

Céline MEINGUET (Grant Télémie),
Johan WOUTERS (Promoteur) ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Namur Medicine & Drug Innovation Center
(NAMEDIC; membre de NARILIS), Université de Namur
(UNamur), rue de Bruxelles, 61, B-5000 Namur, Belgique,
celine.meinguet@unamur.be
johan.wouters@unamur.be

Les dérivés de l'harmine, nouvelles molécules aux propriétés anticancéreuses : de la conception aux études *in vivo*

1. Introduction

L'harmine (Figure 1 (a)) est une molécule naturelle initialement isolée à partir de plantes telles que *Peganum Harmala*. Cette molécule était, à l'origine, utilisée par les indigènes d'Amérique du Sud en tant qu'ingrédient principal de l'ayahuasca, une décoction de plantes consommée, notamment, pour ses effets hallucinogènes [1].

De nos jours, l'harmine est particulièrement étudiée pour ses diverses propriétés pharmacologiques, incluant une activité anticancéreuse. En effet, des études *in vitro* ont mis en évidence la diminution de viabilité cellulaire de cellules cancéreuses provenant de divers tissus incluant le cerveau, le colon, le sein, le poumon, le foie, l'œsophage et les tissus gastriques, après un traitement par l'harmine [2-9]. Cet effet de l'harmine se confirme également *in vivo*, puisque la molécule inhibe la croissance tumorale, et ce pour divers modèles murins [2, 6, 8, 10-12].

L'harmine est également un inhibiteur de la monoamine oxydase (MAO), enzyme catalysant la désamination de neurotransmetteurs tels que la dopamine et la sérotonine [14]. Les inhibiteurs de cette enzyme sont notamment étudiés pour le traitement de la dépression et de la maladie de Parkinson. Dès lors, un projet ayant pour but la découverte de nouvelles molécules inhibitrices et sélectives des MAO-A, une isoforme de la MAO, a été initié au sein du laboratoire de Chimie Biologique Structurale de l'Université de Namur (membre du Centre NAMEDIC-Narilis), laboratoire où cette thèse a été réalisée. Ce travail consistait à étudier le pouvoir inhibiteur de dérivés originaux mono-, di- et trisubstitués de l'harmine, synthétisés au laboratoire (Figure 1 (b-d)) [15, 16].

Bien que l'harmine possède des propriétés pharmacologiques intéressantes, il est à noter que cette molécule présente un caractère neurotoxique *in vivo*. En effet, il a été montré que son injection s'accompagne de tétanie, de mouvements de convulsion ou encore de tremblements, ces effets s'estompant

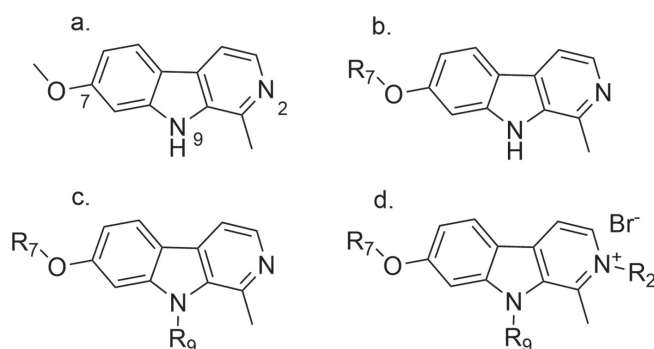


Figure 1 : Structures de (a) l'harmine, (b) des dérivés monosubstitués de l'harmine, (c) des dérivés disubstitués de l'harmine, (d) des dérivés trisubstitués de l'harmine.

plusieurs minutes après injection [10, 16, 17]. Il est également important de noter que l'harmine n'induirait, par contre, pas de génotoxicité *in vivo* [18, 19]. L'existence de ces effets neurotoxiques souligne l'intérêt porté au développement de nouveaux dérivés de l'harmine exempts d'effets secondaires indésirables.

L'objectif de ce travail de thèse est de concevoir de nouvelles molécules possédant des propriétés anticancéreuses. Pour ce faire, et sur base de l'activité anticancéreuse importante observée pour l'harmine, les dérivés synthétisés initialement comme inhibiteurs de MAO-A (Figure 1 (b-d)) ont été le point de départ de cette recherche.

2. Conception, synthèse et caractérisation de trois générations de dérivés de l'harmine

La recherche de nouvelles molécules à visée antiproliférative s'est réalisée en portant une attention particulière à la solubilité des composés. Ce paramètre est important dans l'élaboration de nouvelles molécules. En effet, une faible solubilité est défavorable au développement d'un composé, notamment en limitant son absorption ou encore en restreignant les doses pouvant être administrées par voie intraveineuse (IV). Dès lors, la solubilité a été utilisée comme un filtre à la conception de nouvelles molécules. Plus précisément, une solubilité thermodynamique supérieure à $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ [21] et une concentration permettant de diminuer la viabilité cellulaire de moitié (IC_{50}) inférieure à celle de l'harmine ($\text{IC}_{50} = 28 \pm 3 \mu\text{M}$) ont été posés comme critères permettant de qualifier le candidat en tant que chef de file.

L' IC_{50} des molécules dérivées de l'harmine et étudiées au laboratoire en tant qu'inhibiteurs de MAO-A, a été déterminée par un test de viabilité (test MTT) sur 5 lignées de cellules cancéreuses humaines, dont notamment 3 lignées de gliomes. Le choix de ces lignées cellulaires se concentrant notamment sur l'étude des gliomes se base sur le fait que ces cancers sont très agressifs avec l'un des taux de survie sur 5 ans les plus faibles (19% entre 2010 et 2011 [22]). Les résultats ont mis en évidence que la trisubstitution en positions 2, 7 et 9 par un groupement benzyle ($\text{IC}_{50} = 0,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$) permettait d'augmenter fortement le pouvoir antiprolifératif de l'harmine ($\text{IC}_{50} = 28 \pm 3 \mu\text{M}$), contrairement à leurs

analogues mono- et disubstitués. Ce résultat a ensuite été confirmé par la synthèse et la caractérisation d'une vingtaine de molécules de première génération trisubstituées par des groupements apolaires. Cependant, malgré une activité antiproliférative plus importante ($0,34 < \text{IC}_{50} < 2,7 \mu\text{M}$) que celle mesurée pour l'harmine, ces molécules sont caractérisées par une lipophilie calculée élevée ($\text{cLogP} > 5$) ainsi qu'une faible ($73 \pm 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) voire médiocre ($< 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) solubilité cinétique au pH physiologique (Tableau 1) [22].

Dès lors, dans le but d'accroître la solubilité des molécules, une seconde génération de dérivés trisubstitués portant des groupements polaires a été synthétisée. Cependant, bien que ces molécules possèdent une faible lipophilie calculée ($\text{cLogP} < 2$) et une importante solubilité au pH physiologique ($> 206 \mu\text{g.mL}^{-1}$), une perte de l'activité antiproliférative a été observée ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$) pour ces molécules (Tableau 1). Ce résultat a permis, dès lors, de restreindre ensuite notre recherche aux substituants apolaires [23].

Afin de rationaliser l'ensemble des résultats obtenus sur la première et la deuxième générations de dérivés de l'harmine, un modèle 3D-QSAR a été élaboré et a permis d'établir une relation quantitative entre la structure tridimensionnelle des molécules et leur activité antiproliférative sur la lignée de cellules cancéreuses de gliomes Hs683. Sur base de ce modèle, une troisième génération de dérivés de l'harmine, composée de 8 nouvelles molécules, a été conçue. Ces molécules sont caractérisées par une importante solubilité ($> 164 \mu\text{g.mL}^{-1}$) combinée à une importante activité antiproliférative ($0,3 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} < 13 \mu\text{M}$) (Tableau 1) [23]. Parmi ces dérivés de troisième génération, la molécule 1 (Figure 2), possédant l'activité antiproliférative moyenne la plus importante ($\text{IC}_{50} < 0,3 \mu\text{M}$), a été définie comme chef de file. Une étude plus approfondie a été réalisée afin de, notamment, déterminer ses propriétés pharmacologiques et toxicologiques.

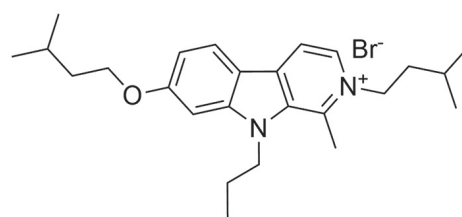


Figure 2 : Structure de la molécule 1

3. Étude pharmacologique de 1

Afin d'approfondir les connaissances de la molécule 1, une évaluation pharmacologique et toxicologique *in silico*, *in vitro* et *in vivo* a été menée.

Dans un premier temps, une étude *in silico* suggère un caractère très pénétrant de 1 au niveau de la barrière hématoencéphalique. Ce résultat renforce *a priori* l'intérêt porté à l'étude du composé notamment dans le traitement de gliomes.

Dans un second temps, une étude *in vitro* a permis de mettre en évidence trois propriétés intéressantes du composé. D'une part, le composé 1 présente une activité antiproliférative du même ordre de grandeur sur les deux lignées de cellules saines humaines de fibroblastes (BJ - $IC_{50}=1,60 \mu\text{M}$) et de cellules endothéliales (HUVEC - $IC_{50}=2,00 \mu\text{M}$). D'autre part, ces cellules saines sont moins sensibles à l'action antiproliférative de 1 que les cellules cancéreuses A549 ($IC_{50}=0,16 \mu\text{M}$). Ce résultat s'explique par un effet antiprolifératif induit par 1 plus important sur A549 que sur les cellules saines étudiées, pour des concentrations comprises entre 1 et $10 \mu\text{M}$. Cette propriété est notamment intéressante dans le développement de molécules présentant une toxicité sélective envers les cellules cancéreuses. Enfin, le composé est stable pendant huit heures au moins, dans du plasma humain reconstitué. Ceci représente un résultat important dans le cadre du développement d'un futur médicament.

Étant donné les propriétés très intéressantes observées pour 1, une étude de toxicité *in vivo* a été envisagée. La dose maximale tolérée de 1 a été évaluée sur un groupe comprenant 6 souris. Les résultats ont mis en évidence l'absence d'effets indésirables pour une dose unique de 1 mg.kg^{-1} administrée par voie intrapéritonéale (IP), alors qu'une dose de 5 mg.kg^{-1} entraîne un comportement amorphe des animaux après administration ainsi qu'un taux de survie de 67% en fin d'expérience. Il est à noter qu'un comportement amorphe suggère l'action potentielle du composé au sein du système nerveux central. Dès lors, la dose de 1 mg.kg^{-1} a été choisie dans le but d'évaluer l'efficacité anticancéreuse de 1 *in vivo* sur un modèle murin induisant des métastases pulmonaires. Cette expérience consistait à comparer le temps de survie d'animaux traités trois fois par semaine pendant trois semaines par le témozolomide (composé de référence - 80 mg.kg^{-1} , *per os*) [24, 25], d'animaux traités une fois par semaine pendant trois semaines par le composé 1 (1 mg.kg^{-1} , IP) et d'animaux recevant uniquement l'excipient une fois par semaine pendant trois semaines. Cette étude *in vivo* a mis en évidence une augmentation significative du temps de survie des animaux traités par le composé de référence, le témozolomide. Par contre, le temps de survie des animaux traités par le composé 1 n'est pas significativement différent du temps de survie des animaux recevant uniquement l'excipient, permettant de conclure que le composé 1 n'est pas actif sur le modèle utilisé.

	Activité antiproliférative: IC_{50} moyenne (μM)	Solubilité (pH 7,4 ; 25°C) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	cLogP
Harmine	28±3	ND ^a	ND
Molécules de 1^{ère} génération	0,34 – 2,7	<73	>5
Molécules de 2^{ième} génération	>100	>206	<2
Molécules de 3^{ième} génération	<0,3 – 13	>164	2 – 3,5

^aND : Non déterminé

Tableau 1 : Activité antiproliférative moyenne (IC_{50}) sur cinq lignées de cellules cancéreuses humaines, solubilité cinétique mesurée et lipophilie calculée (cLogP) pour l'harmine, ainsi que pour les molécules de première, deuxième et troisième génération.

Trois hypothèses ont été émises afin d'expliquer ce résultat. La première est que la dose administrée est plus faible que la dose efficace. La seconde est que 1 n'est pas actif sur le modèle utilisé. En effet, ce modèle permet l'étude de l'efficacité d'un composé sur le développement de métastases pulmonaires. Or les métastases présentent des modifications génétiques par rapport aux tumeurs primaires, induisant des phénotypes différents [26]. La troisième hypothèse, renforcée par une étude pharmacocinétique réalisée sur 1, est qu'une trop faible résorption du composé après administration par voie IP empêche d'atteindre la dose efficace au sein de la circulation sanguine. Cependant, l'administration IP de 1 était inévitable puisque le composé se présente sous forme de suspension dans les deux excipients étudiés (99,9% NaCl 0,9% m/v / 0,01% Tween-80 ou 90% NaCl 0,9% m/v / 10% DMSO). Dès lors, la troisième partie du travail s'est consacrée à l'étude d'un mode de formulation permettant l'obtention d'une solution injectable de 1 autorisant ainsi une administration par voie IV du composé.

4. Etude de la formulation de 1 : complexation avec les cyclodextrines

Une administration par voie IV n'étant possible que pour une solution, la formation d'un complexe avec des cyclodextrines (CDs) a été envisagée afin d'accroître la solubilité de la molécule 1 dans l'excipient. Cette étude s'est divisée en quatre parties, à savoir : la caractérisation de la solubilité de 1 en présence de CDs ; l'évaluation de la structure des complexes ; l'étude biologique des complexes et enfin la détermination de la solubilité

des complexes dans l'excipient [26].

Dans un premier temps, un premier criblage a mis en évidence l'accroissement de solubilité de 1 en présence de cyclodextrines composées de 7 sous-unités de glucose, β CD et 2HP- β CD (β CD modifiée par des groupements 2-hydroxypropyles). Une expérience de solubilité de phase en présence de concentrations croissantes en 2HP- β CD a corroboré ce résultat et a mis en évidence une stœchiométrie 1:1 entre les deux molécules. Ce résultat est également confirmé par une expérience utilisant la méthode des variations continues en mesurant le déplacement chimique du proton H-3 de la CD par résonance magnétique nucléaire ($^1\text{H-RMN}$). De plus, une constante de stabilité de 116 M^{-1} et une efficacité de complexation de 0,28 ont été calculées pour des concentrations en 2HP- β CD allant jusqu'à 80 mM. Ces valeurs sont caractéristiques de ce type de complexe et confirment l'inclusion de 1 au sein de la cavité de la CD.

Dans un second temps, une étude de la géométrie du complexe par $^1\text{H-RMN}$ et par optimisation de géométrie a été réalisée et suggère une interaction de la partie aromatique indolique de la β -carboline avec la cavité de la CD (Figure 3).

De plus, un test de viabilité cellulaire en présence des complexes 1 : 2HP- β CD ($\text{IC}_{50}=0,18 \mu\text{M}$) et 1 : β CD ($\text{IC}_{50}=0,19 \mu\text{M}$) a mis en évidence que la complexation n'affecte pas le pouvoir antiprolifératif de 1 ($\text{IC}_{50}=0,16 \mu\text{M}$).

Finalement, le complexe 1 : 2HP- β CD a été préparé dans l'excipient (99,9% NaCl 0,9% m/v et 0,01% Tween-80), pour une dose en 1 de $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, condui-

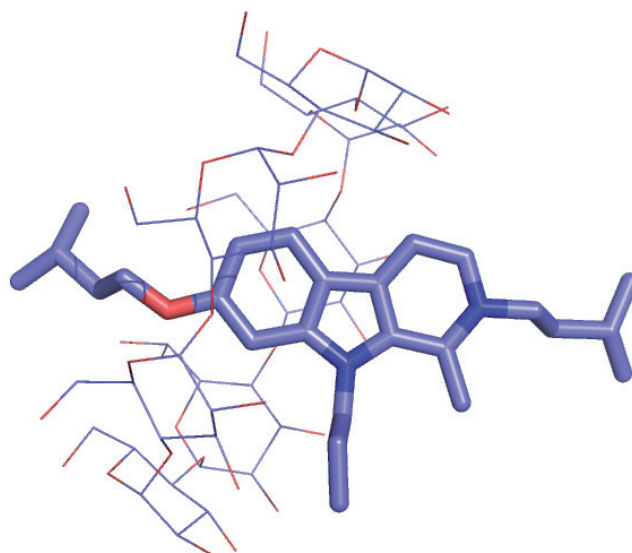


Figure 3 : Structure du complexe entre la β CD (lignes) et 1 (bâtons) déterminé par optimisation de géométrie.

sant à une solution et non plus à une suspension. Ce résultat confirme que l'objectif posé lors de cette troisième partie du travail a été atteint et permet d'entrevoir l'étude de l'activité anticancéreuse de 1 après administration par voie IV du complexe 1 : 2HP- β CD.

5. Conclusions

Au cours de ce projet, un travail pluridisciplinaire a été réalisé et a permis de contribuer au développement et à l'étude approfondie d'une nouvelle molécule combinant aussi bien une activité antiproliférative de l'ordre du submicromolaire sur diverses lignées de cellules cancéreuses, à une importante solubilité au pH physiologique. Sur base des résultats obtenus dans le cadre de ce travail, il serait intéressant d'évaluer le pouvoir anticancéreux du complexe 1 : 2HP- β CD sur un modèle murin de tumeur solide, après administration IV. Si le pouvoir anticancéreux de ce composé est confirmé, il pourra ainsi être évalué de manière plus approfondie dans le cadre du traitement de divers cancers, incluant les gliomes.

Remerciement

Ce projet a été financé par le FNRS (Grant Télévie 7.4.529.13.F et Grant FRSM 4525.11). L'auteur remercie également le centre NAMEDIC-Narilis pour la mise à disposition de son équipement.

Références

- [1] D.J. McKenna, G.H.N. Towers, F. Abbott, Monoamine oxidase inhibitors in south american hallucinogenic plants: tryptamine and β -carboline constituents of ayahuasca, *J. Ethnopharmacol.* 10 (1984) 195–223.
- [2] R. Cao, Q. Chen, X. Hou, H. Chen, H. Guan, Y. Ma, W. Peng, A. Xu, Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted β -carboline derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 4613–23.
- [3] J.M. Pérez Martín, V. Labrador, P. Fernández Freire, M.L. Molero, M.J. Hazen, Ultrastructural changes induced in HeLa Cells after phototoxic treatment with harmine, *J. Appl. Toxicol.* 24 (2004) 197–201.
- [4] Y. Song, D. Kesuma, J. Wang, Y. Deng, J. Duan, J.H. Wang, R.Z. Qi, Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317 (2004) 128–32.
- [5] T.P. Hamsa, G. Kuttan, Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma., *Chin. Med.* 6 (2011) 1–8.
- [6] H. Liu, D. Han, Y. Liu, X. Hou, J. Wu, H. Li, J. Yang, C. Shen, G. Yang, C. Fu, X. Li, H. Che, J. Ai, S. Zhao, Harmine hydrochloride inhibits Akt phosphorylation and depletes the pool of cancer stem-like cells of glioblastoma, *J. Neurooncol.* 112 (2013) 39–48.
- [7] L. Zhao, M. Wink, The β -carboline alkaloid harmine inhibits telomerase activity of MCF-7 cells by down-regulating hTERT mRNA expression accompanied by an accelerated senescent phenotype, *PeerJ.* 1 (2013) e174.
- [8] H. Zhang, K. Sun, J. Ding, H. Xu, L. Zhu, K. Zhang, X. Li, W. Sun, Harmine induces apoptosis and inhibits tumor cell proliferation, migration and invasion through down-regulation of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer, *Phytomedicine.* 21 (2014) 1–8.
- [9] M.R. Cao, Q. Li, Z.L. Liu, H.H. Liu, W. Wang, X.L. Liao, Y.L. Pan, J.W. Jiang, Harmine induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial signaling pathway, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 10 (2011) 599–604.
- [10] Q. Chen, R. Chao, H. Chen, X. Hou, H. Yan, S. Zhou, W. Peng, A. Xu, Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis., *Int. J. Cancer.* 114 (2004) 675–82.
- [11] F. Dai, Y. Chen, Y. Song, L. Huang, D. Zhai, Y. Dong, L. Lai, T. Zhang, D. Li, X. Pang, M. Liu, Z. Yi, A natural small molecule harmine inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth through activation of p53 in endothelial cells, *PLoS One.* 7 (2012) e52162.
- [12] T.P. Hamsa, G. Kuttan, Studies on Anti-metastatic and Anti-invasive Effects of Harmine Using Highly Metastatic Murine B16F-10 Melanoma Cells, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 30 (2011) 123–137.
- [13] R. Millet, *Mastère en Drug Design*, in: *Les Neurotransmetteurs*, Institut de chimie pharmaceutique Albert Lespagnol, Lille, France, 2012.
- [14] J. Reniers, Rational design, synthesis, molecular modeling and evaluation of β -carboline and 5H-indeno[1,2-c] pyridazin-5-one derivatives as potential MAO and IDO inhibitors, Thèse de doctorat, Université de Namur, Namur, Belgium, 2011.
- [15] J. Reniers, S. Robert, R. Frederick, B. Masereel, S. Vincent, J. Wouters, Synthesis and evaluation of β -carboline derivatives as potential monoamine oxidase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 134–44.
- [16] M.M. Airaksinen, A. Lecklin, V. Saano, L. Tuomisto, J. Gyntner, Tremorogenic effect and inhibition of tryptamine and serotonin receptor binding by β -carbolines, *Pharmacol. Toxicol.* 60 (1987) 5–8.
- [17] R. Cao, H. Chen, W. Peng, Y. Ma, X. Hou, H. Guan, X. Liu, A. Xu, Design, synthesis and in vitro and in vivo antitumor activities of novel beta-carboline derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 991–1001.
- [18] J.M. Boeira, J. da Silva, B. Erdtmann, J.A. Henriques, Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro, *Pharmacol. Toxicol.* 89 (2001) 287–94.
- [19] J.N. Picada, K.V.C.L. da Silva, B. Erdtmann, A.T. Henriques, J.A.P. Henriques, Genotoxic effects of structurally related β -carboline alkaloids, *Mutat. Res.* 379 (1997) 135–49.
- [20] E.H. Kerns, L. Di, *Drug-like properties: concept, structure design and methods from ADME to toxicity optimization*, Academic P, 2008.
- [21] Cancer Research UK, *Cancer Statistics Report*, *Lancet.* (2014) 1–10. <http://publications.cancerresearchuk.org/cancerstats/statssurvival/survival.html> (accessed April 1, 2015).
- [22] R. Frédérick, C. Bruyère, C. Vancraeynest, J. Reniers, C. Meinguet, L. Pochet, A. Backlund, B. Masereel, R. Kiss, J. Wouters, Novel trisubstituted harmine derivatives with original in vitro anticancer activity, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 6489–501.
- [23] C. Meinguet, C. Bruyère, R. Frédérick, V. Mathieu, C. Vancraeynest, L. Pochet, J. Laloy, J. Mortier, G. Wolber, R. Kiss, B. Masereel, J. Wouters, 3D-QSAR, Design, Synthesis and characterization of trisubstituted harmine derivatives with in vitro antiproliferative properties, *Eur. J. Med. Chem.* 94 (2015) 45–55.
- [24] N. Wauthoz, P. Deleuze, J. Hecq, I. Roland, S. Saussez, I. Adanja, O. Debeir, C. Decaestecker, V. Mathieu, R. Kiss, K. Amighi, In vivo assessment of temozolomide local delivery for lung cancer inhalation therapy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 39 (2010) 402–11.
- [25] V. Mathieu, M. Le Mercier, N. De Neve, S. Sauvage, T. Gras, I. Roland, F. Lefranc, R. Kiss, Galectin-1 knockdown increases sensitivity to temozolomide in a B16F10 mouse metastatic melanoma model, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 2399–410.
- [26] J. Yokota, J. Yokota, Tumor progression and metastasis, *Carcinogenesis.* 21 (2000) 497–503.
- [27] C. Meinguet, B. Masereel, J. Wouters, Preparation and characterization of a new harmine-based antiproliferative compound in complex with cyclodextrin: Increasing solubility while maintaining biological activity, *Eur. J. Pharm. Sci.* 77 (2015) 135–140.