

se lancèrent dans l'étude des connaissances médicales autochtones.

La recherche scientifique sur les plantes médicinales en Occident a tiré parti des progrès techniques de la chimie (chromatographie de haute résolution, dispositifs de séparation et spectrométrie en ligne), de la biologie cellulaire (culture biotechnologique de cellules végétales et production de composants dans des réactifs) et de la biologie moléculaire (détermination de récepteurs cellulaires avec sondes et marqueurs).

En Allemagne, ces chercheurs revalorisent cliniquement l'emploi de la camomille (*Matricaria recutita*), pour ses effets anti-inflammatoires et immuno-stimulants (qualificatif d'un produit pharmaceutique provoquant une augmentation non spécifique des mécanismes de défense de l'organisme). En Angleterre, on récupère la tisane de tanaïs (*Tanacetum parthenium*), afin de soulager les migraines et l'on découvre le mode d'action de ses lactones sur le mécanisme sérotoninergique de déclenchement des migraines. Les polysaccharides de l'*Echinacea purpurea* se sont révélés utiles, comme l'ont prouvé des études cliniques, dans l'accroissement des défenses immunitaires face aux infections telles que le rhume commun et les troubles viraux. L'*hypericum perforatum* est considéré comme un inhibiteur de la monoamine oxydase (MAO) et aurait des effets antidépresseurs, anxiolytiques et antipsychotiques, bien que l'action de plusieurs de ses principes actifs soit encore inconnue.

L'extrait de *Ginkgo biloba* a été diffusé partout dans le monde pour le traitement de troubles cérébrovasculaires, des dépressions et la maladie d'Alzheimer. Il est élaboré et dosé à partir de la concentration d'un ensemble de flavonoïdes. En provenance du Tiers-Monde, le *Psidium guajava* (la si populaire goyave), est utilisée depuis l'époque précolombienne comme traitement des diarrhées et des colites nerveuses, tandis que l'*Ononis spinosa* a la réputation d'être un médicament antirhumatismal. Néanmoins, en dépit des progrès effectués en matière de techniques d'extraction, de séparation (techniques chromatographiques) et d'instrumentation analytique et spectroscopique, nous en savons toujours très peu sur le métabolisme

secondaire de la majorité des espèces végétales supérieures, et en particulier sur la flore des forêts tropicales humides.

Transplantations végétales dans l'animal

La biotechnologie utilise aussi les plantes médicinales. Les chercheurs tentent déjà de transplanter des cellules végétales dans des organismes animaux pour qu'elles y exercent leur action curative. Les transplantations entre règnes ont montré que les cellules végétales pouvaient séparer des composants actifs dans le flux sanguin ou dans les organes d'un animal. Les cellules de plantes médicinales préparées *in vitro* et injectées ensuite à un animal de laboratoire restent viables d'un point de vue métabolique durant des mois dans le corps d'un animal. De plus, nous avons démontré, dans mon laboratoire de l'*Instituto Mexicano de Seguro Social*, que la réponse immunitaire de l'hôte n'empêche pas la survie et l'adaptation du tissu végétal.

Le marché des phytomédicaments a-t-il un véritable avenir? Assistons-nous au retour des plantes médicinales? Dans certains pays, oui ; dans d'autres, non. La science médicale universitaire reste peu touchée. La recherche menée sur les plantes médicinales ne se modifiera que dans la mesure où le progrès de la technique permettra d'élaborer de nouveaux paradigmes.

Xavier LOZOYA dirige le Laboratoire de biotechnologie des plantes médicinales de la ville de Mexico. Il a consacré sa vie à l'étude des médecines traditionnelles mexicaines.

N.R. FARNSWORTH, O. AKERELE et al., *Medicinal Plants in Therapy*, in *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 63, n° 6, pp. 965-981, 1985.

Ethnopharmacological Investigation in Chinese Medicinal Plants, CIBA Foundation Symposium 185, John Wiley & Sons, in *Ethnobotany and the Search for New Drugs*, pp. 169-178, New York, 1994.

X. LOZOYA, I. MADRAZO et al., *Survival of Cultured Plant-Cells Grafted into the Subcutaneous Tissue of Rats*, in *Archives Medical Research*, vol. 26, n° 1, pp. 85-89, 1995.

Vers une conception rationnelle des médicaments

GERD FOLKERS • HUGO KUBINYI

Les progrès de la biologie moléculaire, de la chimie et de l'informatique permettent une conception rationnelle des médicaments. Aujourd'hui ceux-ci servent moins à combattre les symptômes qu'à lutter contre les maladies dont on connaît les mécanismes moléculaires.

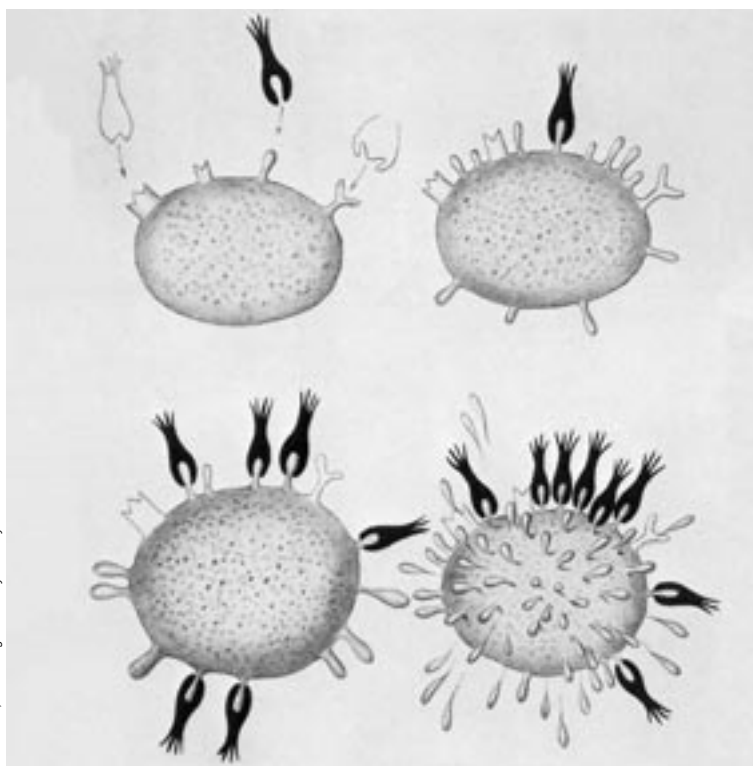
Il y a un siècle, le chimiste allemand Emil Fischer (1852-1919) et le médecin allemand Paul Ehrlich (1854-1915) décrivaient les mécanismes moléculaires des interactions entre médicaments et structures de l'organisme. Fischer compara les principes actifs à des clefs, et leurs récepteurs à des serrures, tandis qu'Ehrlich imaginait le concept de boulet magique (voir la figure 1) : une partie d'un tel médicament acheminerait ce dernier jusqu'aux organes malades, où il exercerait ses effets sans léser les tissus sains. Les progrès de l'analyse physico-chimique, de l'informatique, de la biologie moléculaire et du génie génétique ont récemment concrétisé les visions de ces deux pionniers : la pharmacie progresse grâce à la compréhension moléculaire des maladies et à la conception rationnelle de molécules ayant une action spécifique.

Quelle différence avec la méthode classique, par essais éclairés et par erreurs ! Naguère la pharmacie testait chaque année des milliers de composés de

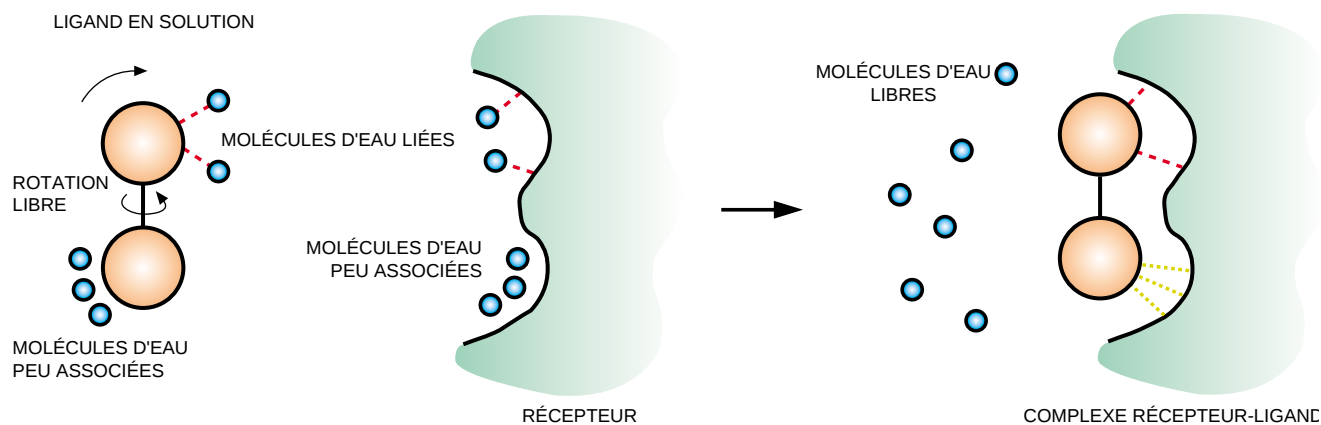
synthèse ou d'extraits de plantes ; souvent elle devait choisir les molécules testées au hasard, et elle utilisait de nombreux animaux de laboratoire, sur lesquels on recherchait d'éventuels effets biologiques. La recherche rationnelle des médicaments, qui se fonde plutôt sur la connaissance des mécanismes

moléculaires de la maladie, a le double avantage de conduire à des médicaments mieux ciblés, par des tests d'efficacité effectués *in vitro*, sur des systèmes acellulaires ou sur des cellules cultivées.

Comment identifier les molécules associées à une déficience biochimique ? Les découvertes récentes du génie génétique ont montré que de nombreuses maladies résultent de défauts génétiques ou de perturbations des mécanismes de régulation. Une fois que les gènes responsables de la maladie sont identifiés, on sait en produire un très grand nombre de copies par amplification de gènes (ou PCR, pour l'anglais *polymerase chain reaction*, soit « réaction en chaîne à la polymérase ») ; introduites dans des bactéries ou dans des levures, ces copies font produire aux cellules modifiées de grandes quantités de la protéine codée par le gène, de sorte qu'on peut ensuite analyser les relations entre la structure et la fonction des protéines. Ainsi on identi-



1. LES INTERACTIONS DE RÉCEPTEURS disposés à la surface des cellules et de ligands ont été décrites par le médecin Paul Ehrlich (1854-1915) en 1900. Les laboratoires pharmaceutiques cherchent aujourd'hui des ligands artificiels qui se fixent aussi spécifiquement que leurs homologues naturels sur des récepteurs déterminés, afin de traiter des maladies où interviennent ces récepteurs.



P.R. Andrews

2. UN LIGAND s'ancre sur un récepteur quand sa forme est complémentaire de celle du site de fixation du récepteur, et aussi quand ses atomes établissent des liaisons avec les atomes du récepteur. Des liaisons hydrogène (*traits rouges*) se forment quand un atome d'hydrogène (H) lié à un atome électronégatif, tel un atome d'oxygène ou d'azote, attire un autre atome porteur d'une charge négative partielle (Y), formant une structure du type X-H...Y. Des forces hydrophobes apparaissent, en solution dans l'eau, entre des groupes chimiques non solubles dans l'eau. Enfin, la polarisabilité de la surface des molécules contribue à l'énergie de leur liaison. La liaison a lieu quand l'énergie de l'état lié est inférieure à l'énergie de l'état où le ligand, d'une part, et

le site de fixation, d'autre part, sont liés à des molécules d'eau. La tendance des systèmes à l'augmentation de l'entropie (désordre) joue également un rôle. Ainsi, l'entropie du ligand libre en solution, où il peut se mouvoir et tourner sur lui-même sans entraves, est supérieure à celle de l'état lié, où il est ancré au récepteur. En contrepartie, la libération des molécules d'eau augmente leur entropie. Le rapprochement mutuel de deux surfaces hydrophobes est toujours favorable (*traits jaunes*), car les molécules d'eau proches de telles surfaces ne leur sont que faiblement associées et peu ordonnées, et leurs liaisons hydrogène ne sont pas entièrement saturées : leur libération augmente alors l'entropie du système global et diminue son énergie.

fie la nature des déficiences et l'on obtient des informations qui seront précieuses pour la conception rationnelle de médicaments. On fabrique ces derniers conformément au principe clef-serrure, afin de leur conférer une spécificité biologique indispensable.

La biodisponibilité

Toutefois une molécule biologiquement active n'est pas un médicament : la molécule doit pouvoir migrer, de son lieu d'application à son lieu d'action, et rester suffisamment longtemps dans l'organisme pour agir, avant d'être dégradée par diverses enzymes. La plupart des médicaments modernes sont administrés par voie orale : après l'ingestion, la substance active doit se dissoudre, dans l'estomac ou dans les intestins, puis traverser les parois de ces organes pour gagner le sang. En chemin, le médicament doit traverser plusieurs membranes : ces dernières étant composées de molécules de phospholipides, avec une extrémité soluble dans l'eau et une extrémité insoluble, la partie centrale des membranes est un milieu de type huile ; de ce fait, les médicaments doivent se dissoudre aussi bien dans l'eau que dans les graisses. Des substances moyennement lipophiles (qui se dissolvent dans les graisses) ont cette propriété. Les acides ou les bases or-

ganiques faibles sont, à cet égard, remarquablement appropriés, car, selon l'acidité du milieu, ce sont soit des molécules neutres, solubles dans les graisses, soit des molécules ionisées, solubles dans l'eau. De ce fait, les acides et les substances neutres lipophiles sont souvent absorbés lors de leur passage dans le milieu acide de l'estomac, tandis que les bases et les composés neutres polaires ne sont totalement absorbés que lors de leur passage dans l'intestin, où le milieu est neutre ou légèrement basique.

Une fois dans le sang, les molécules doivent résister à l'action du foie. Tout le sang qui provient de la paroi intestinale arrive d'abord par la veine porte, où s'effectue la détoxification du sang. Certaines substances, telles celles qui sont lipophiles ou celles qui possèdent une masse moléculaire supérieure à 500, sont immédiatement ramenées dans l'intestin par l'intermédiaire de la bile ; d'autres molécules sont dégradées dans le foie par des enzymes (par hydrolyse ou oxydation) et généralement transformées en produits inoffensifs et facilement excrétables. Enfin, quelques molécules sont transformées en substances toxiques. Le pharmacologue doit s'assurer que son médicament potentiel ne produira pas de tels métabolites dangereux. Inversement, il peut tirer parti des enzymes du foie ou d'autres

organes pour libérer un composé actif à partir d'un précurseur inactif : ce concept de « promédicament » est aujourd'hui important.

On traite la maladie de Parkinson, par exemple, en faisant parvenir jusqu'au cerveau des malades de la dopamine, qui est un neuromédiateur, c'est-à-dire une molécule utilisée par les neurones pour communiquer. Comme cette substance polaire traverse difficilement la barrière hémato-encéphalique, entre le sang et le cerveau, on utilise un précurseur qui transporte l'acide aminé L-dopa dans le cerveau. Une enzyme, la décarboxylase, transforme alors ce précurseur en dopamine active.

Cependant cette décarboxylase est également présente dans d'autres parties de l'organisme, où la libération de dopamine s'accompagne de phénomènes secondaires indésirables, tels qu'une accélération du rythme cardiaque et une hypertension. En administrant, en même temps que le précurseur de la dopamine, un inhibiteur de la décarboxylase qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (en raison de sa polarité), on inhibe la conversion de la L-dopa en neuromédiateur dans le sang. Enfin l'administration d'un inhibiteur de la monoaminoxydase, l'enzyme responsable de la dégradation de la dopamine, qui se concentre en particulier

dans le cerveau, augmente la durée de vie de la dopamine.

Les médicaments agissent généralement sur des enzymes, sur des récepteurs, sur des transporteurs, sur des canaux ioniques ou sur des protéines servant de signaux. Ceux qui agissent sur les enzymes les inhibent généralement. Ceux qui s'ancrent sur des récepteurs déclenchent des effets analogues à ceux des molécules de l'organisme (agonistes) ou bloquent le fonctionnement des récepteurs (antagonistes). Ceux qui se lient aux molécules servant de transporteurs de molécules endogènes bloquent les transports. Ceux qui se lient aux canaux ioniques stabilisent ces derniers en configuration ouverte, ou bien, au contraire, en position fermée. Enfin, ceux qui agissent sur les protéines de communication cellulaire modifient l'activité des enzymes, des récepteurs ou des canaux ioniques.

Des cibles moléculaires pour les substances actives

Dans tous les cas, le médicament n'est efficace que s'il se lie aux molécules de l'organisme, de sorte que la conception rationnelle d'un nouveau principe actif se fonde sur une connaissance approfondie des structures de reconnaissance de l'organisme. Toutes les cibles des médicaments sont des macromolécules ou des associations de plusieurs molécules. Le plus souvent, ce sont des protéines, c'est-à-dire des chaînes de plusieurs centaines d'acides aminés repliées sur elles-mêmes en pelote.

Les fonctions des protéines sont variées. Dans les membranes cellulaires, par exemple, des protéines assurent la transmission des signaux chimiques : ce sont des récepteurs. Des protéines transmembranaires ont une fonction de canaux ioniques, de pores ou de pompes. Certaines protéines de transport sont composées de plusieurs protéines : ainsi des transporteurs d'acides aminés introduisent dans les cellules des molécules qui participent à l'édification des structures cellulaires, ou font traverser la barrière hémato-encéphalique à des molécules qui nourrissent les cellules cérébrales ; des protéines de résistance font sortir des cellules les substances étrangères, dont certains médicaments.

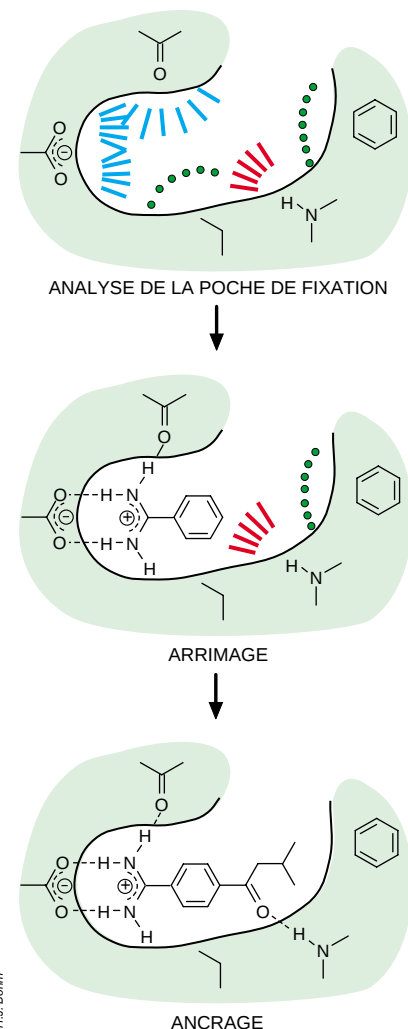
Généralement les protéines comportent des sites auxquels se lient spécifiquement des molécules variées : hormones, acides aminés, acides nucléiques, sucres, graisses ou produits du métabolisme cellulaire... Le plus souvent, ces ligands sont petits

et de masse moléculaire inférieure à 1 000, mais la règle n'est pas absolue : les enzymes du système digestif qui sont chargées de l'assimilation des aliments doivent interagir avec de gros biopolymères pour les transformer, ce qui ne les empêche pas d'être bloquées par des ligands de faible masse moléculaire lorsque ces derniers s'adaptent à la poche de fixation et y adhèrent plus fortement que le ligand naturel. L'inhibition est alors compétitive.

On connaît également des molécules actives qui se fixent en un autre site que le site de fixation naturel du ligand et qui modifient ainsi le repliement de la protéine ou la configuration du groupe de protéines. Certaines de ces modifications changent la structure du site de fixation et bloquent la fixation du ligand, inhibant la protéine. De telles inhibitions « allostériques » sont plus fréquentes pour les protéines membranaires, tandis que l'inhibition compétitive est de règle chez les enzymes.

Les molécules d'ADN sont également des cibles thérapeutiques importantes pour les techniques de conception rationnelle de médicaments. En effet, l'ADN contient l'information nécessaire à la synthèse de toutes les protéines des cellules. Cette synthèse a lieu quand des protéines de signalisation se lient à des séquences particulières de la molécule. Des médicaments qui se logent entre les deux brins qui constituent la double hélice d'ADN ou qui se lient aux protéines de signalisation bloquent toutefois la transcription en ARN.

Enfin, les membranes sont une cible longtemps négligée, mais des découvertes récentes ont montré leur rôle fondamental dans la stabilisation des protéines qui y sont plongées et aussi, parfois, dans leur capacité à former des complexes. Les membranes cellulaires humaines sont constituées de deux feuillets, rigidifiés par des sortes de « clous », que sont les molécules de stéroïdes, tel le cholestérol. En revanche, chez les champignons, la stabilisation des membranes est assurée par l'insertion de molécules d'ergostérol, un composé qui n'existe pas chez l'homme. De ce fait, on peut inhiber un champignon responsable de mycoses à l'aide d'un médicament qui bloque l'enzyme de synthèse de l'ergostérol.



3. LE PROGRAMME DE CONCEPTION ASSISTÉE PAR ORDINATEUR LUDI facilite l'étude de nouveaux ligands des protéines. Quand on connaît la structure atomique d'une protéine, l'utilisateur peut définir un site de fixation et tester la liaison, à ce site, de petites molécules de structure connue. Dans un premier temps, le programme analyse le site de fixation et définit les positions que doivent occuper les partenaires de l'interaction (en haut) ; sur cette figure, des domaines donneurs de liaisons hydrogène (X-H) sont représentés par des traits bleus, les zones acceptrices de liaisons hydrogène (Y) par des traits rouges, et les régions lipophiles par des points verts. Puis le programme détermine comment des ligands potentiels se lieraient en les disposant de toutes les façons possibles. Les molécules qui se lient bien sont alors mises en mémoire avec l'évaluation de leur affinité. Lors de la dernière étape, on peut ajouter divers groupes sur les structures ainsi trouvées, afin d'augmenter les forces de liaison.

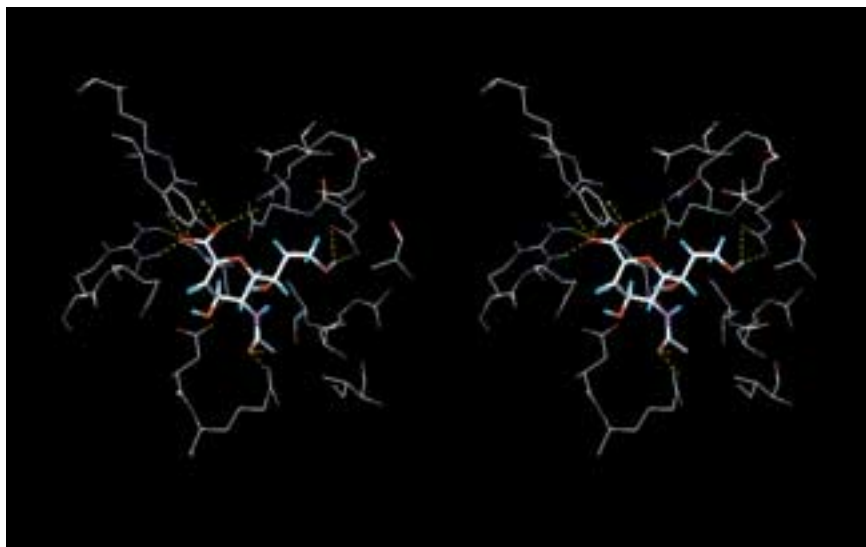
L'exploration du site de fixation

Une cible biologique étant identifiée, comment construire une molécule qui s'y liera (voir la figure 2)? On conçoit naturellement la structure du ligand d'après celle de la cible, mais, pour que le ligand reste en place de manière stable et durable, la seule prise en compte de la forme des molécules est insuffisante ; les atomes ou groupes d'atomes en vis-à-vis doivent s'attirer. Ces interactions peuvent être de plusieurs types : par exemple, des liaisons hydrophobes s'exercent entre des groupes non solubles dans l'eau ; des liaisons hydrophiles s'exercent, inversement, entre des molécules solubles dans l'eau. Les liaisons hydrogène, plus fortes, s'établissent quand un atome d'hydrogène (H) lié à un atome électronégatif (X) tel qu'un atome d'oxygène ou d'azote est proche d'un atome (Y) chargé de manière partiellement négative : une structure de type X-H...Y se forme.

Les liaisons hydrogène imposent des orientations particulières des médicaments et de leur cible. Leur contribution à la force de liaison est très variable : des expériences d'introduction d'un groupe hydroxyle (-OH) supplémentaire dans un ligand peuvent aussi bien augmenter la force de liaison d'un facteur 100 millions que la réduire. En revanche, le remplissage de la poche hydrophobe d'un site de fixation avec un résidu hydrophobe stabilise toujours la liaison.

Enfin, la «chiralité» des molécules biologiques doit être prise en compte : une molécule est chirale quand, telle une main (*cheir*, en grec), elle n'est pas superposable à son image dans un miroir. Les acides aminés, par exemple, sont chiraux, tout comme les protéines qu'ils constituent. De même qu'un gant gauche s'adapte mieux à une main gauche qu'à une main droite, les médicaments contre une cible chirale doivent avoir la chiralité appropriée.

On a ainsi observé entre deux énantiomères (les deux formes d'une molécule chirale) des différences considérables (avec une des formes jusqu'à 500 000 fois plus active que l'autre), et l'on sait que les molécules miroir de certains médicaments chiraux sont toxiques. Le pharmacologue doit donc veiller, lors de la syn-



4. LA NEURAMINIDASE, une enzyme présente à la surface du virus de la grippe, est une bonne cible thérapeutique, car cette enzyme n'existe pas chez l'homme : quand on la bloque spécifiquement, on ne provoque pas d'effets secondaires gênants. Cette enzyme élimine un sucre, nommé neuramine ou acide sialique, de glycoprotéines cellulaires auxquelles le virus se lie lors de l'infection. L'étude des neuraminidases des virus de la grippe de types A et B et des neuraminidases de diverses bactéries a montré que le site de fixation de la neuramine comprend trois arginines, un acide glutamique, la tyrosine, et une poche hydrophobe. Depuis les années 1970, on connaissait un inhibiteur faible de la neuraminidase, le Neu5Ac2en, qui co-cristallise bien avec l'enzyme. Lorsque la structure de ce complexe a été établie par analyse aux rayons X, au début des années 1990, on a utilisé la structure spatiale exacte du site de fixation, représenté ici sous la forme d'une paire de vues stéréoscopiques, où les atomes de carbone, d'oxygène, d'azote et d'hydrogène sont respectivement représentés en blanc, rouge, violet et bleu (pour voir la molécule en relief, loucher de façon que les deux images fusionnent ; après plusieurs secondes, l'image en relief apparaît). Avec de telles données, on a entrepris la mise au point d'inhibiteurs perfectionnés.

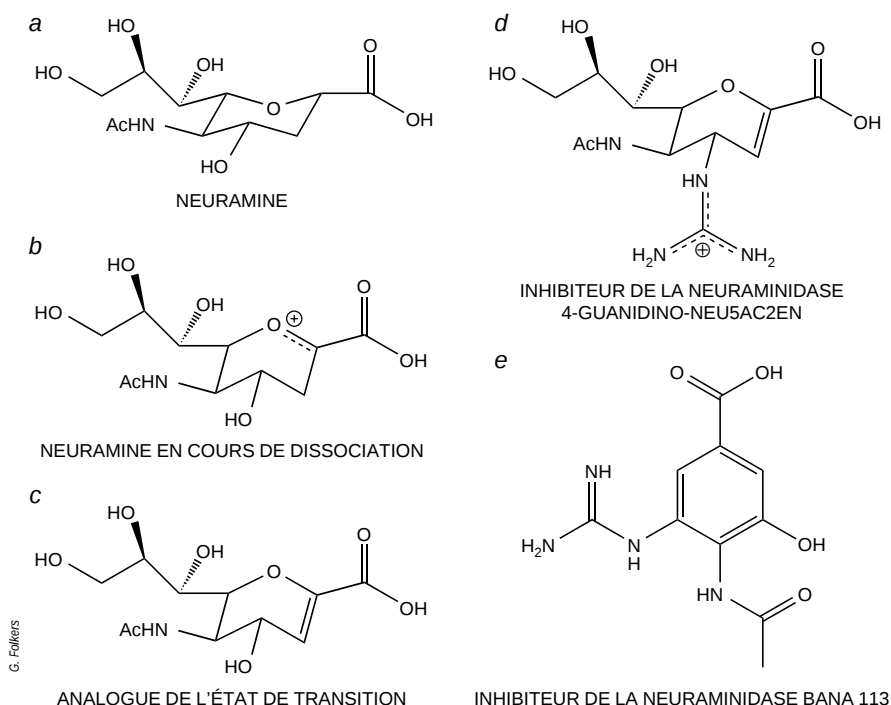
thèse de médicaments, à produire d'emblée la bonne configuration ou bien à séparer le produit utile de son énantiomère (la forme opposée).

Comment déterminer la forme géométrique du site de fixation d'une enzyme et les atomes qui sont présents à sa surface? L'analyse aux rayons X est largement utilisée : quand on irradie un cristal de protéine par un faisceau de rayons X, on obtient un cliché de diffraction à partir duquel on détermine la position dans l'espace de tous les atomes. Généralement une résolution comprise entre 0,15 et 0,3 nanomètre est suffisante, car elle permet déjà de reconnaître des détails structuraux tels que la formation de liaisons hydrogène entre les ligands et leurs sites de fixation.

Naturellement on ne peut faire de telles analyses que si l'on sait cristalliser les protéines ; pour les enzymes solubles, les techniques de cristallisation sont aujourd'hui mieux au point : comme de nombreuses protéines restent actives à l'état cristallin, on sait que leur configuration repliée n'a pas été modifiée notablement au cours de la cristallisation.

Dans le cas des protéines difficiles à cristalliser, l'observation au microscope électronique à très basse température révèle parfois la configuration de surface avec une résolution atomique. Grâce à des techniques de modélisation fondées sur la connaissance de la séquence en acides aminés et sur les données de structure secondaire, acquises par des techniques tant biochimiques que spectroscopiques, on connaît même bientôt les détails moléculaires. Aujourd'hui déjà, ces techniques de microscopie électronique assistée par la modélisation ont indiqué que l'acétylcholine (un neuromédiateur) ne se lie à son récepteur que dans une orientation déterminée.

Les molécules en solution peuvent être étudiées par résonance magnétique nucléaire quand elles ne sont pas trop grosses. Pour les protéines, la limite est un nombre d'acides aminés égal à 300 environ, de sorte que les récepteurs sont inaccessibles par résonance magnétique nucléaire. En revanche, la technique permet d'étudier les interactions entre un ligand et son récepteur protéique à la tem-



5. POUR SYNTHÉTISER un inhibiteur de la neuraminidase, les chimistes sont partis du substrat naturel de l'enzyme : la neuramine (sur la figure a, Ac désigne le groupe acétate $-\text{COO}-\text{CH}_3$). Les chimistes se sont intéressés à la forme que cette molécule prend lors de sa coupure (b), lorsque l'enzyme y est liée. Ils ont alors mis au point un analogue de l'état de transition (c), qui présentait des propriétés inhibitrices intéressantes. Puis une analyse détaillée de la structure de la poche de fixation a conduit à une augmentation de cette efficacité par un facteur 10 000, après le greffage sur cette molécule de guanidine (d). D'autres modélisations ont ensuite conduit à une autre classe de composés plus faciles à synthétiser : des dérivés de l'acide benzoïque, au noyau hexagonal plan (e).

pérature ambiante et en solution aqueuse, c'est-à-dire dans des conditions quasi physiologiques. Comme les signaux enregistrés dépendent notamment de la distance entre les atomes, on peut déduire des spectres la position tridimensionnelle des atomes et «résoudre» ainsi la structure des groupes observés.

D'autre part, de nouveaux micro-calorimètres, à base d'alliages très bons conducteurs de la chaleur, permettent désormais d'étudier la fixation d'un ligand sur une protéine : dans un récipient où l'on dispose une quantité infime de la protéine à étudier, on ajoute de petites quantités connues de ligand et l'on mesure le dégagement de chaleur qui accompagne la fixation. Encore peu utilisée, cette méthode complète pourtant bien les études purement structurelles.

Après avoir ainsi déterminé la structure et les caractéristiques d'un site de fixation, on peut vérifier expérimentalement la justesse des modèles par des techniques de biologie moléculaire et de génie génétique. Quand les études de cristallographie aux

rayons X, de microcalorimétrie et de chimie quantique montrent qu'un acide aminé particulier de la poche de fixation joue un rôle important dans l'interaction avec le médicament, par exemple, on peut remplacer cet acide aminé par un autre et voir à quelle vitesse et avec quelle affinité le ligand se fixe alors. Par cette méthode, on a montré qu'un acide aminé soufré, la méthionine, dans un site actif de la thymidine kinase des virus, se liait au ligand par une force hydrophobe : le remplacement de cet acide aminé par une isoleucine, dotée d'une chaîne latérale purement hydrophobe, réduisait considérablement l'activité de l'enzyme.

La conception d'un ligand

Les données des analyses structurales et biochimiques, ainsi que les résultats des études de biologie moléculaire et de chimie quantique sont à la base des travaux de modélisation moléculaire : à l'aide d'ordinateurs, on calcule des modèles tridimensionnels que l'on affiche sur un écran sous l'angle que

l'on veut. Sur ces modèles, on peut faire apparaître diverses propriétés des molécules, telles des caractéristiques électroniques d'un ligand ou de certains de ses substituants. On visualise ainsi les diverses possibilités d'interaction avec le centre actif.

De tels modèles tridimensionnels servent de base à la conception rationnelle de composés qui se fixeront aux cibles biochimiques. Parfois on part de molécules déjà connues pour leur capacité de fixation spécifique, on analyse quels sont les éléments de leur structure qui assurent cette capacité, et l'on optimise la structure chimique afin de trouver des molécules qui se lient plus fortement aux molécules visées. Parfois aussi, on conçoit des ligands entièrement nouveaux, dont la structure est complètement imaginée à partir de la structure chimique du récepteur visé. Des programmes tels que LUDI, dû à Hans-Joachim Böhm, de la Société BASF, essaient d'adapter au modèle tridimensionnel de petites molécules qui établissent un nombre maximal d'interactions (voir la figure 3). Le programme montre comment des ligands peuvent s'introduire dans la poche de fixation quand ils sont munis de groupes latéraux appropriés. On identifie ainsi, pour chaque site de fixation, plus de 100 000 substances d'une masse moléculaire inférieure à 500. De tels programmes guident le choix parmi des milliers de ligands intéressants, et permettent de n'en synthétiser que quelques-uns, qui seront ensuite étudiés expérimentalement.

Lutte contre les virus

Au cours des cinq dernières années, les procédés rationnels de conception des médicaments ont obtenu de nombreux succès. On a notamment conçu des inhibiteurs d'une enzyme du virus d'immunodéficience humaine (VIH), responsable du SIDA : des chimistes de la Société *DuPont/Merck* ont montré que certaines urées cycliques se lient bien au centre actif de l'enzyme virale, une protéase (qui forme plusieurs protéines virales en découpant un précurseur). Ces «inhibiteurs de protéase», utilisés en trithérapie du SIDA, réduisent la concentration virale à des valeurs inférieures à la limite de détection, chez certains malades.

Les nouvelles techniques ont été également utiles contre la grippe. Les vaccins antigrippaux ont l'inconvénient que les antigènes principaux des virus grippaux – l'hémagglutinine et la neuraminidase – changent rapidement, tout en conservant leurs fonctions. Pour lutter plus efficacement contre le virus de la grippe, on a cherché à attaquer les protéines de surface du virus.

Le virus se fixe sur les cellules de l'organisme par son hémagglutinine : la molécule s'attache à la neuramine, qui constitue l'extrémité de glycoprotéines, de glycolipides et d'oligosaccharides qui font saillie à la surface des cellules. Ultérieurement, l'enzyme virale nommée neuraminidase élimine les sucres afin que les nouvelles particules virales n'y restent pas accrochées, lors de leur sortie des cellules infectées.

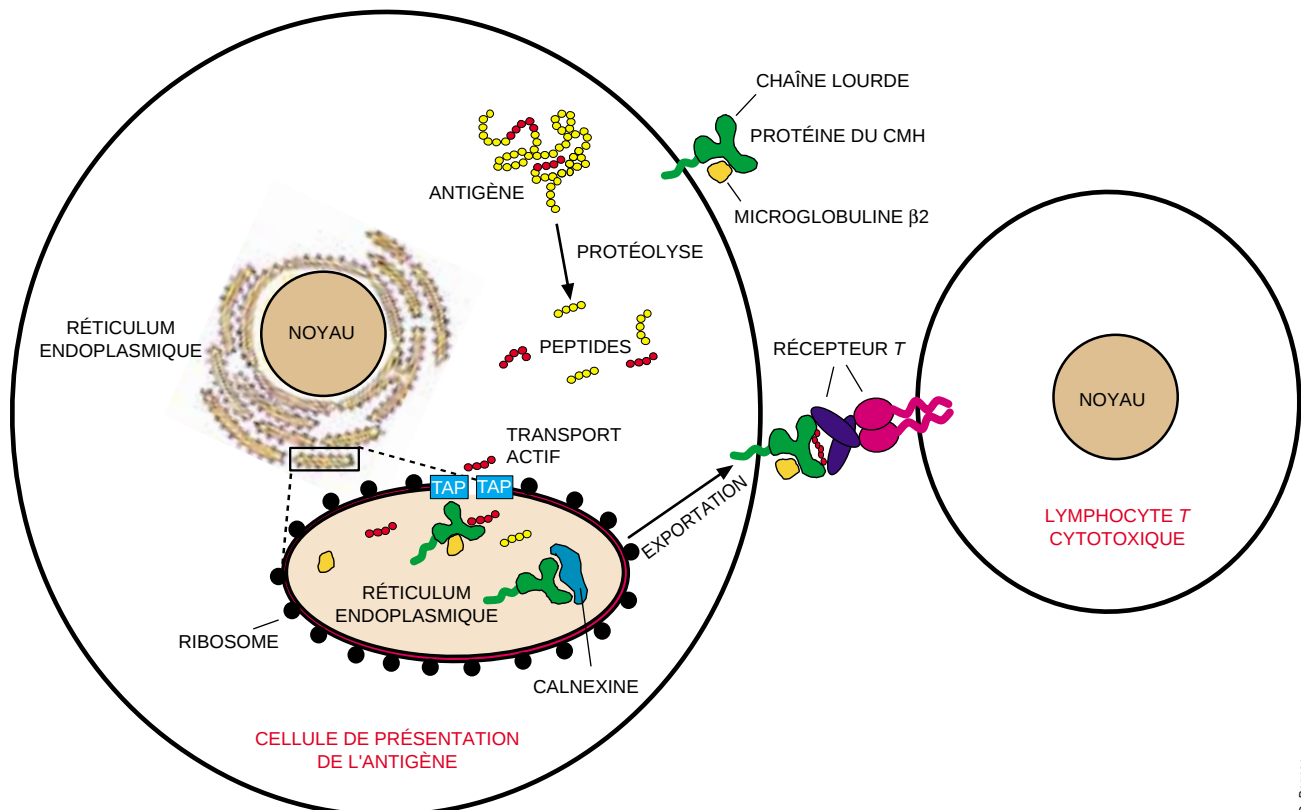
Depuis les années 1970, on connaît un analogue de la neuramine (Neu5Ac2en) capable d'inhiber faiblement la neuraminidase et de cristalliser avec cette enzyme. On a étudié le complexe formé par cristallographie aux rayons X, et l'on a ainsi identifié le centre actif de l'enzyme (voir la figure 4) : ayant observé qu'il contient une crevasse que l'inhibiteur Neu5Ac2en ne remplit pas, on a imaginé de greffer sur ce dernier un groupe chimique qui s'introduirait dans cette crevasse et assurerait une meilleure fixation.

Au cours de cette recherche, des chimistes australiens trouvèrent qu'un groupe ammonium ($-NH_3^+$) ou amidinium ($-C(NH_2)_2^+$) se liait à la poche de fixation vide. Ils remplacèrent alors le groupe hydroxyle ($-OH$) présent à l'endroit correspondant de la molécule d'inhibiteur par un groupe guanidine, chargé positivement (voir la figure 5) : la molécule résultante, la 4-guanidino-Neu5Ac2en, aujourd'hui nommée inhibiteur GLAXO GG167, se révéla 10 000 fois plus active que le composé initial. Une analyse aux rayons X de la neuraminidase du virus influenza B cocrystallisée avec le nouvel inhibiteur confirma les prévisions théoriques. Le virus ne deviendra probablement pas résistant à cet inhibiteur, car des modifications du site catalytique de la neuraminidase perturberaient sa fonction.

La conception rationnelle a également apporté beaucoup contre les maladies auto-immunes, au cours desquelles

La lutte contre les rhumatismes

La conception rationnelle a également apporté beaucoup contre les maladies auto-immunes, au cours desquelles

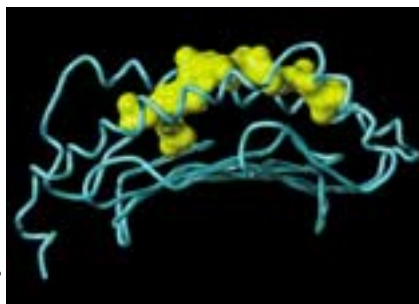


6. LA RÉACTION IMMUNITAIRE due aux lymphocytes T résulte de la reconnaissance de molécules spécifiques, à la surface des cellules infectées. Les cellules de présentation des antigènes découpent les antigènes, ou protéines étrangères, en peptides qui sont placés dans le réticulum endoplasmique sous la forme d'un complexe avec deux protéines de transport. Le réticulum endoplasmique est constitué de vésicules membranaires aplaties où les protéines sont importées lors de leur synthèse par les ribosomes qui tapissent l'extérieur de ces vésicules. Parmi ces protéines figurent les molécules de présentation des antigènes, que l'on nomme protéines du CMH, car elles sont codées par le complexe majeur d'histocompatibilité. Dès que des peptides apparaissent (en rouge), les protéines du CMH forment avec eux un complexe qui migre vers la surface de la cellule. Lorsque des lymphocytes T cytotoxiques munies d'un

récepteur approprié se fixent à ce complexe, ils sont activés, se multiplient et tuent toutes les cellules qui présentent le peptide étranger. Une maladie auto-immune peut se déclencher lorsqu'une protéine d'un micro-organisme pathogène renferme par hasard une séquence suffisamment longue que l'on retrouve dans une protéine de l'organisme. Si, par hasard, la personne ainsi infectée possède des molécules du CMH qui sont capables de se lier à cette séquence, le système immunitaire attaque non seulement les cellules qui contiennent la protéine étrangère, mais aussi celles qui synthétisent cette protéine de l'organisme. Même quand l'infection est vaincue, le système immunitaire continue d'attaquer les tissus de l'organisme reconnus à tort. La molécule du CMH responsable de cette reconnaissance erronée est une cible des médicaments dirigés contre les maladies auto-immunes.

D. Rognan

des tissus de l'organisme sont reconnus à tort comme étrangers et attaqués par le système immunitaire. Le déclenchement d'une réaction immunitaire normale résulte de la présentation, à la surface des cellules infectées, de fragments de leurs propres protéines et de peptides dérivés de l'agent pathogène



D. Rognan

7. LA POCHE DE FIXATION d'une protéine du CMH (*en bleu*) intervenant dans le déclenchement d'un rhumatisme articulaire d'origine auto-immune est représentée ici avec son ligand peptidique (*en jaune*). Le ligand pénètre profondément dans la molécule de présentation. Ses deux extrémités sont importantes pour la liaison à la molécule de présentation, tandis que la partie centrale, arquée vers le haut, assure le contact avec les lymphocytes T. De telles modélisations facilitent la mise au point de molécules capables de bloquer la protéine du CMH, en établissant avec cette dernière une combinaison qui ne sera pas reconnue par les lymphocytes T.

responsable de l'agression, associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Quand les lymphocytes T cytotoxiques reconnaissent cette combinaison moléculaire (*voir la figure 6*), ils sont activés, se multiplient et commencent à combattre les cellules infectées.

Une maladie auto-immune peut se déclencher lorsqu'une protéine d'un micro-organisme pathogène contient par hasard une longue séquence protéique qui figure également dans une protéine de l'organisme. Quand la personne infectée a des molécules du CMH qui s'associent précisément avec cette séquence pour donner un complexe de présentation, une attaque se déclenche non seulement contre les cellules qui contiennent la protéine étrangère, mais aussi contre celles qui fabriquent la protéine normale. Même quand l'agent pathogène a été éliminé, le système immunitaire continue d'attaquer le tissu qui contient la séquence reconnue.

La molécule du CMH qui intervient dans cette mauvaise reconnaissance est une cible parfaite pour des médicaments contre les maladies auto-immunes : on bloque la réaction à l'aide de pseudo-peptides qui forment

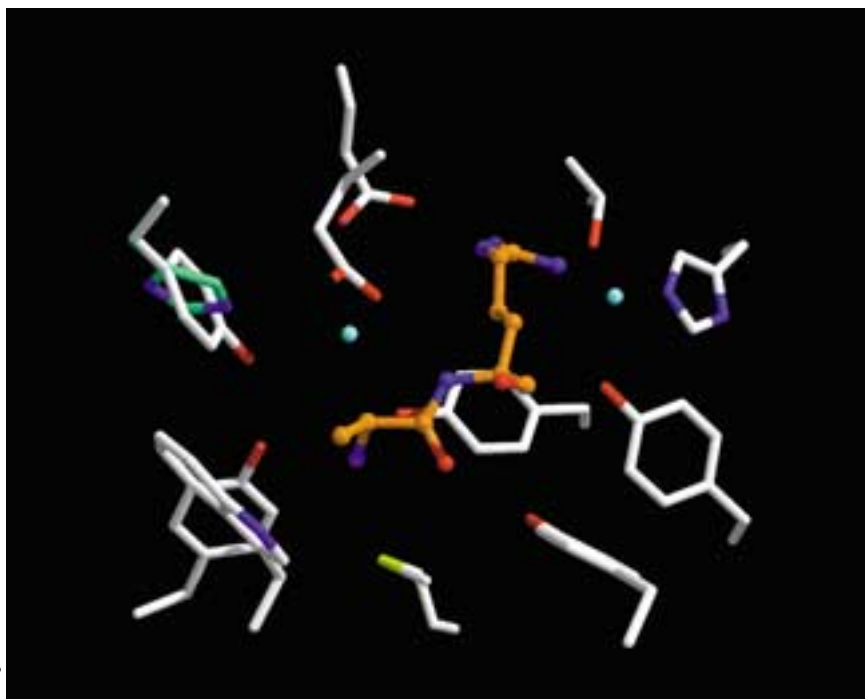
une combinaison qui n'est pas reconnue par les lymphocytes T, mais ces ligands doivent se fixer de manière très spécifique sur la molécule du CMH concernée et non sur d'autres molécules analogues, sous peine d'une dépression générale du système immunitaire.

On a identifié quelques-unes des molécules du CMH qui participent à un rhumatisme articulaire auto-immun : l'arthrite spondyliiforme. Il y a quelques années, à l'École polytechnique de Zurich, Didier Rognan a reconstitué par ordinateur la structure de plusieurs molécules du CMH et prédit les conditions exactes de fixation des molécules de ligand dans la poche de fixation. À partir de ces analyses, il a simulé par ordinateur la fixation de plusieurs ligands et a déterminé la mobilité et l'exposition au solvant des divers groupes chimiques portés par le ligand et par les sites de fixation correspondants sur la protéine réceptrice. Le modèle a ensuite été vérifié par cristallographie aux rayons X (*voir la figure 7*).

Les simulations ont montré que, pour un peptide de neuf acides aminés, seuls le deuxième, le troisième et le neuvième acides aminés étaient importants pour la fixation ; les autres acides aminés étaient chargés de l'immobilisation du récepteur T ou n'avaient aucun rôle dans la reconnaissance de l'antigène. Des simulations informatiques ont également indiqué que l'affinité du ligand était centuplée quand on incorporait en troisième position un acide aminé non naturel pourvu d'un groupe naphthyle.

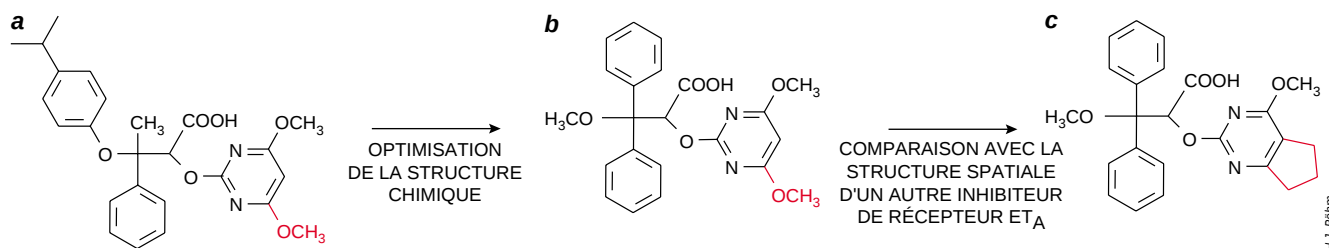
En outre, il semblait possible de remplacer sans perte d'affinité toute la partie intermédiaire du ligand par des analogues hydrocarbonés, qui ne permettraient plus la reconnaissance par les lymphocytes T. En fait, il s'agissait d'inhiber uniquement la reconnaissance par le sous-type de récepteur des lymphocytes T qui est spécifiquement responsable du déclenchement de la maladie.

Le ligand trouvé n'était malheureusement pas capable d'une telle différenciation, mais des observations de biologie moléculaire montrèrent ensuite que le remplacement de la tyrosine en position 59 par une histidine, dans la molécule du CMH, suffit à faire disparaître la sensibilité à l'arthrite spondyliiforme (*voir la figure 8*).



D. Rognan

8. CETTE PARTIE DE LA POCHE DE FIXATION d'une protéine du CMH, représentée ici avec les chaînes latérales des acides aminés, dans la partie concernée (*les atomes de carbone sont en blanc, ceux d'oxygène en rouge et ceux de soufre en jaune*), est responsable de la fixation des acides aminés en positions 1 et 2 du peptide antigénique (*la chaîne carbonée est représentée en orange*) reconnu par la protéine. Quand on remplace la tyrosine en haut à gauche par une histidine (*en vert*), on obtient un autre sous-type de protéine du CMH.



9. LES ENDOTHÉLINES sont des peptides synthétisés par l'organisme, aux puissantes propriétés vasoconstrictrices. Elles agissent en se fixant à deux récepteurs, ET_A et ET_B . L'exploration informatique de la banque de substances de la Société BASF, à la recherche d'un antagoniste du récepteur ET_A , a conduit à un composé qui avait été pressenti pour des usages phytosanitaires (a). L'étude de sa fixation aux endothélines a conduit à un composé plus facile à synthétiser et qui se fixe encore

plus fortement au récepteur (b). Lorsque la Société *SmithKline Beecham* publia la structure d'un antagoniste qu'elle avait mis au point, la superposition de cette substance avec celle de la Société BASF fit imaginer d'autres modifications. On a notamment compris que le remplacement du groupe méthoxyle ($-OCH_3$) par une structure lipophile plus grande (en rouge) s'accompagnerait d'une augmentation de l'affinité : le composé (c) qui fut alors synthétisé s'est révélé 15 fois plus actif.

H.J. Böhm

Toutefois cette mutation modifie la fixation du premier acide aminé.

Par modélisation moléculaire, D. Rognan a alors conçu un peptide capable de différencier les deux sous-types lors d'expériences *in vitro*. Il se caractérise par la présence d'un acide aminé bêta en première position. On n'a pas encore de médicament qui pourra être administré aux malades : il faut maintenant vérifier que l'on peut atteindre dans l'organisme les concentrations actives déterminées *in vitro*, et trouver une forme appropriée d'administration du médicament.

De la plante au récepteur

La réalisation d'inhibiteurs des endothélines est un autre exemple de synthèse raisonnée. Constituées de 21 acides aminés, les endothélines ont été découvertes en 1988 ; synthétisées par l'organisme, ce sont des vasoconstricteurs qui augmentent fortement la pression artérielle (l'action est un ordre de grandeur supérieure à celle d'autres hormones déjà connues depuis longtemps telles que la vasopressine, l'angiotensine II ou la noradrénaline). Leur sécrétion excessive peut entraîner une vasoconstriction si grave que des organes tels que les reins ne sont plus suffisamment irrigués et peuvent être endommagés.

Les endothélines exercent leur action par l'intermédiaire de deux récepteurs, ET_A et ET_B . Les substances thérapeutiques peuvent ainsi être dirigées soit contre les endothélines, soit contre leurs récepteurs, mais comme on ne connaît pas encore la structure spatiale des récepteurs ET et qu'on ne dispose même pas de modèles des domaines de fixation, la concep-

tion d'inhibiteurs ne peut être fondée que sur la structure des endothélines. C'est ce qui a incité récemment plusieurs laboratoires pharmaceutiques à passer au crible, à l'aide des récepteurs ET_A et ET_B obtenus par génie génétique, les banques de substances dont ils disposaient afin d'y détecter d'éventuels antagonistes : il suffit de mettre le récepteur en présence de la substance à tester et de déterminer la force de liaison.

Parmi des milliers de composés testés, les chimistes de la Société BASF ont identifié une substance qui avait initialement été pressentie comme produit phytosanitaire. Ce composé était non seulement fort efficace, mais se distinguait en outre par sa différence d'affinité pour le récepteur ET_A et pour le récepteur ET_B . Il comportait deux centres chiraux, ce qui amena les chimistes à tenter, dans une première étape, de simplifier la molécule, sans perdre d'efficacité ni de sélectivité. Finalement les chimistes ont trouvé une substance qui se fixe au récepteur ET_A avec une affinité 40 fois supérieure à celle du produit phytosanitaire initial et avec une sélectivité supérieure pour le récepteur ET_B (voir la figure 9, à gauche).

La modélisation moléculaire a été employée tout à la fin de cette étude, lorsqu'une équipe des Laboratoires *SmithKline Beecham* publia la structure d'un autre antagoniste des récepteurs ET, mis au point dans ses propres laboratoires. Celui-ci se différenciait nettement de la substance mise au point par la Société BASF, mais des analogies apparaissaient. On découvrit alors que l'insertion de groupes spécifiques devrait augmenter notablement l'affinité pour le récepteur (voir la figure 9, à droite). Quelques dérivés furent alors

synthétisés, et l'un d'entre eux montra une affinité 15 fois supérieure, sans perte de sélectivité.

Ainsi la recherche rationnelle de médicaments donne aujourd'hui des composés plus efficaces que ceux qui sont découverts par hasard. C'est le cas de l'hypotenseur Captopril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), et c'est aussi le cas de l'inhibiteur de la pompe à protons Omeprazol contre l'hyperacidité gastrique, par exemple. La découverte rationnelle de substances actives repose sur la compréhension des causes moléculaires des troubles de la santé ; cette compréhension permettra de soigner les maladies les plus graves, car elle identifie des événements multifactoriels qui sont souvent à l'origine de ces maladies.

Gerd FOLKERS est professeur de chimie pharmaceutique à l'École polytechnique de Zurich. Hugo KUBINYI est professeur de chimie à la Faculté de pharmacie de Heidelberg.

H.-J. BÖHM, G. KLEBE et H. KUBINYI, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996.

Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design, sous la direction de N. Cohen, Academic Press, Londres, 1996.

H.-D. HÖLTJE et G. FOLKERS, *Molecular Modeling, Basic Principles and Applications*, in *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, vol. 5, VCH, Weinheim, 1996.

P. KROGSGAARD-LARSEN, T. LILJEFORS et U. MADSEN, *A Textbook of Drug Design and Development*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996.

C.G. WERMUTH, *The Practice of Medicinal Chemistry*, Academic Press, Londres, 1997.

Animaux et médicaments

Le concept de médicaments reste l'apanage de l'espèce humaine.

Ces dernières années, des primatologues ont observé des chimpanzés qui consommaient des produits naturels aux effets analogues à ceux de médicaments utilisés par les humains. D'où la question : les animaux pratiquent-ils une protopharmacie ? L'analyse du phénomène montre qu'il est abusif de qualifier ces comportements de « pratiques médicales » et que l'usage des médicaments, dans le sens où nous l'entendons généralement, reste l'apanage de notre espèce.

En 1989, Michael Huffman, un primatologue américain associé à l'Université de Kyoto, et son assistant tanzanien Mohamedi Seifu Kalunde publiaient une observation exceptionnelle d'utilisation d'une plante par un chimpanzé de Tanzanie : l'un des animaux du groupe observé, qui ne s'alimentait presque plus et souffrait de troubles intestinaux, cueillit des rameaux de *Vernonia amygdalina* – une plante au goût très amer, généralement évitée – pour les mâcher et en sucer le jus ; l'animal s'étant rapidement rétabli, les deux zoologistes avaient envisagé l'hypothèse d'une intentionnalité, pour un but curatif, dans le choix et l'usage de ce « médicament ».

La consommation d'argile, observée chez le chimpanzé et chez de nombreux autres singes, et celle de charbon de bois, tout récemment décrite chez le colobe rouge de Zanzibar par Thomas Stuhsaker et ses collègues des Universités de Caroline du Nord et du Wyoming, sont considérées comme des phénomènes de même nature, souvent comparées à des usages de médicaments par les animaux. En effet, les pharmacies vendent du charbon activé ou certaines formes d'argile pour traiter les troubles stomacaux et intestinaux.

En ce qui concerne les argiles, j'ai moi-même dosé, avec Léon Guéguen, de l'INRA de Jouy-en-Josas, les sels minéraux dans les échantillons qui étaient utilisés par les chimpanzés du Gabon, ainsi que dans d'autres terres argileuses ingérées par les entelles (des singes de la famille des Colobidae) du



C.M. Hladik

Peut-on dire qu'un chimpanzé recherche un effet « médicamenteux » lorsqu'il suce le jus des tiges d'*Hypselodelphis violacea* qui lui procure des acides aminés indispensables ? Ce comportement a un effet bénéfique comparable à celui de l'ingestion d'autres produits qui peuvent éliminer les tanins.

Sri Lanka. Nous avons comparé ces concentrations en sels minéraux à celles dans les aliments, principalement des fruits et des feuilles, consommés par les primates. À l'époque où nous abordions ce problème de la géophagie (consommation de terres), les zoologistes admettaient généralement que les animaux trouvaient dans le sol du chlorure de sodium ou d'autres sels minéraux. Nous avons écarté cette hypothèse : la concentration en sels assimilables était bien inférieure à celle que nous avons trouvée dans la plupart des aliments végétaux consommés.

Dans l'article que nous avons publié, en 1974 (*Comptes rendus de l'Académie des sciences*, Paris, t. 279), nous avons proposé une autre explication, qui supposait une interaction des argiles et des tanins, aujourd'hui bien établie pour le cas des singes. En effet, les tanins sont des molécules qui rendent indigestes une grande partie des protéines. Par exemple, lorsque des animaux consomment des feuillages riches en tanins, ceux-ci se lient aux protéines du bol ali-

mentaire, de la même façon que la peau d'un animal peut être transformée en cuir par des liaisons stables entre des tanins et des protéines animales, au cours de l'opération de tannage. L'ingestion d'argile, qui lie rapidement les tanins par adsorption, évite ces liaisons néfastes à la digestion.

Les animaux connaîtraient-ils alors l'usage des médicaments ? Certains zoologistes n'hésitent pas à utiliser le terme de médicament et de protopharmacie, mais il n'existe aucune différence entre la consommation de produits riches en sucres, en protéines, en sels minéraux, etc., indispensables à l'équilibre énergétique du régime alimentaire, et l'absorption de substances végétales ou minérales qui, de la même façon, contribuent à l'équilibre de l'alimentation, en éliminant les substances indigestes, lorsqu'elles sont mélangées aux autres aliments. Dirait-on, par exemple, que des rats carencés en vitamines (ou en certains sels minéraux) « se soignent » lorsqu'ils choisissent préférentiellement, quand on leur en propose, les aliments qui contiennent les vitamines ou les sels minéraux manquants ?

Le médicament, lui, est défini, dans le monde occidental, non seulement par son action spécifique (sur la base de leur action, de nombreuses substances ingérées sont comparables à des médicaments), mais aussi par le contexte où il est utilisé, en fonction du concept de maladie, que l'on oppose à celui de bonne santé.

Si le mode d'action de certaines substances utilisées par des primates non humains est très comparable à celui de certains de nos médicaments, il est abusif d'appliquer aux observations effectuées sur le monde animal cette notion de médicament, définie par rapport à un contexte social. Jusqu'à preuve du contraire, les notions de maladie et de non maladie n'existent que dans les cultures humaines.

Claude Marcel HLADIK
Laboratoire d'écologie générale
du Muséum national d'histoire
naturelle, Brunoy

