



**Ambassade de France aux Etats-Unis
Mission pour la Science et la Technologie**

4101 Reservoir Road, NW, Washington DC 20007

Tél. : +1 202 944 6249

Fax : +1 202 944 6219

Mail : publications.mst@ambafrance-us.org

URL : <http://www.consulfrance-sanfrancisco.org>

Domaine	: Coopération de Recherche
Document	: Rapport d'études
Titre	: Les apports de la Biologie Structurale à l'innovation pharmaco-thérapeutique : applications en Pharmaco-Design, un aperçu aux Etats-Unis
Auteur(s)	: Jean-Luc Ferrer, Responsable Groupe Synchrotron, IBS CEA-CNRS-UJF, Grenoble Armand Renucci, Attaché pour la science et la technologie
Date	: Mai 2006
Contact MST	: Peggy Rematier, deputy-sdv.mst@consulfrance-sanfrancisco.org
Numéro	:

Mots-clefs	: Biologie Structurale, Pharmaco-Design, cristallographie, modélisation
Résumé	: Ce document a pour but de : <ul style="list-style-type: none">- Décrire les développements technologiques de la biologie structurale et ses applications en recherche pharmacologique.- Mettre en évidence les potentialités de ce domaine d'activité, en particulier dans le contexte des interactions entre la recherche académique et le secteur industriel.

NB : Toutes nos publications sont disponibles auprès de l'Agence pour la Diffusion de l'Information Technologique (ADIT), 2, rue Brûlée, 67000 Strasbourg (<http://www.adit.fr>).

AMBASSADE DE FRANCE AUX ETATS-UNIS
MISSION POUR LA SCIENCE ET LA TECHNOLOGIE

**Les apports de la Biologie Structurale à
l'innovation pharmaco-thérapeutique**

Applications en « Pharmaco-Design »

Un aperçu aux Etats-Unis

MAI 2006

Jean-Luc FERRER

Responsable Groupe Synchrotron, IBS CEA-CNRS-UJF, Grenoble En mission auprès du Salk
Institute, La Jolla, USA

Armand RENUCCI

Attaché pour la Science et la Technologie

RESUME

Ce document a pour but de:

*-Décrire les développements technologiques de la biologie structurale et ses applications en recherche pharmacologique.
-Mettre en évidence les potentialités de ce domaine d'activité, en particulier dans le contexte des interactions entre la
recherche académique et le secteur industriel.*

J.-L. FERRER : Institut de Biologie Structurale, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble cedex 1, France (ferrer@ibs.fr)

A. RENUCCI : Consulat Général de France, 530 Bush Street, San Francisco, CA 94108, USA

SOMMAIRE

1. « Structure Based Drug Design » : une approche essentielle pour accélérer la caractérisation de nouvelles molécules thérapeutiques. Définitions et enjeux.	<i>p.5</i>
1.1. Les protéines : principales cibles thérapeutiques.	<i>p.4</i>
1.2. La caractérisation de molécules thérapeutiques : les approches traditionnelles.	<i>p.6</i>
1.3. La caractérisation de molécules thérapeutiques à l'ère postgénomique.	<i>p.6</i>
1.4. Les développements de la biologie structurale apportent une nouvelle dimension dans la caractérisation de molécules thérapeutiques.	<i>p.7</i>
2. Les outils du “Structure Based Drug Design”	<i>p.9</i>
2.1. Obtention d'une protéine purifiée.	<i>p.9</i>
2.2. Analyse structurale.	<i>p.9</i>
2.2.1. Analyse structurale par la cristallographie.	<i>p.9</i>
2.2.1.1. Cristallisation des protéines.	<i>p.11</i>
2.2.1.2. Exposition des cristaux à un rayonnement et enregistrement des données.	<i>p.14</i>
2.2.1.2.1. Utilisation des rayons X.	<i>p.14</i>
2.2.1.2.2. Utilisation des Neutrons.	<i>p.17</i>
2.2.2. La Résonance Magnétique Nucléaire ('RMN').	<i>p.18</i>
2.2.3. La spectrométrie de masse.	<i>p.19</i>
2.2.4. La cryomicroscopie électronique.	<i>p.19</i>
2.3. Résolution de la structure et construction d'un modèle, dans le cas des rayons X.	<i>p.20</i>
2.4. Exploitation des modèles pour la conception et/ou l'amélioration d'un ligand : les outils du « docking » structural.	<i>p.21</i>
3. « Structure Based Design » : quelques exemples d'application et perspectives	<i>p.23</i>
3.1. Les réalisations et développements récents dans le domaine.	<i>p.23</i>
3.2. Quelques grandes familles fonctionnelles de protéines bénéficiaires de cette approche.	<i>p.23</i>
3.3. Perspectives.	<i>p.33</i>
4. Les intervenants économiques dans la démarche 'SBDD'.	<i>p.34</i>
4.1. Les laboratoires académiques.	<i>p.34</i>
4.2. Les grands instruments financés par les fonds publics.	<i>p.35</i>
4.3. Les entreprises pharmaceutiques.	<i>p.36</i>
4.4. Les entreprises biotechnologiques.	<i>p.37</i>

5. Conclusion.	<i>p.39</i>
Annexes	<i>p.41</i>
Structure des protéines : caractéristiques et déterminants.	<i>p.41</i>
Liste de sociétés engagées dans une activité liée au « Drug Design ».	<i>p.43</i>
Références	<i>p.44</i>

1. « Structure Based Drug Design » : une approche essentielle pour accélérer la caractérisation de nouvelles molécules thérapeutiques. Définitions et enjeux.

1.1. Les protéines : principales cibles thérapeutiques.

Les protéines sont des macro-molécules extrêmement variées, indispensables au fonctionnement des cellules et à leur intégration physiologique au niveau des tissus et de l'organisme entier. Elles remplissent des rôles essentielles au niveau structural (cytosquelette), métabolique (catalyse de réactions chimiques, enzymes), échange de signaux (hormones), reconnaissance cellulaire (récepteurs de surface), motilité (myofibrilles), défense immunitaire (anticorps) etc...

Chaque protéine, en fonction de sa composition et de l'enchaînement de ses acides aminés, possède une structure tridimensionnelle qui conditionne ses propriétés chimiques et ses fonctions biologiques liées à son environnement (voir Annexe). Cette relation 'structure-fonction' se matérialise par l'existence de domaines fonctionnels au niveau desquels la protéine et ses partenaires (ligand) fonctionnels et/ou structuraux interagissent (petites molécules, protéines, ADN etc...). Parmi les exemples les mieux connus : les sites actifs des enzymes qui assure la catalyse chimique de réactions spécifiques en fixant les substrats adéquats et la transduction de signaux extracellulaires correspondant à de petites molécules qui se fixent sur des récepteurs membranaires ou nucléaires.

La plupart des molécules thérapeutiques (médicaments), sont des composés qui ont pour cible une protéine : ils interagissent avec les domaines fonctionnels impliqués pour bloquer ou modifier une activité physiopathologique de la protéine ou induire une activité à effet thérapeutique. Bien que la plupart des médicaments actuels appartiennent à la classe des petites molécules, les démarches évoquées dans ce rapport peuvent être appliquées à de nouvelles molécules, plus complexes, de type peptides, anticorps dont le nombre ira en croissant.

1.2. La caractérisation de molécules thérapeutiques : les approches traditionnelles.

Elles concernent historiquement des molécules de petite taille et sont basées sur le criblage de bibliothèques chimiques. Plusieurs centaines de milliers de composés chimiques synthétiques sont échantillonnés sur la base d'un effet désiré en s'appuyant sur un test *in vitro* représentatif de l'activité physio(patho)logique ciblée très souvent en utilisant des systèmes cellulaires ("targeted screening"). Ultérieurement, des tests *in vivo* sont faits sur des animaux modèles de la pathologie afin de valider cette première phase. Historiquement, le nombre de composés testés nécessaires pour caractériser une nouvelle entité thérapeutique était de l'ordre de 10 000 composés testés pour un approuvé.

1.3. La caractérisation de molécules thérapeutiques à l'ère postgénomique.

Durant la dernière décennie, la disponibilité des génomes, l'accès à de larges fractions des transcriptomes des différents types cellulaires et les développements de la génétique moléculaire appliquée à de multiples modèles animaux reproduisant ou permettant d'analyser de pathologies humaines ont donné accès à de larges spectres de cibles thérapeutiques. Un grand nombre est disponible sous forme de protéines synthétiques aujourd'hui directement utilisés pour des cribles biochimiques.

Face à la multiplication des cibles et dans le but de réduire les coûts élevés qui étaient liés aux cribles traditionnels, l'industrie a investi dans de multiples technologies afin de réaliser des échantillonnages plus rapides et plus efficaces qui combinent haut débit et automatisation et permettent une meilleure quantification des paramètres gouvernant l'interaction entre la molécule testée et sa cible (*e.g.* récepteur-ligand/enzyme-substrat). L'objectif est de réduire le nombre de composés qui doivent être testés pour identifier un composé actif, aujourd'hui 3000 à 5000 pour une molécule approuvée. Ce nombre demeure relativement grand car il doit être factorisé en termes de coût impliqué dans les différents types d'échantillonnages plus sophistiqués (<http://pro.chemist.online.fr/>).

1.4. Les développements de la biologie structurale apportent une nouvelle dimension dans la caractérisation de molécules thérapeutiques.

L'analyse de séquences est susceptible de fournir des informations pertinentes dans de nombreux problèmes liés aux propriétés et à l'activité des protéines (insertion membranaire, sites d'interaction protéique hautement probables, sites antigéniques potentiels...). Néanmoins l'information structurale est souvent indispensable à la compréhension des mécanismes d'action, des fonctions et des modes d'interactions protéine-ligand (protéine, acide nucléique, petite molécule...), l'étude de la structure tridimensionnelle des protéines ouvre d'autres possibilités telles que l'étude de domaines fonctionnels, la définition des critères de stabilité, la prédiction d'épitopes, la compréhension de mécanismes enzymatiques, etc.

Les développements technologiques de la biologie structurale dont la résolution atteint le niveau atomique permettent d'appréhender la structure d'un complexe protéine-ligand et, au-delà de la forme qui intervient dans la complémentarité des deux molécules (eg. effecteur dans le site actif de l'enzyme), de déterminer en particulier les interactions (entre régions chargées, les liens hydrogène, les interactions hydrophylques, lipophiliques, électrostatiques, dipolaires, etc.) impliquées dans la fixation d'un ligand, l'activité du domaine fonctionnel considéré et les éventuelles modifications structurales induites qui conditionnent ses propriétés fonctionnelles. Ainsi l'accès à la structure du complexe protéine-ligand à l'échelle atomique permet d'opérer une conception raisonnée préalable de nouvelles molécules actives avec les propriétés fonctionnelles/thérapeutiques recherchées. (e.g .capacité à bloquer la réaction spécifique du site actif d'une enzyme).

Cette nouvelle approche, “**Structure Based Drug Design**”, (**SBDD**) pour concevoir des médicaments est un élément clé désormais intégré à la recherche pharmacologique où les réductions de temps et de coût deviennent essentielles non seulement sur plan économique mais également *in fine* pour le bénéfice du malade.

L'objectif de ce rapport est de fournir un aperçu des technologies liées au “Structure Based Drug Design” et de leur application, tant au niveau académique qu'industriel, en particulier aux Etats-Unis, en précisant également les développements attendus à court et plus long terme.

2. Les outils du “Structure Based Drug Design”

La connaissance de la structure des macromolécules cibles à une résolution atomique est essentielle. Une analyse détaillée de leur structure tri-dimensionnelle à haute résolution, révélant le détail intime des interactions à l'échelle atomique est accessible grâce à deux techniques de choix qui à ce jour ont un rôle majeur : la **Cristallographie par rayons X**, la plus utilisée, et la **Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)** (Figure 1 ; partie 2.2.). L'écart entre les deux techniques est essentiellement lié à la limitation en taille des molécules pouvant être étudiées par RMN, technique qui présente cependant l'avantage de ne pas nécessiter de cristallisation.

	<i>X-ray</i>	<i>RMN</i>	<i>Total</i>
<i>Protéines, Peptides et Virus</i>	26172	4021	30193
<i>Protéines/ Acides Nucléiques</i>	1236	117	1353
<i>Acides Nucléiques</i>	843	663	1506
<i>Carbohydrates</i>	11	2	13
<i>Total</i>	28262	4803	33065

Figure 1 : Nombre de structures déposées dans la 'Protein Data Bank' (PDB) résolues par cristallographie aux rayons X et par RMN, Nov. 2005 (<http://www.rcsb.org/pdb/holdings.html>).

La démarche opérationnelle du “**Structure Based Drug Design**” va d'une protéine définie (la cible) jusqu'à la définition d'un 'ligand' possédant des propriétés thérapeutiques potentielles. Les grandes étapes sont :

1. l'obtention en quantité et qualité adéquate de la protéine cible.
2. l'analyse structurale proprement dite :
 - La cristallisation de cette protéine et l'enregistrement de données obtenues après exposition à un rayonnement (*e.g.* rayons X, neutrons).
 - Analyse directe en RMN,
 - Les autres techniques d'analyse.
3. La résolution de la structure et la construction d'un modèle.
4. L'exploitation de ce modèle pour la conception et/ou l'amélioration d'un ligand.

2.1. Obtention d'une protéine purifiée.

Cette première étape très limitante qui reposait sur la purification directe d'une protéine à partir de tissus a énormément progressé dans les années 80-90, avec l'arrivée des outils de la biologie moléculaire. Le clonage d'ADNc (dans le contexte de la caractérisation des transcriptomes) et l'expression de la protéine dans des systèmes variés (*in vitro* ou *in vivo*) donnent accès à une large fraction du protéome, en particulier dans la catégorie des protéines solubles.

Plus récemment, le recours à des robots de clonage et de purification, d'abord dans les entreprises pharmaceutiques, puis petit à petit dans les laboratoires académiques, a permis la mise en oeuvre d'approches systématiques. Il est ainsi possible désormais de mener en parallèle la production d'un grand nombre de constructions, homologues ou mutants, de la protéine cible (Gilbert et Albala, 2002 ; Lesley, 2001 ; Stevens, 2000a). La durée de l'étape de production d'une protéine suffisamment pure s'en trouve grandement réduit, parfois à mois d'une semaine.

2.2. Analyse structurale.

2.2.1. Analyse structurale par la cristallographie.

La cristallographie des protéines est essentiellement basée sur l'utilisation des rayons X. Jusqu'aux années 70, la détermination d'une structure par cette méthodologie était une aventure téméraire, pouvant prendre de 1 à 20 ans selon la difficulté de la protéine, et monopolisant des ressources humaines importantes. Aujourd'hui la cristallographie par rayon X est la technique majoritairement utilisée dans la résolution de structure en vue de développer des molécules actives. Elle compte en effet pour une large fraction de l'ensemble des structures déposées dans les bases de données (« Protein Data Bank », <http://www.rcsb.org/pdb>) qui ont connu ces dernières années une progression quasi exponentielle (Fig. 2). L'augmentation du nombre des cristallographes des macromolécules en est peut être une des raisons, mais cette progression est probablement d'avantage à mettre au compte du développement remarquable, en qualité et en quantité, des outils mis à la disposition de ces cristallographes. L'avènement de la Génomique Structurale (GS), suite naturelle des séquençages systématiques de différents génomes, a été le principal moteur de ces progrès. Même si les projets labellisés GS n'ont pas toujours engendré le nombre de structure espéré, du moins ont-il

dirigé un certain nombre de ressources, humaines et financières, vers l'instrumentation et la méthodologie. Une des conséquences majeures de ces progrès est que l'obtention d'une structure cristallographique est, dans la plus part des cas, devenu possible pour des non-cristallographes.

La technique cristallographique consiste à exposer dans différentes orientations un cristal de la molécule à étudier dans un faisceau, le plus souvent monochromatique. Les clichés de diffractions enregistrés sont ensuite analysés afin de remonter à la structure.

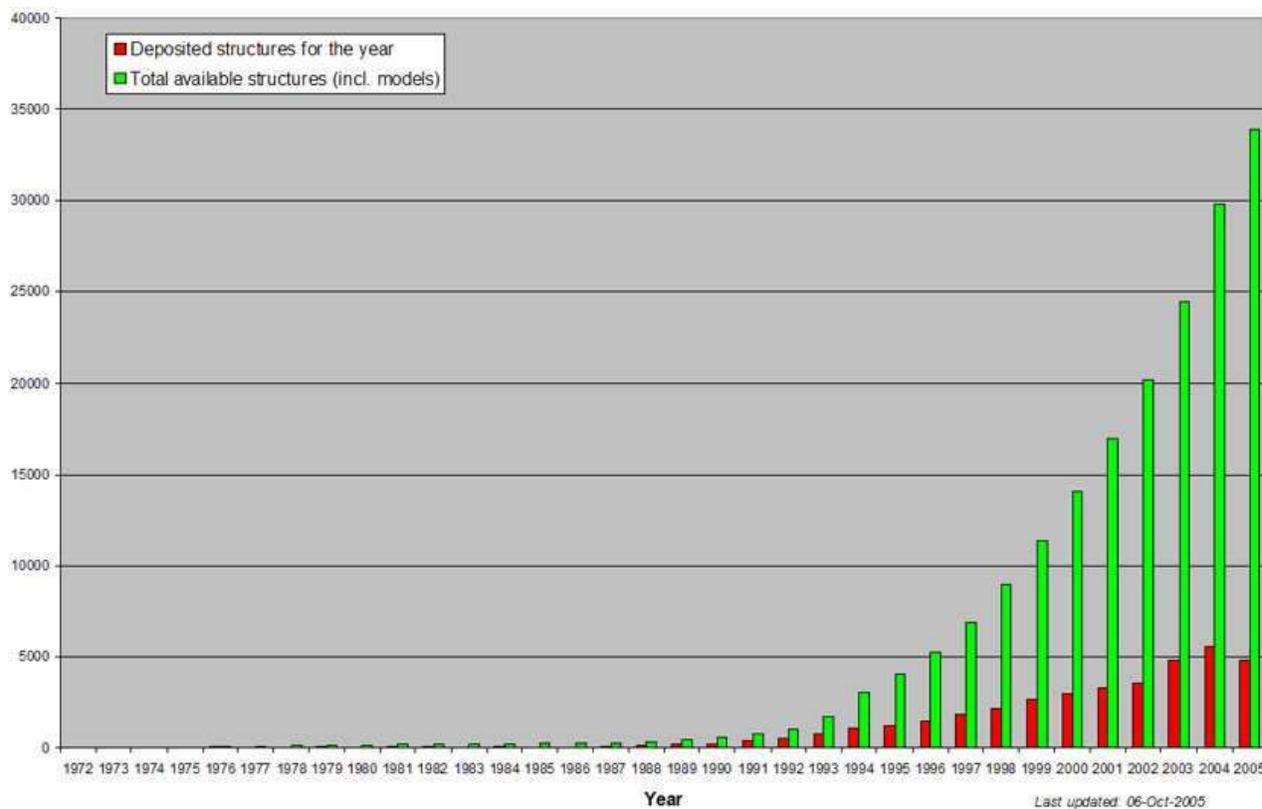


Figure 2: Structures déposées dans la « Protein Data Bank » (<http://www.rcsb.org/pdb/holdings.html>)

2.2.1.1. Cristallisation des protéines.

La cristallisation a toujours été, et reste encore, l'étape limitante de la détermination d'une structure par cristallographie en effet une difficulté majeure se situe au niveau de l'obtention de cristaux de bonne qualité. Il n'existe pas à ce jour de moyen de prédire les conditions qui permettront à une protéine donnée de cristalliser. Sur un plan pratique, la protéine est mélangée avec une solution de cristallisation, dans une goutte de faible volume qui s'équilibre lentement contre une solution plus concentrée.

Deux approches sont pratiquées : (i) des essais sont menés avec une collection restreinte de conditions de cristallisation, afin d'analyser le comportement de la protéine vis à vis de ces conditions et d'en déduire de meilleures conditions. (ii) Une autre approche, qui semble devenir la méthode de choix, consiste à tester massivement une très large collection de conditions (plus d'un millier). On utilise pour cela des robots de cristallisation qui permettent désormais de réaliser rapidement un nombre impressionnant d'essais de cristallisation avec des quantités d'échantillon minimales sur des supports à haute densité, et de façon parfaitement reproductible.

Les premières tentatives maladroites d'automatisation de cette étape remontent aux années 80. Ces robots, peu fiables, ont été remplacés par des machines de nouvelle génération, issus des efforts de la Génomique Structurale notamment (Kuhn et al., 2002) :

- Un des premiers systèmes de nouvelle génération a été le 'T2K' développé par le « Lawrence Berkeley National Laboratory ». Ce système pouvait réaliser jusqu'à 480 essais de cristallisation par heure, avec des volumes de 20–100 nl par goutte (Goodwill et al., 2001 ; Santarsiero et al., 2002 ; Stevens, 2000b).

- Ensuite est venu un système développé par « Hauptman-Woodward Institute » (HWI, Buffalo, NY, USA), utilisé par le projet du Consortium Nord-Est de génomique structurale, financé par le NIH (<http://www.nesg.org>), et par le Consortium de Génomique Structurale des Protozoaires Pathogènes (<http://depts.washington.edu/sgpp>). Le système HWI (<http://www.hwi.buffalo.edu/throughput.html>) utilise des gouttes de 500 nl sur des plaques de cristallisation à 1536 puits (Luft et al., 2001). Durant les premiers 18 mois de fonctionnement, ce système a réalisé plus de 700 000 essais de cristallisation, sur plus de 400 échantillons différents.

- La « Protein Structure Factory » (Berlin) a également développé un système robotisé

totalemment intégré (Mueller et al., 2001). Ce système utilise des plaques à 96 puits, et une technologie de dépôt du type jet-d'encre, projetant des gouttes de 250 nl.

- GNF (San Diego, CA) et Syrrx (San Diego, CA) ont développé Agincourt™, un système de seconde génération basé sur le système T2K. Agincourt™ produit des gouttes assises de 20 nl à 1 l en utilisant la technologie SynQuad™ de Cartesian, et des plaques à 96 puits. Il peut ainsi réaliser jusqu'à 4000 essais par heure (Goodwill et al., 2001). Ce système est utilisé par Syrrx, GNF et le « Joint Center for Structural Genomics » financé par le NIH (<http://www.jcsg.org>). Pendant la première année de fonctionnement, ce système a produit plus de 3 millions d'essais de cristallisation, sur plus de 1000 protéines différentes.

- Le « Center for Biophysical Sciences and Engineering » (CBSE) de l'Université d'Alabama (Birmingham), en collaboration avec ANALIZA (« Precision Dispensing Equipment and Diversified Scientific »), a développé une série d'outils (ScreenTool™, RecipeMaker™, NanoScreen™, VapourPro™) permettant de réaliser des essais de cristallisation en gouttes nanolitre, mais aussi d'affiner les conditions dynamiquement avec des volumes plus importants (www.dsitech.com). Environ 2160 essais peuvent être réalisés en 8 heures, soient 360 conditions pour 6 protéines différentes.

- Enfin, il existe désormais une multitude de systèmes plus petits, disponibles commercialement, et pouvant s'installer sur un coin de paillasse (Mosquito™ de *Molecular Dimensions Ltd*, etc...).

Avec le nombre croissant d'essais de cristallisation rendus possibles par l'utilisation de robot, l'analyse manuelle des résultats de ces essais est rapidement devenu un problème. Il s'en est donc suivi le développement de robot de stockage et de visualisation, souvent couplés à des logiciels d'analyse par reconnaissance de forme :

- La station de visualisation CrystalScore™ développée par Diversified Scientific, Inc. est un système complet avec archivage, visualisation et traitement automatique des clichés.

- La station Crystal Monitor™ développée par Emerald BioStructures, Inc. (Bainbridge Is., WA) est constituée d'une table de translation sous un stéréo-microscope équipé d'une caméra couleur. Ce système peut traiter une plaque de 96 puits en 4 mn (100 plaques en 7 heures).

- Le « Hauptman-Woodward Institute » s'est doté d'un système comprenant une table de translation pouvant accueillir 28 plaques (Luft et al., 2001). Ce système peut traiter deux plaques à 1536 puits par heure (3072 images). Chaque image est traité avec MATLAB en 0.5 s (Jurisica et al.,

2001).

- Des systèmes totalement intégrés ont également été développés, tel le HomeBase™ de Automation Partnership, permettant le stockage et l'analyse de tous les types de plaques au format « Society of Biomolecular Screening microliter plate » (Long, 2001). Un système HomeBase™ est utilisé par le Max Planck Institute dans le cadre de la « Protein Structure Factory ». Il comprend des racks de stockage, un robot de transfert des racks, et un second robot pour la présentation des plaques au convoyeur qui alimente le système de visualisation, le tout dans un environnement contrôlé. Plus de 960 000 essais de cristallisation peuvent être stockés et contrôlés régulièrement par le système implanté au Max Planck Institute (Heinemann, 2001), 80 à 100 plaques de cristallisation pouvant être visualisées en une heure.

- Le système de cristallisation robotisé installé chez Syrrx comprend également une unité de stockage et de visualisation pouvant traiter un million de gouttes par jour. Il utilise pour la visualisation le sous-ensemble OptiMag Veeco-Oasis 1700, comprenant la prise d'image, un système serveur avec base de données SQL et un traitement d'image. La prise des images et leur traitement sont asynchrones, afin de permettre un plus haut débit. Une plaque de 96 puits peut ainsi être traitée en moins de 60 s.

- La société RoboDesign International (Carlsbad, CA), en collaboration avec Structural GenomiX (San Diego, CA) a développé le RoboMicroScope™, un système de prise d'images automatique, et RoboStorage™, un système de stockage. Le premier peut traiter six plaques à la fois, de tous formats. Ce système réalise dans un premier temps une image globale de l'ensemble de la condition de cristallisation, puis dans un second temps, une caméra haute résolution réalise une analyse détaillée de la goutte. Selon la complexité de l'expérience, RoboMicroScope™ peut réaliser l'analyse de 3600 essais de cristallisation par heure. Chaque RoboStorage™ est couplé à deux unités de visualisation, permettant de traiter 1 million d'essais stockés dans 10000 plaques de cristallisation.

- Un autre système, disponible commercialement, est le “Crystal Farm” développé par Discovery Partners International, San Diego (Frankel, 2005). Il s'agit d'un système tout intégré, comprenant une armoire de stockage des plaques de cristallisation thermostaté, d'un robot de manipulation et d'un microscope doté d'un logiciel de reconnaissance.

- Tous les systèmes précédent souffrent d'un manque de fiabilité, lié à la difficulté de visualiser des cristaux plongés dans une liqueur mère d'indice de réfraction très proche. L'utilisation de lumière polarisée apporte une petite amélioration, mais à ce jour encore insuffisante. De plus, cette

analyse ne dispense pas d'un traitement manuel, l'extraction du cristal et sa congélation, ne serait ce que pour déterminer par diffraction X s'il s'agit bien d'un cristal de protéine. Une alternative intéressante est l'analyse des conditions de cristallisation directement par un faisceau X, soit en présentant la plaque de cristallisation dans le faisceau (Jacquamet et al., 2004), soit en procédant aux essais de cristallisation dans un support plus adapté (Yadav et al., 2005 ; <http://www.atcg3d.org/>). Il s'agit probablement là de techniques d'avenir, permettant d'atteindre réellement un très haut débit en s'affranchissant de la dernière étape manuelle du processus.

Ainsi, l'utilisation de systèmes de cristallisation robotisés permet de réduire les erreurs de manipulation, les coûts, et autorise la réalisation de tests plus étendus. Mais aussi, en introduisant la possibilité de travailler sur des volumes plus petits, ces robots ont permis d'accélérer la cristallisation, d'améliorer la qualité des cristaux produits (Santarsiero et al., 2002), et de faciliter leur congélation (Goodwill et al., 2001). Le gain de cette automatisation est donc à la fois quantitatif et qualitatif.

2.2.1.2. Exposition des cristaux à un rayonnement et enregistrement des données.

2.2.1.2.1. Utilisation des rayons X.

Les sources de rayons X de laboratoire ont constamment progressé, en terme de qualité de faisceau et d'intensité. Du tube scellé, on est passé dans les années 90 aux anodes tournantes, puis plus récemment aux sources compactes, micro-foyer et autres. Mais c'est réellement l'utilisation du rayonnement synchrotron qui a révolutionné la cristallographie des protéines. Ce qui n'était au départ qu'un rayonnement parasite des accélérateurs utilisés par les physiciens, s'est avéré exploitable par les cristallographes, en effet le rayonnement synchrotron permet la production d'un rayonnement X intense, stable, de longueur d'onde variable et de grande qualité optique sur lequel s'appuie la très grande majorité des études cristallographiques contemporaines au point que désormais des machines sont construites pour la seule utilisation de ce rayonnement : -d'une part grâce à son intensité, il permet d'obtenir des données exploitables pour des cristaux de macromolécules que des sources classiques ne permettaient pas d'étudier : mailles plus grandes (et donc molécules ou complexes plus grands), cristaux de plus petite dimension voire imparfaits. Cette intensité remarquable a également rendu nécessaires d'autres progrès, tel que la congélation rapide des cristaux (Garman, 1999), et

l'utilisation de robots de transfert d'échantillons (Abola et al., 2000 ; Muchmore et al., 2000 ; Ohana et al., 2004). Ainsi, la qualité des images obtenues et la rapidité d'exécution des clichés ont permis une accélération considérable de la vitesse d'acquisition des données, réduisant celle-ci à quelques heures au lieu de quelques semaines. -d'autre part, et de manière essentielle, la propriété du rayonnement synchrotron d'être accordable en énergie a apporté la solution au problème de l'information de phase. Cette phase, qui n'est pas directement accessible par l'expérience et qui est nécessaire avec la mesure des intensités de diffractions pour obtenir une carte de densité électronique, est obtenue grâce à l'utilisation de la diffusion anormale multi-longueur. Que ce soit en utilisant la sélénométhionine introduite lors de la surexpression de la protéine (Guss et al., 1988 ; Hendrickson et al., 1990), ou des métaux lourds apportés par trempage des cristaux, il est possible ainsi, en utilisant une ou des longueurs d'onde appropriées, d'estimer les phases manquantes.

Pour comprendre ce que représente les synchrotrons pour la communauté des cristallographes des protéines (Fig. 3 et 4), on peut noter que, dans les allées 90, le nombre d'expériences effectuées au LURE s'élevait à plus de 600 par an et le nombre d'utilisateurs à plus de 2000 (Cuvilliez et Trégouët, 2000). Désormais, on trouve les mêmes chiffres pour chaque ligne de lumière, et l'ESRF par exemple compte l'équivalent de huit lignes dédiées à la cristallographie des protéines. La notion de service rendu par les synchrotrons est évidemment aussi présente aux Etats-Unis, avec, par exemple, un ensemble de 4500 utilisateurs sur les 4 synchrotrons du DOE et une influence régionale de chaque machine. Et le nombre de synchrotrons ne cesse de s'accroître, avec des machines nationales (SOLEIL en France, SLS en Suisse, Diamond en Angleterre, etc...) mais aussi de nouveaux projets de machines à l'échelle d'un continent (nouvelle machine remplaçant NSLS à Brookhaven, USA).

Ainsi la résolution des structures des protéines qui pouvait s'effectuer avec des instruments de laboratoires, bascule, dans tous les pays, vers les synchrotrons, ainsi qu'en témoigne le graphique suivant (Fig. 3) réalisé par le laboratoire de l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory) implanté sur le site des synchrotrons du Hasylab de Hambourg.

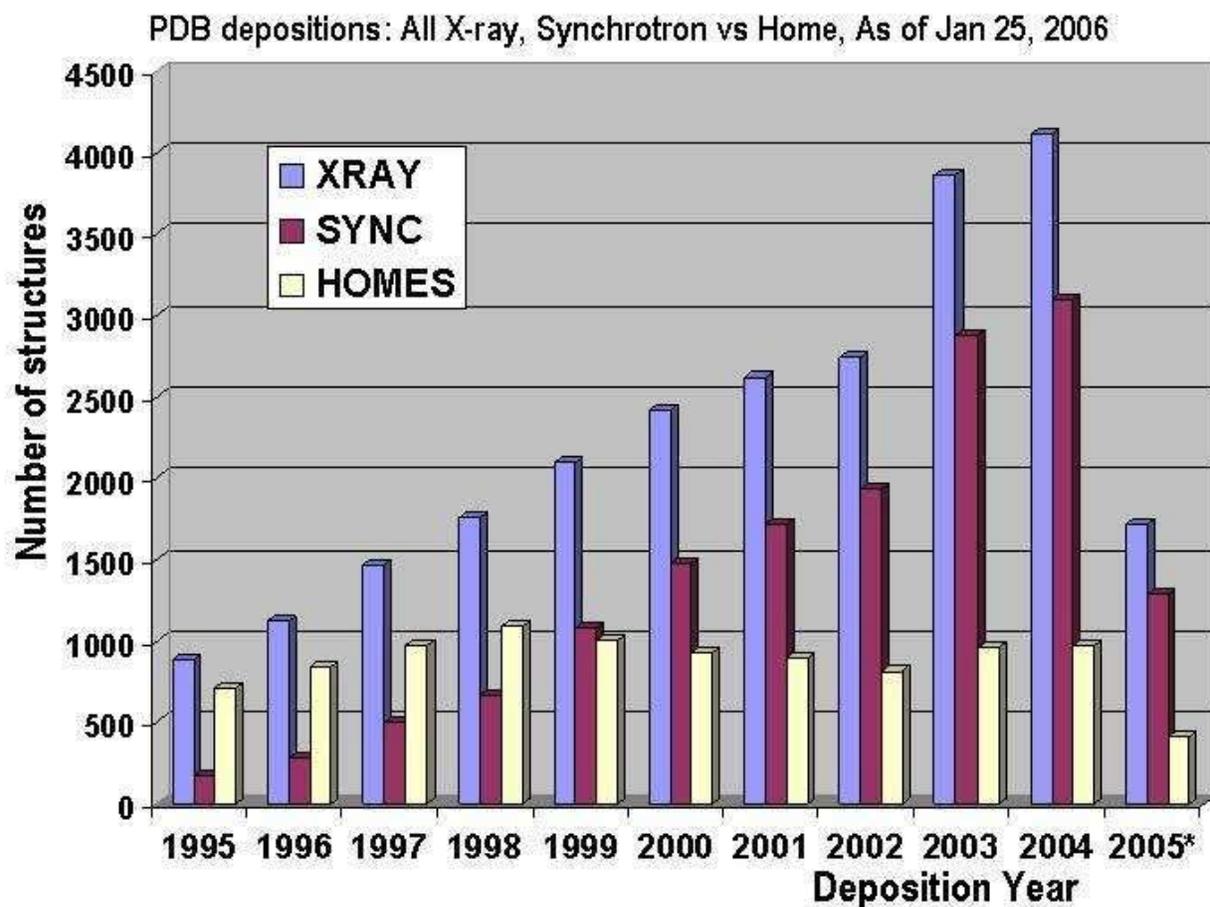


Figure 3 : L'importance croissante du rayonnement synchrotron pour l'élucidation des structures macromoléculaires (<http://asdp.bnl.gov>)

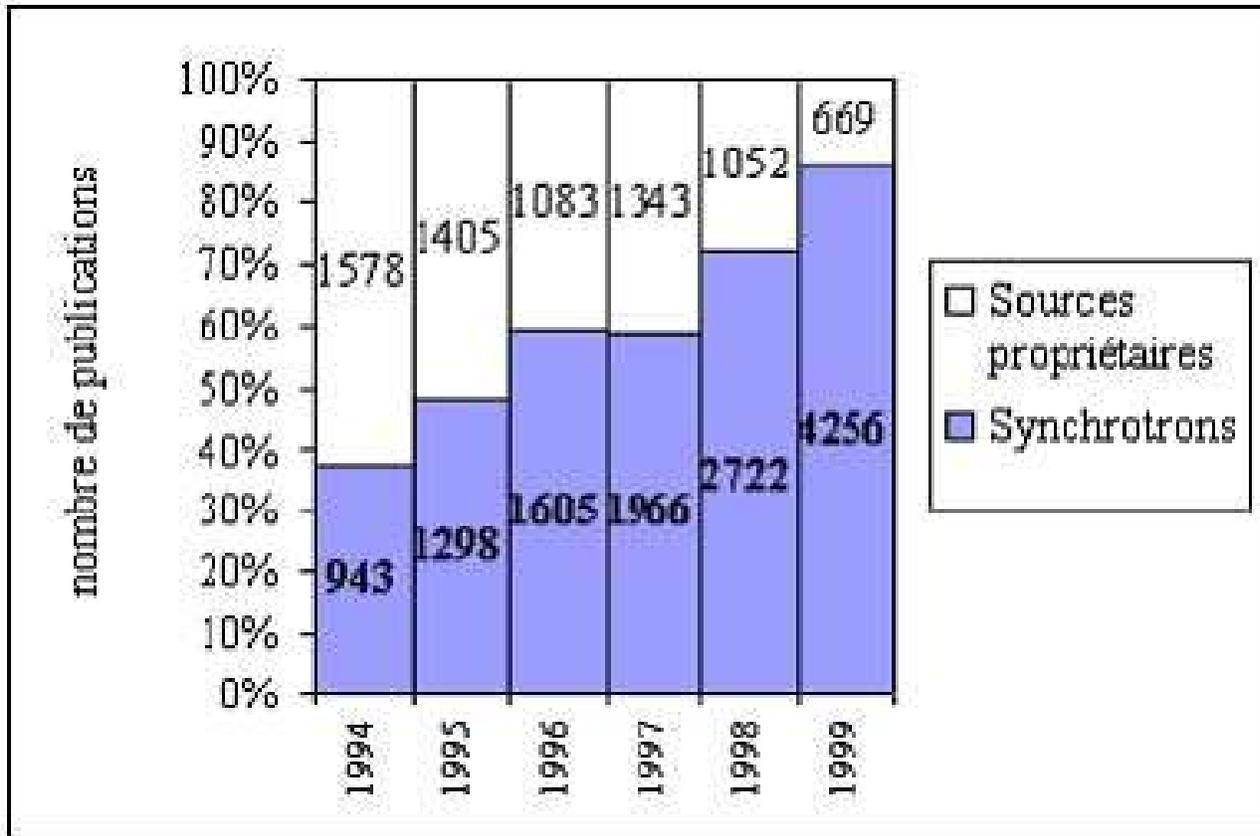


Figure 4 : Comparaison du total mondial de publications de biologie structurale résultant de travaux conduits sur des synchrotrons ou sur des sources propriétaires

2.2.1.2.2. Utilisation des Neutrons.

L'utilisation de neutrons en biologie structurale, dans le cadre d'expériences de cristallographie, est moins spectaculaire que celle des rayons X, les données obtenues ne fournissant pas la même résolution. De plus, ils nécessitent des cristaux de taille importante, souvent impossible à obtenir. Pour toutes ces raisons, la cristallographie neutronique reste marginale, et ne sera pas d'avantage abordée dans ce document. Il faut cependant noter qu'elle permet d'obtenir des informations complémentaires en ce qui concerne la dynamique moléculaire des macromolécules biologiques (échelle de temps allant de la pico-à la nanoseconde). En particulier, des expériences de diffusion inélastique, grâce à des marquages sélectifs au deutérium que les neutrons permettent de distinguer de l'hydrogène, génèrent des informations sur les complexes de grandes tailles ou sur les structures membranaires.

2.2.2. La Résonance Magnétique Nucléaire ('RMN').

La résonance magnétique nucléaire est une technique de spectroscopie appliquée aux noyaux atomiques présentant un spin nucléaire non nul. C'est un phénomène par lequel un noyau de l'atome considéré absorbe les rayonnements électromagnétiques d'une fréquence spécifique en présence d'un fort champ magnétique. Le décalage en fréquence par rapport aux valeurs de référence nous renseigne sur l'environnement de l'atome considéré, permettant ainsi une reconstruction du modèle de proche en proche.

La RMN en phase liquide est la seule méthode amenant à la structure atomique de macromolécules en solution. Elle comporte cependant des contraintes significatives sur la taille des molécules étudiées (30-40 kDa au plus) comme sur leurs propriétés de solubilité. Si un certain nombre de structures connues ont été résolues par RMN, cette technique n'est réellement supérieure à la cristallographie que pour la résolution de structure de petite taille, difficiles à cristalliser. De plus, on a longtemps considéré que les protéines présentant les caractéristiques requises pour une étude par RMN, en terme de solubilité et de stabilité (et donc de qualité des spectres mesurés), étaient en fait celles qui conduiraient à des cristaux exploitables par cristallographie aux rayons X, et permettant de cette façon d'accéder plus rapidement à l'information structurale à l'échelle atome, comparativement à l'analyse par RMN qui peut prendre des mois. Cependant, cette image est en train d'évoluer : des comparaisons menées sur un grand nombre de protéines, dans le cadre du projet « Northeast Structural Genomics Consortium » (NESGC, USA), ont montré qu'une grande complémentarité était possible entre cristallographie et RMN, du moins dans une gamme de taille de protéines limitée (Snyder et al., 2005 ; Yee et al., 2005).

Par ailleurs, la RMN offre des possibilités uniques d'études dynamiques des molécules, des interactions macromolécules-solvant et d'analyse structurale de la formation des complexes transitoires.

La RMN du solide, en particulier par rotation de « l'angle magique » ouvre quant à elle des possibilités intéressantes, mais encore peu exploitées, pour l'étude de macromolécules sous forme de poudre (donc non cristallisable) et pour les protéines membranaires. Ce domaine reste cependant loin d'avoir démontré entièrement son potentiel.

2.2.3. La spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse consiste à séparer les molécules chargées dans un champ magnétique, afin d'en déterminer la masse avec une grande précision.

Cette technique est particulièrement utilisée aujourd'hui pour les analyses de protéomes. Cependant, il ne faut pas négliger les progrès que cet outil, en pleine période de développement, apporte à l'analyse structurale. Des techniques d'échanges isotopiques rendent accessibles à l'analyse des zones de flexibilité induites par la liaison du ligand ou des zones d'interaction entre macromolécules au sein d'un complexe. Couplées à des techniques de réticulation covalente, la spectrométrie de masse permet aussi d'obtenir des données sur la formation de complexes. Elle offre également l'opportunité de caractériser des complexes non covalents (protéine-protéine, protéine-ligand).

2.2.4. La cryomicroscopie électronique.

L'amélioration des sources d'électrons (canons à effet de champs FEG) et des méthodes de traitement informatique de l'image ont complètement modifié l'utilisation de cet outil en biologie structurale.

La cryomicroscopie électronique permet de déterminer la structure de complexes de grande taille avec une résolution nettement inférieure à 10 Å. En intégrant des structures d'éléments d'un complexe déterminées par cryomicroscopie électronique avec celles obtenues par cristallographie, il est désormais possible d'obtenir un modèle de la structure globale de complexes de très grande taille. La cryomicroscopie permet également d'obtenir une enveloppe de la protéine utilisable en cristallographie pour déterminer des premières phases à basse résolution, que l'on peut ensuite étendre à plus haute résolution.

Une autre technique en développement concerne l'analyse de cristaux bidimensionnels utilisant la microscopie électronique et/ou la diffraction électronique. Ils permettent d'atteindre des résolutions de l'ordre de 3 Å. Actuellement, des techniques de cristallisation 2D sur mono ou bicouches lipidiques sont en cours de développement (lipides modifiés pour fixer spécifiquement certaines molécules, par exemple). Cependant cette qualité, en terme de résolution, se limite souvent à une seule direction.

2.3. La résolution de la structure et construction d'un modèle, dans le cas des rayons X.

L'étape suivante, la résolution de la structure et la construction d'un modèle à partir des données expérimentales, repose sur les développements de la bioinformatique. Là aussi, les progrès sont remarquables. Dans les années 80, il s'agissait d'un processus long et fastidieux, faisant appel à des ordinateurs puissants (pour l'époque), mais aussi à des moyens plus « artistiques », telles que la construction de modèles en bois. Les programmes mis en oeuvre sur les ordinateurs étaient d'un abord difficile, avec des fichiers de paramétrages touffus, faisant appel à des connaissances pointues. Une première révolution a été la généralisation de systèmes graphiques stéréo, souvent issu des applications militaires. En parallèle, l'informatique a connu de larges progrès concrétisés aujourd'hui par des puissances de calcul considérables, parfois sous la forme de simples ordinateurs portables. Enfin, plus récemment sont apparus des logiciels permettant la résolution de structure de façon quasi automatique (Adams et Grosse-Kunstleve, 2000 ; Perrakis et al., 1999 ; Terwilliger et Berendzen, 1999 ; Terwilliger, 2000). Leur intégration dans l'environnement des lignes de lumière a permis de voir les premières structures résolues de façon complètement automatique, sans intervention humaine depuis le montage de l'échantillon dans le faisceau X, jusqu'à la production d'un premier modèle atomique (Ferrer, 2001). Il s'agit là d'un facteur important de l'ouverture de la cristallographie des rayons X à une communauté non-cristallographe. Cela ne concerne encore que des cas simples, mais cette évolution est inéluctable.

Un deuxième apport de la bioinformatique repose sur la modélisation *ab-initio* des structures. Les puissances de calcul obtenues, combinées au nombre croissant de structures connues, permettent d'obtenir *in silico*, en particulier sur la base des séquences primaires déduites de données génomiques, des modèles par homologie structurale.

Une assez grande précision et justesse ($\sim 1 \text{ \AA}$ rms pour les atomes de la chaîne principale) est obtenue pour des séquences à $>50\%$ d'homologie. Les erreurs se trouvent dans l'empaquetage et l'orientation des chaînes latérales. Entre 30-50% d'homologie de séquence les modèles sont d'une précision et d'une justesse moyenne. En plus des orientations, des distorsions dans le coeur, des erreurs de modélisation des boucles et des erreurs d'alignement occasionnelles sont possibles. Les 'rms' sont typiquement $\sim 1.5 \text{ \AA}$. En dessous de 30% d'homologie, les erreurs d'alignement augmentent énormément. Ces erreurs sont les plus graves car elles peuvent résulter en un modèle de repliement

totalement incorrect.

Dans la plupart des cas, la précision des modèles obtenus par homologie structurale est insuffisante pour la conception rationnelle de molécules actives, néanmoins ils peuvent apporter des informations complémentaires utilisables dans ce cadre. Ils permettent en effet l'analyse des effets de mutations localisées, par rapport à une structure connue, et leurs conséquences sur la fixation de molécules actives connues. Dans ce dernier cas, la minimisation en énergie des programmes de modélisation, tel que Modeller (Sali and Blundell, 1993), est une façon élégante de positionner les quelques chaînes latérales mutées, en supposant que le repliement est parfaitement conservé.

2.4. L'exploitation des modèles pour la conception et/ou l'amélioration d'un ligand : les outils du « docking » structural.

La première approche pour la conception, à partir de l'information structurale, de molécules actives, consiste à dessiner manuellement une molécule adaptée au site de fixation de la protéine cible. Il existe cependant sur le marché plusieurs logiciels permettant l'automatisation de cette démarche (Abagyan et Totrov, 2001 ; Blundell et al., 2002 ; Charifson et al., 1999 ; Klebe, 2000). Les composés développés grâce à eux les rendent désormais parfaitement crédibles. Certains laboratoire pharmaceutiques, tels que Abbot (Nienaber et al., 2000) et Astex Technology (Blundell et al., 2002), ont désormais recours systématiquement à ces outils. On compte notamment parmi ceux-la (www.ks.uiuc.edu/Development/biosoftdb/biosoft.cgi?&category=7) :

- . • Autodock (<http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/>) : AutoDock est une suite d'outils automatisée destinée à prédire comment de petites molécules peuvent se fixer sur un récepteur dont la structure 3D est connue. Il s'agit d'un logiciel gratuit pour la recherche académique, développé par le « Scripps Institute » (San Diego, USA).
- . • Gold (http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/) : Gold est un logiciel d'analyse de fixation de ligand, basé sur un algorithme génétique. Il est commercialisé par la « Cambridge Crystallographic Database ».
- . • Glide (<http://www.schrodinger.com/Products/glide.html>) : Glide est également un programme d'analyse de fixation de ligand. Plusieurs niveaux de filtres permettent de traiter très rapidement un grand nombre de petites molécules (criblage *in silico*). Il fait partie d'une suite très complète (analyse de petits fragments, mécanique quantique, ...) permettant de réaliser toutes les

étapes de modification jusqu'à l'obtention d'un médicament. C'est donc un logiciel assez évolué, utilisé par l'industrie pharmaceutique.

3. “Structure Based Drug Design” : quelques exemples d'application et perspectives.

3.1. Les réalisations et développements récents dans le domaine.

Ce sont essentiellement les 'petites molécules' pharmacologiques visant des protéines intracellulaires qui ont bénéficié des apports de la biologie structurale. Historiquement, on compte parmi les premiers succès de cette approche le cas des inhibiteurs de la protéase du HIV-1 (Kaldor et al., 1997 ; Kim et al., 1995 ; Wlodawer et al., 1998), ainsi que des molécules destinées à limiter la virulence du virus de la grippe en empêchant l'interaction de la neuraminidase avec ses cibles (Babu et al., 2000 ; von Itzstein et al., 1993 ; Kim et al., 1997). Des exemples de ce type, où la structure a été le moyen de concevoir ou d'optimiser des composés actifs, se sont multipliés ces dix dernières années. Un certain nombre d'exemples remarquables de conception de molécules actives, sur la base de l'information structurale, sont présentés ici (Kuhn et al., 2002 ; Williams et al., 2005). D'autres types de molécules plus complexes, de type anticorps visant des protéines extracellulaires de surface ou des protéines exogènes commencent également à bénéficier de ces développements. On peut citer par exemple le RemicadeTM, de la société Centocor, Inc., filiale de Johnson & Johnson. Cette approche bénéficie également à la définition des domaines immunogènes des protéines virales (coque du virus) à des fins de développement de vaccins.

3.2. Quelques grandes familles fonctionnelles de protéines qui ont bénéficiées de cette approche.

-Protéases

Historiquement, les protéases ont été une cible de choix pour la recherche de molécules actives, dont un nombre important ont été développées ou améliorées à partir d'information structurale.

- Protéase du HIV (Kaldor et al., 1997 ; Kim et al., 1995 ; Wlodawer et al., 1998) : historiquement un des premiers exemples d'utilisation de la structure pour la conception d'une molécule active. Encore récemment (Surlereaux et al., 2005), la comparaison structurale des modes

de fixation des différents inhibiteurs connus a permis la conception d'une nouvelle molécule interagissant avec Asp29 et Asp30, afin d'élargir le spectre d'efficacité vis à vis de mutants résistants aux autres inhibiteurs (Fig. 5.1). Tout dernièrement, l'obtention d'une structure cristallographique de la protéase dans un état intermédiaire de la protéolyse jusqu'alors jamais observé ouvre la voie vers de nouveaux inhibiteurs (Amit das et al., en préparation).

. • Matrix métalloprotéinase (Schroder et al., 2001) : cible de traitement contre le cancer et l'arthrite notamment. Des études structurales récentes ont montré qu'un groupement spiro lactam associé à un acide barbiturique par une liaison de type ether-diphényle conduisait à une série d'inhibiteurs ayant une affinité sub-nanomolaire (Fig. 5.2).

. • Protéasome 20S (chymotrypsin-activity) (Furet et al., 2001) : l'inhibition du protéasome est une approche classique des thérapies anti-cancer. De nouveaux inhibiteurs non-covalents de l'activité protéolytique du protéasome 20S humain, plus simples et plus efficaces que ceux connus jusqu'alors, ont été développés récemment à partir d'un modèle du protéasome humain construit par homologie avec la structure cristallographique du protéasome de levure (Fig. 5.3).

. • Rénine (Rahuel et al., 2000) : la conception de l'aliskiren, un inhibiteur oral efficace de la rénine, est reportée par Wood et les collègues (Rahuel et al., 2000). Ce nouvel agent contre l'hypertension a été développé à partir d'une série d'inhibiteurs précédemment connus. L'analyse des structures cristallographiques de la rénine en complexe avec des membres de cette série a permis d'identifier un nouveau point d'ancrage dans la poche S3, qui a été efficacement exploité afin d'obtenir une affinité nettement améliorée pour la rénine et une meilleure sélectivité vis à vis des peptidases aspartiques. L'aliskiren (SPP-100 ; Fig. 5.4) est passé en production en tant que médicament potentiel contre l'hypertension.

. • β -sécrétase 1 : le peptide β -amyloïde, qui joue un rôle crucial dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer, provient du clivage par deux enzymes de la grosse protéine APP. Une β -sécrétase clive l'APP à l'extrémité N-terminale du peptide, tandis qu'une γ -sécrétase

. exerce son action de l'autre côté. La β -sécrétase a été identifiée par l'équipe de Martin Citron de la firme californienne Amgen (Thousand Oaks). De part le rôle de la β -sécrétase 1 (BACE-1), le développement d'un inhibiteur efficace de cette enzyme serait d'un grand intérêt pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Stachel et ses collègues ont récemment développé de nouveaux inhibiteurs de BACE-1 (Fig. 5.5), de faible poids moléculaire et non-peptidiques, à l'aide d'une structure cristallographique de l'enzyme en complexe avec un premier inhibiteur identifié par criblage haut-

débit (Stachel et al., 2004).

• Facteur VIIa (Young et al., 2001) : l'activation du facteur de tissu (TF) par le facteur de protéase à sérine VIIa est une étape essentielle dans la formation du thrombus. Un composé visant le facteur VIIa afin d'empêcher la formation du complexe TF-VIIa aurait donc une activité antithrombique. Les chercheurs de chez Pharmacia ont employé des techniques de conception basées sur l'information structurale afin d'identifier une série d'inhibiteurs, du type pyrazinone, du complexe entre TF et le facteur VIIa (Parlow et al., 2003 ; South et al., 2003). Des études *in silico*, à partir d'un hétéro-cycle à six atomes fixé dans le site actif d'une structure cristallographique du complexe de TF-VIIa, a suggéré un pyrazinone comme point de départ. Des études encore affinées ont conduit à la synthèse d'un inhibiteur efficace ($K_i = 150 \text{ nM}$). La structure cristallographique de TF-VIIa en complexe avec le composé précédemment obtenu, et des considérations structurales relatives aux protéases en général, ont suggéré l'ajout d'un groupe méta-aminé à une partie phénylique pendante pour gagner des interactions avec Asp60, un résidu unique à TF-VIIa. Ces modifications, et d'autres, ont finalement conduit au composé de la figure 5.7, qui présente un IC_{50} avec le complexe TF-VIIa de 16 nM et un excellent profil de sélectivité vis à vis du facteur Xa et de la trypsine.

• Enzyme convertissant l'interleukine-1 β (caspase-1) (Shahripour et al., 2002) : la modulation du niveau d'expression de l'interleukin-1 β par l'inhibition de la caspase-1 est une solution pour le traitement des problèmes d'arthrite et de choc septique. Harter et ses collègues ont décrit la conception de nouveaux inhibiteurs de la caspase-1 présentant des caractéristiques améliorées par rapports aux inhibiteurs relativement faibles et flexibles précédemment connus (Harter et al., 2004). En utilisant une structure d'un co-cristal avec la caspase-1, ils ont conçu des liaisons hydrogène internes afin de rigidifier la molécule. En utilisant un sulfonamide en tant que donneur de liaison hydrogène, l'analogue modifié (Fig. 5.8) a montré une augmentation d'un facteur 30 du pouvoir d'inhibition.

- Cathepsine B (Greenspan et al., 2001).
- Cathepsine L, cathepsin S (Katunuma et al., 1999).
- Facteur Xa (Liebeschuetz et al., 2002 ; Maignan et al., 2001).
- Mémapsine 2 (β -secretase) (Ghosh et al., 2001a).

-Kinases, phosphatases

La phosphorylation réversible des protéines est un moyen de contrôle majeurs des différentes voies

métaboliques des cellules eukaryotes. L'identification des kinases et phosphatases d'intérêt est un domaine de recherche qui connaît une forte activité (Moller et al., 2005 ; Noble et al., 2004 ; Pratt et al., 2004). La structure d'un grand nombre de ces enzymes a déjà été élucidée. A partir de ces données, des modèles structuraux ont également été développés par homologie (<http://www.gen2x.com/kinase3D/>).

- . • Kinase Abl (Schindler et al., 2000).
- . • Kinases cycline-dépendantes (Furet et al., 2000 ; Gray et al., 1998 ; Honma et al., 2001) : Comme thérapie potentielle de cancer, Anderson et ses collègues ont rapporté une nouvelle famille d'inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes (CDK) identifiés par hybridation, sur la base de la structure d'inhibiteurs connus (Anderson et al., 2003). Les structures cristallographiques de CDK2 en complexe avec deux types différents d'inhibiteurs ont suggéré une stratégie d'hybridation dans laquelle une partie d'un des inhibiteurs est remplacé par la partie correspondante du deuxième inhibiteur. Cette idée a mené directement au composé de la figure 5.9, qui inhibe CDK2 avec un IC50 de 3 nM. Un groupe de Cyclacel a décrit la conception guidée par la structure de nouveaux inhibiteurs sélectifs de CDK4 (McInnes et al., 2004). Par une analyse détaillée des inhibiteurs sélectifs connus de CDK4, en utilisant des méthodes informatiques et un modèle d'homologie de CDK4, l'importance d'un groupement chargée à proximité de Glu144 de CDK4 a été mis en évidence. L'addition d'un groupement pipérazine convenablement placé a sélectivement augmenté le pouvoir d'inhibition contre CDK4 d'un facteur 17, produisant un inhibiteur (Fig. 5.10) avec un IC50 de 7 nM et un rapport de sélectivité CDK4/CDK2 de 31.

- . • Kinase p38 α : Un groupe de chercheurs de la société Astex a développé, à partir d'une combinaison de fragments, de nouveaux inhibiteurs de la kinase "mitogen-activated" p38 α , cible potentielle pour les traitements anti-inflammatoires (Gill et al., 2005). Les structures cristallographiques de deux substituants pyrimidine ont montré que la partie aryl était orienté vers une poche hydrophobique. Ce résultat a suggéré de combiner ces molécules avec des composés connus pour se lier à une forme inactive de p38 α présentant une poche hydrophobique plus étendue, et l'information structurale a permis de définir le mode de liaison des deux composés. Le composé ainsi obtenu s'est révélé satisfaisant lors de tests *in vivo* sur des modèles de l'inflammation.

- . • Kinase Lck (Zhu et al., 1999).
- . • Kinase Src (Fretz et al., 2000 ; Shakespeare et al., 2000).
- . • « Epidermal growth factor receptor kinase » (Ghosh et al., 2001b).

- Urokinase (Hajduk et al., 2000).

- « Urokinase-type plasminogen activator » (Verner et al., 2001).

- Protein-tyrosine phosphatase (Iversen et al., 2001) : La tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) régule négativement le récepteur de l'insuline, et est donc de ce fait une cible thérapeutique contre le diabète. En s'appuyant sur une stratégie d'assemblage de fragments, et en utilisant à la fois la RMN, pour le criblage, et la cristallographie par rayons-X, un groupe de chez Abbott a rapporté la découverte d'un inhibiteur potentiel sélectif de PTP1B (Szczechankiewicz et al., 2003). Un premier criblage, suivi d'une analyse structure-activité (SAR) a conduit à un inhibiteur de faible affinité ($K_i = 39$ mM). Une structure cristallographique de ce composé lié à PTP1B a confirmé que ce composé se fixe effectivement au site actif de l'enzyme dans sa conformation ouverte. L'examen de la structure a conduit à l'ajout d'un groupement diamide sur la position 4 du cycle naphthyle, produisant ainsi une amélioration d'un facteur 40. Un second criblage par RMN a conduit à l'identification d'un ligand pour une partie non catalytique du site actif de PTP1B. La jonction des deux parties aromatiques a donné naissance au composé de la figure 5.12, qui présente un bon pouvoir d'inhibition de PTP1B, avec un K_i de 22 nM.

- Glycogen synthase kinase 3 : La Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) est une cible d'intérêt contre le diabète. En utilisant l'information structurale d'un complexe GSK3–inhibiteur, et après une analyse détaillée des propriétés conformationnelles de l'inhibiteur, un groupe de chez Vertex a identifié l'importance d'une liaison hydrogène CH-O, ce qui a conduit au développement d'un nouvel inhibiteur potentiel de GSK3 (Fig. 5.11) (Pierce et al., 2005).

-Récepteurs nucléaires

Les membres de la famille des récepteurs nucléaires (NR) sont des facteurs de transcription régulés par des ligands. Tous les développements de composés menés à ce jour sur la base de l'information structurale s'appuient sur la structure du domaine de fixation du ligand (LBD) (Sznajdman et al., 2003). On peut ainsi mentionner :

- Récepteur de la prostaglandine (Soper et al., 2001).

- PPAR δ : Dans le cas du “peroxisome proliferator-activated” récepteur delta (PPAR δ), une cible pour le traitement de l'obésité et d'autres dérèglements métaboliques, un criblage contre une bibliothèque de petites molécules a permis d'identifier plusieurs composés, essentiellement des acides carboxyliques lipophiliques (Sznajdman et al., 2003). La structure d'un de ces composés, liés à PPAR δ , a montré que l'acide cinnamique adopte une conformation en forme de Z. En réduisant la

liaison double de ce composé, on obtient ainsi une molécule plus flexible pouvant adopter plus facilement la meilleure conformation. Cette modification a donc conduit à une bien meilleure affinité. La structure a également révélé la présence d'une poche lipophile proche. L'addition d'un groupement méthyle à cette position a conduit au composé de la figure 5.13, qui présente des propriétés améliorées en terme d'affinité d'inhibition.

- Récepteur nicotinique neuronal (Nicolotti et al., 2001).

- Récepteur des rétinoïdes (RXR) : Le récepteur de la stéréo forme 9-cis de l'acide rétinoïque (RXR), un hétérodimer comme beaucoup d'autres récepteurs nucléaires, est une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement du psoriasis, des cancer et de plusieurs dérèglements métaboliques. L'utilisation de la structure de RXR α sans ligand (apo-RXR α) a permis la conception, à partir de composés identifiés par criblage, d'un ligand sélectif (Haffner et al., 2004). En effet, sur la base de la structure de l'apo-RXR α et de la modélisation des premiers ligands, un nouveau composé a été redessiné, avec un arrangement 2,4 autour d'un tétramethyltétrahydronaphtalène, au lieu de 2,5. Cette modification a conduit à un accroissement d'un facteur 10 de l'affinité. L'hypothèse a également été faite qu'un composé plus rigide avec une forme en L, plutôt que linéaire, devrait améliorer la sélectivité vis à vis des autres récepteurs, et notamment de celui de l'acide rétinoïque (RAR, récepteur fixant tous les stéréo-isomères de l'acide rétinoïque). Finalement un tel composé, à deux cycles contraints géométriquement, a conduit aux caractéristiques souhaitées en terme d'inhibition de RXR α , et de sélectivité.

- Récepteur des oestrogènes : Il existe chez l'homme deux gènes codant pour des récepteurs des oestrogènes (ER), ER α et ER β . Ces récepteurs nucléaires sont des cibles thérapeutiques pour le traitement de nombreuses indications, tels que les symptômes de la ménopause ou le cancer du sein. Dans le but de concevoir des ligands stéroïdiens qui se fixent préférentiellement sur un des types de récepteur particulier, un groupe de chercheurs a utilisé la structure cristallographique de ER α , ainsi qu'un modèle par homologie structurale de ER β (Hillish et al., 2004). Une analyse des sites de fixation respectifs a révélé que parmi les 23 résidus concernés, seulement deux diffèrent entre ER α et ER β . En prenant avantage de cette différence, il a alors été démontré qu'une simple extension du cycle D des stéroïdes pouvait conduire à une préférence pour ER α d'un facteur 70, alors qu'un groupe aliphatique directement au dessus des cycles B et C conduisait à une préférence encore plus marquée pour ER β , d'un facteur 180. Un autre groupe a utilisé avec succès la structure cristallographique de ER afin de concevoir un ligand non stéroïdien de ER β (Manas et al., 2004). Ainsi, la structure de ER

en complexe avec un hydroxyl-substitué benzofuran a suggéré que l'ajout d'un groupe faisant face au résidu Ile373 de ER β (une Met dans ER α) pouvait conduire à la sélectivité voulue. Deux substitutions, un groupe vinyl en position 7 et un groupe fluoro en ortho de l'hydroxyle du cycle A (Fig. 5.15), a conduit à un composé, ERB-041, présentant une sélectivité pour ER β d'un facteur 100.

-Oxydases, réductases

- Monoamine oxidase-B (Gritsch et al., 2001).
- Aldose réductase (Iwata et al., 2001).
- Trihydroxynaphthalene réductase (Liao et al., 2001).
- Dihydrofolate réductase (Debnath et al., 2002).
- 5- α -réductase (Chen et al., 2001).

-Divers

- Thrombine (Chirgadze et al., 2000).
- Adénosine déaminase (ADA) : Une série d'articles de Terasaka et al. illustrent trois développements rationnels réussis d'inhibiteurs de l'adenosine déaminase (ADA), une cible potentielle pour le traitement de l'inflammation et des maladies prolifératives (Terasaka et al, 2004a ; Terasaka et al, 2004b ; Terasaka et al, 2004c). Dans un premier article, deux composés dans la gamme des 2 μ M sont introduits : un imidazole obtenu par conception rationnelle et un thiophène obtenu par criblage. La structure cristallographique de ADA en complexe avec ces deux inhibiteurs a ensuite été déterminée, révélant une remarquable absence de recouvrement spatial du mode de fixation de ces inhibiteurs, et également qu'un substituant benzimidazole du thiophène permettait d'ouvrir une nouvelle poche hydrophobe adjacente au site de fixation du substrat. Plutôt que d'optimiser séparément ces deux séries de composés, Terasaka et al. ont utilisé les deux poches hydrophobes où se fixent les membres respectifs de ces deux séries afin de concevoir un inhibiteur hybride ($K_i = 7.7$ nM ; Fig. 5.16). Le second article décrit une approche combinant cristallographie et chimie classique afin de sélectionner des groupements hydrophobes reliés entre eux de sorte à générer une série de composés hybrides aux propriétés optimales. Le troisième article montre que l'addition rationnelle d'un unique groupement méthyle améliore un intermédiaire initial de 0.7 mM à 11 nM. L'addition de ce méthyle s'est opérée sur la base de la similarité de cet intermédiaire avec des nucléosides analogues. Une optimisation plus poussée a permis, par conception rationnelle, d'éviter

des risques métaboliques tout en conservant l'affinité. Le résultat final a été un anti-inflammatoire inhibant ADA, pouvant être administré oralement (Fig. 5.17).

• « farnesyl transférase » : Sur la base de la structure de la farnesyl transférase (FTase) co-cristallisée avec un inhibiteur potentiel, le tipifarnib, aux propriétés potentiellement anticancer, Li et al. ont montré qu'il était possible de remplacer le quinolinone de tipifarnib par un pyridone et une liaison appropriée (Li et al., 2004). Malgré l'interaction essentielle de l'imidazole du tipifarnib avec l'atome de zinc du site actif de la FTase, un groupement hydrophobe a pu être attaché via le groupe N-méthyle de cet imidazole sans perte de l'affinité. Au contraire, le résultat (Fig. 5.19) s'est avéré avoir une meilleure affinité (8-12 nM) et sélectivité vis à vis de la FTase.

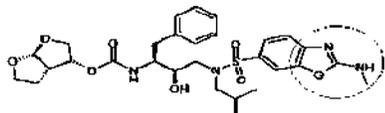
- Phospholipase-A2 (Mihelich et Schevitz, 1999).
- Transducteurs de signal et activateurs de transcription (Turkson et Jove, 2000).
- bcl-2 (Wang et al., 2000).
- Neuraminidase (Babu et al., 2000 ; von Itzstein et al., 1993 ; Kim et al., 1997) : La neuraminidase du virus de l'influenza, impliquée dans l'infection des cellules hôtes par le virus, est l'objet depuis plus de 10 ans de développements s'appuyant sur des données structurales. Stoll et al. (Stoll et al., 2003) ont ainsi pu, à partir d'une première structure d'un complexe neuraminidase-inhibiteur, générer plus de 120 structures cristallographiques afin d'identifier de nouvelles molécules actives. Cette étude structurale massive a permis de montrer des différences importantes dans le cas de SAR, conduisant ainsi à un inhibiteur à forte affinité. La compréhension du mode de fixation dans le cas de SAR a été une étape importante de la compréhension de la résistance de SAR aux inhibiteurs classiques. Ainsi, un composé de type cyclopentyle ($K_i = 26 \text{ mM}$) s'est avéré se fixer dans deux orientations différentes. La modification de la chiralité d'un cycle substitué d'un groupement amine a conduit à un mode de fixation unique et a ainsi réduit le K_i à 0.7 mM (Fig. 5.18). D'autres améliorations furent encore possibles, telles que le déplacement d'un atome d'azote du pyrrolidine, la substitution de l'amine primaire attaché au cyclopentyle, ou d'autres substitutions afin d'occuper l'ensemble des cinq sites de fixation secondaires.

- Glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (Bressi et al., 2001).
- Phosphodiesterase : L'inhibition des phosphodiesterases (PDEs) peut être un moyen potentiel de traiter une multitude de maladies, particulièrement celles associées à des symptômes vasculaires, de dérèglements immunitaires ou d'inflammations. Card et al. a présenté un processus en trois étapes afin d'obtenir un inhibiteur efficace contre différents membres de la famille des PDE,

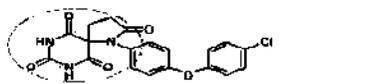
utilisant une combinaison de criblage et d'optimisation (Card et al., 2005). Dans un premier temps, une série d'inhibiteurs de plusieurs PDE a été identifié par criblage. Parmi les 316 composés identifiés, 269 ont été co-cristallisés avec une PDE, et 107 structures co-cristallisées ont été résolues. Les structures ont ensuite été examinées afin de déterminer le mode de fixation et de valider le composé. L'étape finale a été une optimisation des composés afin d'aboutir à des inhibiteurs efficaces. Cette dernière étape a été réalisée à l'aide d'un criblage virtuel à partir des structures de co-cristaux. Plus de 100 composés ont ainsi été évalués *in silico*, et une dizaine ont été synthétisés. Deux de ces composés ont une affinité meilleur que 50 nM pour PDE4B et PDE4D (Fig. 5.20).

- . • Thymidylate synthase (Webber et al., 1993).
- . • Acetylcholinesterase (Doucet-Personeni et al., 2001).
- . • Cyclooxygenase-2 (Palomer et al., 2002).
- . • N-myristoyl transferase (Karki et Kulkarni, 2001).
- . • Hypoxanthine-guanine-xanthine (Aronov et al., 2000).
- . • Phosphoribosyltransferase.
- . • DNA gyrase (Boehm et al., 2000).
- . • Human carbonic anhydrase II (Grzybowski et al., 2002).
- . • Peptide déformylase (Guilloteau et al., 2002).

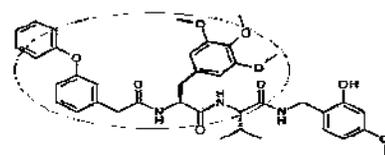
1 HIV protease



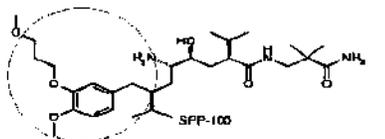
2 MMP-13



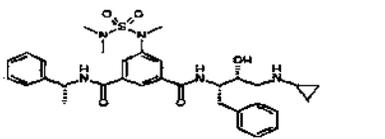
3 Proteasome



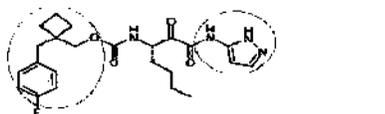
4 Perin



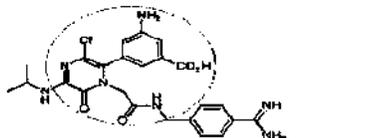
6 BACE-1



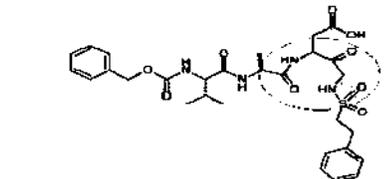
6 Cathepsin K



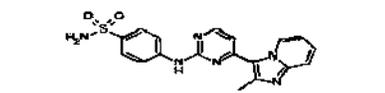
7 Factor VIIa



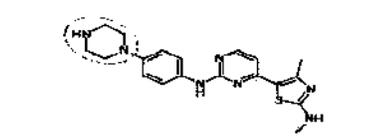
8 Caspase-1



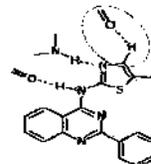
9 Cyclin-dependent kinase 2



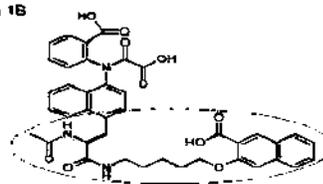
10 Cyclin-dependent kinase 4



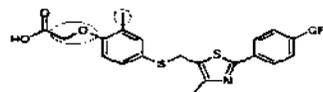
11 Glycogen synthase kinase 3



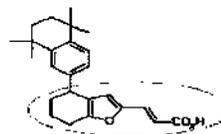
12 Protein tyrosine phosphatase 1B



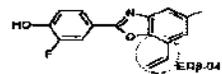
13 PPAR γ



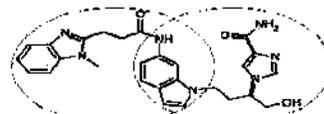
14 RXR



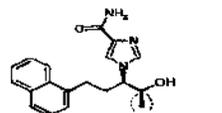
15 ER β



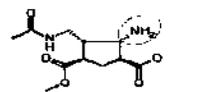
16 Adenine deaminase



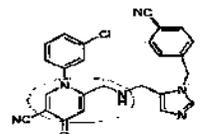
17 Adenine deaminase



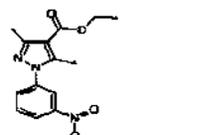
18 Neuraminidase



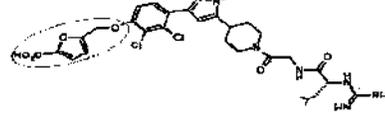
19 Farnesyl-transferase



20 PDE4



21 IL-2



3.3. Perspectives.

On n'a évidemment que peu d'informations sur les développements en cours et à venir, les laboratoires conservant jalousement le secret de leurs recherches et ne publiant généralement dans les journaux scientifiques que les études abandonnées (Kreusch, entretien du 2/5/2006). Sur la base des dépôts de brevets, on peut cependant dégager quelques grandes orientations :

• Le développement de vaccins antiviraux : HIV, mais aussi le virus de la grippe (conception accélérée de vaccin contre la grippe aviaire, sur une base structurale, Nable, 2005). L'utilisation de protéines de faible masse et de forte affinité, en lieu et place d'anticorps est en cours d'exploration (Jeong et al., 2005). Longtemps sous-estimé, le marché des vaccins connaît une progression remarquable.

• Le développement de nouveaux antibiotiques : la résistance des microorganismes aux antibiotiques existants est un problème récurrent de santé publique, particulièrement en milieu hospitalier de même que la nécessité de se prémunir contre le retour de pathologies considérées disparues (Richard, entretien du 12/5/2006). Il est donc nécessaire de trouver des composés présentant des modes d'action totalement différents de ceux utilisés jusqu'à présent, et limitant ainsi le risque de voir apparaître trop rapidement une résistance, inévitable à terme, chez les organismes pathogènes visés. On peut ainsi mentionner le développement d'inhibiteur de la peptidase déformylase (Fieulaine et al., 2005) et d'enzymes de la voie non mévalonate de synthèse des terpénoïdes (Borel et al., en préparation).

• Stratégies anti-cancer : cette pathologie complexe liée au vieillissement de la population et à la présence croissante d'agents carcinogénétiques dans notre environnement (pollution, multiplication de produits issus de l'industrie chimique dont les effets à faible dose sont mal connus) est un sujet majeur de recherche. Les nouvelles molécules développées visent le cycle cellulaire, cible classique des traitements anti-cancer, mais aussi des kinases impliquées dans la signalisation, les transporteurs ABC impliqués dans le transit des molécules actives hors de la cellule cible (limitation de la toxicité), etc...

• La lutte contre les dérèglements métaboliques : ils ont un impact croissant en terme de santé publique (eg. obésité) et touchent essentiellement les pays riches, USA mais aussi en

Europe, ils font l'objet d'une recherche intensive (e.g. nouveaux inhibiteurs de PPAR δ contre l'obésité ; Richard, entretien du 12/5/2006).

. • D'une manière générale, les protéines membranaires de surface constituent des cibles privilégiées d'une part à cause de leur accessibilité et d'une toxicité médicamenteuse plus limitée par rapport à des cibles intracellulaires et d'autre part à cause de leur implication dans la plupart des grands processus biologiques soumis à un contrôle externe via des signaux extracellulaires (familles de récepteurs et/ou canaux présentant des activités kinases et/ou phosphatases; la très vaste famille des récepteurs membranaires associés aux protéines G; les 'GPCR' constituent déjà une cible majeure pour une large fraction des médicaments commercialisés et représentent encore un très gros potentiel en cours d'exploration). De part leur nature, la manipulation et l'étude des protéines membranaires restent difficiles et c'est dans ce domaine que sont attendus les progrès méthodologiques les plus importants (Kreusch, entretien du 2/5/2006 ; Richard, entretien du 12/5/2006).

4. Les intervenants économiques dans la démarche 'SBDD'.

4.1. Les laboratoires académiques.

Au travers des thèmes biologiques étudiés, ils ont un rôle important dans l'identification des cibles thérapeutiques potentielles (Richard, entretien du 12/5/2006). Dans un contexte de réduction des crédits de la recherche, de nombreux laboratoires aux USA essayent désormais d'intégrer une dimension structurale avec un objectif de 'SBDD'. Cette démarche passe par l'association avec des équipes de cristallographie des protéines, de chimie organique ou l'intégration de ces activités dans une même structure. L'objectif est in fine de déboucher sur la prise de brevet pour des molécules actives, plus rentable que les brevets d'instrumentation ou de méthodologie et générer ainsi de nouveaux revenus (Bochurberg, entretien du 4/5/2006).

4.2. Les grands instruments financés par les fonds publics.

L'accès au rayonnement synchrotron est, comme on l'a vu plus haut, un point essentiel pour la résolution de structures par cristallographie. Cet accès était encore très limité il y a seulement quelques années. Désormais, sous la pression de la communauté des utilisateurs, la part des moyens (nombre de lignes de lumière) consacrée à la cristallographie des protéines a considérablement

augmenté. Dans un même temps, certaines machines sont reconstruites avec un faisceau plus intense ou un nombre de lignes plus important :

- BNL à Long Island (USA),
- SSRL à Stanford (USA), et de nouvelles machines sont planifiées ou déjà en construction

(voir la liste complète des synchrotrons à l'adresse suivante : <http://www.nsls.bnl.gov/about/links/>) :

- SOLEIL en France,
- DIAMOND en Angleterre,
- ALBA en Espagne,
- CLS au Canada,
- NSRRC in Taiwan,
- etc...

Les progrès réalisés en terme d'automatisation ont également grandement amélioré le rendement des installations déjà existantes. Tout cela fait que l'accès au rayonnement synchrotron n'est en général plus un problème, autant aux USA qu'en Europe.

Le coût de construction d'un synchrotron, même de petite taille, est d'avantage du ressort d'un état que d'une entreprise privée, avec cependant une possible évolution révélée par les premières machines TableTop telle que celle du projet ATCG3D (<http://www.atcg3d.org/technologies.htm#synchrotron>). L'accès des industriels au rayonnement synchrotron se fait généralement sous deux formes : soit par la construction de lignes privées sur des machines publiques (modèle adopté essentiellement aux USA), soit par l'achat de temps de faisceau sur des lignes publiques. Dans ce dernier cas, le coût actuel d'un créneau de 8h à l'ESRF par exemple est de 4000 Euros. Il s'agit là d'un coût réellement mineur dans la totalité d'un cycle de développement du type SBDD : en moyenne 8 ans / 800 millions de dollars, de l'identification de la cible à la molécule active mise sur le marché (Richard, entretien du 12/5/2006). Le coût le plus important dans cette étape réside d'ailleurs d'avantage dans le temps et les moyens humains nécessaires, et à ce titre les industriels apprécient énormément les efforts menés en automatisation, et la possibilité qui en découle de pouvoir piloter des expériences à distance tel que cela est couramment réalisé à Stanford (Richard, entretien du 12/5/2006).

4.3. Les entreprises pharmaceutiques.

Ces dernières années, la position dominante des compagnies américaines a largement été entamée. Les raisons de ce brusque renversement sont multiples : une politique d'austérité des organismes payeurs américains sur le prix des médicaments, la progression des génériques (en 2006, près de 20 milliards de dollars de produits sous brevets vont échoir dans le domaine public) et une trop faible proportion du chiffre d'affaire sur les « blockbusters ». Sur ces aspects, les sociétés américaines montrent une plus grande fragilité que les sociétés européennes, accrue par les revers juridiques récemment subis (molécules anti-Cox, telles que Vioxx pour Pfizer et Celebrex pour Merck) (Richard, entretien du 12/5/2006) (1). A cela s'ajoute une réduction drastique des crédits de la recherche publique et un ralentissement de l'activité de transfert vers l'industrie de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouvelles molécules actives issues de la recherche académique.

L'ensemble de ces difficultés ont conduit aux Etats-Unis à un changement de stratégie où afin d'alimenter plus rapidement le 'pipeline' du développement de nouvelles molécules, les entreprises pharmaceutiques renoncent à la partie la plus amont de la recherche. Elles s'orientent désormais vers l'acquisition de molécules développées par de petites compagnies ayant idéalement passé avec succès la phase I des tests cliniques.

(1) Pour information, le classement 2005 par chiffre d'affaire des compagnies pharmaceutiques s'établit comme suit (Mamou, 2006) :

- Pfizer (USA) : 46,4 milliards de dollars de chiffre d'affaire en 2005,
- GlaxoSmithKline (Grande Bretagne) : 33,5 milliards de dollars,
- Sanofi Aventis (Franco-Allemand) : 28,2 milliards de dollars,
- Novartis (Suisse) : 27,3 milliards de dollars,
- Johnson & Johnson (USA) : 24,7 milliards de dollars,
- AstraZeneca (Grande Bretagne, Suède) : 23,9 milliards de dollars,
- Merck (USA) : 22 milliards de dollars,
- Roche (Suisse) : 18,9 milliards de dollars.

4.4. Les entreprises de biotechnologie.

En marge des remaniements majeurs qu'ont connues les grosses compagnies pharmaceutiques, en particulier des concentrations afin de réduire les coûts, le secteur des petites compagnies de biotechnologie dans leur ensemble et en particulier dans le domaine d'activité analysé, a aussi connu une évolution importante que l'on peut décrire en trois phases.

Première phase : la bulle (aujourd'hui terminée). Soutenue par des investisseurs enthousiastes qui ont investi des sommes très importantes, un grand nombre de sociétés ont été créées et dans un contexte spéculatif certaines se sont revendues très rapidement à prix fort où ont été récemment rachetées, tel que Syrrx (La Jolla, USA, racheté par Takeda, Japon).

Deuxième phase : la purge (qui continue aux Etats-Unis). Un grand nombre de compagnies n'ont vécu ou ne vivent que sur les financements des investisseurs sans dégager de profits voire réaliser un chiffre d'affaire. Dans ce contexte où les investisseurs sont devenus beaucoup plus prudents et exigeants un grand nombre de restructurations, voire de dépôts de bilan, sont intervenus :

- Diversa (<http://www.diversa.com/>) : société spécialisée depuis plus de dix ans dans la valorisation de nouvelles protéines à usage industriel ou médical. Diversa a brutalement réduit ses effectifs d'un tiers en janvier 2006.
- Triad Therapeutics (<http://www.triad.com/>) : cessation d'activité après la vente de son projet p38 à Novartis.

Troisième phase : la maturité. Elle a été atteinte par des sociétés qui ont ciblées un 'bon' créneau dès leur début, d'autres ne doivent leur survie qu'au prix d'une réduction de leurs ambitions ou d'un déplacement de leur activité vers d'autres secteurs :

- SGX (La Jolla, USA) : après une réduction marquée de leur activité dans l'instrumentation et la biologie structurale, SGX s'est recentré sur la valorisation de quelques cibles thérapeutiques.
- Gen2x (taille familiale) : spin-up du Salk Institute (La Jolla, USA), offrant initialement des services en cristallographie des protéines. Gen2x cherche désormais à développer sa propre recherche appliquée, basée sur une approche 'SBDD'.

La tendance générale aux Etats-Unis (incluant les sociétés tournées vers le 'SBDD') est de baser la stratégie de la société sur le développement de quelques nouvelles molécules (typiquement prêtes pour une phase d'essai clinique de niveau 1) afin de les vendre à de grosses entreprises pharmaceutiques qui possèdent les moyens de mener les essais cliniques jusqu'au terme de la commercialisation.

L'existence de zones à forte concentration en biotechnologie ('cluster'), telles que San Diego, la 'Bay Area', (voir supplément « Californie », Nature Décembre 2005) et Boston avec de grandes entreprises pharmaceutiques sur le territoire sont les atouts essentiels des USA que ne possèdent pas les pays européens.

Afin de compenser le retard pris en Europe, différentes actions ont été entreprises avec plus ou moins de succès en particulier en Grande-Bretagne et en Allemagne avec un soutien important des pouvoirs publics. Il faut noter au niveau européen, la 'European Investment Bank' ('EIB'), instrument financier de la commission européenne, qui évalue la possibilité de prêts à destination des entreprises biotech dont un ou plusieurs produits sont suffisamment avancés dans leur développement. Cependant, face à l'absence en général de chiffre d'affaire de ces sociétés, cette réponse n'est probablement pas la plus adaptée, des financements du type prêt contre actions le seront peut être davantage, pour celles du moins dont le titre est coté en bourse.

En France, également, une nouvelle phase en terme de politique industrielle s'est mise en place avec la création des pôles de compétitivité thématiques tournés en particulier vers la création et le soutien à des PME innovantes (aides publiques directes : subventions et indirectes : fiscalité, charges sociales) et la recherche académique dans une optique de transfert. Trois grands pôles orientés vers l'innovation thérapeutique viennent d'être définis (Ile-de-France, Rhône-Alpes et Alsace), dans le secteur biotech. Dans notre contexte national, à côté des stratégies traditionnelles (ventes, fusion, partenariats divers avec des entreprises pharmaceutiques, éventuellement étrangères) des modèles plus originaux pourraient être favorisés, par exemple, une société munie d'une masse critique de moyens assureraient le développement autonome, ciblé, d'un produit jusqu'à la commercialisation (modèle Gilead, Bay Area, sur une gamme de produits anti-viraux). Sur le plan technologique, la création des « génopôles » avec des plateformes spécialisées a répondu aux soucis de l'éclatement géographique et la dispersion des moyens, elles doivent constituer un outil supplémentaire dans le cadre du développement des pôles de compétitivité. Enfin, on peut cependant souligner quelques

succès hexagonaux, tels que Protein'Expert (Grenoble), situé en amont de la démarche SBDD, et BIOXTAL, une des premières en France (au début une entreprise de service en cristallographie uniquement; <http://www.bioxtal.com>).

5. Conclusion

La conception de molécules basée sur des informations structurales est promise à de grands développements. Ainsi, ce qui dans les exemples cités dans la partie 3 relevait essentiellement du flair remarquable des pionniers de cette approche, et d'une certaine part de chance, tient désormais d'une approche plus rationnelles, avec des outils élaborés et des techniques largement enseignées. Il existe même désormais des congrès portant sur cette seule approche structurale du développement de molécules actives (« CHI's Annual Structure-Based Drug Design » ; <http://www.healthtech.com/2006/sbd/>).

La cristallographie aux rayons X est actuellement la technique de choix pour l'obtention de l'information structurale nécessaire à la conception rationnelle de molécules actives. Cette technique est cependant encore en pleine évolution. Des raffinements permettront de mieux appréhender les changements conformationnels liés aux activités des macromolécules biologiques. Les études cristallographiques résolues dans le temps constituent une de ces avancées majeures, mais restent encore peu développées car difficiles à mettre en oeuvre. En complément de la cristallographie, les autres outils de la biologie structurale sont également amenés à jouer un rôle croissant, tel la 'RMN' pour l'étude de la formation de complexes transitoires. Des techniques d'échanges isotopiques rendent maintenant accessibles à l'analyse des zones de flexibilité induites par la liaison du ligand ou des zones d'interaction entre macromolécules au sein d'un complexe. Couplées à des techniques de réticulation covalente, la spectrométrie de masse permet aussi d'obtenir des données sur la formation de complexes. Elle offre également l'opportunité de caractériser des complexes non covalents (protéine-protéine, protéine-ligand), et constitue un champ de recherche très porteur qui élargira certainement au niveau des protéines cibles le spectre de molécules actives exploitables.

La maturité atteinte par les outils informatiques a largement contribué au succès de la démarche SBDD. L'accumulation des structures tridimensionnelles élucidées, une connaissance accrue des caractéristiques structure-activité d'un ligand vis-à-vis de sa cible, les puissances de calcul en croissance exponentielle devraient permettre à long terme, à l'aide de modèles prédictifs, de

conceptualiser et d'évaluer *in silico* de nouvelles molécules sur un plan structural et fonctionnel.

A court terme, l'utilisation de la structure cristallographique des protéines combinée à de nouveaux outils bioinformatiques dédiés à la conception de molécules actives est un moyen essentiel pour caractériser de nouveaux médicaments plus efficaces et raccourcir leur cycle de développement avec une réduction des coûts pour les laboratoires pharmaceutiques (prédéfinition de familles chimiques, compression des cribles...). C'est en effet au tout début du cycle de développement que cette démarche est la plus utile, lorsqu'elle indique les directions dans lesquelles doivent travailler les chimistes (Kreusch, entretien du 2/5/2006). Cependant, l'importance de son impact est directement reliée à la disponibilité des nouvelles cibles thérapeutiques définies grâce à la génétique moléculaire dans les pathologies majeures visées aujourd'hui : cancer, maladies neurodégénératives, maladies infectieuses (HIV, Hépatite C...), obésité, diabète etc... Une importante synergie académie-industrie, avec une attention croissante accordée aux applications thérapeutiques en particulier par les laboratoires de biologie structurale académiques, est une condition préalable au succès de l'approche 'SBDD'.

Structure des protéines : caractéristiques et déterminants.

La fonction d'une protéine est définie par l'organisation tridimensionnelle qu'adopte la chaîne d'acides aminés qui la compose. Cette fonction est donc intimement mais indirectement liée à la séquence. Une fois synthétisée, une protéine se replie et adopte une conformation selon les interactions entre les chaînes latérales de ses acides aminés et les interactions des acides aminés avec le solvant. La structure d'une protéine est déterminée par de nombreuses interactions : ponts hydrogènes, liaisons hydrophobes, forces électrostatiques, forces ioniques. Il existe plusieurs niveaux de structure qu'une protéine entreprend avant d'atteindre sa conformation native (Voet et al., 1998) :

-*Structure primaire* : La structure primaire d'une protéine correspond simplement à sa séquence linéaire en acides aminés.

-*Structure secondaire* : La structure secondaire d'une protéine correspond à sa conformation spatiale locale. Il existe trois types principaux de structures secondaires :

- Hélice alpha : hélice droite avec des angles de torsion $\Phi = -57^\circ$ et $\psi = -47^\circ$. Elle compte en moyenne 3.6 acides aminés par tour et a un pas de 5.4 Å. L'angle Φ correspond à l'angle entre le carbone N-terminal et le C α et l'angle ψ correspond à l'angle entre le C α et le carbone C-terminal. Des ponts hydrogènes s'établissent entre le groupement carbonyle du résidu n et le groupement amine du résidu n+4.

- Feuillet bêta : structure planaire utilisant le maximum de liaisons hydrogènes possibles du squelette polypeptidique. Les liaisons hydrogènes s'effectuent entre le groupement amine d'un résidu sur une chaîne et le groupement carbonyle d'un résidu sur une autre chaîne. Il y a deux types de feuillets bêta

 - Feuillet anti-parallèle : chaînes polypeptidiques de sens opposé.

 - Feuillet parallèle : chaînes polypeptidiques de même sens. Cette conformation est moins stable que le feuillet antiparallèle.

- Structures non-répétitives : Structures secondaires irrégulières. Les coudes bêta en sont un exemple : ils relient plusieurs feuillets bêta antiparallèles.

-*Structure tertiaire* : La structure tertiaire correspond à l'arrangement tridimensionnel des structures secondaires et des chaînes latérales d'une protéine. En d'autres mots, l'assemblage des

structures secondaires et la disposition spatiale des chaînes latérales déterminent la conformation native de la protéine. La structure tertiaire est stabilisée par des interactions hydrophobes et des ponts disulfures. Certains assemblages de structures secondaires sont connus sous le nom de superstructures. Les plus connues sont :

- Motif $\beta\alpha\beta$: Deux feuillets bêta parallèles reliés par une hélice alpha.
- Motif en épingle à cheveux : Un feuillet bêta antiparallèle formé de chaînes polypeptidiques et relié par des tournants en épingle à cheveux.
- Motif $\alpha\alpha$: Deux hélices alpha antiparallèles reliées ensemble ayant un axe incliné afin de favoriser des interactions.
- Tonneau β : Feuillet bêta qui s'enroulent pour former des structures cylindriques.

-*Structure quaternaire* : Certaines protéines ont plus d'une chaîne polypeptidique. En effet, elles peuvent contenir plusieurs sous-unités assemblées de façon spécifique. L'arrangement spatial de ses sous-unités est désigné sous le nom de structure quaternaire.

Il n'y a pas de correspondance univoque entre la séquence et la structure tertiaire d'une protéine. D'une part il existe un nombre restreint de types de structures tertiaires (le repliement, ou « fold » en anglais). De ce fait, de nombreuses protéines parfois très éloignées, en terme de séquence ou de fonction, présentent un repliement proche. Ainsi, il est rare, mais pas impossible (Kuzuyama et al., 2005), qu'une structure nouvellement élucidée révèle un repliement inédit. A l'opposé, une séquence donnée peut conduire, sous l'influence de divers facteurs extérieurs, à des repliements différents. La protéine du prion en est un exemple remarquable (Kenwood et al., 1996). En conséquence, la connaissance du repliement global d'une protéine, bien qu'étant une étape importante dans l'analyse de la fonction, est souvent insuffisante pour les applications de type « structure based drug design ». Une analyse détaillée de la structure à haute résolution, révélant le détail intime des interactions à l'échelle atomique, est le plus souvent indispensable.

Listes des sociétés mentionnées dans ce rapport et engagées dans une activité liée au « Drug Design » (par ordre d'apparition).

	adresse	site web	commentaires
GNF	San Diego, USA	http://web.gnf.org	Novartis Research Fondation
Syrrx, Inc	San Diego, USA	http://www.takedasd.com	racheté par Takeda, 2005
Structural GenomiX	San Diego, USA	http://www.sgxpharma.com	
Amgen, Inc	Thousand Oaks, USA	http://www.amgen.com	a racheté Abgenix, 2006
Pharmacia	Cambridge, USA	http://www.pfizer.com	racheté par Pfizer
Cyclacel	New Jersey, USA	http://www.cyclacel.com	
Astex	Cambridge, Grande-Bretagne	http://www.astex-therapeutics.com	
Vertex	Cambridge, USA	http://www.vpharm.com	
Gen2X, Llc	San Diego, USA	http://www.gen2x.com	
Diversa	San Diego, USA	http://www.diversa.com	
Bioxtal	Mundolsheim, France	http://www.bioxtal.com/	

Références

Publications

Abagyan R, Totrov M: High-throughput docking for lead generation. *Curr Opin Chem Biol* 2001, 5:375-382.

Abola E, Kuhn P, Earnest T, Stevens RC: Automation of X-ray crystallography. *Nat Struct Biol* 2000, 7:973-977.

Adams PD, Grosse-Kunstleve RW: Recent developments in software for the automation of crystallographic macromolecular structure determination. *Curr Opin Struct Biol* 2000, 10:564-568.

Amit Das A, Vishal Prashar V, Mahale S, Serre L, Ferrer J-L, Hosur MV: Observation of a tetrahedral reaction intermediate and a low barrier hydrogen bond in HIV-1 protease-substrate complex. En préparation.

Anderson M, Beattie JF, Breault GA, Breed J, Byth KF, Culshaw JD, Ellston RP, Green S, Minshull CA, Norman RA et al.: Imidazo[1,2-a]pyridines: a potent and selective class of cyclindependentkinase inhibitors identified through structurebased hybridisation. *Bioorg Med Chem Lett* 2003, 13:3021-3026.

Aronov AM, Munagala NR, Ortiz De Montellano PR, Kuntz ID, Wang CC: Rational design of selective submicromolar inhibitors of *Tritrichomonas foetus* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* 2000, 39:4684-4691.

Babu YS, Chand P, Bantia S, Kotian P, Dehghani A, El-Kattan Y, Lin TH, Hutchison TL, Elliott AJ, Parker CD et al.: BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *J Med Chem* 2000, 43:3482-3486.

Blundell TL, Jhoti H, Abell C: High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nat Rev Drug Discov* 2002, 1:45-54.

Boehm HJ, Boehringer M, Bur D, Gmuender H, Huber W, Klaus W, Kostrewa D, Kuehne H, Luebbers T, Meunier-Keller N, Mueller F: Novel inhibitors of DNA gyrase: 3D structure based biased needle screening, hit validation by biophysical methods, and 3D guided optimization. A promising alternative to random screening. *J Med Chem* 2000, 43:2664-2674.

Borel F et al.: Design of a new inhibitor of the non mevalonate terpenoid pathway based on the structure of *Agrobacterium tumefaciens* 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase. En préparation.

Bressi JC, Verlinde CL, Aronov AM, Shaw ML, Shin SS, Nguyen LN, Suresh S, Buckner FS, Van Voorhis WC, Kuntz ID et al.: Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae via structure-based drug design. *J Med Chem* 2001, 44:2080-2093.

Card GL, Blasdel L, England BP, Zhang C, Suzuki Y, Gillette S, Fong D, Ibrahim PN, Artis DR, Bollag G et al.: A family of phosphodiesterase inhibitors discovered by cocrystallography and scaffoldbased drug design. *Nat Biotechnol* 2005, 23:201-207.

Charifson PS, Corkery JJ, Murcko MA, Walters WP: Consensus scoring: a method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *J Med Chem* 1999, 42:5100-5109.

Chen GS, Chang CS, Kan WM, Chang CL, Wang KC, Chern JW: Novel lead generation through hypothetical pharmacophore three-dimensional database searching: discovery of isoflavonoids as nonsteroidal inhibitors of rat 5 alpha-reductase. *J Med Chem* 2001, 44:3759-3763.

Chirgadze NY, Sall DJ, Briggs SL, Clawson DK, Zhang M, Smith GF, Schevitz RW: The crystal structures of human alpha-thrombin complexed with active site-directed diamino benzo[b]thiophene derivatives: a binding mode for a structurally novel class of inhibitors. *Protein Sci* 2000, 9:29-36.

Cuvillez C (député), Trégouët R (sénateur), Rapport de l'OPECST n° 273 (1999-2000), fait au nom de l'Office parlementaire d'évaluation des choix scient. tech., déposé le 21 mars 2000.

Debnath AK: Pharmacophore mapping of a series of 2,4-diamino-5-deazapteridine inhibitors of *Mycobacterium avium* complex dihydrofolate reductase. *J Med Chem* 2002, 45:41-53.

Doucet-Personeni C, Bentley PD, Fletcher RJ, Kinkaid A, Kryger G, Pirard B, Taylor A, Taylor R, Taylor J, Viner R et al.: A structure-based design approach to the development of novel, reversible AchE inhibitors. *J Med Chem* 2001, 44:3203-3215.

Ferrer J-L: Automated Data Processing on beamline FIP (BM30A) at ESRF. *Acta Cryst. D57* 2001:1752-1753.

Fieulaine S, Juillan-Binard C, Serero A, Giglione C, Meinnel T, Ferrer J-L: The crystal structure of mitochondrial (type 1A) peptide deformylase provides clear guidelines for the design of inhibitors specific for the bacterial forms. *J. Biol. Chem.* 2005, 280:42315-42324.

Frankel D: Structure based drug design and high throughput protein crystallisation. *DrugPlus International* 2005, 4:23-24.

Fretz H, Furet P, Garcia-Echeverria C, Schoepfer J, Rahuel J: Structure-based design of compounds inhibiting Grb2-SH2 mediated protein-protein interactions in signal transduction pathways. *Curr Pharm Des* 2000, 6:1777-1796.

Furet P, Zimmermann J, Capraro HG, Meyer T, Imbach P: Structurebased design of potent CDK1 inhibitors derived from olomoucine. *J Comput Aided Mol Des* 2000, 14:403-409.

Furet P, Imbach P, Furst P, Lang M, Noorani M, Zimmermann J, Garcia-Echeverria C: Modeling of the binding mode of a non-covalent inhibitor of the 20S proteasome. Application to structure-based analogue design. *Bioorg Med Chem Lett* 2001, 11:1321-1324.

Garman E: Cool data: quantity AND quality. *Acta Crystallogr D* 1999, 55:1641-1653.

Gary N: Rational vaccine design for emerging viruses , Celebration of Science Friday, October 28, 2005, The Salk Institute.

Ghosh AK, Bilcer G, Harwood C, Kawahama R, Shin D, Hussain KA, Hong L, Loy JA, Nguyen C, Koelsch G et al.: Structure-based design: potent inhibitors of human brain memapsin 2 (beta-secretase). *J Med Chem* 2001a, 44:2865-2868.

Ghosh S, Liu, X-P, Zheng, Y, Uckun FM: Rational design of potent and selective EGFR tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets* 2001b, 1:129-140.

Gilbert M, Albala JS: Accelerating code to function: sizing up the protein production line. *Curr Opin Chem Biol* 2002, 6:102-105.

Gill AL, Frederickson M, Cleasby A, Woodhead SJ, Carr MG, Woodhead AJ, Walker MT, Congreve MS, Devine LA, Tisi D et al.: Identification of novel p38alpha MAP kinase inhibitors using fragmentbased lead generation. *J Med Chem* 2005, 48:414-426.

Gray NS, Wodicka L, Thunnissen AM, Norman TC, Kwon S, Espinoza FH, Morgan DO, Barnes G, LeClerc S, Meijer L: Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* 1998, 281:533-538.

Goodwill KE, Tennant MG, Stevens RC: High-throughput X-ray crystallography for structure-based drug design. *Drug Discovery Today* 2001, 6 (Genomics Suppl):S113-118.

Greenspan PD, Clark KL, Tommasi RA, Cowen SD, McQuire LW, Farley DL, van Duzer JH, Goldberg RL, Zhou H, Du Z et al.: Identification of dipeptidyl nitriles as potent and selective inhibitors of cathepsin B through structure-based drug design. *J Med Chem* 2001, 44:4524-4534.

Gritsch S, Guccione S, Hoffmann R, Cambria A, Raciti G, Langer T: A 3D QSAR study of monoamino oxidase-B inhibitors using the chemical function based pharmacophore generation approach. *J Enzyme Inhib* 2001, 16:199-215.

Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V: Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3:950-964.

Grzybowski BA, Ishchenko AV, Kim CY, Topalov G, Chapman R, Christianson DW, Whitesides GM, Shakhnovich EI: Combinatorial computational method gives new picomolar ligands for a known enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:1270-1273.

Guilloteau J-P, Mathieu M, Giglione C, Blanc V, Dupuy A, Chevrier M, Gil P, Famechon A, Meinel T, Mikol V: The Crystal structures of four peptide deformylases bound to the antibiotic actinonin reveal two distinct types: A platform for the structure-based design of antibacterial agents. *J Molec*

Biol 2002, 320:951-962.

Guss JM, Merritt EA, Phizackerley RP, Hedman B, Murata M, Hodgson KO, Freeman HC: Phase determination by multiplewavelength X-ray diffraction: crystal structure of a basic "blue" copper protein from cucumbers. *Science* 1988, 241:806-811.

Hajduk PJ, Boyd S, Nettesheim D, Nienaber V, Severin J, Smith R, Davidson D, Rockway T, Fesik SW: Identification of novel inhibitors of urokinase via NMR-based screening. *J Med Chem* 2000, 43:3862-3866.

Harter WG, Albrect H, Brady K, Caprathe B, Dunbar J, Gilmore J, Hays S, Kostlan CR, Lunney B, Walker N: The design and synthesis of sulfonamides as caspase-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, 14:809-812.

Heinemann U: The Berlin protein structure factory initiative: a technology-oriented approach to structural genomics. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2001, 34:101-121.

Hendrickson WA, Horton JR, LeMaster DM: Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of threedimensional structure. *EMBO J* 1990, 9:1665-1672.

Hillisch A, Peters O, Kosemund D, Muller G, Walter A, Schneider B, Reddersen G, Elger W, Fritzscheier KH: Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design. *Mol Endocrinol* 2004, 18:1599-1609.

Honma T, Hayashi K, Aoyama T, Hashimoto N, Machida T, Fukasawa K, Iwama T, Ikeura C, Ikuta M, Suzuki-Takahashi I et al.: Structure-based generation of a new class of potent Cdk4 inhibitors: new de novo design strategy and library design. *J Med Chem* 2001, 44:4615-4627.

von Itzstein M, Wu W-Y, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin, B, Phan TV, Smythe ML, White HF, Oliver SW, Colman PM et al.: Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* 1993, 363:418-423.

Iversen LF, Andersen HS, Moller KB, Olsen OH, Peters GH, Branner S, Mortensen SB, Hansen TK, Lau J, Ge Y et al.: Steric hindrance as a basis for structure-based design of selective inhibitors of protein-tyrosine phosphatases. *Biochem* 2001, 40:14812-14820.

Iwata Y, Naito S, Itai A, Miyamoto S: Protein structure-based de novo design and synthesis of aldose reductase inhibitors. *Drug Des Discov* 2001, 17:349-359.

Jacquamet L, Ohana J, Joly J, Borel F, Pirocchi M, Charrault P, Bertoni A, Israel-Gouy P, Carpentier P, Kozielski F, D. Blot D, Ferrer J-L: Automated analysis of vapor diffusion crystallization drops with an X-ray beam". *Structure* 2004, 12:1219-1225.

Jeong KJ, Mabry R, Georgiou G: Avimers hold their own. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23:1493-1494.

Jurisica I, Rogers P, Glasgow JI, Fortier S, Luft JR, Wolfley JR, Bianca MA, Weeks DR, DeTitta GT: Intelligent decision support for protein crystal growth. *IBM Systems J* 2001, 40:394-409.

Kaldor SW, Kalish VJ, Davies JF II, Shetty BV, Fritz JE, Appelt K, Burgess JA, Campanale KM, Chirgadze NY, Clawson DK, Dressman BA, Hatch SD, Khalil DA, Kosa MB, Lubbehusen PP, Muesing MA, Patick AK, Reich SH, Su KS, Tatlock JH: Viracept (nelfinavir mesylate, AG1343): a potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease. *J Med Chem* 1997, 40:3979-3985.

Karki RG, Kulkarni VM: A feature based pharmacophore for *Candida albicans* myristoylCoA: protein N-myristoyltransferase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2001, 36:147-163.

Katunuma N, Murata E, Kakegawa H, Matsui A, Tsuzuki H, Tsuge H, Turk D, Turk V, Fukushima M, Tada Y, Asao T: Structure based development of novel specific inhibitors for cathepsin L and cathepsin S in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 1999, 458:6-10.

Kenwood M, Landon M, Laszlo L, Mayer RJ: Heat Shock proteins, molecular chaperones and prion encephalopathies. *Cell Stress and Chaperones* 1996, 1:18-22.

Kim EE, Baker CT, Dwyer MD, Murcko MA, Rao BG, Tung RD, Navia MA: Crystal structure of HIV1 protease in complex with VX-478, a potent and orally bioavailable inhibitor of the enzyme. *J Am Chem Soc* 1995, 117:1181-1182.

Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu HT, Zhang LJ, Swaminathan S, Bischofberger N, Chen MS, Mendel DB, Tai CY et al.: Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J Am Chem Soc* 1997, 119:681-690.

Klebe G: Recent developments in structure-based drug design. *J Mol Med* 2000, 78:269-281.

Kuhn P, Wilson K, Patch MG and Stevens RC: The genesis of high-throughput structure-based drug discovery using protein crystallography. *Curr Opin Chem Biol.* 2002, 6:704-710.

Kuzuyama T, Noel JP, Richard SB: Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* 2005, 435:983-987.

Lesley SA: High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world. *Protein Expr Purif* 2001, 22:159-164.

Li Q, Claiborne A, Li T, Hasvold L, Stoll VS, Muchmore S, Jakob CG, Gu W, Cohen J, Hutchins C et al.: Design, synthesis, and activity of 4-quinolone and pyridone compounds as nonthiol-containing farnesyltransferase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, 14:5367-5370.

Liao D, Basarab GS, Gatenby AA, Valent B, Jordan DB: Structures of trihydroxynaphthalene reductase-fungicide complexes: implications for structure-based design and catalysis. *Structure* 2001, 9:19-27.

Liebeschuetz JW, Jones SD, Morgan PJ, Murray CW, Rimmer AD, Roscoe JM, Waszkowycz B, Welsh PM, Wylie WA, Young SC et al.: PRO_SELECT: combining structure-based drug design and arraybased chemistry for rapid lead discovery. 2. The development of a series of highly potent and selective factor Xa inhibitors. *J Med Chem* 2002, 45:1221-1232.

Long A: Drug discovery tutorial: high-throughput protein crystallization. *Gen Eng News* 2001, 21:34,62.

Luft JR, Wolfley J, Jurisica I, Glasgow J, Fortier S, DeTitta GT: Macromolecular crystallization in a high throughput laboratory the search phase. *J Cryst Growth* 2001, 232:591-595.

Maignan S, Mikol V: The use of 3D structural data in the design of specific factor Xa inhibitors. *Curr Top Med Chem* 2001, 1:161-174.

Mamou Y: Les laboratoires européens entament l'hégémonie de leurs rivaux américains. *Le Monde* 11/03/2006.

Manas ES, Unwalla RJ, Xu ZB, Malamas MS, Miller CP, Harris HA, Hsiao C, Akopian T, Hum WT, Malakian K et al.: Structure-based design of estrogen receptor-beta selective ligands. *J Am Chem Soc* 2004, 126:15106-15119.

McInnes C, Wang S, Anderson S, O'Boyle J, Jackson W, Kontopidis G, Meades C, Mezna M, Thomas M, Wood G et al.: Structural determinants of CDK4 inhibition and design of selective ATP competitive inhibitors. *Chem Biol* 2004, 11:525-534.

Mihelich ED, Schevitz RW: Structure-based design of a new class of anti-inflammatory drugs: secretory phospholipase A(2) inhibitors, SPI. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1441:223-228.

Mitchell, P: Could bank loans solve Europe's biotech financing slump? *Nat. Biotechnol.* (2005), 23:1459-1460.

Moller NPH, Andersen HS, Jeppesen CB, Iversen LF: Structurebased design of protein tyrosine phosphatase inhibitors. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 167. Edited by Pinna LA, Cohen TW. Springer-Verlag; 2005:215-262.

Muchmore SW, Olson J, Jones R, Pan J, Blum M, Greer J, Merrick SM, Magdalinos P, Nienaber VL: Automated crystal mounting and data collection for protein crystallography. *Struct Fold Des* 2000, 8:R243-R246.

Mueller U, Nyarsik L, Horn M, Rauth H, Przewieslik T, Saenger W, Lehrach H, Eickhoff H: Development of a technology for 708 Analytical techniques automation and miniaturization of protein crystallization. *J Biotechnol* 2001, 85:7-14.

Nicolotti O, Pellegrini-Calace M, Carrieri A, Altomare C, Centeno NB, Sanz F, Carotti A: Neuronal nicotinic receptor agonists: a multiapproach development of the pharmacophore. *J Comput Aided Mol Des* 2001, 15:859-872.

Nienaber VL, Richardson PL, Klighofer V, Bouska JJ, Giranda VL, Greer J: Discovering novel ligands for macromolecules using X-ray crystallographic screening. *Nat Biotechnol* 2000,18:1105-1108.

Noble ME, Endicott JA, Johnson LN: Protein kinase inhibitors: insights into drug design from

structure. *Science* 2004, 303:1800-1805.

Ohana J, Jacquamet L, Joly J, Bertoni A, Taunier P, Michel L, Charrault P, Pirocchi M, Carpentier P, Borel F, Kahn R, Ferrer J-L : CATS: a Cryogenic Automated Transfer System installed on the beamline FIP at ESRF. *J Appl Cryst* 2004, 37:72-77.

Palomer A, Pascual J, Cabre M, Borra's L, Gonzalez G, Aparici M, Carabaza A, Cabre F, Garcija ML, Mauleon D: Structure-based design of cyclooxygenase-2 selectivity into ketoprofen. *Bioorg Med Chem Lett* 2002, 12:533-537.

Parlow JJ, Case BL, Dice TA, Fenton RL, Hayes MJ, Jones DE, Neumann WL, Wood RS, Lachance RM, Girard TJ et al.: Design, parallel synthesis, and crystal structures of pyrazinone antithrombotics as selective inhibitors of the tissue factor VIIa complex. *J Med Chem* 2003, 46:4050-4062.

Perrakis A, Morris R, Lamzin VS: Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol* 1999, 6:458-463.

Pierce AC, ter Haar E, Binch HM, Kay DP, Patel SR, Li P: CH...O and CH...N hydrogen bonds in ligand design: a novel quinazolin-4-ylthiazol-2-ylamine protein kinase inhibitor. *J Med Chem* 2005, 48:1278-1281.

Pratt DJ, Endicott JA, Noble ME: The role of structure in kinasetargeted inhibitor design. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2004, 7:428-436.

Rahuel J, Rasetti V, Maibaum J, Rueger H, Goschke R, Cohen NC, Stutz S, Cumin F, Fuhrer W, Wood JM, Grutter MG: Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. *Chem Biol* 2000, 7:493-504.

Reich SH, Johnson T, Wallace MB, Kephart SE, Fuhrman SA, Worland ST, Matthews DA, Hendrickson TF, Chan F, Meador J III et al.: Substituted benzamide inhibitors of human rhinovirus 3C protease: structure-based design, synthesis, and biological evaluation. *J Med Chem* 2000, 43:1670-1683.

Sali A, Blundell TL: Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 1993, 234:779-815.

Santarsiero BD, Yegian DT, Lee CC, Spraggon G, Gu J, Scheibe D, Uber DC, Cornell EW, Nordmeyer RA, Kolbe WF et al.: An approach to rapid protein crystallization using nanodroplets. *J Appl Crystallogr* 2002, 35:278-281.

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J: Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000, 289:1938-1942.

Schroder J, Henke A, Wenzel H, Brandstetter H, Stammer HG, Stammer A, Pfeiffer WD, Tschesche H: Structure-based design and synthesis of potent matrix metalloproteinase inhibitors derived from a 6H-1,3,4-thiadiazine scaffold. *J Med Chem* 2001, 44:3231-3243.

Shahripour AB, Plummer MS, Lunney EA, Albrecht HP, Hays SJ, Kostlan CR, Sawyer TK, Walker NP, Brady KD, Allen HJ et al.: Structure-based design of nonpeptide inhibitors of interleukin-1beta converting enzyme (ICE, caspase-1). *Bioorg Med Chem* 2002, 10:31-40.

Shakespeare W, Yang M, Bohacek R, Cerasoli F, Stebbins K, Sundaramoorthi R, Azimioara M, Vu C, Pradeepan S, Metcalf C III et al.: Structure-based design of an osteoclast-selective, nonpeptide src homology 2 inhibitor with in vivo antiresorptive activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:9373-9378.

Snyder DA, Chen Y, Denissova NG, Acton T, Aramini JM, Ciano M, Karlin R, Liu J, Manor P, Rajan PA, Rossi P, Swapna GV, Xiao R, Rost B, Hunt J, Montelione GT: Comparisons of NMR spectral quality and success in crystallization demonstrate that NMR and X-ray crystallography are complementary methods for small protein structure determination. *J Am Chem Soc.* 2005, 127:16505-16511.

Soper DL, Milbank JB, Mieling GE, Dirr MJ, Kende AS, Cooper R, Jee WS, Yao W, Chen JL, Bodman M et al.: Synthesis and biological evaluation of prostaglandin-F alkylphosphinic acid derivatives as bone anabolic agents for the treatment of osteoporosis. *J Med Chem* 2001, 44:4157-4169.

South MS, Case BL, Wood RS, Jones DE, Hayes MJ, Girard TJ, Lachance RM, Nicholson NS, Clare M, Stevens AM et al.: Structure-based drug design of pyrazinone antithrombotics as selective inhibitors of the tissue factor VIIa complex. *Bioorg Med Chem Lett* 2003, 13:2319-2325.

Stachel SJ, Coburn CA, Steele TG, Jones KG, Loutzenhiser EF, Gregro AR, Rajapakse HA, Lai MT, Crouthamel MC, Xu M et al.: Structure-based design of potent and selective cellpermeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1). *J Med Chem* 2004, 47:6447-6450.

Stevens RC: Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Struct Fold Des* 2000a, 8:R177-R185.

Stevens RC: High-throughput protein crystallization. *Curr Opin Struct Biol* 2000b, 10:558-563.

Stoll V, Stewart KD, Maring CJ, Muchmore S, Giranda V, Gu Y-gY, Wang G, Chen Y, Sun M, Zhao C et al.: Influenza neuraminidase inhibitors: structure-based design of a novel inhibitor series. *Biochemistry* 2003, 42:718-727.

Surleraux DL, de Kock HA, Verschueren WG, Pille GM, Maes LJ, Peeters A, Vendeville S, De Meyer S, Azijn H, Pauwels R et al.: Design of HIV-1 protease inhibitors active on multidrugresistant virus. *J Med Chem* 2005, 48:1965-1973.

Szczepankiewicz BG, Liu G, Hajduk PJ, Abad-Zapatero C, Pei ZH, Xin ZL, Lubben TH, Trevillyan JM, Stashko MA, Ballaron SJ et al.: Discovery of a potent, selective protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor using a linked-fragment strategy. *J Am Chem Soc* 2003, 125:4087-4096.

Sznajdman ML, Haffner CD, Maloney PR, Fivush A, Chao E, Goreham D, Sierra ML, LeGrumelec C, Haffner CD, Lenhard JM, Miller AB, McDougald DL, Dwornik K, Ittoop OR, Gampe RT Jr, Xu HE, Blanchard S, Montana VG et al.: Structure-based design of potent retinoid X receptor alpha

agonists. *J Med Chem* 2004, 47:2010-2029.

Terasaka T, Kinoshita T, Kuno M, Nakanishi I: A highly potent non-nucleoside adenosine deaminase inhibitor: efficient drug discovery by intentional lead hybridization. *J Am Chem Soc* 2004a, 126:34-35.

Terasaka T, Kinoshita T, Kuno M, Seki N, Tanaka K, Nakanishi I: Structure-based design, synthesis, and structureactivity relationship studies of novel non-nucleoside adenosine deaminase inhibitors. *J Med Chem* 2004b, 47:3730-3743.

Terasaka T, Okumura H, Tsuji K, Kato T, Nakanishi I, Kinoshita T, Kato Y, Kuno M, Seki N, Naoe Y et al.: Structure-based design and synthesis of non-nucleoside, potent, and orally bioavailable adenosine deaminase inhibitors. *J Med Chem* 2004c, 47:2728-2731.

Terwilliger TC, Berendzen J: Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallographica D55* 1999:849-861.

Terwilliger TC: Maximum likelihood density modification. *Acta Cryst. D56* 2000:965-972.

Turkson J, Jove R: STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 2000, 19:6613-6626.

Verner E, Katz BA, Spencer JR, Allen D, Hataye J, Hruzewicz W, Hui HC, Kolesnikov A, Li Y, Luong C et al.: Development of serine protease inhibitors displaying a multicentered short (2.3 Å...) hydrogen bond binding mode: inhibitors of urokinase-type plasminogen activator and factor Xa. *J Med Chem* 2001, 44:2753-2771.

Voet D, Voet JG. *Biochimie. De Boeck Université*, 1998. Chapitres 7, 27, 29 & 33:140-180, 830, 946, 1100-1150.

Wang JL, Liu D, Zhang ZJ, Shan S, Han X, Srinivasula SM, Croce CM, Alnemri ES, Huang Z: Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:7124-7129.

Webber SE, Bleckman TM, Attard J, Deal JG, Kathardekar V, Welsh KM, Webber S, Janson CA, Matthews DA et al.: Design of thymidylate synthase inhibitors using protein crystal structures: the synthesis and biological evaluation of a novel class of 5-substituted quinazolines. *J Med Chem* 1993, 36:733-746.

Williams SP, Kuyper LF, Pearce KH: Recent applications of protein crystallography and structure-guided drug design. *Curr Opin Chem Biol.* 2005, 9:371-80.

Wlodawer A, Vondrasek J: Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1998, 27:249-284.

Xu HE, Montana VG et al.: Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)—synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2003, 13:1517-1521.

Yadav MK, Gerdts CJ, Sanishvili R, Smith WW, Roach LS, Ismagilov RF, Kuhn P, Stevens RC: *In situ* data collection and structure refinement from microcapillary protein crystallization. J. Appl. Cryst. 2005, 38:900-905.

Yee AA, Savchenko A, Ignachenko A, Lukin J, Xu X, Skarina T, Evdokimova E, Liu CS, Semesi A, Guido V, Edwards AM, Arrowsmith CH: NMR and X-ray crystallography, complementary tools in structural proteomics of small proteins. J Am Chem Soc. 2005, 127:16512-16517.

Young WB, Kolesnikov A, Rai R, Sprengeler PA, Leahy EM, Shrader WD, Sangalang J, Burgess-Henry J, Spencer J, Elrod K, Cregar L: Optimization of a screening lead for factor VIIa/TF. Bioorg Med Chem Lett 2001, 11:2253-2256.

Zhu X, Kim JL, Newcomb JR, Rose PE, Stover DR, Toledo LM, Zhao H, Morgenstern KA: Structural analysis of the lymphocytespecific kinase Lck in complex with non-selective and Src family selective kinase inhibitors. Structure 1999, 7:651-661.

Entretiens

-L. Bochorberg. Fondateur de BioTeaming (San Diego, USA). Entretien du 4 mai 2006.

-Dr. A. Kreuzsch. Responsable du Groupe de Biochimie Structurale, GNF (La Jolla, USA; <http://web.gnf.org/scientific/protein.html>). Entretien du 2 mai 2006.

-Dr. S. Richard. Président/Fondateur de Gen2X LLC (www.gen2x.com), Fondateur de « French BioBeach » (<http://frenchbiobeach.org>), chercheur au Salk Institute (La Jolla, USA), Consultant Biotech local auprès de l'ambassade de France aux USA. Entretien du 12 mai 2006.