

# Le rôle de la chimie dans l'élucidation de mécanismes biologiques et le développement des médicaments

## L'exemple des métallopeptidases à zinc

Bernard P. Roques

**Abstract** **The role of chemistry to investigate biological mechanisms aimed at designing new drugs: illustration with zinc metallopeptidases**

Zinc metallopeptidases constitute a group of enzymes with about the same mechanism of action. Therefore, modern techniques of medicinal chemistry such as molecular modeling, high throughput screening, libraries, combinatorial chemistry can be used with these proteins. The review illustrates the crucial role of zinc metallopeptidases in three domains: analgesia, cardiovascular, neurotoxicity of botulinum neurotoxin. In each case, new concepts and methods have been developed leading to molecules active in humans. This demonstrates the critical requirement of interdisciplinary approaches at the frontier of chemistry and biology in the field of medicinal sciences.

**Mots-clés** **Inhibiteurs de métallopeptidases à zinc, nouveaux analgésiques et antihypertenseurs, modélisation moléculaire, banques d'inhibiteurs, synthèse stéréosélective.**

**Key-words** **Zinc metallopeptidase inhibitors, new analgesics and anti-hypertensives, molecular modelling, inhibitor's libraries, stereoselective synthesis.**

Les enzymes jouent un rôle crucial dans le fonctionnement des êtres vivants. Elles participent aux étapes essentielles qui permettent l'expression des gènes et leur traduction en protéines actives (protéome), y compris en réglant leur concentration intracellulaire par clivage de ces macromolécules en composés inactifs (protéasome). Ce sont également des enzymes, essentiellement des protéases, qui participent au métabolisme et *in fine* au catabolisme des effecteurs peptidiques ou protéiques.

On comprend dès lors qu'un nombre très important de médicaments ont pour cibles des enzymes. Pour prendre des exemples récents, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) inhibent une ou deux cyclo-oxygénases (COX-1 et/ou COX-2) qui génèrent des substances participant à l'inflammation des tissus et à la douleur qui en résulte. La plus grande partie des antitumoraux sont des inhibiteurs des enzymes qui contrôlent la division cellulaire au niveau de l'ADN et réduisent ainsi la prolifération des cellules tumorales. De même, un inhibiteur de la phosphorylation d'une protéine oncogénique au niveau de résidus tyrosines s'est récemment démontré extrêmement efficace contre certaines formes de leucémies. La synthèse enzymatique des précurseurs du cholestérol est la cible des statines, capables de réduire très efficacement l'excès de cholestérol. Les anti-protéases bloquent l'enzyme codée par le génome du virus VIH-1, ce qui inhibe la formation de la particule virale et donc sa multiplication. Le rôle des protéases est donc d'hydrolyser une liaison peptidique à un endroit (site) déterminé. Parmi elles se trouvent les métalloprotéases, constituées en majorité d'enzymes contenant un atome de zinc catalytique.

### Les métallopeptidases à zinc (MPZ) : des enzymes physiologiques

On connaît actuellement environ 50 à 60 métallopeptidases à zinc (MPZ). Des prédictions à partir du décryptage du

#### Glossaire

##### **Analgésique**

Produit capable d'annihiler complètement une douleur intense. L'exemple type en est la morphine.

##### **Antalgique**

Produit diminuant la sensation douloureuse, le plus souvent grâce à ses propriétés anti-inflammatoires (ex. : aspirine).

##### **Central**

Désigne le cerveau.

##### **Épissage**

Liaison entre les exons (séquences nucléotidiques qui seront traduites en protéines). Cette liaison peut se faire en éliminant une partie d'un exon créant une protéine tronquée.

##### **Jonction neuromusculaire**

Espace (synapse) qui sépare la terminaison nerveuse et le muscle qu'elle innerve.

##### **Leucémie**

Processus tumoral qui affecte les globules blancs (cancer du sang).

##### **Matrixines**

Métallopeptidases à zinc dont la fonction physiologique est de digérer les protéines qui séparent les cellules. Elles sont très actives lors de la progression tumorale.

##### **Nocicepteurs**

Fines arborisations des nerfs périphériques présents dans tous les tissus et dont la fonction est de transmettre la douleur à la moelle épinière. Des récepteurs opioïdes par exemple peuvent se trouver au niveau de ces nocicepteurs.

##### **Spinal**

Désigne la moelle épinière.

génomme humain en prévoient 5 à 6 fois plus, dont un nombre important sont sans doute des isoformes obtenues par épissage alternatif.

La majorité des MPZ bien caractérisées ont des rôles physiologiques. Deux grands groupes peuvent être distingués : celui des protéases impliquées dans le métabolisme et/ou le catabolisme d'effecteurs peptidiques, et celui des protéases (matrixines) dont le rôle est de modifier le tissu (matrice) intra et/ou extracellulaire. Parmi les protéases, il faut distinguer les endoprotéases qui clivent un substrat au sein de sa séquence peptidique, et les exopeptidases qui libèrent un acide aminé terminal : aminopeptidase ou carboxypeptidase (schéma 1).

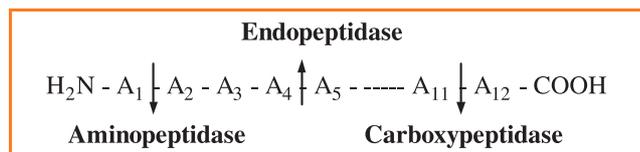


Schéma 1.

Les deux premières MPZ cristallisées ont été la carboxypeptidase A et l'endopeptidase bactérienne, thermolysine (TLN). C'est cette dernière, dont la structure a été établie seule et en présence de différents inhibiteurs, qui a conduit B. Matthews à proposer un mécanisme d'action très simple pour ces métalloenzymes [1].

La figure 1 montre que le zinc de la TLN est lié à trois acides aminés (deux histidines et un acide glutamique). Le 4<sup>e</sup> ligand du zinc est une molécule d'eau. La polarisation de cette dernière est accentuée lors de la liaison du carbonyle de la liaison peptidique qui sera clivée, le complexe pentacoordiné conduisant à une transconformation de l'enzyme avec rapprochement spatial du carboxyle du glutamate catalytique. L'énergie d'activation est abaissée et le complexe de Michaelis se dissocie par rupture de la liaison amide et formation de deux métabolites. L'affinité et la sélectivité des MPZ sont assurées par l'occupation des sous-sites de l'enzyme selon la figure 2.

Les sites occupés par un substrat varient d'une peptidase à l'autre, mais à l'exception des toxines clostridiales, il est rare que plus de 5 ou 6 sous-sites soient réellement occupés, le substrat étant alors hors de la peptidase ou à sa surface.

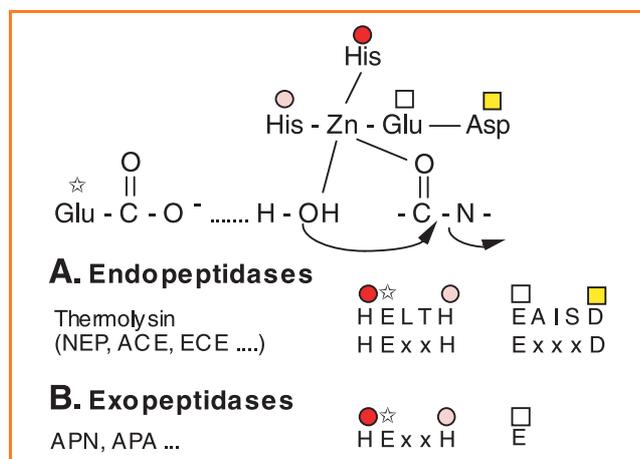


Figure 1 - Acides aminés essentiels des MPZ impliqués dans l'hydrolyse d'une liaison peptidique et schéma des liaisons avec le zinc et du mécanisme d'hydrolyse.

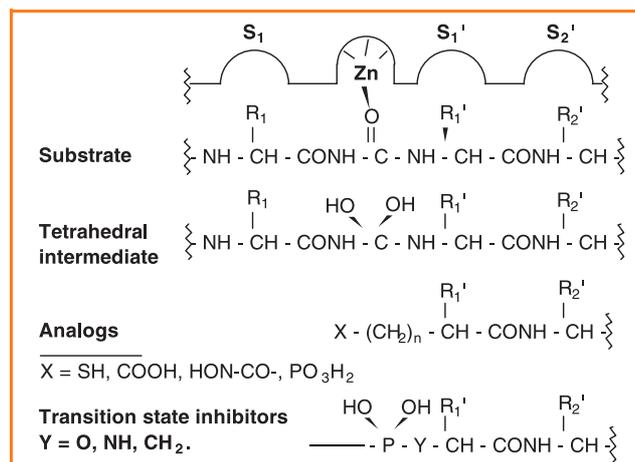


Figure 2 - Modes d'interaction d'un substrat avec une MPZ, état intermédiaire et différents types d'inhibiteurs.

## Les manipulations génétiques et la modélisation des MPZ

La première MPZ physiologique clonée et séquencée a été l'endopeptidase neutre (NEP) [2]. Ceci a permis de démontrer la présence de deux séquences consensus HExxH et ExxD (H : histidine, E : acide glutamique, D : acide aspartique) présentes dans le site catalytique de la TLN (figure 1). En dépit d'une différence de taille très importante (TLN = 315 acides aminés (a.a), NEP = 747 a.a) et d'une homologie de séquence très faible (~ 15 %), il a été possible par des expériences de mutagenèse dirigée de retrouver les aminoacides essentiels du site catalytique de la NEP (revue dans [3]) et constater qu'ils sont identiques à ceux de la TLN. Par ailleurs, le clonage de la NEP a entraîné celui de nombreuses autres MPZ (ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine, APA : aminopeptidase A, APN : aminopeptidase N, ECE : enzyme de conversion de l'endothéline...) et la détermination de la structure des matrixines de petite taille (stromélysine, astacine).

Les sites actifs de ces trois enzymes ont été superposés montrant une identité d'arrangement des structures secondaires en hélices et feuilletts. En s'appuyant sur ce résultat, un modèle de site actif de la NEP (400 résidus) a été proposé [4] et étayé par mutagenèse dirigée [5] (figure 3). Sa cohérence a été confirmée en le confrontant à la structure RX de la NEP obtenue quelques mois plus tard [6]. Cette

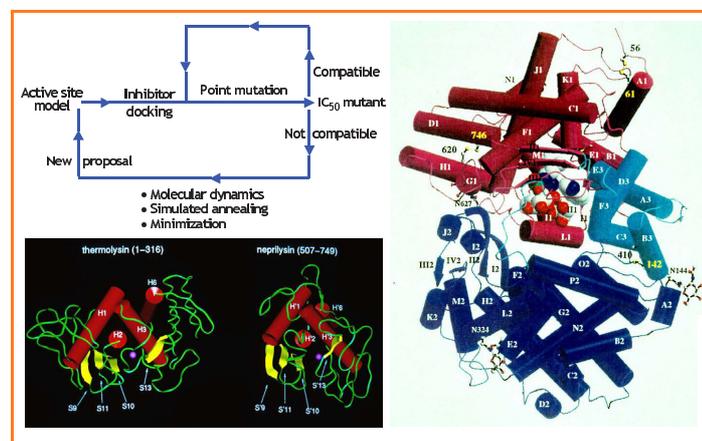


Figure 3.

stratégie de modélisation englobant des étapes de dynamique moléculaire est désormais couramment utilisée comme par exemple avec l'ECE. Ces approches ont permis d'explorer en détail les sous-sites de la NEP et l'ECE permettant d'améliorer encore les affinités mono- ou pluri-sélectives des inhibiteurs.

### L'inhibition des MPZ : le rôle crucial de la chélation du métal

Les enzymes sont certainement les cibles pharmacologiques qui se prêtent le mieux à une démarche rationnelle dans le développement d'agents inhibant leur fonction. Dans le cas des MPZ, la recherche plus ou moins aléatoire de molécules par tri systématique, qui permet de faire émerger une tête de série (« lead »), est contrainte par la présence du zinc qui doit impérativement être coordonné par un ou plusieurs atomes pour conduire à des inhibiteurs puissants. Ceci réduit la combinatoire dans la mesure où l'exploration des sous-sites effectuée, il est indispensable d'incorporer à la structure choisie un groupe X à forte affinité pour le zinc : thiol, carboxyl, hydroxamate, reste phosphinique, phosphonamide, phosphonamides mono ou bidentés (figure 2). Très peu de nouveaux chélatants du zinc ont été proposés depuis 1970 et ceci rend le dépôt de brevets de plus en plus complexe. Nous avons récemment démontré la bidentation d'un thiol et d'un carbonyle au sein d'une même molécule, ouvrant la voie au développement de nouveaux ligands. La mise au point d'inhibiteurs de MPZ, souvent destinée à la clinique, requiert la mise au point de synthèses stéréospécifiques, souvent par des voies nouvelles [7], nécessitant le développement de réactifs nouveaux. En effet, la molécule finale doit posséder une seule configuration spatiale et donc des centres chiraux tous définis. Ceux-ci sont souvent nombreux (voir figure 8a). La synthèse industrielle d'un médicament doit reprendre ces méthodes de laboratoire et les optimiser, ce qui est également difficile mais fascinant (voir [7, 16] et références citées).

### Modulation de la transmission peptidergique par les ectopeptidases à zinc

Les effecteurs peptidiques (molécule capable de se lier à une cible pour transmettre une information et générer une réponse) souvent présents dans le système nerveux central et dans les organes périphériques sont sécrétés selon un mécanisme d'exocytose calcium-dépendant classique pour aller agir au niveau de récepteurs appartenant le plus souvent à la classe des récepteurs couplés aux protéines G (figure 4). Ces dernières, intracellulaires, servent à transmettre le message reçu à l'extérieur de la cellule pour conduire à la réponse attendue (sécrétion d'une hormone par exemple). L'interruption du message est conditionnée non pas par la recapture cellulaire du peptide, mais par sa dégradation en fragments incapables de se lier aux récepteurs et ce, par des ectopeptidases à zinc [3]. Ces enzymes ont leur site actif à l'extérieur de la cellule et sont enchâssées dans la membrane de celle-ci par un court segment transmembranaire (figure 4).

Ce mécanisme a été particulièrement étudié dans le cas des peptides opioïdes (enképhalines qui sont inactivées par deux peptidases à zinc, la NEP et l'APN) et dans le cas des MPZ impliquées dans la régulation de la pression artérielle et de l'homéostasie des fluides circulants (figure 5).

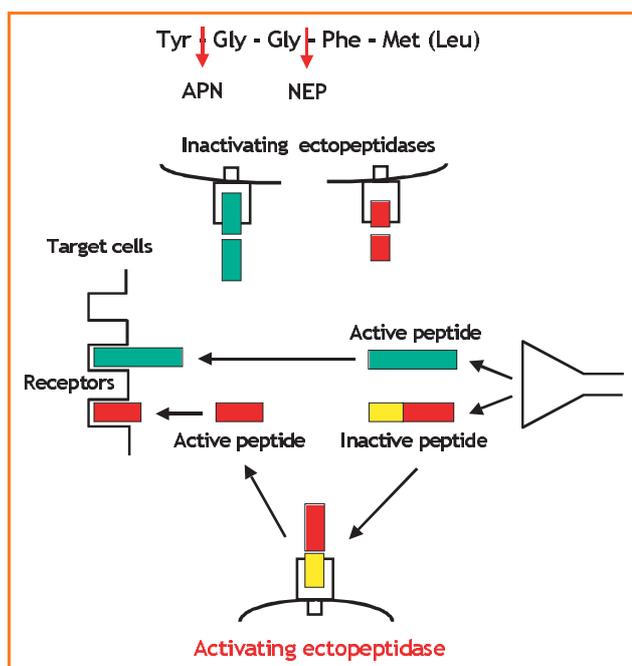


Figure 4 - Schéma de la transmission peptidergique montrant les récepteurs et les peptidases d'activation et/ou d'inactivation (la partie active de l'enzyme est à l'extérieur de la cellule).

L'inhibition de l'une ou plusieurs de ces MPZ aura donc pour effet de moduler la concentration extracellulaire (cerveau) et/ou circulante des effecteurs peptidiques endogènes. La très grande différence avec la démarche classique, qui consiste à synthétiser des agonistes ou antagonistes des récepteurs capables de les activer ou les bloquer, est que l'on échappe à deux inconvénients majeurs : la stimulation ou le blocage excessifs par des molécules exogènes et le caractère ubiquitaire de l'action de celles-ci. Ceci peut conduire, comme dans le cas de la morphine par exemple, à des effets secondaires majeurs tels que : tolérance, constipation par action sur les récepteurs opioïdes de l'intestin, dépression respiratoire (overdose chez les héroïnomanes), etc. Dans le cas des inhibiteurs, la réponse est conditionnée par la libération tonique (basale) ou phasique (provoquée par la douleur par exemple) des morphines internes (enképhalines). Elle est donc localisée et recrute des récepteurs à l'endroit désiré. Par ailleurs, la concentration de peptide augmentera par inhibition du catabolisme, mais sans altérer la sécrétion naturelle par la cellule [3]. Les inconvénients peuvent être

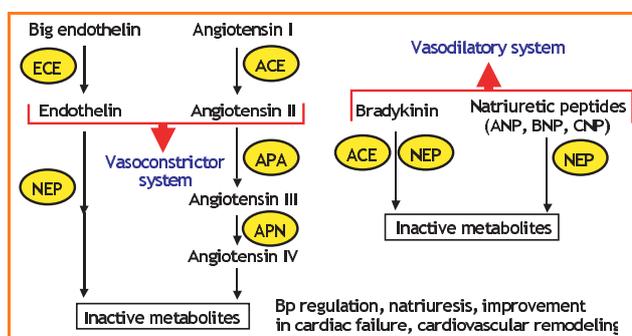


Figure 5 - Les différentes MPZ impliquées dans le contrôle de la pression artérielle. NEP : néprylisine, ACE : « angiotensin-converting enzyme », ECE : « endothelin-converting enzyme ».

une moindre sélectivité et efficacité mais dans ce dernier cas, c'est ce qui est recherché par exemple pour l'analgésie.

La première MPZ « thérapeutique » a été l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui génère dans la circulation le très puissant peptide vasoconstricteur angiotensine II (A<sub>II</sub>) à partir de l'angiotensine I. En 1977, l'inhibition de l'ECA par le captopril a démontré que l'on pouvait diminuer la pression artérielle en diminuant la concentration circulante de A<sub>II</sub> [8]. Cette découverte a joué un rôle très important en pharmacologie.

### Le concept d'inhibiteur mixte

Les figures 4 et 5 montrent clairement qu'il existe plusieurs peptidases qui participent au contrôle d'une voie peptidergique (système d'information utilisant un effecteur peptidique). Dans le cas des enképhalines, ce sont la NEP et l'APN. Le thiorphan (figure 6a), premier inhibiteur synthétique de la NEP développé dans le laboratoire [9], ne produit pas une augmentation suffisante du taux d'enképhalines et donc pas de réponse analgésique suffisante. Il en est de même pour des inhibiteurs sélectifs d'APN. Ceci nous a conduit à proposer le concept d'inhibiteur mixte (une molécule capable d'inhiber deux enzymes) pour le couple NEP/APN [10] que nous avons étendu ensuite à l'inhibition NEP/ACE [11], puis à l'inhibition triple ACE/NEP/ECE [12] (figures 4 et 5). L'inhibition sélective de la NEP par le thiorphan a néanmoins trouvé une application clinique comme puissant antidiarrhéique (du nourrisson à l'adulte) protégeant les enképhalines dans la partie ultérieure de l'intestin. Ces peptides ont un

	animal models	opiates	NSAIDs	dual inhibitors
<b>severe</b>	tail flick hot plate electric stimulation	++	0	+
<b>inflammatory</b>	formalin arthritic rats carragenin	++	±	++
<b>neuropathic</b>	sciatic nerve compression sciatic nerve ligature diabetic rats	±	0	+
<b>visceral</b>	writhing	++	+	++

effet sélectif de réduction des transferts d'eau et d'ions au travers de la muqueuse intestinale par interaction primaire avec les récepteurs opioïdes delta. Le Tiorfan® ne ralentit donc pas le transit intestinal comme le font les agonistes mu (loperamide par exemple) dont l'usage comporte un risque de retenue fécale avec augmentation des effets délétères des entérotoxines, sources de décès fréquents chez l'enfant dans les pays en voie de développement.

C'est néanmoins l'effet analgésique qui a été recherché en priorité grâce aux inhibiteurs mixtes (figure 6a). Il existe en effet un besoin impérieux de substances actives sur les douleurs difficilement prises en charge (post-opératoires, ostéoarticulaires, neurogéniques, douleurs de l'enfant, du patient âgé, etc.). La protection des enképhalines endogènes remplit cette fonction (figure 6b).

Plusieurs types de molécules existent désormais et leur action est fonction de leur biodisponibilité. Il faut rappeler que la douleur est contrôlée par les enképhalines endogènes à trois niveaux périphériques : au niveau des nocicepteurs qui reçoivent l'influx douloureux au niveau de la peau, des organes, etc. et où se trouvent des récepteurs (y compris opioïdes), lieu d'action du kétolorphan ; au niveau spinal (site d'action des inhibiteurs aminophosphiniques), et enfin central pour les disulfides (figure 6a). Parmi ces derniers, certains étant actifs par voie orale agissent aux trois niveaux. Les analgésies obtenues comblent le fossé séparant les antalgiques (aspirine, anti-inflammatoire non stéroïdien...) et les analgésiques opioïdes (tableau I). Ils représentent une percée importante et attendue dans le domaine du traitement de la douleur (revue dans [13]). Deux sont en essais précliniques.

### Dosages optimisés et sondes radioactives pour visualisation de la distribution des MPZ

Il s'agit d'outils essentiels pour étudier le rôle physiologique des peptidases dans les différents tissus et pour faciliter le développement d'inhibiteurs par les méthodes de tri rapide (bibliothèque, chimie combinatoire).

La figure 7 montre la structure et les affinités des inhibiteurs radioactifs sélectifs développés pour les NEP, APN et APA, et la bonne cohérence dans la distribution dans le cerveau de rat des deux enzymes d'inactivation des enképhalines et des récepteurs  $\mu$  et  $\delta$  sur lesquels se lient ces peptides endogènes. Pour ce qui est des dosages enzymatiques, il est crucial de posséder une méthode simple, rapide, sensible et sélective pour un tri rapide. Plusieurs dosages désormais commercialisés ont été mis au point.

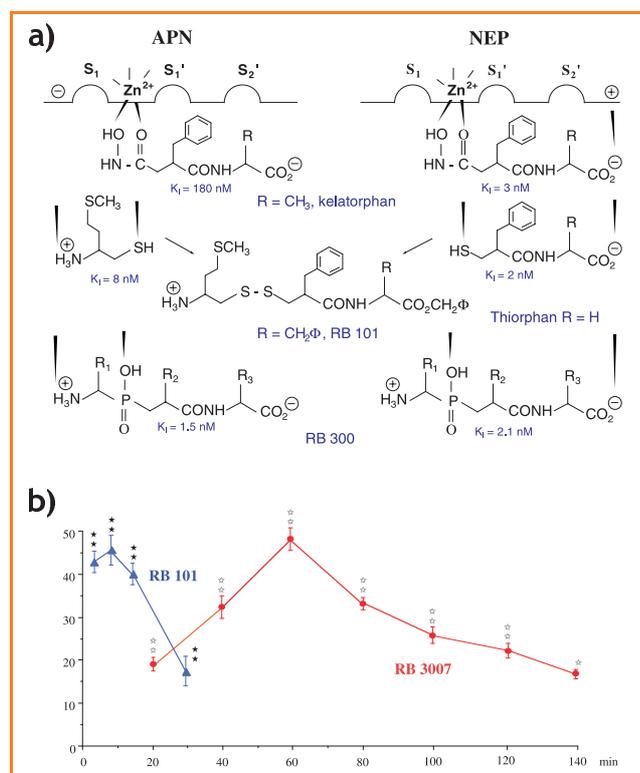


Figure 6 - (a) Structures des différents types d'inhibiteurs mixtes d'APN et NEP et mode de reconnaissance des enzymes ; (b) Test de la plaque chaude chez la souris (analgésie 25 mg/kg, i.v.) (on mesure le temps mis par l'animal à sauter pour échapper à la douleur ; l'appareil s'arrête automatiquement pour ne pas blesser l'animal).

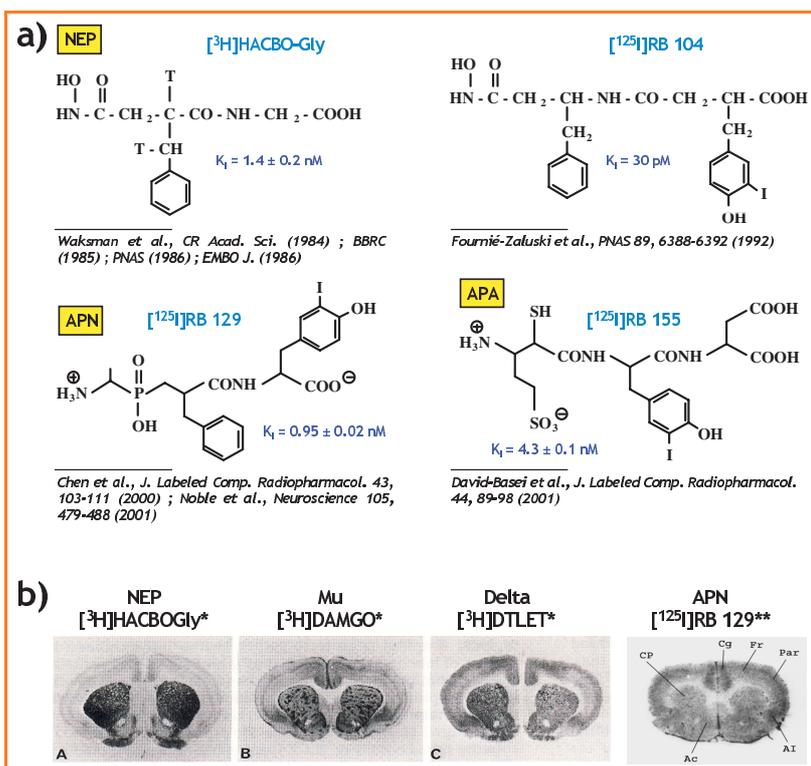


Figure 7.

Le plus intéressant concerne la toxine botulique BoNT dont l'extrême toxicité est due à son activité de MPZ capable de cliver un élément essentiel (synaptobrevine, Sb) de la libération d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire, entraînant ainsi une paralysie très grave (revue dans [14]). Il n'existe pas de traitement spécifique et la BoNT fait partie des substances utilisées dans le bioterrorisme au même titre que l'anthrax. L'idée a été d'utiliser le plus petit fragment de Sb hydrolysable par la BoNT et d'encadrer le site de clivage par un fluorophore très puissant, la pyrénylaniline (Pya) et un reste p.NO<sub>2</sub>-Phe capable d'éteindre quasi totalement cette fluorescence à cause de la proximité de Pya (figure 8). La BoNT hydrolyse le Sb et « libère » une intense fluorescence permettant la détection de la présence de la toxine à des concentrations 10 000 fois inférieures à la dose létale chez l'Homme [15]. C'est actuellement la méthode la plus efficace

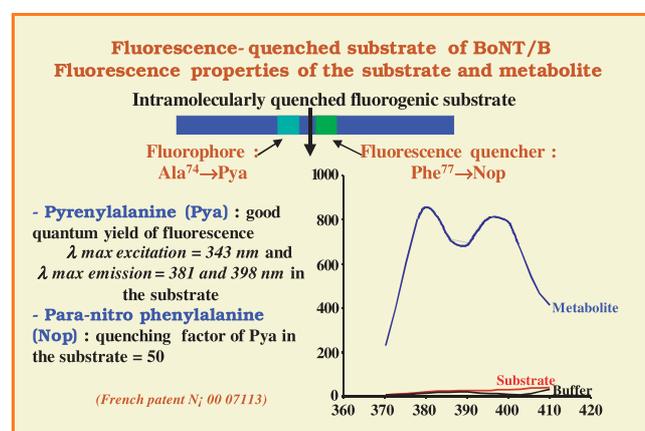


Figure 8 - Méthode de détection très sensible et rapide de la toxine botulique B.

en cas de bioterrorisme. Elle est évidemment utilisable pour la mise au point d'inhibiteurs de l'activité MPZ de BoNT (vide infra).

## Traitement de l'hypertension et de l'insuffisance cardiaque par les inhibiteurs des vasopeptidases (ACE, ECE, NEP, APA)

Le contrôle de la pression artérielle est assuré entre autres par des peptides physiologiquement antagonistes. Ainsi, l'A<sub>II</sub> et l'endothéline sont de puissants vasoconstricteurs formés par action de métallopeptidases spécifiques, l'ACE et l'ECE (figure 5). Inversement, il existe un contre-système vasodilatateur et diurétique exercé par la bradykinine (BK) et le peptide natriurétique atrial (ANP) rapidement inactivé par l'ACE et la NEP.

On peut donc modifier la pression artérielle en bloquant tout ou partie du système vasopresseur et en favorisant la durée de vie des peptides vasodilatateurs. C'est dans cet esprit que le concept d'inhibiteurs mixtes a été étendu au couple ACE/NEP [11] puis développé le premier inhibiteur triple : ACE/NEP/ECE [16] (figure 9).

Des molécules telles que le SR 21402, développé avec Servier, et l'Omapatrilat de BMS ont donné des réponses extrêmement prometteuses sur le problème majeur que représente l'insuffisance cardiaque et ce tant chez l'animal que chez l'Homme. Cependant, des essais à grande échelle avec l'Omapatrilat ont montré l'apparition de réactions d'obstruction trachéale probablement dues à une protection trop efficace de la BK. Ceci a entraîné l'interruption des essais cliniques des deux molécules (figure 9).

Il est trop tôt pour dire ce qu'il adviendra des inhibiteurs triples qui pourraient s'avérer moins délétères grâce à l'absence de vasoconstriction résiduelle due à l'endothéline. Le rôle du système rénine/angiotensine cérébral demeure mystérieux. Très récemment, nous avons montré, grâce à des inhibiteurs sélectifs de l'APN, que le contrôle central de la pression artérielle impliquait non pas l'A<sub>II</sub> mais l'A<sub>III</sub> [17]

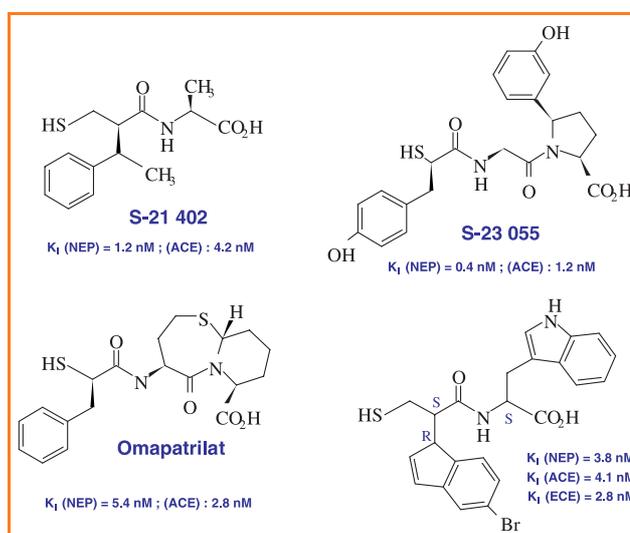


Figure 9 - Structure d'inhibiteurs mixtes de NEP et d'ACE.

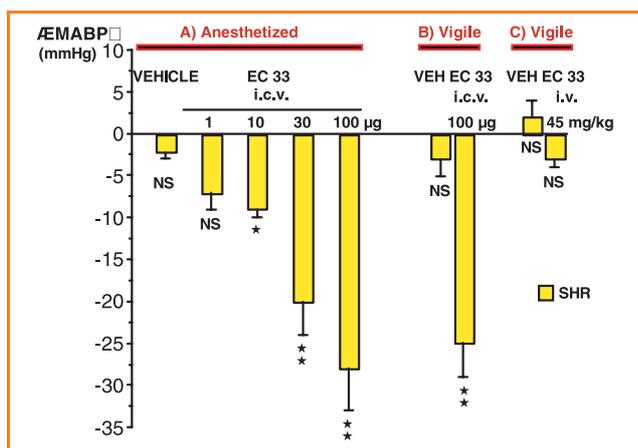


Figure 10 - Effet hypertenseur de l'EC 33 résultant de son action inhibitrice de l'aminopeptidase A.

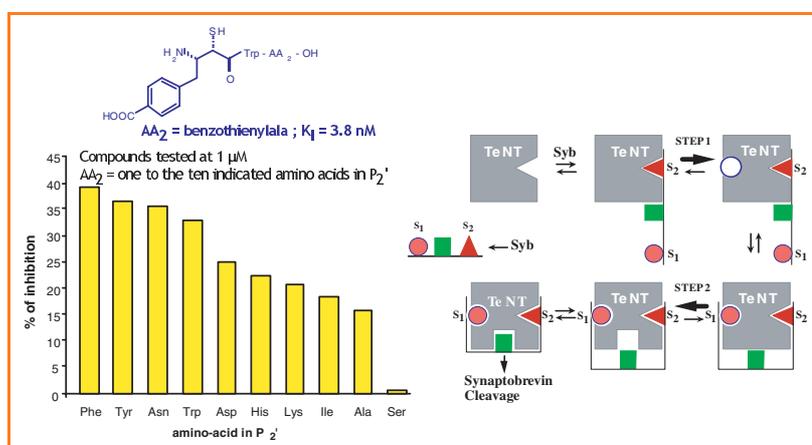


Figure 11 - (a) librairie d'inhibiteurs ; (b) mécanisme coopératif d'hydrolyse par la toxine tétanique.

(figure 10). Les résultats obtenus (coll. Inserm/Collège de France, Lab. Glaxo, France) sur divers types d'hypertension, y compris après administration orale, sont intéressants. A la suite de l'échec des inhibiteurs mixtes NEP/ACE, ils représentent un nouvel espoir dans les traitements de l'insuffisance cardiaque.

### Détection et inhibition des neurotoxines tétanique et botulique

Le mécanisme d'action de ces neurotoxines explicité précédemment est dû à une activité MPZ. Des études de cinétique enzymatique à l'aide de fragments de Sb ont permis de montrer que la toxine tétanique (TeTx) clivait la Sb selon un mécanisme de coopération positive par étapes successives d'occupation de deux exosites présents sur la protéine [18] (figure 11). Ceci gêne la mise au point d'inhibiteurs compétitifs mais un bloquant à  $10^{-7}$  a tout de même été mis au point (revue dans [14]).

Dans le cas de la BoNT, l'inhibition est directe ; et en utilisant des librairies d'inhibiteurs, nous avons mis au point le premier inhibiteur nanomolaire de cette enzyme (figure 11).

Les expériences sur cellules montrent que ces molécules ont au minimum une action de protection de l'infection [19].

### Conclusion

Les pays où la recherche est la plus florissante (États-Unis, Suède, Japon, Grande-Bretagne...) favorisent la chimie à la frontière de la biochimie. Je crains que ce ne soit pas le cas en France où les enseignements et la recherche en chimie organique qui faisaient la spécificité des facultés de pharmacie sont remis en cause. Quelle erreur ce serait ! Les connaissances fondamentales attendues de la protéomique ne se feront pas sans l'apport des techniques chimiques (caractérisation de familles des protéines, cinétique des assemblages, trafic intra- et extracellulaire, etc.). Que dire de la thérapeutique sinon que plus de 40 % des médicaments innovants sont issus de recherches académiques. L'exigence d'ambition et de réussite est une contrainte dans ces domaines frontières souvent mal perçus par les organismes de recherche qui doivent impérativement s'associer des évaluateurs compétents. La réputation scientifique d'un pays et son indépendance économique sont étroitement liées à ces disciplines d'avenir. Pour les jeunes, elles sont extrêmement formatrices par l'étendue de connaissances qu'elles exigent et également source de joie intense. Qu'y a-t'il de plus ludique que d'explicitier un mécanisme biologique resté obscur ou d'apporter une lueur d'espoir dans le traitement d'une affection majeure ?

### Références

- [1] Matthews B.W., *Acc. Chem. Res.*, **1988**, *21*, p. 333.
- [2] Devault A., Lazure C., Nault C., Le Moulal H., Seidah N.G., Chretien M., Kann P., Powell J., Mallet J., Beaumont A., Roques B.P., Crine P., Boileau C., *Embo J.*, **1987**, *6*, p. 1317.
- [3] Roques B.P., Noble F., Dauge V., Fournié-Zaluski M.C., Beaumont A., *Pharmacol. Rev.*, **1993**, *45*, p. 87.
- [4] Tiraboschi G., Jullian N., Théry V., Antonczak S., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P., *Prot. Engineering*, **1999**, *12*, p. 141.
- [5] Marie-Claire C., Tiraboschi G., Ruffet E., Inguibert N., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P., *Proteins: Struct. Funct. Gen.*, **2000**, *39*, p. 365.
- [6] Oeffner C., d'Arcy A., Henning M., Winkler F.K., Dale G.E., *J. Mol. Biol.*, **2000**, *296*, p. 341.
- [7] David L., Bischoff L., Meudal H., Mothé A., Demota N., Danascimento S., Llorens-Cortes C., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P., *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, p. 5197.
- [8] Ondetti M.A., Rubin B., Cushman D.W., *Science*, **1977**, *196*, p. 441.
- [9] Roques B.P., Fournié-Zaluski M.C., Soroca E., Lecomte J.M., Malfroy B., Llorens C., Schwartz J.C., *Nature*, **1980**, *288*, p. 286.
- [10] Fournié-Zaluski M.C., Chaillet P., Bouboutou R., Coulaud A., Chérot Waksman G., Costentin J., Roques B.P., *Eur. J. Pharmacol.*, **1984**, *102*, p. 525.
- [11] Roques B.P., Beaumont A., *Trends Pharmacol. Sci.*, **1990**, *11*, p. 245.
- [12] Roques B.P., *Pathol. Biol.*, **1998**, *46*, p. 191.
- [13] Roques B.P., *Trends Pharmacol. Sci.*, **2000**, *21*, p. 475.
- [14] Roques B.P., Anne C., Turcaud S., Fournié-Zaluski M.C., *Biol. Cell.*, **2000**, *92*, p. 445.
- [15] Anne C., Cornille F., Lenoir C., Roques B.P., *Anal. Biochem.*, **2001**, *291*, p. 253.
- [16] Inguibert N., Poras H., Teffo F., Beslot F., Selkti M., Tomas A., Scalbert E., Bennejean T., Renard P., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, p. 2001.
- [17] Réaux A., Fournié-Zaluski M.C., David C., Zini S., Roques B.P., Corvol P., Llorens-Cortes C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, p. 12028.
- [18] Cornille F., Martin L., Lenoir C., Cussac D., Roques B.P., Fournié-Zaluski M.C., *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, p. 3459.
- [19] Anne C. et al, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, p. 4648.



**Bernard P. Roques**

est professeur au Laboratoire de pharmacochimie moléculaire et structurale Inserm/CNRS à la Faculté de Pharmacie de Paris\* et membre de l'Institut.

\* Laboratoire de pharmacochimie moléculaire et structurale, Inserm/CNRS, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06.  
Tél. : 01 43 25 50 45. Fax : 01 43 26 69 18.  
Courriel : roques@pharmacie.univ-paris5.fr