

# Je suis la clé de la vie...

**Andrée Marquet\*** professeur

**Summary :** *I am the key to life*

*Chemistry has to provide to life sciences the tools necessary to the understanding of biological mechanisms. This allows the rational design of drugs, through an approach which is complementary to systematic screening as illustrated by the history of AIDS chemotherapy. The development of a predictive toxicology or the control of biotechnological processes are further examples of what can be the contribution of chemistry.*

**Mots clés :** *Études mécanistiques, conception rationnelle, criblage, pharmacologie, toxicologie, biotechnologie.*

**Key-words :** *Mechanistic studies, rational design, screening, pharmacology, toxicology, biotechnology.*

Si on juxtapose les deux mots « chimie et santé » et pour peu que l'on choisisse résolument le camp de l'optimisme, on pense immédiatement « médicament » et accessoirement produits phytosanitaires, nouveaux cosmétiques...

En fait, les liens entre chimie et santé vont bien au-delà. Qui dit santé dit bon fonctionnement et contrôle des processus biologiques qui conditionnent la vie des organismes et ces processus sont régis par les lois de la chimie. Dans toute communication entre cellules ou entre entités subcellulaires, des partenaires se reconnaissent à l'échelle moléculaire, s'adaptent l'un à l'autre ; il en résulte une réaction, un changement de conformation, le déclenchement d'un signal, un transport, le franchissement d'une barrière. Ce sont les lois de la cinétique et de la thermodynamique qui régulent les flux intracellulaires... Où se situe la différence entre un chimiste qui étudie un mécanisme réactionnel et un biochimiste qui décrypte un processus enzymatique ?

Le biochimiste Arthur Kornberg, prix Nobel de médecine, écrivait en 1987 : « *Much of life can be understood in rational terms if expressed in the language of chemistry. It is an interna-*

*tional language, a language for all time, a language that explains where we came from, what we are and where the physical world will allow us to go. Chemical language has great esthetic beauty and links the physical sciences to the biological sciences* »... [1].

Le rôle du chimiste va donc bien au-delà d'une intervention sur une pathologie grâce à une molécule dont les propriétés ont pu être découvertes par criblage. Tout en contribuant bien évidemment à accroître l'arsenal des molécules utiles, il se doit de participer à la compréhension intime des mécanismes du vivant.

## L'apport de la chimie : regard sur les dernières décennies

La place de la chimie dans la recherche biochimique et thérapeutique et les domaines associés a beaucoup varié au cours des dernières décennies. Comparée à la chimie, la biochimie est une science relativement jeune et les problèmes abordés d'une complexité telle que ce n'est qu'assez récemment qu'une description opérationnelle, à l'échelle atomique, de certains processus biologiques a pu être proposée.

Pendant longtemps, le développement de la chimie médicinale a donc reposé sur les modulations de structure de substances actives, découvertes par criblage de substances naturelles ou de molécules de synthèse. Les tests étaient généralement réalisés *in vivo* ou sur

organes isolés, sans cible moléculaire, conduisant à des relations structure-activité empiriques englobant un grand nombre de paramètres complexes. C'est l'intuition du chimiste médicinal qui guidait les programmes de synthèse.

Avec les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes biochimiques et dans la définition des cibles et grâce à l'apport de la biologie structurale, on est entré dans l'ère de la pharmacologie moléculaire. La cristallographie, la résonance magnétique nucléaire, la modélisation moléculaire, plus récemment la spectrométrie de masse permettent d'atteindre la structure tridimensionnelle des macromolécules et d'étudier leur dynamique et leurs interactions. La conception rationnelle de principes actifs, faisant appel à un raisonnement chimique sophistiqué, est devenue possible et a suscité beaucoup d'espoirs. Au lieu de fabriquer plus ou moins à l'aveugle des milliers de molécules, on allait pouvoir aller droit au but et faire l'économie d'un grand nombre de synthèses improductives.

Malgré quelques exemples spectaculaires de médicaments ou de produits phytosanitaires élaborés grâce à cette démarche rationnelle, largement utilisés par les enseignants pour motiver les futurs chercheurs, force est de constater que les résultats en terme de molécules utiles, ne sont pas directement corrélés aux investissements intellectuels consentis. Il est vrai que, par cette approche, « *on ne trouve que ce que l'on cherche* », car on raisonne par rap-

\* Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de chimie organique biologique, UMR CNRS 7613, Université P. et M. Curie, boîte courrier 182, 4, place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05.  
Tél. : 01.44.27.55.35. Fax : 01.44.27.71.50.  
E-mail : marquet@ccr.jussieu.fr

port au ligand naturel de la macromolécule cible, en termes de forme ou de réactivité. On ne conçoit pas, *a priori*, les structures extrêmement complexes des produits naturels et l'on n'aurait, par exemple, jamais imaginé le taxol. Et pourtant, les activités découvertes « par hasard » font souvent faire des sauts qualitatifs importants en termes d'innovation et également de compréhension mécanistique.

Il faut aussi se méfier des « dogmes mécanistiques ». C'est ce qu'illustre très bien, par exemple, le cas des hormones stéroïdes. Découvertes dans les années 30, elles ont fait l'objet d'un nombre incroyable de modifications chimiques et d'études biologiques plus ou moins empiriques, ce qui a abouti aux succès que l'on sait avec la mise sur le marché des corticoïdes, des différentes pilules etc. Ce n'est qu'ensuite que l'on a découvert leurs cibles moléculaires qui sont des récepteurs situés dans le noyau de la cellule, le complexe stéroïde-récepteur régulant la biosynthèse de certaines protéines. Les structures cristallines de cette famille de récepteurs viennent d'être établies et une nouvelle ère de « conception rationnelle » est en train de s'ouvrir. Mais, voici que l'on découvre que nombre de « réponses rapides » aux stéroïdes ne peuvent s'expliquer *via* leurs interactions avec les récepteurs nucléaires...

Le débat sur les mérites relatifs de l'approche rationnelle et du screening systématique a été relancé, avec acuité ces dernières années, avec l'avènement de la chimie combinatoire et des tests à haut débit s'appuyant sur la robotisation. Il s'agit d'accéder rapidement au plus grand nombre de molécules possible, souvent testées d'abord en mélanges. L'industrie pharmaceutique s'est engagée à fond dans cette voie.

Est-ce à dire qu'il n'y a plus de place pour la recherche mécanistique en dehors d'un légitime besoin de recherche fondamentale ? Il s'agit d'un faux débat et il n'est pas question, personne n'y songe sérieusement, de retourner au Moyen-Age de la chimie médicinale. Les deux approches doivent être utilisées en même temps de manière interactive, leur poids relatif dépendant du problème abordé et du degré de définition de la cible. C'est ce

que les quelques exemples développés ci-dessous vont tenter d'illustrer. Ils sont volontairement choisis dans des domaines différents (pharmacochimie, toxicologie, biotechnologie), afin de montrer l'universalité de la démarche, quel que soit le secteur concerné des sciences de la vie.

### La chimiothérapie du sida : un exemple de démarche de recherche

Même si nous attendons tous avec anxiété les progrès de la lutte contre le virus du sida (syndrome immuno déficitaire acquis), le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), force est de constater que les résultats déjà obtenus, aboutissant à la trithérapie [2], l'ont été en un temps record au vu de l'échelle de temps généralement nécessaire à la découverte d'un médicament.

En effet, c'est en 1981-1982 que la maladie est officiellement connue et désignée sous le nom de sida et en 1983 que le virus responsable, le VIH, a été identifié. En 1985, tous ses gènes étaient séquencés. Dès 1985, la protéase a été repérée comme une bonne cible et en 1988 elle était disponible, soit par clonage, soit par synthèse chimique. Sa structure cristallographique a été résolue en 1989. Les premiers inhibiteurs efficaces ont été obtenus en 1990 et la mise sur le marché des anti-protéases actuellement utilisées date de 1995. L'AZT, quant à lui, a été autorisé dès 1987.

Comment est-on arrivé si vite ? Il y a plusieurs raisons à cela. Tout d'abord, l'agent infectieux est une entité relativement simple. Il appartient à la famille des rétrovirus dont le mécanisme de réplication est assez bien connu, au moins dans ses grandes lignes et des cibles biologiques ont pu être définies assez aisément. Il s'agit en l'occurrence :

- de la transcriptase inverse (TI), l'enzyme qui permet de transférer l'information génétique du virus, stockée sous forme d'acide ribonucléique, en acide désoxyribonucléique qui peut s'intégrer dans le génome de la cellule hôte ;

- de la protéase qui découpe un certain nombre de protéines virales synthétisées par la cellule hôte en fragments

fonctionnels nécessaires à la formation d'un nouveau virus.

La trithérapie associe deux molécules qui sont des inhibiteurs de la TI, dont l'AZT, et un inhibiteur de la protéase. Il est intéressant de se pencher sur la façon dont on est arrivé à ces outils thérapeutiques qui relèvent en fait de deux démarches différentes.

L'AZT est le produit d'une pharmacochimie classique. Il a été synthétisé pour la première fois en 1964, dans le cadre d'études de réactivité, puis testé sur divers systèmes parmi de nombreux autres analogues de nucléosides. En 1974, on a observé qu'il inhibait la réplication d'un rétrovirus. C'est donc tout à fait logiquement qu'il a été testé sur des cellules infectées par le VIH et trouvé efficace en 1985.

C'est un inhibiteur de la TI dont le mécanisme d'action est assez évident. Il suffit de regarder la formule pour voir qu'il s'agit d'un terminateur de chaîne. A partir de ce concept de base, d'autres analogues ont été préparés et certains sont également sur le marché (ddI, ddC...) (*figure 1*). La structure tridimensionnelle de la TI n'est parue qu'en 1992 [3]. On peut maintenant affiner la conception des inhibiteurs, mais l'essentiel a été trouvé avant et ceci illustre bien le potentiel de la pharmacochimie classique.

La mise au point des **antiprotéases** relève d'une tout autre démarche et repose sur une approche très rationnelle basée sur l'expérience acquise avec diverses familles de protéases [2a]. Ce sont des enzymes bien connues qui fonctionnent selon un mécanisme simple puisqu'il s'agit tout simplement de l'hydrolyse d'une liaison peptidique dont le mécanisme est représenté sur la *figure 2*. C'est certainement la famille d'enzymes sur laquelle on a recueilli le plus grand nombre de données structurales et mécanistiques. On classe les protéases en familles d'après leurs mécanismes d'action ; des réactifs et des inhibiteurs spécifiques de chacune d'elles ont été développés.

Il a donc été très facile de caractériser la protéase du VIH et de montrer qu'elle appartient au groupe des « protéases acides » ou « aspartyl protéases ». Grâce à toutes les études antérieures, on connaît bien le mécanisme des enzymes de cette famille et on

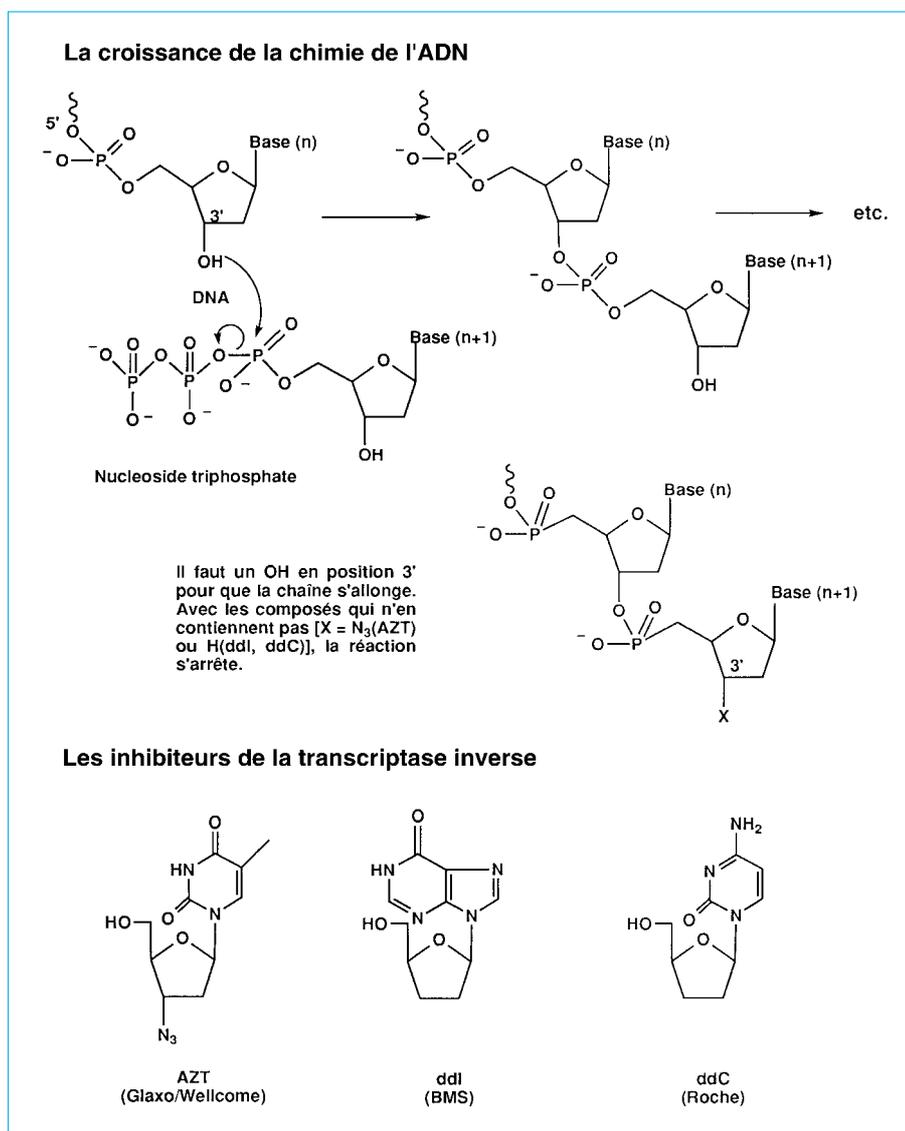


Figure 1 - Les terminateurs de chaîne.

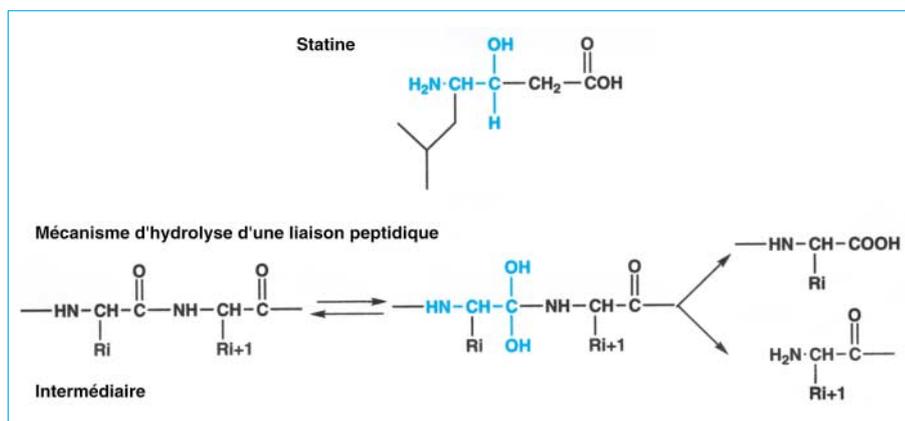


Figure 2 - La statine mime l'intermédiaire de l'hydrolyse d'une liaison peptidique.

savait d'emblée quel type d'inhibiteur viser. Les meilleurs ont été conçus par analogie avec un produit naturel, la pepstatine. Ce produit isolé à partir de cultures de micro-organismes s'est révélé être un inhibiteur de la rénine,

une autre aspartyl protéase impliquée dans la boucle de contrôle de la pression artérielle qui a, par conséquent, fait l'objet de nombreuses études.

En essayant de comprendre l'origine de ce pouvoir inhibiteur de la pepstatine

découvert par criblage, on s'aperçoit qu'elle contient un acide aminé « exotique » la statine et on a très vite supposé que sa structure mimait celle de l'intermédiaire réactionnel produit au cours de l'hydrolyse du substrat (figure 2). Des approches théoriques permettent en effet de prévoir qu'une structure proche de celle d'un intermédiaire réactionnel de haute énergie doit conduire à un inhibiteur possédant une très bonne affinité pour l'enzyme. L'analogie entre la statine et l'intermédiaire est imparfaite, cependant de nombreuses structures cristallines de complexes de protéases acides avec des inhibiteurs de ce type ont montré qu'ils étaient bien positionnés comme prévu, c'est-à-dire avec le groupe OH situé à l'endroit attendu pour l'un des OH de l'intermédiaire (figure 2). On trouve dans la littérature de nombreux exemples montrant la fécondité de cette combinaison de hasard et d'approche rationnelle.

Pour revenir à la protéase du VIH, il fallait ajuster la nature des groupes situés autour du motif central de manière à obtenir la meilleure affinité possible entre l'inhibiteur et l'enzyme. La structure tridimensionnelle de celle-ci étant disponible, il a été possible de concevoir « sur écran » des structures *a priori* affines... Il a ensuite fallu en synthétiser un certain nombre et les tester... Les structures des antiprotéases utilisées actuellement en trithérapie sont représentées sur la figure 3. On voit que toutes contiennent le motif central  $\beta$ -amino-alcool.

Chacun sait que la lutte n'est pas terminée. Le virus deviendra probablement résistant et il faut concevoir d'autres inhibiteurs, en faisant appel aux mêmes concepts, ou à d'autres... Bien évidemment, on s'attaque en même temps à d'autres cibles.

### Vers une toxicologie prédictive par la compréhension des mécanismes chimiques

La toxicité d'un composé, qu'il s'agisse des molécules issues de notre environnement, apportées par la nourriture ou des médicaments ou produits phytosanitaires potentiels, est souvent due à la métabolisation des dites molécules qui les transforme en espèces dont la réactivité chimique est accrue.

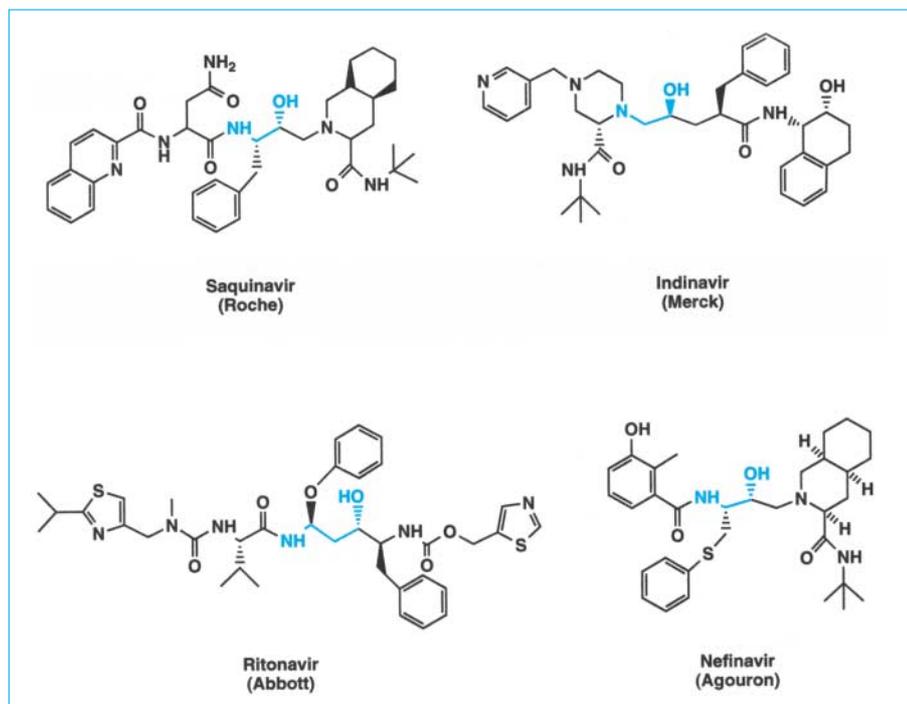


Figure 3 - Les antiprotéases.

Les tests de toxicité ont longtemps été faits *in vivo* sur animal, conduisant à une toxicologie principalement descriptive. Comme le souligne un récent rapport de l'Académie des sciences [4], les limitations prévisibles de l'expérimentation animale et la lourdeur des essais exigent, d'une part, **la mise au point de méthodes alternatives** utilisant par exemple des cultures de cellules humaines ou des protéines humaines recombinantes et, d'autre part, le développement **d'une toxicologie de plus en plus explicative et prédictive**. Il faut évaluer le risque à l'avance et ceci exige beaucoup de rationnel. On entre de plain-pied dans les études de mécanisme basées sur l'enzymologie. Là aussi, le (bio)chimiste a un grand rôle à jouer.

La connaissance de la réactivité intrinsèque des molécules, la prévision de leur comportement vis-à-vis des principaux enzymes de métabolisation sont indispensables et il faudrait arriver à établir des relations structure moléculaire/(hépto)toxicité.

La toxicité peut être directe, c'est-à-dire que le métabolite réactif peut se fixer de manière covalente à une protéine ou à un acide nucléique, entraînant leur inactivation et on peut généralement la détecter lors des essais sur l'animal. Elle peut être aussi d'ordre immuno-allergique et dépendante de l'individu : le médicament, ou plus

généralement un de ses métabolites, peut, de la même manière, se coupler à une protéine, la rendant antigénique et provoquant la sécrétion d'auto-anticorps. Dans cette dernière situation, le système immunitaire humain joue un rôle clé et on ne dispose pas de modèles animaux. La rationalisation du phénomène est alors absolument indispensable.

C'est ainsi qu'un anesthésique, l'halothane, a montré une toxicité hépatique importante, dont le mécanisme a été bien étudié (figure 4) [5]. L'halothane est d'abord hydroxylé par un cytochrome P450 en un produit instable qui se décompose en halogénure de trifluoroacétyle, responsable de la trifluoroacétylation d'une protéine. Cette protéine trifluoroacétylée devient antigénique et provoque des réactions auto-immunes chez le patient. Ceci étant

compris, il ne reste plus... qu'à concevoir des analogues de l'halothane qui conservent les propriétés anesthésiques et ne peuvent pas subir cette transformation ou qui sont métabolisés beaucoup plus lentement.

Un autre exemple intéressant concerne l'acide tiénilique (AT) (figure 5), un diurétique qui a dû être retiré du marché à cause de ses effets secondaires hépatotoxiques. Aucun effet n'avait été observé au cours des tests sur animaux lors des essais précliniques et de nombreuses observations indiquent qu'il s'agit d'une toxicité d'origine auto-immune<sup>1</sup>. Par contre son isomère (ATI) qui correspond à un simple déplacement du substituant du thiophène de la position 2 à la position 3 présente, quant à lui, une toxicité directe mise en évidence chez le rat.

Une interprétation convaincante à été proposée [6] pour rationaliser ces comportements. Les deux composés seraient activés par un cytochrome P450 en métabolites réactifs (les sulfoxydes de thiophène correspondants, électrophiles puissants) qui peuvent se lier de manière covalente à la protéine par attaque d'un nucléophile. Il se trouve que la position de la chaîne latérale influence la réactivité : le site d'attaque est le carbone 5 dans le cas de l'acide tiénilique et le carbone 2 dans le cas de son isomère. Le cytochrome P450 qui possède un site d'attaque proche du carbone 5 peut se lier au métabolite de AT et devenir immunogène. Par contre ATI activé ne peut réagir, pour des raisons géométriques, avec la protéine qui l'a produit. Il s'échappe et va se lier de manière non spécifique à d'autres protéines hépatiques provoquant la toxicité directe.

C'est en multipliant les études de ce type que l'on parviendra, au simple

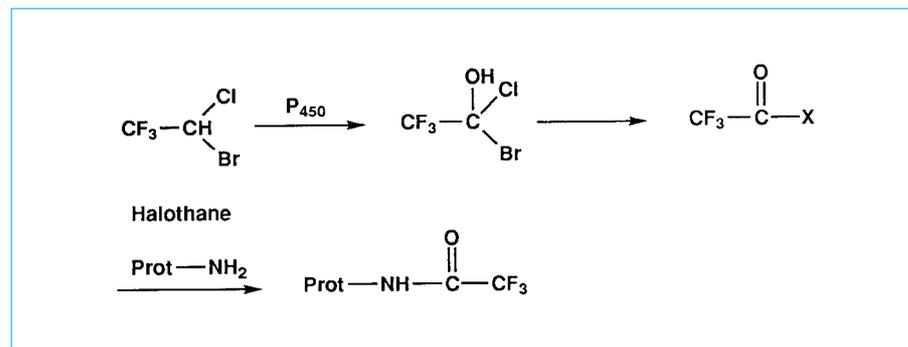


Figure 4 - Le mécanisme de la toxicité de l'halothane.

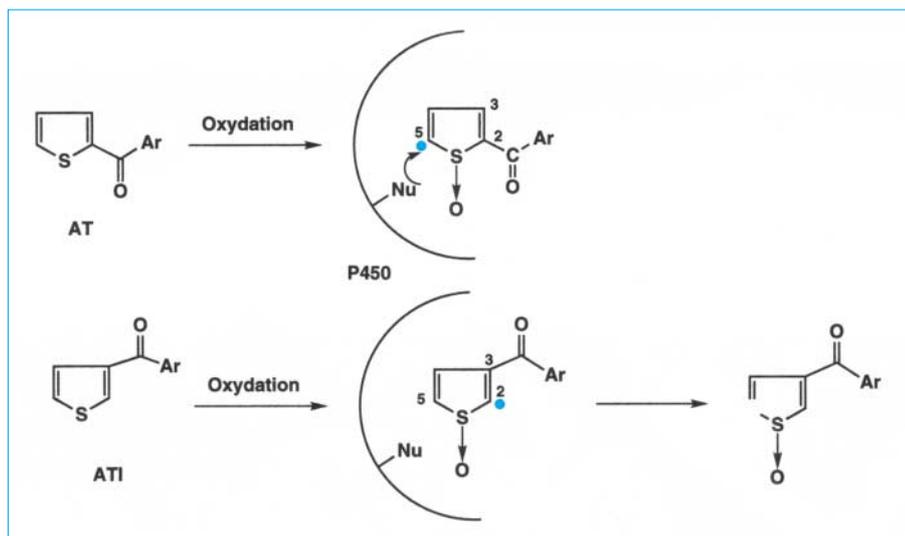


Figure 5 - Le métabolisme de l'acide thiénylique.

examen de la structure des molécules, à prévoir avec un certain degré de confiance la toxicité d'un principe actif et donc à évaluer le risque *a priori* et à faire entrer le raisonnement dès le stade de la recherche d'une nouvelle substance active.

### En biotechnologie aussi, il faut comprendre les mécanismes

La biotine, une vitamine principalement utilisée en alimentation animale et en cosmétologie, est actuellement fabriquée industriellement par synthèse chimique. Elle est produite naturellement par les micro-organismes et les plantes, mais en très faibles quantités et des efforts considérables ont été déployés dans l'industrie depuis une quinzaine d'années pour l'obtenir par fermentation à l'aide de bactéries recombinantes. Ceci supposait l'identification des gènes codant pour les enzymes impliquées et les recherches génétiques ont été conduites avec succès. Des souches bactériennes surexprimant largement les protéines visées ont été construites par différents groupes<sup>2</sup>. On a annoncé (*Le Monde* du 2/12/87) qu'un système de production microbiologique de biotine venait d'être mis au point. Et pourtant, on n'a jamais obtenu la production de biotine à un niveau intéressant, malgré les nombreuses tentatives de mise au point au niveau de la fermentation.

La difficulté vient, entre autre, de ce que deux étapes de cette voie de biosynthèse étaient encore comprises (*figure 6*). L'origine métabolique du précurseur, le pimeloyl CoA, une molécule pourtant fort simple, n'était pas établie et ne l'est toujours pas...

La dernière étape (formation du cycle tétrahydrothiophène), quant à elle, représentait une véritable énigme mécanistique. Elle commence à être décryptée et s'avère d'une extraordinaire complexité [7]. Il a été montré que, outre la protéine spécifique qui avait été identifiée initialement, la biotine synthase, plusieurs autres protéines étaient impliquées, protéines normalement présentes chez tous les micro-organismes qui ne sont pas surexprimées dans les souches recombinantes utilisées. Mais, plus grave encore, il vient d'être montré que l'enzyme était substrat de la réaction en même temps que catalyseur. En effet, des recherches mécanistiques mettant en jeu l'arsenal chimique nécessaire à ce genre d'études (marquage isotopique, synthèse d'intermédiaires postulés, cinétique) ont montré que le centre [Fe-S] contenu dans la

biotine synthase était la source de soufre pour la biotine. Il doit donc à chaque tour se reconstituer pour que l'enzyme puisse fonctionner.

Ces résultats doivent à l'évidence être pris en compte si l'on veut aboutir à des souches plus performantes...

\*  
\* \*

Ces quelques exemples choisis arbitrairement parmi une multitude possible montrent, je l'espère clairement, d'une part, que le débat « approche rationnelle ou screening systématique » est un faux débat et, d'autre part, que le rôle du chimiste face aux problèmes posés par la biologie va bien au-delà de celui d'un pourvoyeur de molécules....

### Notes

<sup>1</sup> Production d'anticorps par une protéine du soi modifiée par la drogue.

<sup>2</sup> La méthode consiste à introduire dans une souche bactérienne de nombreuses copies des gènes qui codent pour les enzymes nécessaires à la biosynthèse. Ces protéines seront alors produites en quantités « anormalement » élevées. L'augmentation de la concentration de « catalyseur » doit augmenter la vitesse de réaction et la production du produit recherché.

### Références

- [1] Kornberg A., The two cultures : chemistry and biology, *Biochemistry*, **1987**, 26, p. 6888.
- [2] (a) De Clercq E., Toward improved anti-HIV chemotherapy : therapeutic strategies for intervention with HIV infections, *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, p. 2491 ; (b) Bousseau A., Thérapeutique anti VIH : état de la question, *Cahier IMABIO*, MPCV/CNRS, **1997**, n° 18, p. 91.
- [3] Kohlstaedt L.A., Wang J., Friedman J.M., Rice P.A., Steitz T.A., Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor, *Science*, **1992**, 256, p. 1783.
- [4] *État de la recherche toxicologique en France*. Rapport de l'Académie des Sciences, CADAS n° 9, **1998**.

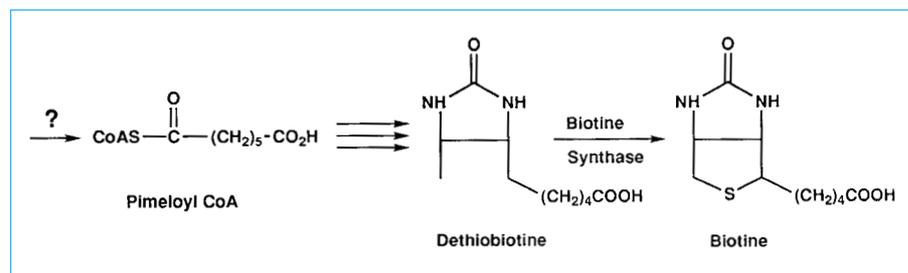


Figure 6 - Les étapes à problème de la biosynthèse de la biotine.

- [5] Uetrecht J.P., New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions. The « Danger Hypothesis » and Innate Immune System, *Chem. Res. Toxicol.*, **1999**, *12*, p. 387.
- [6] Bonierbale E., Valadon Ph., Pons C., Desfosses B., Dansette P.M., Mansuy D., Opposite behaviours of reactive metabolites of tienilic acid and its isomer toward liver proteins : use of specific anti-tienilic acid-protein adduct antibodies and the possible relationship with different hepatotoxic effects of the two compounds, *Chem. Res. Toxicol.*, **1999**, *12*, p. 286.
- [7] (a) Tse Sum Bui B., Florentin D., Fournier F., Ploux O., Méjean A., Marquet A., A novel function for an iron-sulfur center : participation of its inorganic sulfide in the biosynthesis of biotin., *FEBS Lett.*, **1998**, *440*, p. 226 ; (b) Escalettes F., Florentin D., Tse Sum Bui B., Lesage D., Marquet A., Biotin synthase mechanism : evidence for hydrogen transfer from the substrate into deoxyadenosine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, p. 3571.