun traitement idéal

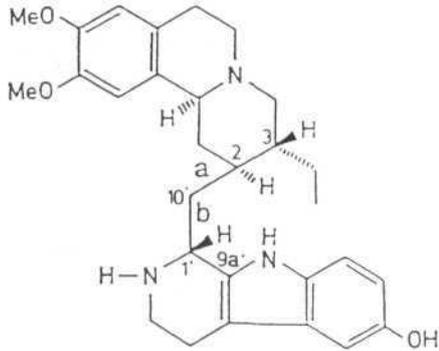
86



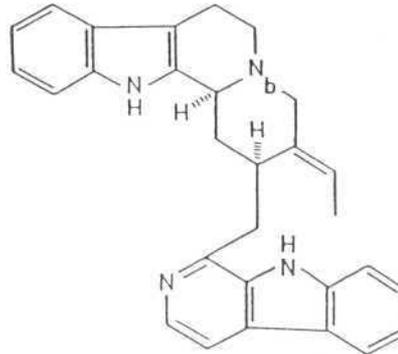
1. Metronidazole



2. éméetine



3. tubulosine



4. usambarensine

Tableau I

Activités amoebicide et cytotoxique (11-12-13)

	<i>E. histolytica</i> I.C. 50 (µg/ml)	zone d'activité cytotoxique (µg/ml)
usambarensine	0,49 (12)	entre 1 et 5 (11)
émétine	1,70 (12)	< 0,05 (11)
tubulosine	~ 20 fois moins active que l'émétine (13)	~ 2 fois moins cyto- toxique que l'émétine (13)

n'existe, le besoin de nouveaux médicaments efficaces dans ce domaine reste élevé et de nombreuses études sont réalisées pour découvrir des produits sélectifs.

Une des premières substances utilisées pour traiter la dysenterie amibienne a été l'émétine **2**, extraite notamment des racines d'ipéca: *Cephaelis ipecacuanha* (Brot) Rich, qui devint, au début du 20^e siècle, la drogue anti-amibienne de choix (4). Ses effets secondaires importants ont favorisé son remplacement par d'autres produits, dont le métronidazole précité, qui manifeste une activité amoebicide à des doses similaires *in vitro* (5). L'émétine est cependant toujours considérée comme un agent extrêmement utile dans le traitement initial de cas sévères d'amibiase hépatique (6). Néanmoins, elle est souvent remplacée par un dérivé hémi-synthétique: la 2,3-déhydroémétine active à dose plus élevée mais moins toxique vu sa vitesse de métabolisation (4).

D'un point de vue biogénétique, chaque molécule d'émétine provient de la condensation de deux molécules de dopamine et d'une molécule de sécologanine. De nombreux alcaloïdes analogues existent et sont biosynthétisés à partir d'une molécule de sécologanine et, soit une molécule de dopamine et une de tryptamine (par exemple, la tubulosine **3**), soit deux molécules de tryptamine (ochrolifuanines, cinchophyllines).

C'est à cette dernière catégorie qu'appartiennent les alcaloïdes indoliques qui ont été extraits à partir des racines (7) et des feuilles (8-9) du *Strychnos usambarensis* Gilg.

Après avoir testé les activités cytotoxiques de ces alcaloïdes (10-11), nous avons déterminé leur effet sur des cultures d'*E. histolytica* (12-13), et avons observé que certains d'entre eux, dont l'usambarensine **4**, étaient beaucoup moins cytotoxiques que l'émétine, mais trois fois plus actifs

sur les amibes (tableau 1). Cette sélectivité nous paraît très intéressante, d'autant plus qu'il s'agit, à notre connaissance, des premiers alcaloïdes possédant une action supérieure à celle de l'émétine. En effet, les études précédentes avaient démontré que l'émétine était un agent amoebicide plus puissant que ses analogues indoliques du groupe de la tubulosine, des ochrolifuanines et des cinchophyllines (13); de plus, des modifications structurales de l'émétine aboutissaient également à une perte d'activité (6). La supériorité d'activité de l'usambarensine nous a incités à continuer les travaux dans ce domaine.

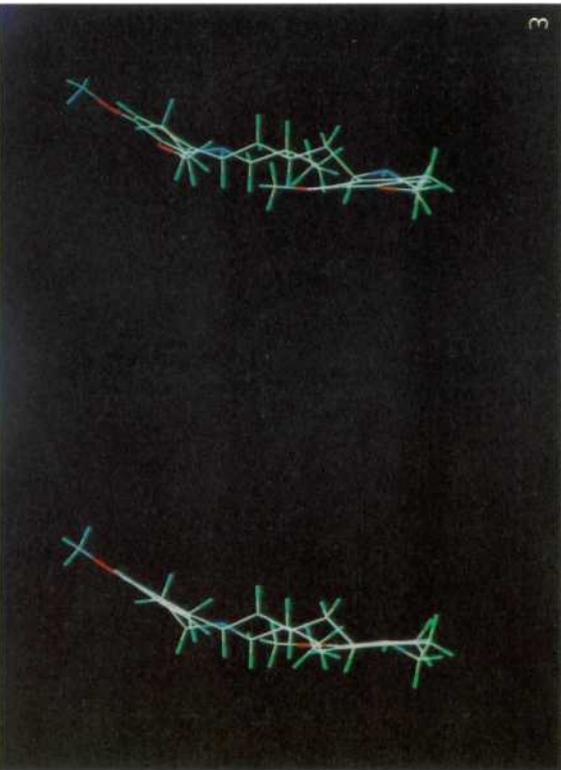
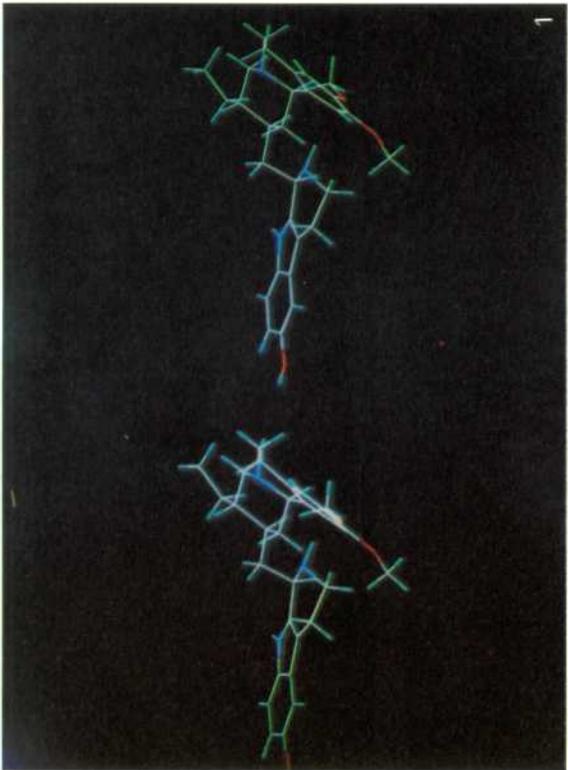
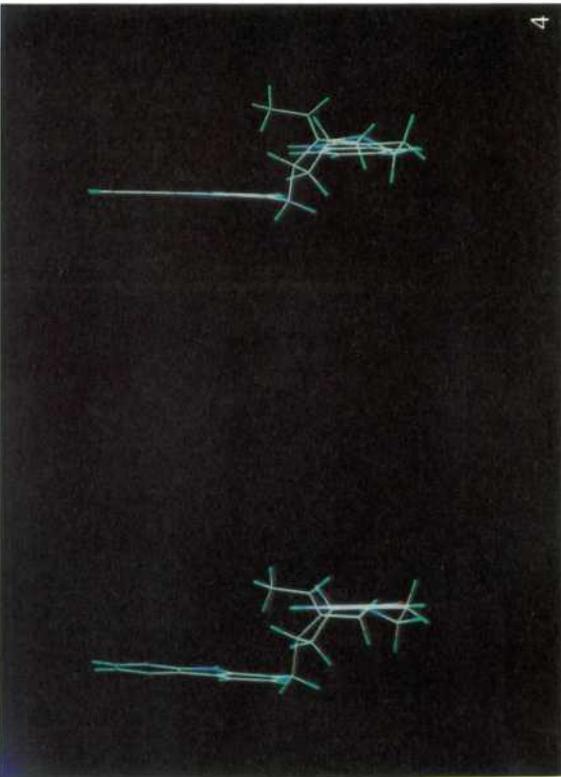
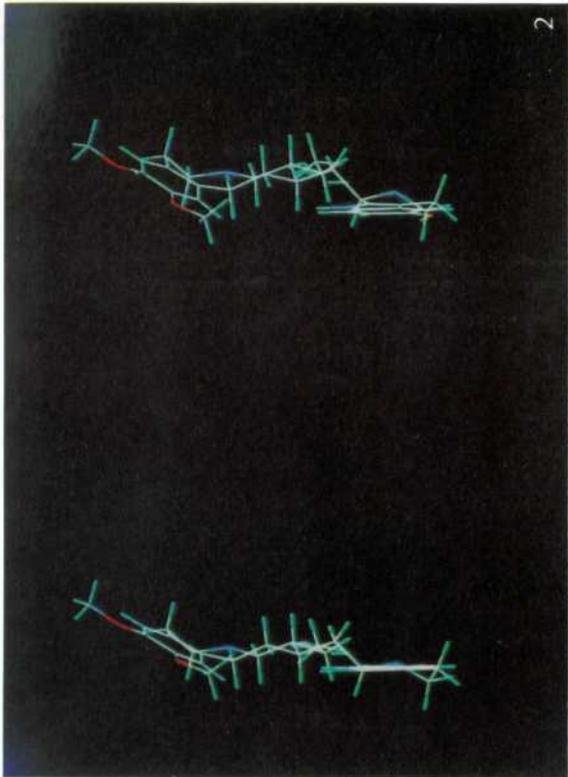
D'un point de vue biochimique, la cytotoxicité de l'émétine est due principalement à une inhibition de la synthèse des protéines. Sur la base d'études de résistance croisée, certains auteurs (14) ont déduit que d'autres alcaloïdes, comme la cryptopleurine, la tylocrébine ou la tubulosine devaient agir sur la même cible moléculaire que l'émétine et dérivés, et ont proposé, pour expliquer cette activité, la présence d'un récepteur ribosomal commun. D'après ces travaux, les molécules, pour être actives, devraient prendre une conformation planaire particulière avec deux cycles aromatiques - rendus légèrement électronégatifs par la présence des substituants méthoxy - situés dans un même plan et, à une certaine distance, un élément nucléophile, par exemple un atome d'azote basique.

Vu l'intérêt potentiel des études de modélisation moléculaire (15) et comme nous disposions d'un programme adéquat applicable aux structures cristallines de l'usambarensine (16) et de la tubulosine (17), nous avons pensé qu'il serait intéressant de vérifier cette hypothèse relative au mode d'action de ces alcaloïdes. Les vues illustrant ce travail ont été réalisées en utilisant le logiciel SYBYL (18) sur un système graphique EVANS and SUTHERLAND PS 330.

RESULTATS ET DISCUSSION

Lors de la construction du stéréomodèle Dreiding de la tubulosine, cette dernière peut prendre une conformation présentant ses deux cycles aromatiques pratiquement coplanaires. C'est également le cas de l'émétine décrite par Gupta et ses collaborateurs (14). Cependant, lorsque l'on construit la tubulosine à partir des données cristallographiques, on s'aperçoit d'abord que, sous sa forme cristalline (conformation A: photo 1) les cycles aromatiques sont dans des plans pratiquement perpendiculaires (17).

D'autre part, lorsqu'on modifie les angles de torsion autour des liaisons a et b, seules variables pouvant être modifiées lorsque la tubulosine **3** est en solution, on observe qu'il devient impossible de mettre les cycles aromatiques dans un même plan. Ceci n'est pas particulièrement surprenant: en effet, les modèles Dreiding se réfèrent à des valeurs d'angles, de longueurs de liaison, de conformation de cycles... idéalisées, mais chaque molécule, en réalité, peut s'en écarter légèrement, ce qui est le cas ici. De plus, des calculs énergéti-



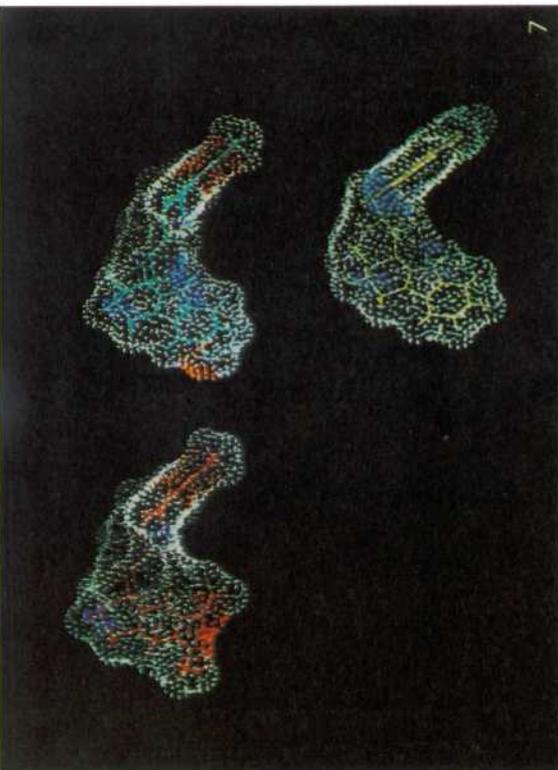
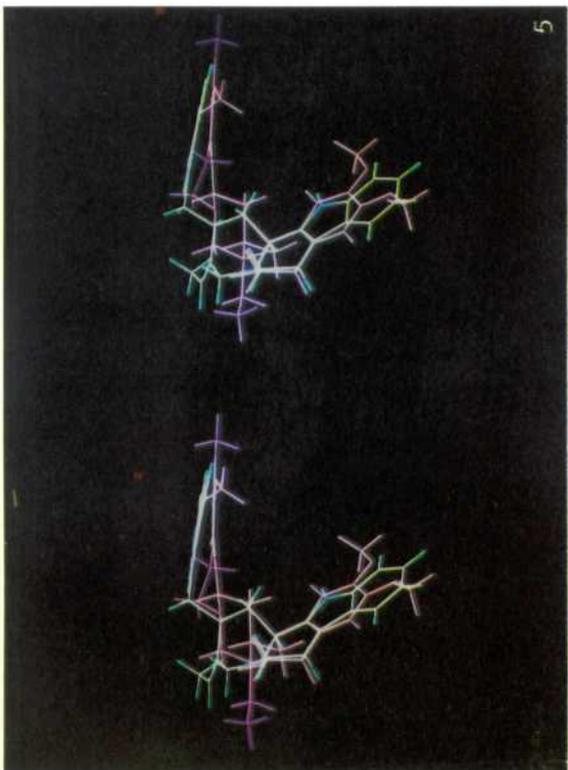
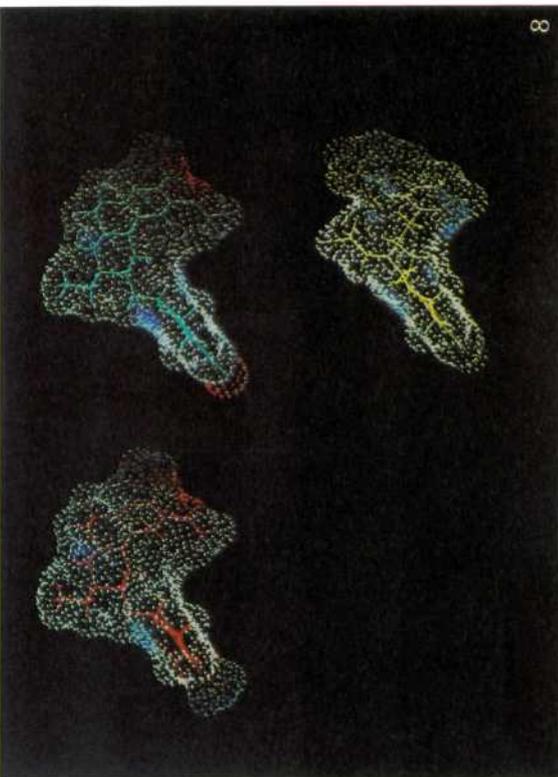
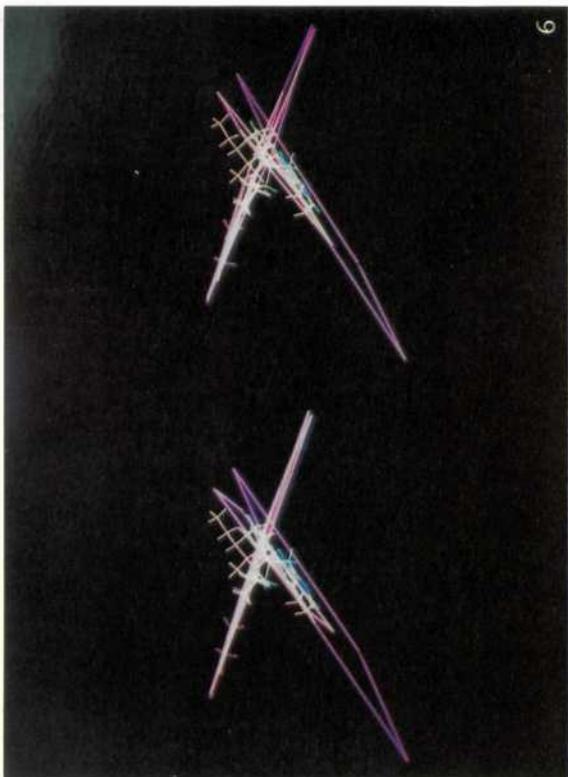


Tableau II

	Conformation	Energie	Angle entre les deux plans
Tubulosine	A	35,5 Kcal	116°
	B	39,9 Kcal	30°
	C	35,5 Kcal	123°
Emétine	A	20,7 Kcal	116°
	B	23,9 Kcal	35°
	C	20,3 Kcal	121°
Usambarensine	A	49,2 Kcal	6°
	C	48,8 Kcal	130°

ques par mécanique moléculaire avec le champ de force Tripos (logiciel SYBYL) sur la structure la plus coplanaire (conformation B: photo 2), donc possédant ses cycles aromatiques dans des plans faisant l'angle le plus proche de 0 ou 180°, c'est-à-dire où les deux angles dièdres définis par les carbones C₂-C₁₀'-C₁'-C_{9a}' et C₃-C₂-C₁₀'-C₁' sont voisins de 240°, nous montrent que cette conformation est énergétiquement moins favorable (E = 39,9 Kcal) que la forme cristalline (E = 35,5 Kcal). De plus, cette conformation est loin d'être plane, puisque les plans contenant les deux cycles aromatiques font un angle de 30°. En construisant l'émétine 2, à partir, pour les fractions communes, des positions atomiques de la forme cristalline de la tubulosine, et en optimisant les autres positions au moyen du logiciel SYBYL (conformation A), on obtient une molécule dont la conformation est très proche de celle de la tubulosine. En modifiant les angles de torsion autour des liaisons a et b de l'émétine, il est également impossible d'avoir les cycles aromatiques dans un même plan. En effet, l'angle minimal entre les deux plans contenant les cycles aromatiques est de 35° (conformation B: photo 3). De plus, cette conformation est également énergétiquement moins favorable (E = 23,9 Kcal) que la conformation A précitée (tableau II). Nous estimons

donc que, sans rejeter immédiatement l'hypothèse d'un récepteur commun, la structure «plane» nécessaire pour agir sur ce récepteur devrait être corrigée ou pour le moins nuancée. Lors de cette étude, nous avons également examiné l'usambarensine, qui sous sa forme cristalline (conformation A: photo 4: E = 49,2 Kcal), a ses cycles aromatiques dans deux plans pratiquement parallèles, et il est également impossible de trouver une conformation où les cycles seraient dans un même plan.

Si ces molécules agissaient sur le même récepteur, il devrait néanmoins exister une autre conformation (non coplanaire) où on retrouverait les éléments communs constitutifs de ces molécules, c'est-à-dire essentiellement les cycles aromatiques et les atomes d'azote basiques dans des positions assez proches. Nous avons ainsi étudié et comparé une série de conformations, possibles au point de vue énergétique, de la tubulosine, de l'usambarensine et de l'émétine, et nous avons observé qu'il existait une conformation énergétiquement favorable (conformation C) où les deux plans comprenant les cycles aromatiques des trois molécules formaient des angles très proches (122,9° pour la tubulosine, 121,4° pour l'émétine et 130,3° pour l'usambarensine). La photo 5 montre la superposition de l'émétine et de

l'usambarensine dans cette conformation particulière. En superposant les trois structures, on remarque aussi une bonne similitude (photo 6). Si l'on représente les surfaces de Connolly (19) (surfaces des molécules accessibles aux solvants), et ce sous deux angles différents (photos 7 et 8), une très grande analogie apparaît principalement entre l'émétine et la tubulosine mais aussi, dans une moindre mesure, avec l'usambarensine. Précisons que l'émétine (squelette rouge) se situe dans le coin supérieur gauche, la tubulosine (squelette bleu), dans le coin supérieur droit et l'usambarensine (squelette jaune) dans le coin inférieur droit des photos 7 et 8.

Il est donc possible que ces molécules agissent au niveau du même récepteur. Cependant, dans le

cas de l'amibe, il semble que l'usambarensine doive sa toxicité plus marquée à la présence d'un angle légèrement différent entre les deux plans contenant les cycles aromatiques. En effet, l'émétine et la tubulosine sont beaucoup plus cytotoxiques que l'usambarensine, tandis que cette dernière substance est un peu plus active sur les amibes que l'émétine, et *a fortiori* que la tubulosine. Il semble également que la polarité des molécules ait aussi une certaine importance, principalement en ce qui concerne l'activité amoebicide. C'est probablement ce qui explique l'effet anti-amibien relativement faible de la tubulosine caractérisée par la présence d'une fonction phénolique.

CONCLUSIONS

Les études de modélisation moléculaire que nous avons effectuées sur la tubulosine, l'émétine et l'usambarensine indiquent qu'aucun de ces alcaloïdes ne semble pouvoir adopter une conformation compatible avec une représentation coplanaire des cycles aromatiques, ce qui est en contradiction avec les hypothèses émises par certains auteurs (14) à partir d'expériences de résistance croisée.

L'étude théorique des énergies conformationnelles des différents modèles moléculaires et la comparaison des différentes conformations énergétiquement possibles pour la tubulosine, l'émétine et l'usambarensine (tableau II) nous ont

cependant montré qu'il existait une conformation particulière, non coplanaire, où l'on retrouvait les éléments communs de ces trois molécules à des positions assez proches, ce qui pourrait confirmer l'hypothèse d'un récepteur commun qui serait, dans le cas de l'amibe, plus sensible à l'usambarensine, tandis que, pour les cellules cancéreuses en culture, l'émétine et la tubulosine seraient plus actives. Nous espérons que les recherches interdisciplinaires que nous développons aboutiront à la mise au point de nouveaux médicaments anti-parasitaires, à partir de ces molécules naturelles dont on découvre actuellement les potentialités biologiques.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le FNRS où l'un de nous (J. Q.-L.) est Chargé de Recherches. L'acqui-

sition du logiciel SYBIL a été possible grâce à un crédit du FRSM.

Reçu en décembre 1990

J. QUETIN-LECLERCQ et L. ANGENOT
Service de Pharmacognosie
Institut de Pharmacie
Université de Liège
Rue Fusch, 5
B-4000 Liège (Belgium)

BIBLIOGRAPHIE

- (1) GUERRANT, R.L. (1986) The global problem of amoebiasis current status, research needs and opportunity for progress. *Rev. Inf. Dis.*, **8**, 218.
- (2) MARTINDALE (1989) The Extra Pharmacopoeia, 29th Edition, p. 667, éd. par REYNOLDS J.E.F. The Pharmaceutical Press, London.
- (3) ORZOCO, E., De La CRUZ HERNANDEZ, F. and RODRIGUEZ, M.A. (1985). Isolation and characterization of *Entamoeba histolytica* mutants resistant to emetine. *Molec. Biochem. Parasitol.*, **15**, 49.
- (4) ROLLO, I.M. (1980) dans GOODMAN and GILMAN'S. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 6th Edition, p. 1061, éd. par GOODMAN, L.S., GILMAN, A., GILMAN, A.G., Baillière and Tindall, London.
- (5) KEENE, A.T., HARRIS, A., PHILLIPSON, J.D. and WARHURST, D.C. (1986) *In vitro* amoebicidal testing of Natural Products; Part I. Methodology, *Planta Med.*, **48**, n° 4, 278.
- (6) KEENE, A.T., PHILLIPSON, J.D., WARHURST, D.C., KOCH, M. and SEGUIN, E. (1987). *In vitro* amoebicidal Testing of Natural Products, Part 2. Alkaloids Related to Emetine, *Planta Med.* **49**, n° 2, 201.
- (7) ANGENOT, L. et BISSET, N.G. (1971) Isolement et structure de nouveaux alcaloïdes extraits du *Strychnos usambarensis* Gilg du Rwanda. *J. Pharm. Belg.*, **26**, 5, 585.
- (8) ANGENOT, L., COUNE, C. et TITS, M. (1978) Nouveaux alcaloïdes des feuilles du *Strychnos usambarensis*. *J. Pharm. Belg.*, **33**, 1, 11.
- (9) ANGENOT, L., COUNE, C., TITS, M. et YAMADA, K. (1978) Alkaloids from *Strychnos usambarensis*: revised structure for usambarine. *Phytochemistry*, **17**, 9, 1987.
- (10) LECLERCQ J., DE PAUW-GILLET, M.-Cl., BASSLEER, R. et ANGENOT, L. (1986). Screening of cytotoxic activities of *Strychnos* alkaloids (methods and results) *J. Ethnopharmacology*, **15**, 305.
- (11) QUETIN-LECLERCQ, J. Détection, purification et analyse structurale d'alcaloïdes indoliques. Etude des effets cytotoxiques produits par certains d'entre eux. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques, ULg, 1989. *Diss. Abstr. Int.*, section C, 1990, **51**, nr 1, p. 95C.
- (12) WRIGHT, C.W., BRAY, D.M., O'NEILL, M.J., WARHURST, D.C., PHILLIPSON, J.D., QUETIN-LECLERCQ, J. and ANGENOT, L. Antiamoebic and antiplasmodial activities of Alkaloids isolated from *Strychnos usambarensis*. *Planta Med.*, in press.
- (13) WRIGHT, C.W., O'NEILL, M.J., PHILLIPSON, J.D., WARHURST, D.C., ANGENOT, L. and QUETIN-LECLERCQ, J. Antiamoebic activity of indole analogues of emetine with *in vitro* potency greater than that of emetine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1990, **42**, 94 P.
- (14) GUPTA, R.S., KREPINSKY, J.J., SIMINOVITCH, L. (1980) Structural Determinants Responsible for the Biological Activity of (-) Emetine, (-) Cryptopleurine, and (-) Tylocrebine: Structure-Activity Relationship among Related Compounds. *Mol. Pharmacol.*, **18**, 136.
- (15) BARLOW, D.J., PERKINS, T.D.S. (1990) Applications of Interactive Computer Graphics in Analysis of Biomolecular Structures. *Natural Product Reports*, **7**, 311.
- (16) DIDEBERG, O., DUPONT, L. et ANGENOT, L. (1975) Détermination de la structure cristalline et de la configuration absolue d'un dérivé de l'usambarensine. *Acta Crystallogr.*, **31**, B, 1571.
- (17) MA, W.W., ANDERSON, J.E., Mc KENZIE, A.T., BYRN, S.R. et Mc LAUGHLIN, J.L. (1990) Tubulosine: an antitumor constituent of *Pogonopus speciosus*. *J. Nat. Prod.*, **53**, 4, 1009.
- (18) SYBYL (1990) Molecular Modelling Software, Version 532, Tripos Associate, a subsidiary of Evans & Sutherland, 1699 Honley Road, St Louis, MO 63144, USA.
- (19) CONNOLLY, M.L. (1985) Computation of Molecular Volume. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 1118.