

Alzheimer, Parkinson : des stratégies innovantes pour la découverte de nouveaux ligands

Résumé L'agrégation des protéines α -synucléine (α -syn) et tau et la multiplication de ces agrégats fibrillaires dans le système nerveux central jouent un rôle central dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. La conception de ligands de ces agrégats à des fins diagnostique ou thérapeutique est difficile, car chaque protéine peut adopter plusieurs conformations à l'origine d'un polymorphisme des agrégats, et donc de leurs surfaces. Via des méthodes bioinformatiques, une cartographie (appelée « pocketome ») des crevasses accessibles à la surface des polymorphes dont la structure est déposée dans la Protein Data Bank a été établie. En parallèle, un algorithme de « scaffold hopping » intégrant des ligands de l' α -syn et de tau déjà connus pour augmenter la diversité structurale des ligands a été utilisé. Cette analyse ouvre la voie à la synthèse de nouveaux ligands potentiels par des méthodes à haut débit et à la validation de la fixation de ces ligands *in vitro* et *in vivo*.

Keywords Maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, diagnostic, thérapie, alpha-synucléine, tau, pocketome, scaffold hopping.

Abstract Alzheimer, Parkinson: innovative strategies for the discovery of new ligands

The aggregation of the proteins α -synuclein (α -syn) and tau into fibrillar assemblies and the multiplication of those aggregates in the central nervous system are associated to the Parkinson's and Alzheimer's neurodegenerative diseases. Designing ligands of fibrillar α -syn and tau with diagnostic and therapeutic potential is a challenge given the multitude of conformations these proteins adopt that result in numerous polymorphs exhibiting different surfaces. Using bioinformatics analyses, a cartography (named pocketome) of the lateral clefts available for ligands binding at the surface of each polymorph using the distinct fibrillar structures available in the Protein Data Bank has been established. In parallel, a "scaffold hopping" analysis based on known ligands of fibrillar α -syn and tau to generate novel structural diversity has been performed. These new strategies will lead to new chemical candidates that will be synthesized using high-throughput experimentation, and their specificity for fibrils will be evaluated through a direct-to-biology approach.

Keywords Parkinson's disease, Alzheimer's disease, diagnosis, therapy, alpha-synuclein, tau, pocketome, scaffold hopping.

Les maladies d'Alzheimer et de Parkinson sont deux maladies neurodégénératives incurables à ce jour parmi les plus communes. On compte aujourd'hui en France environ 1 million de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer [1]. Cette dernière est la forme la plus commune de démence (60 à 70 % des cas [2]) dont étaient atteints plus de 50 millions de personnes dans le monde en 2019 selon l'OMS [3].

Les symptômes de ces deux maladies sont multiples. On rapporte des troubles mnésiques caractéristiques d'une forme de démence ainsi que des difficultés de reconnaissance dans la maladie d'Alzheimer. Les tremblements au repos, la raideur musculaire ou encore la lenteur à initier les mouvements (ou akinésie), qu'on peut regrouper sous le terme de rigidité posturale, sont caractéristiques de la maladie de Parkinson. Cependant, il existe de nombreux autres symptômes moins connus pour ces deux maladies, tels que de nombreux troubles psychologiques (anxiété, aphasie, dépression), du sommeil et du langage.

Aujourd'hui encore, le diagnostic d'une maladie neurodégénérative n'est basé que sur des symptômes [4]. L'identification définitive de la maladie neurodégénérative qui a précisément affecté un malade ne se fait que post-mortem au moyen d'analyses histologiques de plusieurs marqueurs neuropathologiques. La maladie d'Alzheimer se caractérise par une atrophie du cerveau, tout particulièrement de l'hippocampe, et c'est la perte de plus de 50 % de la population de neurones dopaminergiques – ou neurones à dopamine – qui amène aux premiers symptômes de la maladie de Parkinson. Les

médecins sont donc confrontés à un problème majeur dans la lutte contre ces maladies neurodégénératives : ils ne peuvent les diagnostiquer que sur la base de symptômes, et dès lors que ces pathologies sont déjà à des stades avancés.

Dans les deux maladies, on relie la présence ou non de symptômes ainsi que leur gravité à la dégénérescence des neurones, souvent accompagnée d'une neuroinflammation. En 2003, l'équipe du professeur Heiko Braak proposa une classification en stades de la maladie de Parkinson reliant les différents symptômes et l'état de la neurodégénérescence basée sur la distribution de lésions caractéristiques de cette maladie [5]. Ils sont au nombre de six (figure 1), et ce n'est qu'à partir des stades dits « mid-stage » qu'on constate l'apparition de symptômes moteurs, rendant possible un diagnostic. On peut également utiliser cette classification pour l'évolution de la maladie d'Alzheimer.

Maladies neurodégénératives et lésions neuronales

Les maladies neurodégénératives se caractérisent par des dépôts protéiques extra- ou intracellulaires qui sont majoritairement constitués de protéines mal repliées. Ce sont ces dépôts qui sont responsables des pertes neuronales et donc *in fine* du déclin cognitif et de la présence de symptômes. Il a été montré que ces dépôts peuvent se propager en se multipliant – à la manière des protéines infectieuses « prion-like » [6].

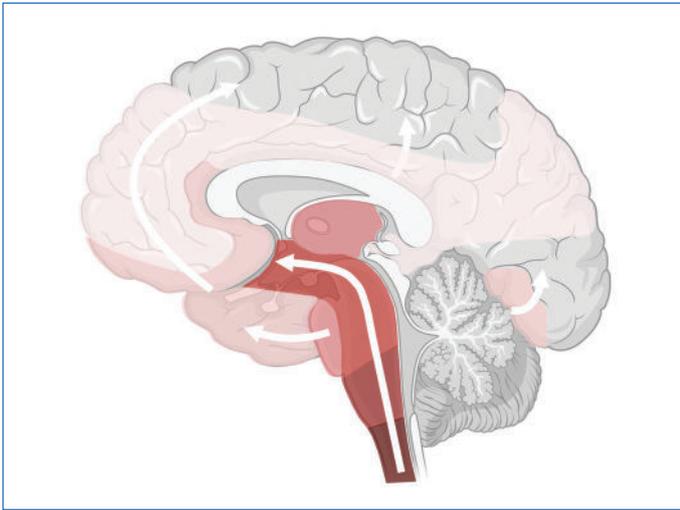


Figure 1 - Représentation graphique des stades de Braak, montrant l'évolution de la maladie de Parkinson. La sévérité décroissante de la pathologie est indiquée par les différents niveaux de couleur, du plus sombre au plus clair. Le processus pathologique ascendant correspondant à la propagation « prion-like » de l'alpha-synucléine agrégée est indiqué par les flèches blanches.

C'est en 1907 que le psychiatre et neuropathologiste Alois Alzheimer – qui donnera donc son nom à la maladie qu'il a décrite – rapporte pour la première fois des lésions neuronales extracellulaires au sein du cerveau de la patiente Auguste Deter, admise à l'hôpital de Francfort pour un cas de démence. L'analyse histologique du cerveau de la patiente permet en effet, pour la première fois, la description des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, à savoir les plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires, dont les composants majoritaires seront connus bien plus tard : les peptides bêta-amyloïdes et les protéines tau, respectivement. La maladie de Parkinson est éponyme du médecin James Parkinson qui décrit pour la première fois les symptômes moteurs de cette dernière dans « An essay on shaking palsy » [7]. Parmi les premiers neurones affectés dans la maladie

de Parkinson, on peut citer les neurones à dopamine de la *substantia nigra* ; leur dégénérescence est causée par la présence de corps d'inclusion intracellulaires appelés corps de Lewy et neurites de Lewy, dont la protéine alpha-synucléine est une composante majeure.

Les peptides bêta-amyloïdes

Les peptides amyloïdes bêta sont une famille de peptides d'une longueur moyenne de 40 acides aminés (37 à 42). Ils résultent du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), et selon l'enzyme qui réalise le clivage, on obtient ou non le peptide bêta-amyloïde (figure 2).

Les protéines tau

La protéine tau est associée aux microtubules (éléments constitutifs du cytosquelette) et contribue au maintien de la structure des neurones. Il existe six isoformes résultant d'un épissage alternatif du gène codant pour la protéine. Ceux-ci suivent la nomenclature (0,1,2)N(3,4)R avec N des parties du domaine N-terminal et R des domaines de répétitions impliqués dans la liaison au microtubule. Le nombre total d'acides aminés varie ainsi de 352 (0N3R) à 441 (2N4R) et la masse moléculaire de 37 kDa à 46 kDa. Elle peut être hyperphosphorylée et se détache alors des microtubules, causant leur déstabilisation. Une fois hyperphosphorylée et détachée des microtubules, la protéine tau peut adopter une conformation lui permettant de s'agréger en fibres et de former des enchevêtrements neurofibrillaires (figure 3). L'accumulation de ces derniers est délétère pour les neurones.

Alpha-synucléine

L'alpha-synucléine est une protéine de 140 acides aminés présente en majorité au niveau des terminaisons présynaptiques. Elle est extrêmement dynamique et peut adopter des conformations riches en feuillets bêta, donnant la possibilité à ces monomères mal repliés de s'empiler pour former un protofilament. L'association de deux protofilaments constitue la fibre amyloïde d'alpha-synucléine, et l'élongation trop

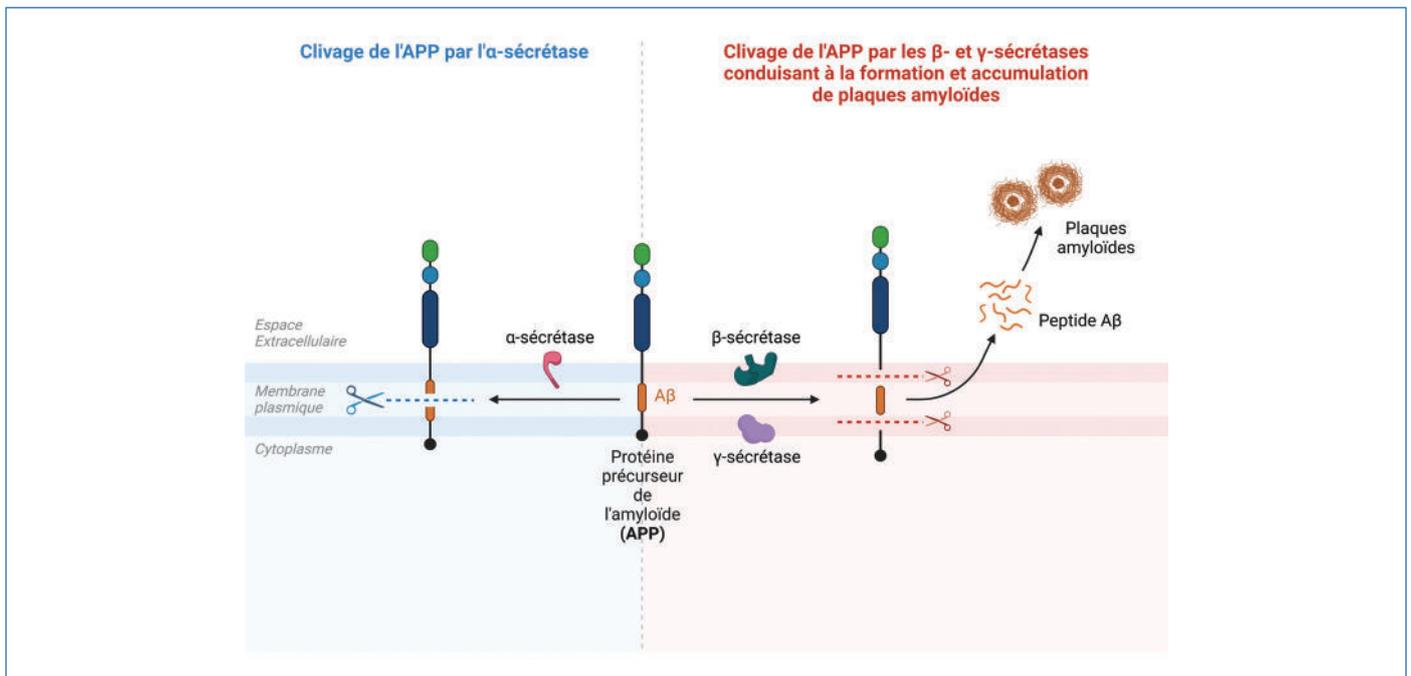


Figure 2 - Clivages possibles de la protéine précurseur de l'amyloïde. Le premier clivage par l'alpha-sécrétase coupe la protéine précurseur de l'amyloïde. Le second clivage par les bêta- et gamma-sécrétases permet la formation du peptide bêta-amyloïde, son accumulation et la formation de plaques amyloïdes extracellulaires.

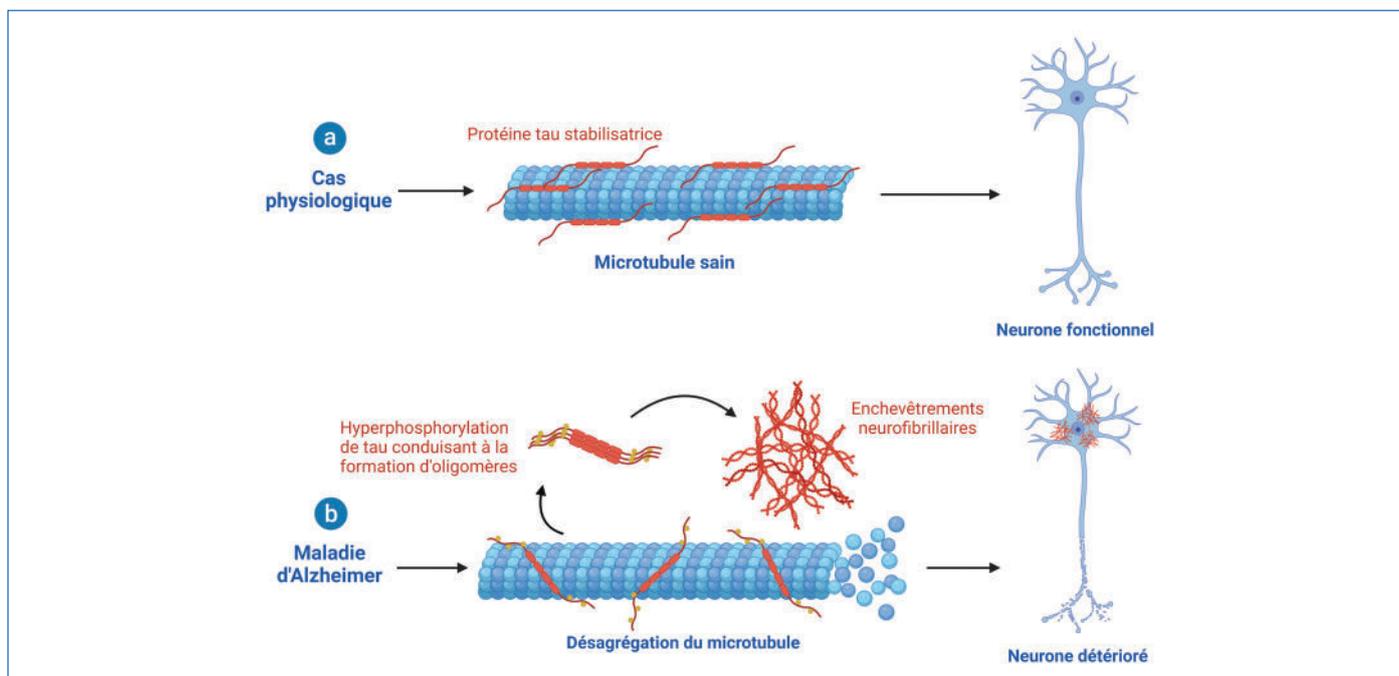


Figure 3 - Formation des enchevêtrements neurofibrillaires dans la maladie d'Alzheimer. Dans le cas physiologique, la protéine tau est associée aux microtubules, permettant leur bon fonctionnement et le maintien du cytosquelette. Dans le cas des patients atteints par la maladie d'Alzheimer, la protéine est phosphorylée dans de nombreux sites, et l'affinité de cette dernière pour le microtubule est alors moindre. À partir d'un certain stade d'hyperphosphorylation, la protéine tau se détache du microtubule et s'agrège en oligomères, puis finalement en enchevêtrements neurofibrillaires, causant la neurodégénérescence.

importante de ces fibres cause la perte de solubilité de celles-ci dans le cytosol et la formation de dépôts intracellulaires que sont les corps et neurites de Lewy (figure 4).

L'existence de polymorphisme et son implication pour la découverte de ligands

Les maladies d'Alzheimer et de Parkinson font partie de familles de protéinopathies. La maladie d'Alzheimer fait partie du spectre des tauopathies tout comme la maladie de Pick, la paralysie supranucléaire progressive et la maladie des grains argyrophiles, alors que la maladie de Parkinson est une forme de synucléinopathies au même titre que la démence à corps de Lewy et que l'atrophie multi-systématisée. De nombreuses données scientifiques indiquent que le polymorphisme, c'est-à-dire les nombreuses formes fibrillaires existantes résultant de l'organisation des protofilaments et/ou de la conformation de polymérisation adoptée, dans les agrégats de tau et de l'alpha-synucléine, est responsable de ces différentes pathologies. Il existe par conséquent une relation entre la structure des agrégats protéiques et la pathologie qui en résulte [8-12]. Dans le cas de l'alpha-synucléine, l'interaction entre les deux protofilaments constituant la fibre amyloïde peut varier. En collaboration avec les équipes d'Henning Stahlberg et Anja Böckmann, notre équipe a répertorié en 2019 deux structures 3D de l'alpha-synucléine qui diffèrent par l'agencement des deux protofilaments formant la fibre amyloïde [13]. Il existe aujourd'hui de nombreux polymorphes répertoriés pour les protéines tau et alpha-synucléine au sein de la Protein Data Bank (PDB).

Le polymorphisme décrit plus haut rend difficile le développement de traitements (petite molécule ou anticorps) efficaces pour lutter contre différentes synucléinopathies et tauopathies, ou les diagnostiquer avec certitude à un stade précoce. En effet, un anticorps en lien avec l'alpha-synucléine indépendamment de quelque repliement ne pourra pas être efficace

puisqu'il ne distinguera pas une forme normale, fonctionnelle, d'une forme anormale, pathologique. Il est alors indispensable de développer des anticorps ou des ligands de plus faible masse moléculaire spécifiques de conformations bien définies.

Il apparaît donc nécessaire de concevoir des ligands spécifiques – vis-à-vis d'une protéine par rapport à une autre, mais surtout d'un polymorphe par rapport à un autre – aux fibres amyloïdes, en utilisant les connaissances structurales actuelles sur les polymorphes et les pistes diagnostiques déjà existantes.

Aujourd'hui, le développement de petites molécules organiques comme ligands potentiels des fibres amyloïdes se fait essentiellement dans le domaine de radiotraceurs pour la tomographie par émission de positons (TEP). Cependant, les candidats déjà développés montrent très souvent un marquage peu, voire non spécifique, des différentes fibres amyloïdes [14], mais également un marquage important d'autres cibles [15] telles que la monoamine oxydase A [16-17].

Expertises et stratégies mises en place

Pour mener à bien ce projet, nous développons des stratégies innovantes d'études *in silico* (en collaboration avec l'Institut Pasteur) et de synthèse organique par méthode dite « HTE » (« high throughput experimentation », expérimentation à haut débit), tout en profitant des connaissances techniques de production de différentes souches fibrillaires d'alpha-synucléine et de tau.

Approches informatiques

L'existence de polymorphisme est un défi pour la conception de ligands, mais la découverte et la caractérisation de nombreuses souches par des méthodes de biologie structurale (essentiellement basées sur les données de cryomicroscopie électronique) et leur dépôt au sein de la PDB nous permettent

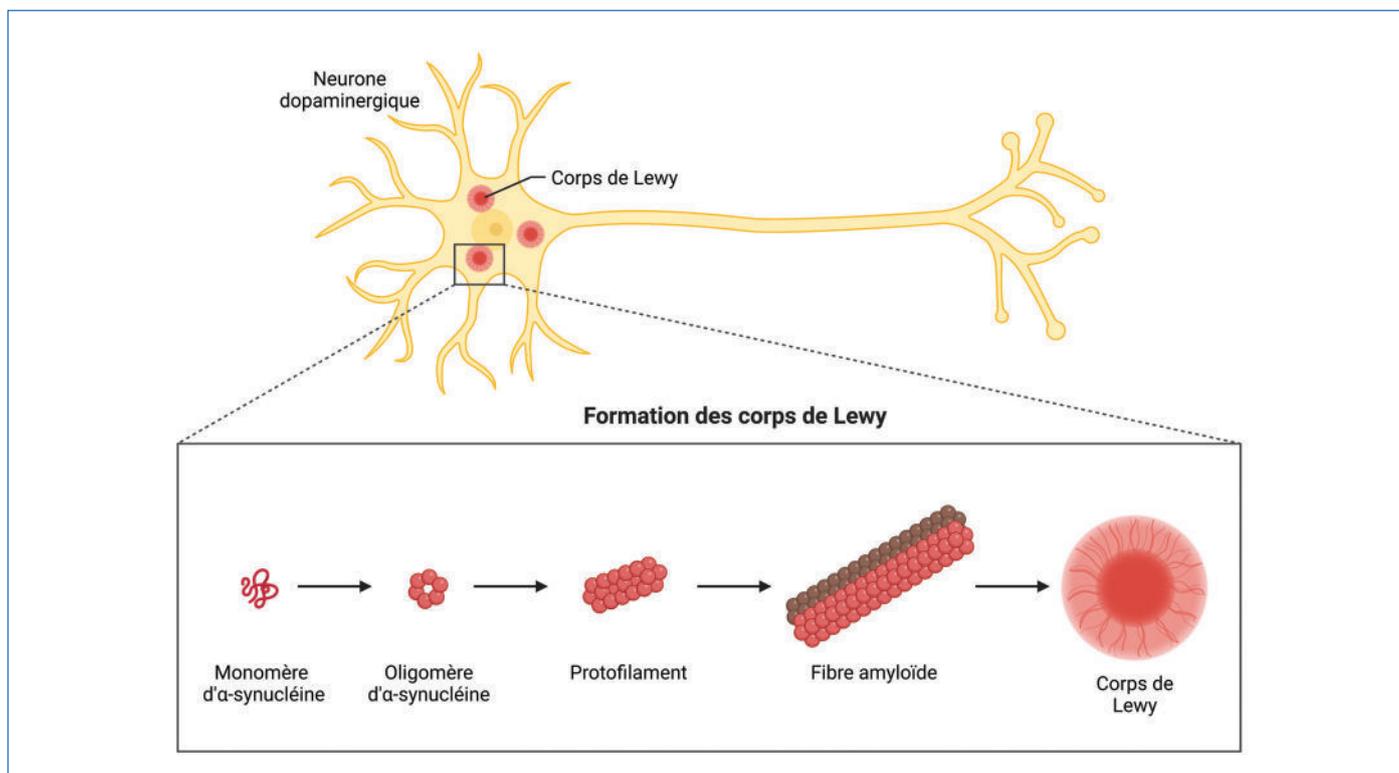


Figure 4 - Mécanisme d'agrégation de l'alpha-synucléine conduisant à la formation des corps de Lewy. On représente ici les deux protofilaments constituant de la fibre amyloïde de deux couleurs différentes (en marron et rouge) afin de permettre une meilleure visualisation. Le neurone représenté est un neurone dopaminergique car c'est le premier type de neurone à être affecté dans la maladie de Parkinson.

d'évaluer les similarités et différences existantes à la surface de ces différentes sources par des approches *in silico*. Nous avons ainsi défini des poches et des sillons créés par la position des acides aminés à la surface de ces structures et/ou leur empilement, et avons comparé les propriétés (volume, polarité, etc.) de ces poches pour créer un « pocketome » des fibres d'alpha-synucléine, de tau et du peptide bêta-amyloïde, les poches spécifiques de polymorphes étant *de facto* de meilleurs candidats pour la conception de ligands eux aussi spécifiques.

Ce pocketome de fibres amyloïdes sera par la suite projeté dans un pocketome plus vaste d'interactions protéine-protéine connues pour être inhibées par une petite molécule. Ainsi, un inhibiteur de VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, impliqué dans le fonctionnement du corps humain), certainement jamais étudié sur une maladie neurodégénérative, pourrait devenir un nouveau candidat car se liant à une poche possédant des propriétés similaires à celles d'une souche fibrillaire.

La dernière approche *in silico*, intitulée « scaffold hopping » (saut structural), trouve son point de départ dans les radiotraceurs déjà développés pour l'imagerie TEP. Continuer à développer de nouveaux analogues de ces structures pour améliorer leurs propriétés serait très coûteux et avec de faibles chances de succès. Notre stratégie est donc de retenir les radiotraceurs actuels avec les meilleures propriétés, et d'utiliser l'intelligence artificielle et des méthodes de « deep learning » (par apprentissage) pour générer des molécules présentant une structure chimique différente, tout en conservant les propriétés physiques et électroniques du radiotraceur initial.

Utilisation et intérêt de la synthèse à haut débit

La synthèse à haut débit (HTE) est une synthèse miniaturisée sur plaque, généralement au format 96 puits, permettant d'optimiser rapidement une réaction chimique ou d'explorer

son champ d'application, en synthétisant 96 analogues en parallèle par une variation des synthons de départ (figure 5). Cette méthode de synthèse permet également une approche dite « direct-to-biology », donnant ainsi la possibilité de réaliser les études *in vitro* à partir de la même plaque. La synthèse HTE permet ainsi de réduire considérablement les coûts matériels, économiques et temporels dans le domaine de la chimie médicinale, où la phase de pharmacomodulation est très longue et coûteuse.

Un espoir de diagnostic précoce

Cette panoplie de stratégies innovantes devrait nous permettre à terme d'obtenir de nouveaux candidats, plus spécifiques et plus rapidement, pour la recherche diagnostique et thérapeutique des maladies de Parkinson et d'Alzheimer, en lien avec les événements moléculaires à l'origine de ces maladies. C'est un espoir de diagnostic précoce (avant même l'apparition de symptômes cognitifs) – via la génération de nouveaux types de radiotraceurs pour l'imagerie TEP – des maladies et donc de meilleurs accompagnements des patients.

Toutefois, il reste nécessaire de rappeler que les maladies neurodégénératives sont encore loin d'être tout à fait comprises et qu'elles sont multifactorielles. On peut citer le rôle de la neuroinflammation dans ces maladies [18-20], celui potentiel de certains métaux, pesticides [21] et toxines [22] dans les mécanismes d'agrégaions protéiques [23-24]. Le nombre et la disparité des facteurs potentiels impliqués dans leur émergence rendent de ce fait un unique médicament peu probable.

C'est pourquoi les stratégies établies visent à générer de nouvelles molécules, mais également à nous renseigner sur les aspects structuraux en lien avec l'existence de polymorphisme

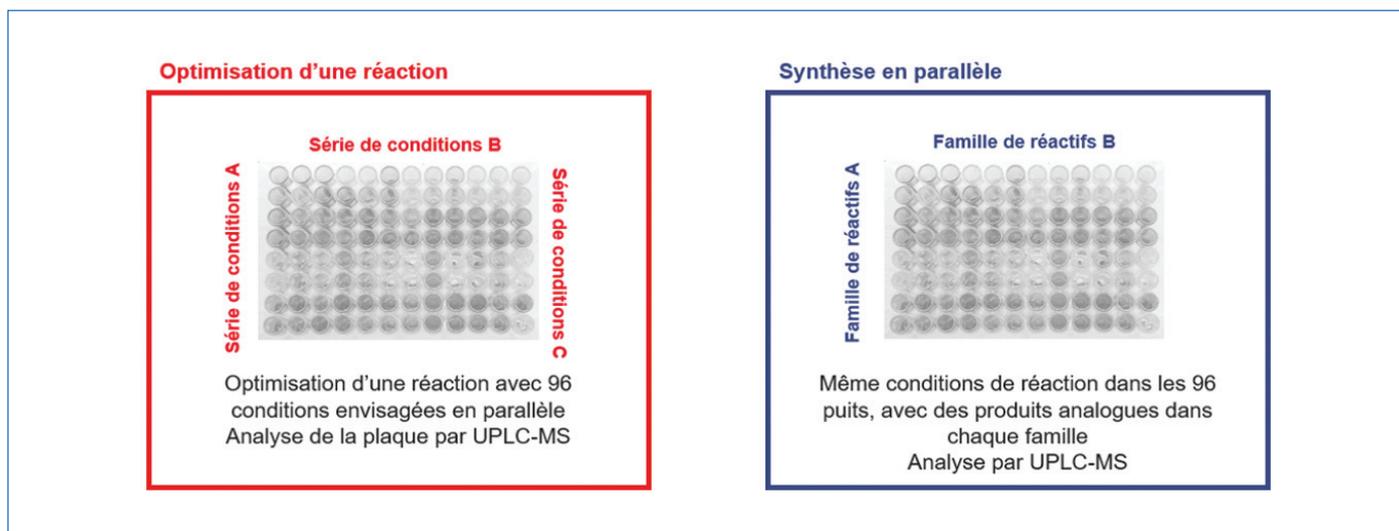


Figure 5 – Possibilités de synthèse HTE. À gauche : optimisation d'une réaction en évaluant des séries de conditions de solvant, catalyseur, base, etc. pour une réaction de travail. À droite : synthèse en parallèle d'une réaction à partir de deux familles de réactifs présentant divers analogues.

dans chaque maladie. L'établissement d'un pocketome pourra permettre à toute la communauté scientifique de comparer les structures des fibres amyloïdes entre elles, et la possibilité de projeter cette cartographie au sein d'autres bases de données structurales. Ces nouvelles informations permettront d'approfondir la recherche de nouveaux ligands spécifiques de manière plus rationnelle et constituent une nouvelle étape de compréhension des structures fibrillaires pouvant, par exemple, amener à de nouvelles études mécanistiques de formation des différentes souches pour mieux comprendre l'existence de polymorphisme.

- [1] www.vaincrealzheimer.org/la-maladie/quelques-chiffres (consulté le 08/09/2023).
- [2] www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia (consulté le 08/09/2023).
- [3] Global status report on the public health response to dementia. Geneva, World Health Organization, **2021**.
- [4] K. Szigeti, Overcoming gaps in the treatment of neurodegenerative disease, *EbioMedicine*, **2020**, *60*, 103088.
- [5] B. Heiko *et al.*, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging*, **2003**, *24*(2), p. 197-211.
- [6] P. Brundin, R. Melki, R. Kopito, Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2010**, *11*(4), p. 301-307.
- [7] J. Parkinson, An essay on the shaking palsy. 1817, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, **2002**, *14*(2), p. 223-236.
- [8] W. Peelaerts *et al.*, α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration, *Nature*, **2015**, *522*(7556), p. 340-344.
- [9] A. Van der Perren *et al.*, The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies, *Acta Neuropathol.*, **2020**, *139*, p. 977-1000.
- [10] R.W.L. So, J.C. Watts, α -Synuclein conformational strains as drivers of phenotypic heterogeneity in neurodegenerative diseases, *J. Mol. Biol.*, **2023**, *435*(12), 168011.
- [11] J. Vaquer-Alicea, M.I. Diamond, L.A. Joachimiak, Tau strains shape disease, *Acta Neuropathol.*, **2021**, *142*, p. 57-71.
- [12] W. Zhang *et al.*, Heparin-induced tau filaments are polymorphic and differ from those in Alzheimer's and Pick's diseases, *Elife*, **2019**, *8*, e43584.
- [13] R. Guerrero-Ferreira *et al.*, Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils, *Elife*, **2018**, *7*, e36402.
- [14] A. Perez-Soriano *et al.*, PBB3 imaging in Parkinsonian disorders: evidence for binding to tau and other proteins, *Mov. Disord.*, **2017**, *32*(7), p. 1016-24.

- [15] M. Marquié *et al.*, Lessons learned about [F-18]-AV-1451 off-target binding from an autopsy-confirmed Parkinson's case, *Acta Neuropathol Com.*, **2017**, *5*(1), p. 1-13.
- [16] C. Vermeiren *et al.*, The tau positron-emission tomography tracer AV-1451 binds with similar affinities to tau fibrils and monoamine oxidases, *Mov. Disord.*, **2018**, *33*(2), p. 273-281.
- [17] L. Lemoine *et al.*, Tau positron emission tomography imaging in tauopathies: the added hurdle of off-target binding, *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, **2018**, *10*, p. 232-236.
- [18] M.T. Heneka *et al.*, Neuroinflammation in Alzheimer's disease, *The Lancet Neurology*, **2015**, *14*(4), p. 388-405.
- [19] M. Jain *et al.*, Role of JAK/STAT in the neuroinflammation and its association with neurological disorders, *Ann. Neurosci.*, **2021**, *28*(3-4), p. 191-200.
- [20] L. Katsouri *et al.*, Ablation of reactive astrocytes exacerbates disease pathology in a model of Alzheimer's disease, *Glia*, **2020**, *68*(5), p. 1017-30.
- [21] A. Elbaz *et al.*, Professional exposure to pesticides and Parkinson disease, *Ann. Neurol.*, **2009**, *66*(4), p. 494-504.
- [22] M. Gerlach *et al.*, MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease, *Eur. J. Pharmacol.: Mol. Pharmacol.*, **1991**, *208*(4), p. 273-286.
- [23] J.T. Pedersen *et al.*, Rapid exchange of metal between Zn7-metallothionein-3 and amyloid- β peptide promotes amyloid-related structural changes, *Biochemistry*, **2012**, *51*(8), p. 1697-1706.
- [24] R.G. Roy, P.K. Mandal, J.C. Maroon, Oxidative stress occurs prior to amyloid A β plaque formation and tau phosphorylation in Alzheimer's disease: role of glutathione and metal ions, *ACS Chem. Neurosci.*, **2023**, *14*(17), p. 2944-54.

Gaëtan OSSARD*^{1,2}, doctorant, **Ronald MELKI**¹, directeur de recherche au CNRS, et **Eugénie ROMERO-LABOUREUR**², ingénieur-chercheur au CEA.

¹Laboratoire des maladies neurodégénératives, Molecular Imaging Reseach Center, Institut Jacob, CEA.

²Laboratoire de chimie bioorganique, Service de chimie bioorganique et de marquage, Département Médicaments et technologies pour la santé, Institut Joliot, CEA, Université Paris-Saclay, INRAE.

* gaetan.ossard@cea.fr