

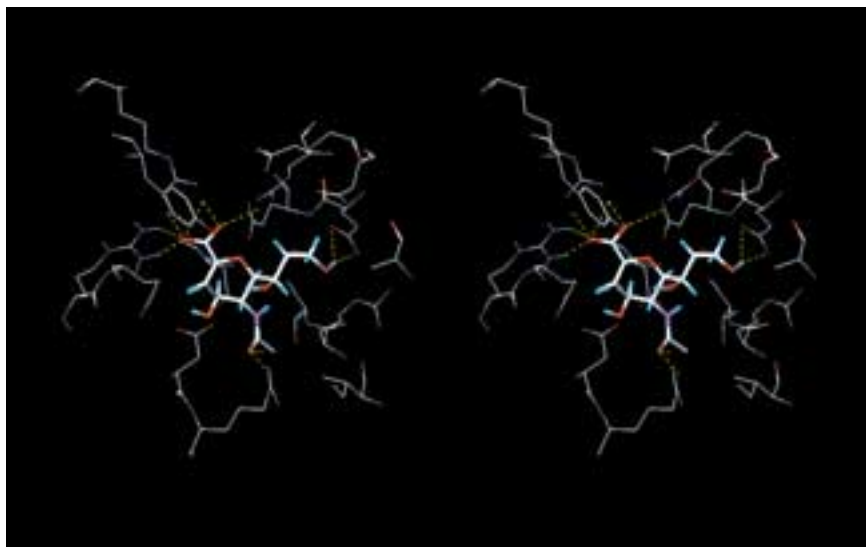
L'exploration du site de fixation

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.

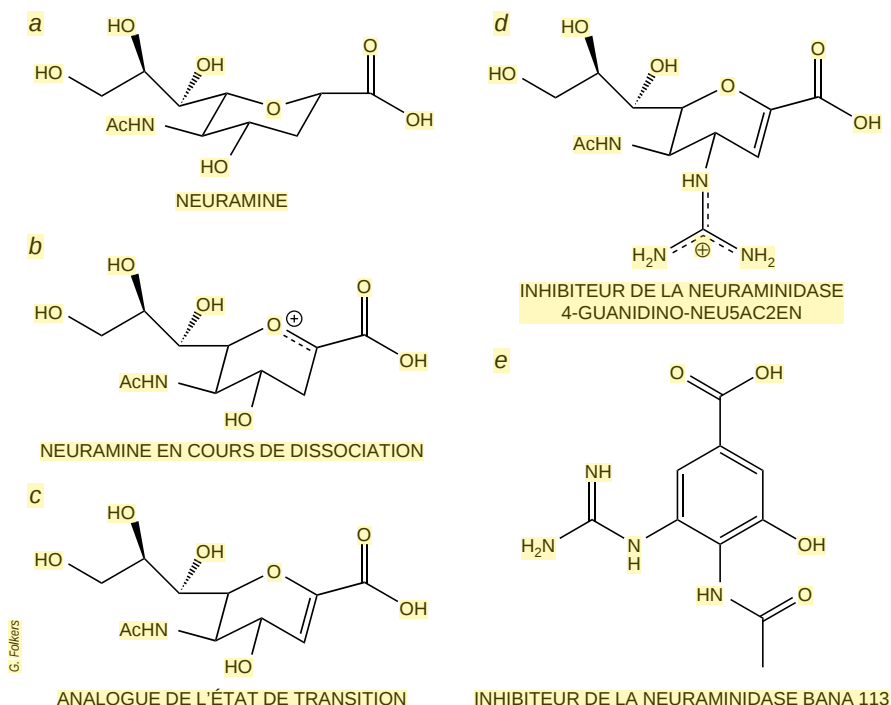
thèse de médicaments, à produire d'emblée la bonne configuration ou bien à séparer le produit utile de son énantiomère (la forme opposée).

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 -COO-CH₃). 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 microcalorimètres, 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 structurales.

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 pré-curseur). Ces «inhibiteurs de protéases», utilisés en trithérapie du SIDA, réduisent la concentration virale à des valeurs inférieures à la limite de détection, chez certains malades.