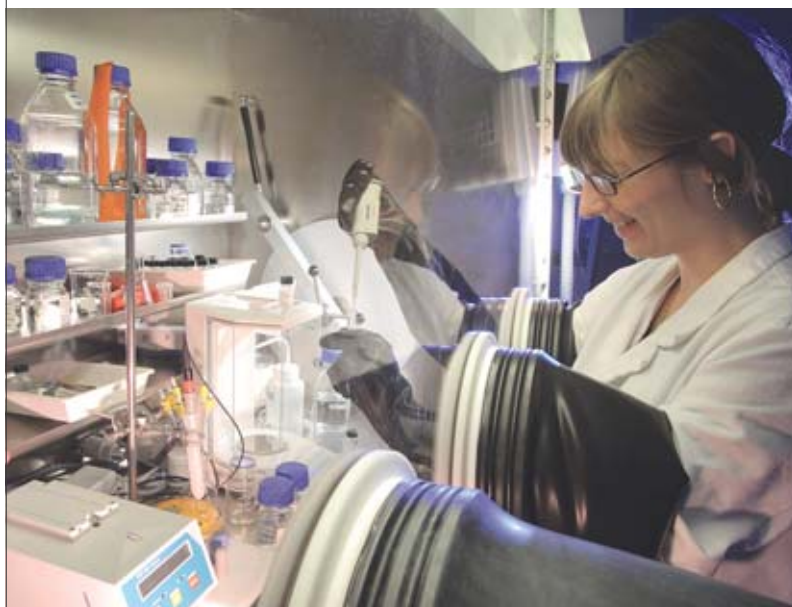


Drug design pour optimiser les molécules pharmacothérapeutiques

Aujourd'hui, **pour doper l'efficacité de nos médicaments ou en créer de nouveaux, les chercheurs ne se contentent plus d'observer et de tester les substances existantes : ils en « dessinent » de nouvelles.** C'est la technique dite *Structure Based Drug Design* (SBDD). Très sophistiquée, elle combine à la fois les progrès de la chimie, de la biologie moléculaire et cellulaire, de la pharmacologie, mais aussi de la simulation numérique. Désormais, les chercheurs peuvent prédire les effets d'une substance sur l'organisme avant même sa fabrication et sa mise sur le marché : une révolution dans la pharmacopée.



Manipulation de composés chimiques sensibles à l'oxygène de l'air sous atmosphère inerte (argon) dans une boîte à gants.

Les médecins antiques soignaient **empiriquement** avec des produits naturels. Il faudra des siècles pour que la science du médicament identifie leurs principes actifs, les fabrique par synthèse chimique, déchiffre les mécanismes d'action... jusqu'aux années 1970 où de nouveaux outils d'exploration des **protéines** et des **gènes** permettront d'appréhender le monde du vivant au niveau moléculaire. D'où l'apparition de molécules « **pharmacophores** » programmées pour atteindre leur cible et remplir leur fonction, qui donneront naissance à de nouveaux médicaments dont voici quelques exemples.

La maladie de Wilson bientôt vaincue ?

C'est un dysfonctionnement de la régulation du cuivre dans l'organisme qui déclenche cette maladie rare atteignant 1 000 à 1 500 personnes, en France. Le cuivre, en s'accumulant dans certaines parties du corps comme les yeux, le système nerveux central, le foie... provoque des symptômes neurologiques, psychiques ou hépatiques (cirrhose) susceptibles d'entraîner une transplantation hépatique.

Une maladie de l'excès de cuivre

Oligo-élément indispensable à la croissance, à la solidité des os, au fonctionnement des globules rouges et blancs, le cuivre se rencontre dans une multitude d'aliments : crustacés, brocolis, champignons ou chocolat... Il existe dans deux **états d'oxydation** solubles : l'état **réduit** Cu (I) et l'état **oxydé** Cu (II). En excès dans l'organisme, il peut générer des espèces oxydantes très nocives pour les cellules. D'où, la nécessaire régulation de la concentration du cuivre opérée par un ensemble de protéines – opération nommée **homéostasie** du cuivre.

Pour comprendre cette maladie, il faut savoir que le gène déficient, responsable de cette maladie, **code** pour une protéine du transport du cuivre dans le foie, appelée **protéine de Wilson**⁽¹⁾, ou ATP7B. Elle distribue le cuivre aux **enzymes** qui en ont besoin ou l'excrète vers la bile quand il se trouve en excès. Que cet excès de cuivre ne s'élimine plus correctement, s'accumule dans l'organisme, et la maladie se déclenche. Des traitements existent pour limiter l'absorption du cuivre alimentaire : la **D-Pénicillamine** et la **trientine**. Cette pharmacopée ancienne et peu spécifique présente un double inconvénient : une efficacité limitée chez certains patients et des effets secondaires importants. D'où l'urgence d'un nouveau médicament.

Une démarche rationnelle vers de nouveaux traitements plus spécifiques

Pour les chercheurs de l'Institut nanosciences et cryogénie (Inac), l'amélioration du traitement de la maladie de Wilson passe par la mise au point de **chélateurs** capables d'aller chercher le cuivre stocké en excès dans le foie, sans interagir avec d'autres **ions** métalliques essentiels. Encore fallait-il synthétiser des molécules capables de piéger le cuivre sous sa forme prédominante dans les cellules – le cuivre (I) – dotées d'un système de guidage vers le foie. Cette molécule possède deux unités : la première chélatant le cuivre (I) et la seconde ciblant les cellules du foie (les hépatocytes). Pour éviter de piéger d'autres métaux essentiels, elle se présente sous

(1) WILSON (Kinnier), médecin neurologue britannique (1878-1937) qui a notamment travaillé avec Pierre Curie et Joseph Babinski, titulaire de la chaire de neurologie au King's College. Il a décrit la maladie qui porte son nom en 1912.

forme prodrogue, c'est-à-dire active seulement après son entrée dans les cellules visées (figure 1).

● Stratégie pour chélater le cuivre (I) :

Ce sont les protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre qui servent de modèles pour l'élaboration de chélateurs du cuivre efficaces dans les cellules. En effet, des transporteurs, comme les « chaperonnes » à cuivre, ou des « séquestrants », comme les **métallothionéines**, fixent le cuivre à l'état réduit Cu(I) grâce à des cystéines, c'est-à-dire des **acides- α -aminés** naturels possédant un groupement **thiol (SH)**. Ce sont les fonctions chimiques thiols qui permettent à ces protéines de lier efficacement et sélectivement le cuivre (I). Ces acides- α -aminés servent de briques de base pour construire l'unité chélatante et obtenir des molécules capables de mimer le pouvoir chélatant des protéines du vivant. Les chélateurs élaborés au Service de chimie inorganique et biologique (SCIB)⁽²⁾ portent donc deux ou trois cystéines greffées sur une plateforme chimique et offrent ainsi plusieurs fonctions thiols convergentes pour piéger le cuivre grâce aux atomes de soufre.

● Stratégie de ciblage des cellules du foie :

Pour cibler les chélateurs vers le foie, le SCIB exploite une propriété des cellules du foie qui possèdent, à leur surface, de nombreux **récepteurs** capables de reconnaître spécifiquement des sucres, comme la **N-acétylgalactosamine**. Il suffit d'insérer trois ou quatre unités de tels sucres, au sein d'une même molécule, pour favoriser l'interaction avec ces récepteurs et donc l'entrée de la molécule dans les cellules hépatiques. D'où l'idée de « décorer » les chélateurs les plus efficaces d'unités sucres qui les guideront vers le foie. Ces nouvelles molécules soufrées s'avèrent donc très efficaces pour piéger le cuivre à l'exclusion d'autres métaux de l'organisme (calcium, zinc...). De plus, leur capacité à lier le cuivre dans des cellules du foie a été mise en évidence récemment par le Laboratoire chimie et biologie des métaux (LCBM)⁽³⁾. Il s'agit donc de nouveaux chélateurs très prometteurs pour lutter contre les surcharges hépatiques en cuivre, cause de la maladie de Wilson. Reste encore à réaliser les tests pour valider leur utilisation en tant que candidats médicaments.

De nouveaux agents décorporants de l'uranium

Dans l'hypothèse d'un rejet accidentel de **radionucléides** au sein d'une installation nucléaire ou dans l'environnement, les chercheurs du CEA étudient de longue date les risques de contamination interne par inhalation, ingestion ou blessure, en mode aigu ou chronique, conduisant à une toxicité chimique⁽⁴⁾ et/ou radiologique⁽⁵⁾ selon l'élément causal. Depuis le début des années 2000, les recherches s'intensifient en matière de **toxicologie** nucléaire, spécialement celles dédiées au traitement de la contamination (ou **décorporation**). C'est justement en privilégiant l'approche chimique que les chercheurs ont pu mettre au point de nouveaux agents décorporants de l'**uranium**. Cette approche a permis la conception et la synthèse de **ligands** susceptibles de **complexer**, *in vivo*, l'**ion uranyle** (UO_2^{2+})

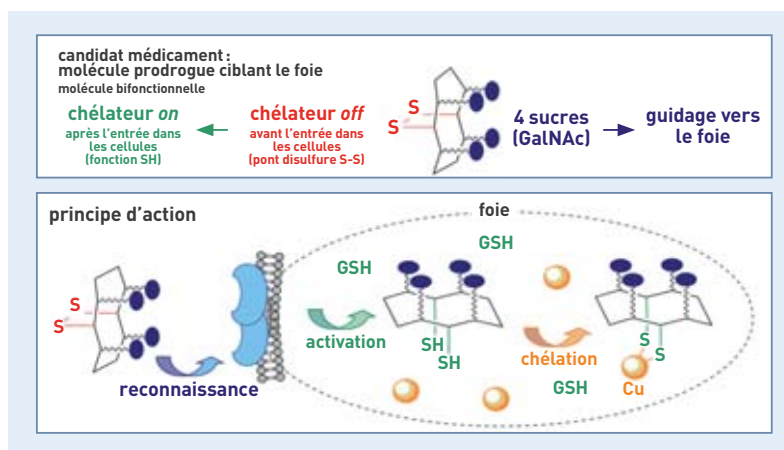


Figure 1. Conception et principe d'action d'une molécule bifonctionnelle prodrogue, chélatant le cuivre(I) et guidée vers les cellules du foie. Les molécules bifonctionnelles présentées comportent un système de guidage vers les cellules du foie [des sucres symbolisés en bleu]. Ces sucres sont reconnus par des récepteurs à la surface des cellules du foie, ce qui permet l'entrée du chélateur dans ces cellules. Le chélateur est dit *Off* (en rouge) avant son entrée dans les cellules car il ne peut pas chélater les ions Cu(I). Après son entrée dans les cellules, le chélateur est activé par du glutathion (GSH), il devient alors dans son état *On* car les fonctions thiols (SH en vert) sont libérées. Il peut alors chélater le Cu(I).

majoritairement présent en milieu biologique, tout en répondant à de puissantes contraintes pour ces ligands : forte association avec le métal, sélectivité par rapport aux **cations** biologiques (calcium, potassium...), non toxicité et bonne **biodisponibilité**. Ce résultat découle de la mise en œuvre de deux stratégies :

- une approche rationnelle, fondée sur des facteurs physico-chimiques et **stériques** comme l'adaptation géométrique du ligand aux dimensions atomiques de l'ion uranyle par **modélisation** moléculaire – approche validée par l'obtention de complexes d'uranyle très stables ;
- une approche reposant sur la synthèse de banque de molécules et le criblage à haut débit, couramment utilisée par l'industrie pharmaceutique pour la conception de nouveaux médicaments. Les chercheurs peuvent désormais sélectionner les ligands conjuguant une forte affinité et une bonne sélectivité *in vitro*. Une « chimiothèque », composée de



Microscope à fluorescence visualisant la protéine de Wilson dans des cellules hépatiques. La non-fonctionnalité de cette protéine entraîne une toxicose cuprique grave, par accumulation tissulaire de cuivre.

(2) Service de l'Institut nanosciences et cryogénie (Inac).

(3) Laboratoire de l'Institut de recherches en technologies et sciences pour le vivant (iRTSV).

(4) Dose exprimée en masse ou en mole.

(5) Dose exprimée en gray (Gy) ou sievert (Sv).



À gauche : congélation d'une solution contenant un chélateur fluorescent.
À droite : agitation d'un réacteur chimique pendant la synthèse de peptides sur support solide.

plus de 300 ligands, a déjà été soumise aux étapes de criblage. Cette opération, menée au Service de chimie bio-organique et de marquage (SCBM)⁽⁶⁾, a mis en évidence les propriétés remarquables d'une famille de molécules bisphosphonates (figure 2). Ces composés se sont révélés très efficaces pour complexer l'ion uranyle avec des constantes d'association très élevées en milieu physiologique. Des tests *in vivo* ont démontré l'efficacité décorporante de ces bisphosphonates, en termes de rétention, d'excrétion et de distribution au sein de différents organes. Ils ont également permis de sélectionner la molécule 19 E (figure 2)

(6) Service de l'Institut de biologie et de technologies de Saclay (iBiTec-S).



Étude de l'effet de l'uranium sur le blé et le colza.

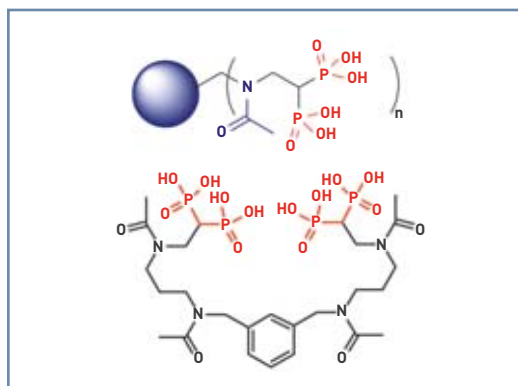


Figure 2. Exemples de structures de ligands ayant un potentiel en décorporation de l'uranium. En haut : structure générale des bisphosphonates ; en bas : structure du dipode bisphosphonate 19 E.

capable d'augmenter l'excrétion de 10 % de l'uranium injecté et de diminuer d'environ 50 % l'uranium fixé au niveau du rein.

Des travaux similaires importants ont été menés sur d'autres radionucléides d'intérêt : d'une part, le **plutonium** pour lequel il existe, à ce jour, une molécule de référence, le **DTPA** et une molécule en cours de développement, le **LIHOPO** et d'autre part, le césium pour lequel la molécule de référence est le **Bleu de Prusse**. Par ailleurs, d'autres applications de la trientine et la D-pénicillamine (citée pour le cuivre) ont été récemment testées pour le traitement de la contamination par le cobalt ((Co (II)) et le polonium (Po (IV)), deux cations proches de cations mous comme le cuivre (Cu (I)) et donc ayant des affinités pour les molécules soufrées. Les perspectives dans le domaine du traitement de la contamination concernent, d'une part, la **vectorisation** des ligands pour améliorer leur efficacité et leur temps de résidence dans l'organisme, et d'autre part, la recherche de formulations assimilables par voie digestive.

Molécules bioactives pour médicaments innovants

Mieux comprendre certaines fonctions biologiques pour concevoir de nouveaux médicaments suppose le développement préalable de molécules biologiquement actives. D'où les études, menées par les chercheurs du SCBM, sur certaines molécules, naturelles ou synthétiques, dont ils étudient les propriétés en collaboration avec des équipes de biologistes.

Lutter contre le cancer grâce aux inhibiteurs de glycosidases

Les **glycosidases** sont des **enzymes** capables de **catalyser** la coupure des sucres par **hydrolyse**, un procédé indispensable pour générer des molécules de plus petit poids moléculaire (**monosaccharides** ou **disaccharides**). Néanmoins, ces enzymes réalisent parfois des **glycosylations** et des hydrolyses aberrantes responsables de pathologies : diabète de type II, maladies génétiques (grippe, **maladie de Fabry et Gaucher**). D'où la nécessaire mise au point d'inhibiteurs de glycosidases dont certains sont déjà apparus sur le marché : Glucobay® (antidiabétique), Zavesca® (traitement de la maladie de Gaucher), Relenza® et Tamiflu® (traitement de la grippe).

Développer de tels agents antiviraux, mais aussi antitumoraux, supposait une meilleure connaissance des mécanismes enzymatiques. En étudiant l'un d'eux, l'hydrolyse des glycosidases, les chimistes du SCBM sont parvenus à concevoir de nouveaux inhibiteurs, **analogues** de l'état de transition de cette réaction. Ils ont démontré comment ces composés miment la structure du sucre à hydrolyser, présent dans le site actif, durant la catalyse enzymatique. Suivait la préparation, par synthèse multi-étape, des inhibiteurs dérivés du glucose et du **mannose** dotés d'une fonction **amidine** diversement substituée, puis les tests en présence de glycosidases (figure 3). Un des dérivés du mannose se révélait alors 30 fois plus efficace que tous les autres inhibiteurs d'**alpha-mannosidases**⁽⁷⁾, une performance qui en fait l'inhibiteur le plus puissant et le plus sélectif connu à ce jour.

(7) $K_i = 6 \text{ nM}$ (K_i = constante d'inhibition et nM = nanomolaire).

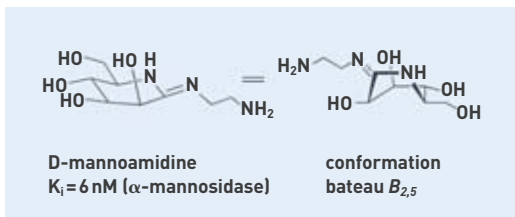


Figure 3. Structure de l'inhibiteur dérivé du D-mannose portant une fonction éthylamine exocyclique, meilleur inhibiteur de mannosidase synthétisé (K_1 étant la constante d'inhibition).

En parallèle, les chercheurs du SCBM ont réalisé des études de **cinétique** d'inhibition et de **co-cristallisation** avec une **bêta-mannosidase** humaine, issue des bactéries *Bacteroides thetaiotaomicron*. Les résultats des co-cristallisations RX (résolution de 2,1 Å)⁽⁸⁾ montrent des inhibiteurs présentant une conformation non usuelle de type « bateau »⁽⁹⁾ avec cette bêta-mannosidase (figure 4). L'état de transition de la réaction adopte vraisemblablement la même conformation, un résultat qu'aucun laboratoire n'avait pu mettre en évidence jusque-là. Les **glycoamidines** synthétisées au laboratoire, de conformation bateau⁽¹⁰⁾ B_{2,5}, sont donc comme des inhibiteurs compétitifs de la bêta-mannosidase de *Bacteroides thetaiotaomicron* mais probablement aussi des inhibiteurs de l'état de transition. Cette étude laisse présager un avenir prometteur aux inhibiteurs de glycosidases comme nouveaux agents thérapeutiques, notamment anti-cancéreux.

Molécules antioxydantes

Incident radiologique lors de traitements médicaux comme la **radiothérapie**, accident nucléaire, acte de terrorisme... Il peut arriver que les **rayonnements ionisants**, rayonnements de haute énergie, endommagent les tissus d'organismes vivants⁽¹¹⁾ – l'ADN étant l'une de leurs cibles privilégiées. D'où le développement de composés aptes à contrecarrer les effets nocifs de ces radiations sur l'organisme – un enjeu majeur pour les chercheurs du CEA.

Certes, un organisme vivant dispose de systèmes de protection contre les espèces réactives de l'oxygène – les molécules **antioxydantes** (**glutathion**) ou les enzymes (**superoxyde dismutase**) notamment. Cependant, en cas

(8) Lorsqu'un inhibiteur montre une très bonne affinité pour une enzyme, il est possible, par une méthode de radiocristallographie aux rayons X (RX), réalisée dans un synchrotron, d'obtenir, après calcul de **transformée de Fourier** inverse, la densité électronique de la molécule; plus la valeur de la résolution obtenue s'avère faible, plus les détails obtenus seront précis: 2,1 Å est donc un résultat très fin. Pour une résolution atomique, il faudrait 1 Å.

(9) Ainsi nommée parce que la structure de la molécule ressemble à une coque de bateau à l'envers.

(10) L'inhibiteur a une forme de bateau: le cycle principal, à six atomes, peut se mettre dans une forme de chaise ou de bateau et notre étude de co-cristallisation montre que, dans le site enzymatique, l'inhibiteur se déforme en bateau.

(11) C'est par réaction avec l'eau contenue dans l'organisme qu'ils produisent des espèces réactives de l'oxygène (ion superoxyde ou **radical hydroxyle**) capables de détruire les biomolécules.

(12) Service de chimie bio-organique et de marquage (SCBM), Service de pharmacologie et d'immuno-analyse (SPI), Service interdisciplinaire sur les systèmes moléculaires et les matériaux (SIS2M).

(13) Dans le cadre d'une étude financée par la **Direction générale de l'armement (DGA)**.

de forte irradiation, leur action demeure insuffisante. Restait donc à concevoir des composés antioxydants sachant protéger l'organisme et facilement absorbables avant ou après l'irradiation.

Une équipe pluridisciplinaire de chercheurs du CEA⁽¹²⁾ a mis en évidence un produit antioxydant exceptionnellement efficace:

la **norbadione A** (figure 5). Isolée à partir du **bolet bai**, ce composé, apparenté aux **acides pulviniques**, a servi de point de départ aux chercheurs du SCBM pour réaliser la synthèse puis l'évaluation d'un grand nombre de molécules analogues (figure 6) et donc de déterminer les éléments structuraux favorisant l'activité antioxydante⁽¹³⁾. La biodisponibilité de ces composés ayant été augmentée en modifiant différentes fonctions, deux molécules montraient alors un effet **radioprotecteur** important. Un projet d'étude concernant le développement d'une de ces molécules est en cours d'évaluation.

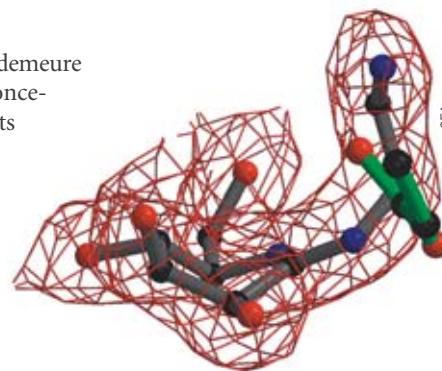


Figure 4. Co-cristallisation de l'inhibiteur avec BtMan2A (bêta-mannosidase 2 A). Sont représentées en gris et vert, les liaisons entre les atomes avec, à leurs extrémités, des atomes d'oxygène (rouge), des atomes d'azote (bleu), des atomes de carbone (noir). L'enveloppe rouge correspond à la carte de densité électronique de la molécule qui permet de déterminer la structure précise de la molécule.

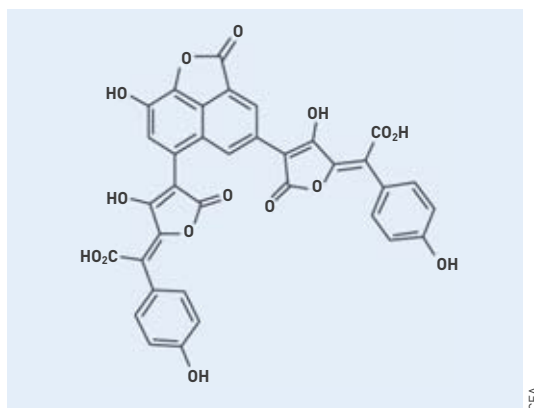


Figure 5. Structure de la norbadione A, pigment du bolet bai.

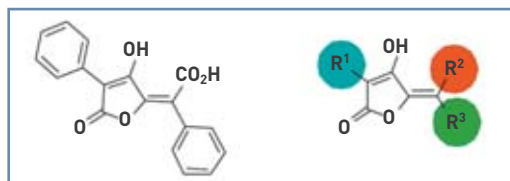


Figure 6. Acide pulvinique, analogues avec sites de modification.

> **Pascale Delangle** et **Christelle Gateau**
Institut nanosciences et cryogénie (Inac)
Direction des sciences de la matière
CEA Centre de Grenoble

> **Éric Ansoborlo**
Département radiochimie et procédés
Direction de l'énergie nucléaire
CEA Centre de Marcoule

> **Marie-Pierre Heck** et **Thierry Le Gall**
Institut de biologie et de technologies
de Saclay (iBiTec-S)
Direction des sciences du vivant
CEA Centre de Saclay