



RONÉOS DFGSP2 2020 - 2021

UE PL2.11 : CTH 3-4

Date : 11/09/20

Plage horaire : 8h25-10h25

Enseignant : BESTEL Isabelle

N°ISBN : 978-2-37366-082-1

Ronéistes

CHARRIER Karl – karlcharrier42@gmail.com

GARNAUD Lola – garnaud.lola@orange.fr

Introduction à la chimie thérapeutique 2

Plan du cours :

III – Cibles de médicaments

D. Protéines

IV – Cas des enzymes

V – Cas des récepteurs

VI – Drug Design

A. Découverte de principes actifs

- a. Héritage du passé
- b. Découverte fortuite
- c. Criblage de substances naturelles
- d. Conception rationnelle
- e. Criblage à haut débit

III – Cible de médicaments

D. Protéines

Les protéines sont la plus grande famille de molécules à intérêt biologique.

Elles présentent plusieurs structures :

- **Une structure primaire** : qui correspond à l'enchaînement d'acides aminés.
- **Une structure secondaire** : qui correspond aux feuillets bêta et aux hélices alpha avec mise en place de liaisons hydrogènes.
- **Une structure tertiaire** : qui correspond à l'organisation tridimensionnelle des structures secondaires.
- **La structure quaternaire** : qui correspond à l'assemblage de plusieurs structures tertiaires.

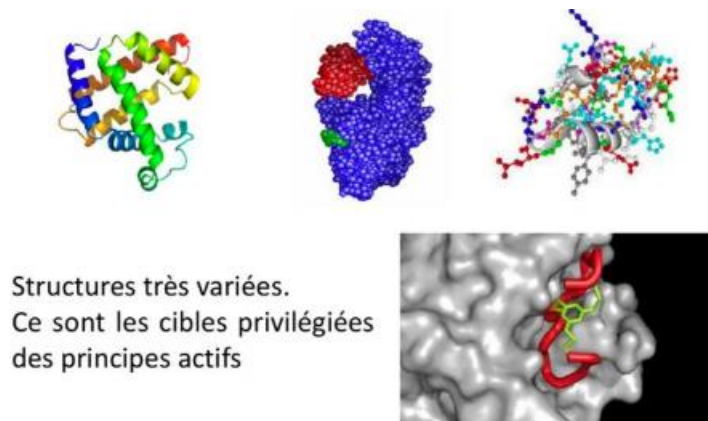
Les structures sont très variées, cela représente la **majorité** des cibles pharmacologiques.

On peut modéliser différentes structures sur ordinateur, de manière à voir les chaînes latérales, le site d'interaction, ...

Il y a deux grandes sous familles de protéines :

- Les enzymes en solution
- Les récepteurs membranaires (principalement entre les lipides des membranes)

Les enzymes sont plus facilement visibles, les récepteurs moins, à cause de leur encombrement par les lipides.



La modélisation moléculaire permet d'avoir une meilleure visualisation.

L'image de gauche est la plus simple, on voit uniquement les feuillets/hélices. Sur la deuxième photo on voit la surface protéique, donc son volume. La plus complexe reste la troisième qui montre la formation protéique et les chaînes latérales.

En dessous une image qui décrit un site actif (très important).

Les protéines réalisent **différentes interactions** : liaisons hydrogènes, Van der Waals, ioniques (dus aux charges des a.a), le pi-stacking (a.a aromatiques) et les liaisons hydrophobes.

IV – Cas des enzymes

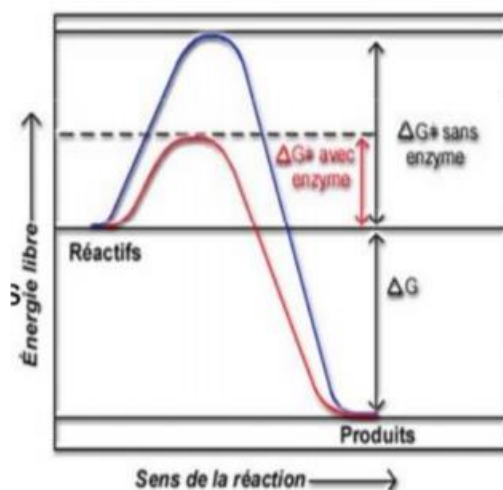
Les enzymes que nous allons voir sont données à titre d'exemple pour comprendre le cours.

Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques, en conditions « douces », très lentes. Dans le corps humain, grâce à des catalyseurs naturels appelés enzymes, la vitesse de réaction est grandement augmentée, ce qui permet de ne pas changer la température corporelle et d'abaisser l'énergie d'activation (qui devient stable par la suite grâce à cet abaissement).

Plus l'énergie augmente, moins la réaction sera stable et inversement. En général le niveau énergétique du produit obtenu est **inférieur** à celui des réactifs de départ.

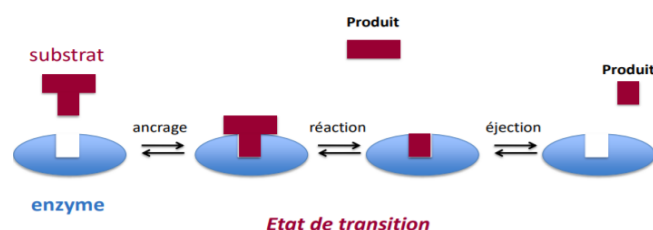
Important : L'équilibre n'est pas changé !!!

Important : La notion d'état de transition est fondamentale !!



La réaction enzyme/substrat :

Le substrat s'ancre sur l'enzyme, ce qui provoque **une réaction chimique**, qui ensuite viendra éjecter le produit final. L'enzyme est également régénérée et elle peut alors recommencer son action.



L'élément fondamental est **l'état de transition**, il est instable et permet d'aboutir au produit.

Pharmacologiquement, on veut mimer cet état pour créer des inhibiteurs enzymatiques.

Plusieurs propriétés qui font des enzymes des molécules très importantes :

- Elles offrent une surface ou environnement propice à la réaction
- Elles rapprochent les réactifs
- Elles vont repositionner les autres molécules, de quoi atteindre la **CONFORMATION** exigée par l'état de transition
- Elles affaiblissent les liaisons à rompre
- Elles peuvent intervenir à part entière dans le mécanisme du processus réactionnel

Exemple : la protéase du VIH

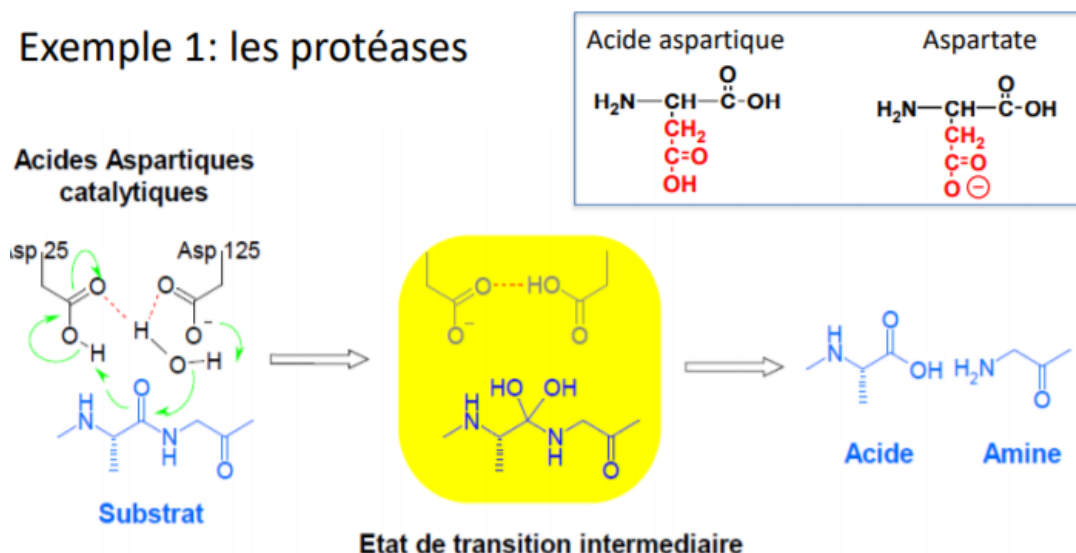
Dès les années 80 la protéase du VIH est étudiée. C'est une cible pharmacologique très importante. Elle coupe les protéines à des endroits bien précis : les **liaisons peptidiques**.

Elle est organisée en **homodimère**, donc deux sous unités identiques. Ce sont des feuillets bêta qui les relient entre elles.

C'est une protéase à acide aspartique, c'est-à-dire qu'au centre de l'enzyme se trouve un acide aspartique qui présente un acide carboxylique sur sa chaîne latérale.

Elle va agir sur les acides aspartiques, notamment ASP 25 et ASP 125. L'un sous forme aspartique et l'autre sous forme aspartate (COO⁻). Le plus souvent il y aura intervention d'une molécule d'eau pour échanger les protons lors de la liaison avec le substrat.

Exemple 1: les protéases



Fonctionnement :

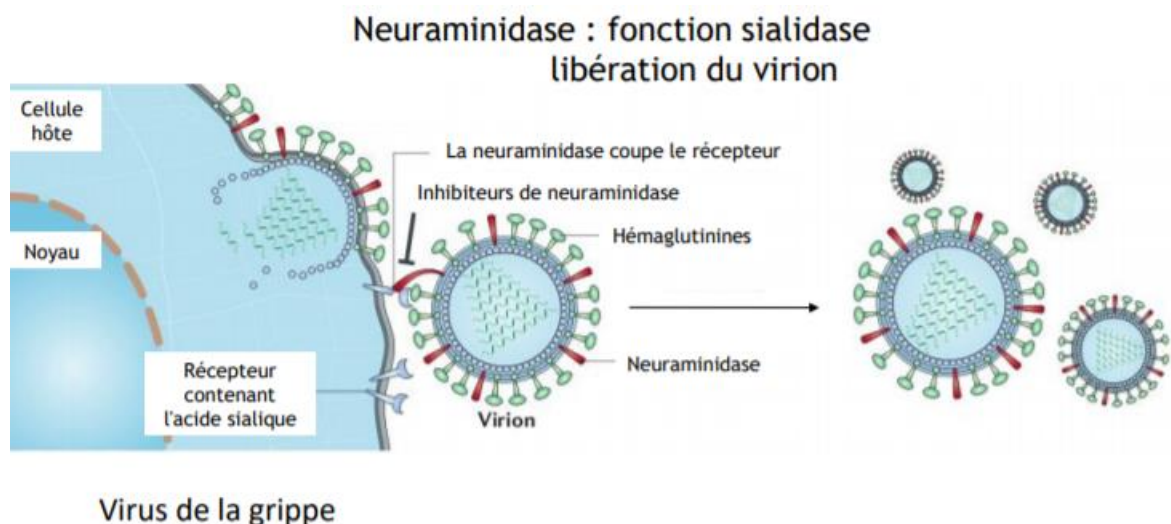
Le substrat se fait couper sur sa liaison amide (= peptidique) par la protéase, H₂O intervient pour inverser la forme aspartique et aspartate au sein des deux acides aminés, c'est un échange. L'oxygène de l'eau attaque le carbonyle pour récupérer le H⁺, ce qui provoque un **état de transition 'diol'** qui, étant instable, donnera à **l'état final : un acide et une amine**.

Précision : En modélisation, les atomes d'azote sont en bleu et l'oxygène en rouge, il faut les connaître.

Chaque enzyme reconnaît précisément la séquence peptidique qu'elle doit couper.
La protéase du VIH coupe précisément à l'intersection d'une phénylalanine et d'une proline.
On peut synthétiser un inhibiteur de protéase, le but sera de reproduire l'état de transition de la molécule.

Synthèse thérapeutique : C'est un leurre qui a pour but de remplacer la liaison peptidique amide PHE-PRO (qui contient un groupement carbonyle) par une liaison hydroxy-éthylamine (qui contient un groupement alcool). La protéase va reconnaître la liaison sans agir dessus, car elle ressemble à la liaison peptidique, mais est différente. On a enlevé le carbonyle, donc il n'y aura pas d'intervention de l'eau, ni de l'enzyme etc.

Exemple 2 : la neuraminidase du virus de la grippe



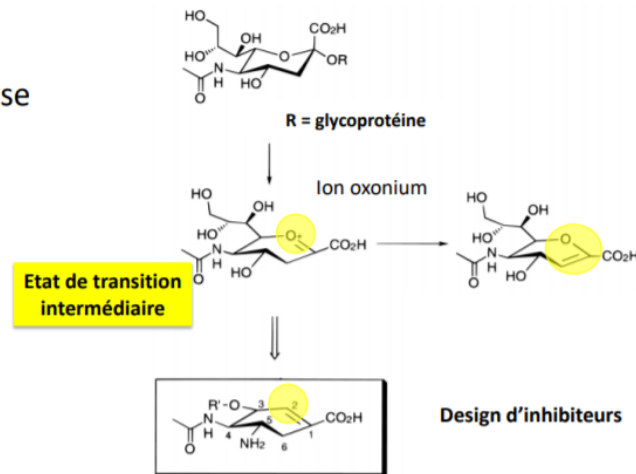
Quelques éléments du virus :

- Les hémagglutinines qui sont spécifiques d'un virus
- La neuraminidase, une enzyme qui va couper le dernier lien du virion pour le laisser s'échapper dans la circulation sanguine. Il est attaché sur un récepteur à acide sialique (= acide N acétylneuraminique)

Le but ici est de produire des inhibiteurs de neuraminidase pour empêcher le virion de sortir et donc le cycle du virus de se finir.

La neuraminidase va couper au niveau d'un sucre (l'acide sialique) sous **forme de chaise** (la conformation la plus stable), cela va libérer le sucre de la protéine.

Exemple 2: neuraminidase



État de transition : Normalement on obtient un ion oxonium (O chargé positivement) qui transforme la forme de chaise en bateau, donc très défavorable pour la molécule.

La pharmacologie étudie alors **deux options** :

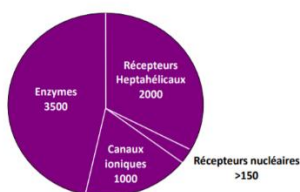
- Déplacer la double liaison et garder l'oxygène
- Laisser la double liaison et supprimer l'oxygène, ce qui sera le choix le plus optimal car le cycle est plus facile à aborder chimiquement.

Encore une fois, on va **mimer l'état de transition**, ce qui est le principal but quand on cherche un inhibiteur enzymatique.

Un médicament nommé Tamiflu, dont le PA est l'oseltamivir, est utilisé en prévention chez les personnes fragiles. Il inhibe la neuraminidase et permet d'augmenter la probabilité de guérison.

V – Cas des récepteurs

Cibles potentielles des principes actifs

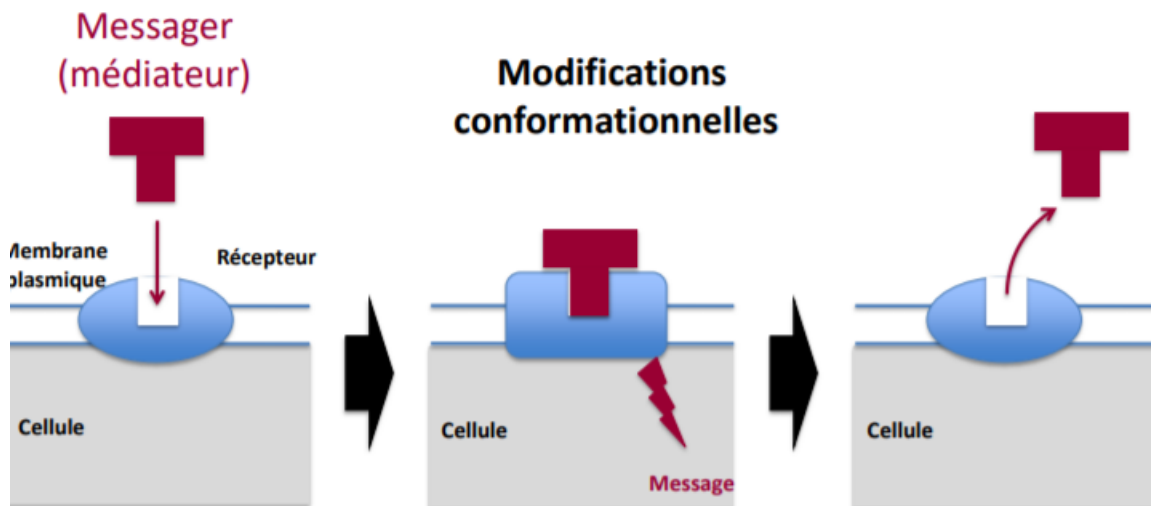


Il y a plusieurs cibles des principes actifs :

- **Enzymes** : cibles les plus importantes car il y en a énormément dans le corps.
- **Récepteurs héptahéliques (= RCPG)** : récepteurs membranaires à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G.

- **Canaux ioniques** : récepteurs membranaires qui une fois ouverts laissent entrer des ions.
- **Récepteurs nucléaires** : peu nombreux.

Propriétés et fonctionnement : Le récepteur possède un site de liaison, à un médiateur (= messenger qui va induire un changement de **conformation** en se fixant et déclencher des phénomènes de signalisation intracellulaire). **Ce n'est pas une réaction chimique**. On peut avoir des liaisons réversibles ou irréversibles.



Rappel : Pour les enzymes, on fera des inhibiteurs, pour les récepteurs on fera surtout des antagonistes/agonistes.

Ces récepteurs sont des macromolécules peptidiques, localisées dans les membranes cellulaires et dont le rôle est de communiquer une information, venant de l'extérieur, à la cellule.

Il y a par exemple les récepteurs canaux, qui permettent le passage des ions.

Les récepteurs enzymatiques comme par exemple les récepteurs tyrosine kinase, qui lorsque le médiateur se fixe, activent une enzyme intracellulaire.

Enfin, il y a les RCPG, où le médiateur se fixe sur le récepteur et active la protéine G.

Agoniste/Antagoniste :

- **Un agoniste** va mimer l'effet du médiateur, et donc activer la réponse cellulaire
- **Un antagoniste neutre** n'a aucun effet mais se fixe à la place du médiateur naturel et empêche l'activation du récepteur
- **Un agoniste inverse** va diminuer l'activité basale (minimale) d'un récepteur

Un récepteur aura parfois une activité basale même sans médiateur, et on pourra soit l'activer soit l'inactiver.

On peut retrouver aussi des agonistes partiels/entiers en fonction de leurs activités voir des agonistes inverses partiels.

Le médiateur interagit dans le site récepteur via des liaisons non covalentes : liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, pi-stacking, effets hydrophobes, interactions de Van der Waals.

Quand on veut produire un agoniste, il y a **plusieurs conditions** :

- Les principes actifs doivent être pourvus des **groupes liants adéquats**
- Ces groupes liants doivent être **positionnés au bon endroit** dans la molécule
- **Le gabarit** (la taille) de la molécule doit être parfaitement adapté au site de fixation

Principe général : plus il y a de groupes liants plus l'interaction sera forte

Plusieurs problèmes se posent :

- Si on retire un des groupes liants, l'interaction va baisser et donc la fixation sera moins forte
- Si la configuration est mauvaise, par exemple un angle à 90° ne convient pas, si on est trop éloigné, si la configuration absolue du carbone est changée, alors on perd encore l'interaction
- Si la molécule est trop grosse, elle ne va pas rentrer, donc toujours pas d'interaction.

Quand on veut produire un antagoniste, il y a plusieurs conditions :

Il faut toujours un changement **conformationnel**. L'antagoniste doit pouvoir se fixer et empêcher le changement de conformation qui est censé activer le récepteur. Un antagoniste par principe sera plus gros et plus lié à la molécule qu'un agoniste.

On va chercher à remplacer le médiateur par une molécule de synthèse 'déficiente', toujours en mimant le médiateur, mais en version antagoniste.

Dans le cas d'un agoniste on va chercher à remplacer un médiateur naturel qui est déficient en le mimant.

Pour les enzymes on crée une molécule, qui prend la place du substrat naturel et donc qui sera un inhibiteur.

VI – Drug Design

Le drug design est une méthode de **conception** de principes actifs qui se base sur la cible biologique (on peut simuler in silico avant d'interagir directement sur l'Homme).

On va s'intéresser à la structure tridimensionnelle des molécules.

A. Découverte de principe actif

XIX^e siècle : période extractive (notamment à partir des plantes)

1803 : isolement de la morphine par Serturner

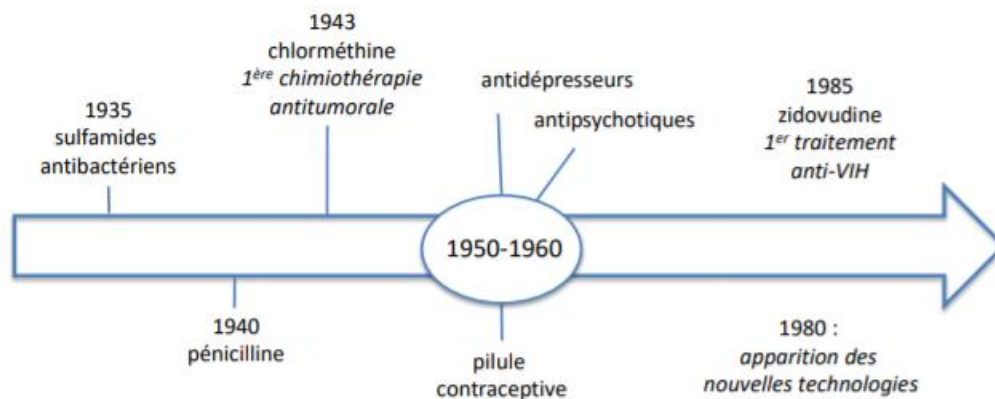
1818 : isolement de la quinine par Pelletier/Caventoux

XX^e siècle : période synthétique

Dans les années 50/60 beaucoup de molécules apparaissent par synthèse chimique organique.

Globalement, les biothérapies sont très courantes aujourd'hui et les médicaments de synthèse chimique sont encore exploités et peu chers (ex de l'hépatite C).

a. Héritage du passé



Les médicaments proviennent essentiellement de pratiques ancestrales chinoises, comme par exemple la Camptothécine en Chine, un anti-tumoral, qui provient de l'arbre de vie, ou encore l'artémisinine un antipaludique très puissant provenant de l'armoise annuelle. (Prix Nobel en 2015)

b. Découverte fortuite = sérendipité

Pénicilline : En 1928 Fleming observe une inhibition de croissance bactérienne de staphylocoques sur une boîte contaminée par un champignon (*Penicillium notatum*). Il a donc déduit que le champignon en question produisait une substance capable de tuer les bactéries. Il faudra un certain temps avant de comprendre le mécanisme.

Disulfirame : A la base créé pour soigner les infections parasitaires, il se trouve qu'au final, c'est un puissant médicament contre la dépendance alcoolique (il bloque la dégradation de l'acétaldéhyde en acide acétique).

Acide valproïque : A la base, on utilise la khelline, très hydrophobe et finalement on se rend compte que le solvant utilisé pour la khelline a des propriétés sur le SNC très intéressantes. Donc on va se mettre à étudier l'acide valproïque qui est un antiépileptique.

Le cisplatine : Des chercheurs ont mis des bactéries en culture, avec du cisplatine. La particularité étant que la molécule libère des dépôts de métaux : le platine. Grâce à cette découverte sont nés des antitumoraux.

c. Criblage de substances naturelles

On ne joue plus sur le hasard mais sur une approche systématique, scientifique.

- Un chercheur ukrainien découvre un champignon, *Streptomyces griseus*. A partir du sol, ce champignon sécrète des aminoglycosides (**antibiotiques**), dont la **Streptomycine** très utilisée aujourd'hui.

- Dans le venin d'une vipère on a découvert une substance aux propriétés potentialisatrices et bradycardisantes, c'est la bradykinine. Ce venin était utilisé par un peuple local qui utilisait

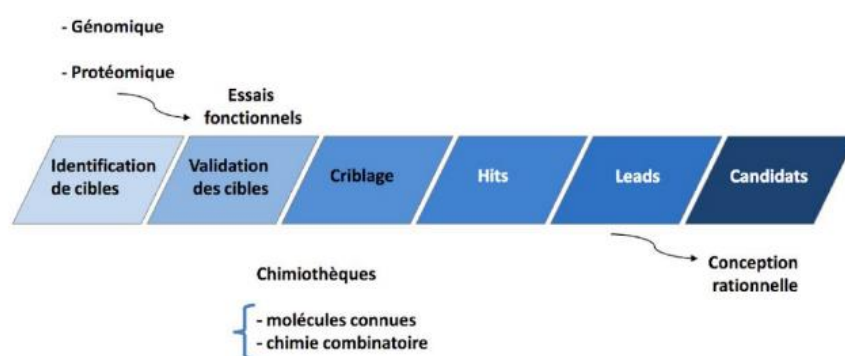
ce venin pour chasser. Son effet hypotenseur est très puissant, elle est aujourd'hui une des découvertes à l'origine **des inhibiteurs de l'enzyme de conversion**.

d. Conception rationnelle

Le but est de faire du biomimétisme à partir de médiateurs naturels. On part de la molécule naturelle puis on réfléchit à comment on peut la modifier pour passer d'un agoniste à un antagoniste.

Par exemple l'histamine : On aurait besoin d'un antagoniste des récepteurs à l'histamine. Les chercheurs vont partir de l'histamine et la modifier, jusqu'à trouver l'antagoniste parfait. Néanmoins, ils se rendent compte qu'il ne faut pas trop toucher le cycle imidazole, mais plutôt la chaîne latérale de l'histamine. De là sont nés les anti-histaminiques.

e. Criblage à haut débit



C'est la technique de référence à l'heure actuelle, la plus moderne. Cela permet de trouver un maximum de substances en un minimum de temps. On va étudier la génomique, protéomique... ce sont là encore des études systématiques.

Une fois les cibles repérées, on va **cribler** des molécules qui peuvent potentiellement agir sur ces cibles. Les chimistes ont depuis un bon moment créé des chimiothèques : un stockage de toutes sortes de molécules créées depuis x années. Si quelqu'un a besoin d'une nouvelle cible, il pourra alors utiliser cette vaste bibliothèque chimique.

Comment fonctionne le criblage ?

Sur plusieurs molécules à tester, on va retenir celle qui va être la plus efficace, on l'appelle un **Hit** (une touche). Ensuite, on va l'optimiser pour obtenir un **Lead** qui finira par atteindre sa forme ultime et deviendra un **candidat médicament** qui aura une bonne pharmacocinétique en plus d'une bonne efficacité.

En 1992, il fallait 20 ans si on voulait tester 1 million de molécules sur une cible et on utilisait des plaques de 96 puits et des échantillons d'environ 200-250 microlitres.

En 1996, on travaillait avec des plaques de 384 puits et des échantillons d'environ 40-50 microlitres. Il fallait 200 semaines pour cribler 1 million de molécules.

A partir des années **2000**, on travaillait avec des plaques de 1536 puits et avec des échantillons d'environ 8 microlitres. Il fallait compter 2 semaines pour cribler 1 million de molécules.

L'avancée technologique a donc permis aux scientifiques d'optimiser le temps et les quantités nécessaires au criblage à haut débit.

On a deux types de criblage : primaire et secondaire.

Le criblage primaire teste la molécule dans une concentration de l'ordre du micromolaire, pour voir si elle a un effet plus ou moins faible. Plus la concentration est faible plus l'affinité est forte (l'optimal étant le nanomolaire).

On va faire des réplica, tester plusieurs fois, puis regarder le % d'activité par rapport aux contrôles positifs/négatifs.

Le criblage secondaire va tester la molécule à plusieurs concentrations encore plus fines, de manière à faire des tests dose/réponse qui renseignent sur :

- l'**IC50 in vitro** : concentration qui inhibe 50 % de l'activité
- l'**EC50 in vivo** : concentration qui induit une baisse de 50% de l'effet

Choix d'un lead et optimisation :

- a une haute affinité pour la cible (inférieure à 1 micromolaire ; très bonne 1 nanomolaire)
- a une bonne disposition pour une modification chimique = présence de groupes modifiables
- doit être libre de toute propriété intellectuelle = molécule qui n'a pas de brevet
- ne doit pas être toxique
- doit avoir une bonne perméabilité pour traverser les membranes des cellules
- ne doit pas être métabolisée trop vite
- doit être soluble dans l'eau
- doit être stable

Sélection d'un candidat :

- L'affinité doit être augmentée 5 fois pour être un bon candidat
- Détermination d'une toxicité et de la biodisponibilité