

20

BIOMOLÉCULES : STRUCTURE ET MÉCANISMES D'ACTION

INTRODUCTION

DANIEL MANSUY

Président de la section

BERNARD BADET

Rapporteur

Pierre Albrecht

Jean-Claude Beloeil

Agnès Delmas

Bruno Figadere

Thérèse Garestier

Michèle Guyot

Jean-Claude Jacquesy

André Jeunet

Thierry Jouenne

Jeanine Laur

Marielle Lemaire

Jean Levy

Claude Monneret

Joël Poncet

Daniel Scherman

Henri Serne

André Tartar

Claude Thal

Michel Van Der Rest

Les objectifs majeurs des chercheurs de la section 20 sont de déterminer la nature puis la structure des différents acteurs impliqués dans une activité biologique donnée (macromolécules biologiques comme les protéines, les acides nucléiques, les lipides ou les sucres, mais aussi biomolécules de plus petite taille comme les médiateurs ou les molécules signal), de comprendre leurs interactions et/ou leurs réactivités qui vont conduire à l'activité biologique, et surtout de **bâtir des outils pour contrôler leur fonctionnement**. Cette démarche doit conduire à de nouveaux médicaments et produits phytosanitaires, ainsi qu'à de nouveaux catalyseurs et matériaux biologiques ou chimiques inspirés du vivant.

La liste ci-dessous décrit de façon très schématique les différentes étapes qui vont de la mise en évidence d'une nouvelle activité biologique ou, plus simplement, des différents acteurs nécessaires à une activité biologique connue, à la construction rationnelle d'outils chimiques ou biologiques pour la contrôler.

1) Étude des systèmes biologiques (microorganismes, plantes, animaux).

1') Analyse des génomes.

2) Mise en évidence de nouvelles activités biologiques.

- 3) Identification des acteurs moléculaires & macromoléculaires mis en jeu dans ces activités.
- 4) Production des molécules et macromolécules.
- 5) Études structurales.
- 6) Réactivité et fonctions.
- 7) Outils de contrôle de la fonction (produits naturels, synthèse organique, ...)
- 8) Optimisation de l'activité.
- 9) Construction de systèmes artificiels.

Les étapes 1 et 2 concernent la mise en évidence d'activités biologiques, éventuellement nouvelles, à partir de l'étude des systèmes vivants menée par les biologistes. L'étape 3 résulte de l'analyse du système responsable de ces activités avec l'identification des différents acteurs (molécules et macromolécules) mis en jeu. L'étape 4 vise à obtenir les molécules ou macromolécules en question à l'état pur et en quantités suffisantes pour mener à bien la détermination de leur structure tridimensionnelle (étape 5) et l'étude de leur réactivité et/ou de leur fonction (étape 6). L'étape 7 consiste à trouver de nouvelles molécules capables d'agir de façon sélective sur un ou plusieurs des acteurs de l'activité biologique afin de la contrôler. Après une longue optimisation, certaines d'entre elles pourront devenir des médicaments ou des composés utilisables dans le domaine phytosanitaire. Une autre application de la connaissance des acteurs d'une activité biologique est l'utilisation de certains d'entre eux en biotechnologie, après en avoir éventuellement optimisé l'activité par les méthodes de la chimie ou de la biologie moléculaire (étape 8). Dans le cas des enzymes, ceci peut aboutir à de nouveaux catalyseurs utilisables non seulement dans des processus biotechnologiques, mais aussi en chimie fine et/ou industrielle. Finalement, la stratégie suivie dans l'étape 9 est d'utiliser notre connaissance détaillée des acteurs d'une activité biologique pour synthétiser des systèmes chimiques, dits biomimétiques ou bioinspirés, capables de reproduire cette activité (ou cette fonction). Ces systèmes artificiels nés de l'imagination du chimiste peuvent être de nouveaux catalyseurs ou de nouveaux matériaux (polymères utilisables pour des prothèses ou nouveaux types de conducteurs moléculaires par exemple).

Cette présentation des activités de la section 20 est bien sûr schématique et sans doute réduc-

tionniste. Mais il est clair qu'il ne suffit pas de travailler sur les cibles biologiques isolées et qu'il est nécessaire de les étudier dans des environnements plus complexes avec un niveau d'intégration plus proche de leur fonctionnement *in vivo* (organite cellulaire, culture de cellules, organes perfusés...). De tels systèmes plus complexes contenant la cible sont d'ailleurs utilisés pour la découverte de nouvelles molécules effectrices, l'idéal étant de pouvoir travailler simultanément sur la cible isolée et sur des systèmes complexes la contenant *in vitro* et *in vivo*. De même, certains systèmes biologiques complexes (microorganismes par exemple) sont utilisés en tant que tels en biotechnologie et/ou en catalyse sans qu'il soit nécessaire, au départ tout au moins, d'en connaître le composant actif.

Toutefois, le schéma ci-dessus a l'avantage de permettre un exposé simple de la problématique scientifique de la section 20. Il est clair que ce plan ainsi que bon nombre des activités décrites sont très proches de ceux qui figurent dans le rapport de conjoncture de la section jumelle, la section 21. Les objets d'étude, les biomolécules, sont communs aux deux sections. Un certain nombre de façons d'aborder leur étude sont aussi très analogues ; toutefois la culture "chimique" de la majorité des chercheurs de la section 20 conduit souvent à des approches différentes des problèmes. Cette culture rend le chimiste particulièrement apte à une analyse détaillée des macromolécules biologiques **au niveau moléculaire et/ou atomique**, à la réalisation d'**études mécanistiques portant sur la réactivité** (formation et rupture de liaisons covalentes), et surtout à **la synthèse de molécules ou macromolécules nouvelles**, qu'il s'agisse d'effecteurs de cibles biologiques ou de nouveaux catalyseurs ou matériaux inspirés par le vivant. Ceci conduirait à positionner les recherches de la section 20 plutôt au niveau des étapes 5 à 9 du plan ci-dessus. En fait, ce positionnement a nettement évolué au cours de ces dix dernières années et devrait encore beaucoup changer dans les années qui viennent. Ceci est dû aux progrès spectaculaires réalisés récemment à la fois **en biologie moléculaire** (permettant, par clonage et expression hétérologue, de très vite déterminer la nature des protéines impliquées dans une activité biologique et de les produire en quantités importantes) et **dans le domaine de la détermination des structures et de l'étude de la réactivité des**

biomolécules. Un grand nombre de biomolécules sont dès lors passées de l'état de "boîtes noires", très difficiles à isoler, à l'état d'outils disponibles et analysables par de nombreuses techniques spectroscopiques. Il faut d'ailleurs noter que le décryptage des génomes (étape 1') va conduire à une multiplication de nouvelles biomolécules qui seront disponibles et dont il faudra préciser les fonctions.

La période actuelle est donc particulièrement propice à l'**intervention des chimistes et des physiciens dans l'étude des molécules du vivant**. Leur participation de plus en plus importante dans la démarche du plan ci-dessus tient en grande partie à l'accès facilité aux cibles biologiques et aux concepts et techniques de la biologie moléculaire. Cette participation est d'autant plus nécessaire que nombre d'équipes de biochimistes, spécialisées en enzymologie par exemple, se sont progressivement orientées récemment vers l'étude de systèmes biologiques plus complexes.

Les étapes 1 et 2 de notre liste ne concernaient jusqu'alors que très peu les chercheurs de la section 20. En ce qui concerne l'étape 1', leur implication est faible et se situe au niveau de la mise au point de nouveaux outils de séquençage des gènes (outils de coupure sélective des ADN par exemple). Leur implication au niveau de l'étape 3 était aussi relativement faible ces dernières années et concernait surtout la **mise en évidence de nouvelles molécules de petite taille intervenant dans certaines activités biologiques** (médiators, molécules signal comme NO ou l'éthylène). On peut citer à cet égard la découverte des facteurs *Nod* impliqués dans la transmission à certaines plantes de la capacité à réduire l'azote en ammoniac. En effet, la mise en évidence de ces molécules "signal" fait intervenir à la fois un savoir-faire analytique (détection de composés à l'état de traces par des techniques sophistiquées de spectrométrie de masse par exemple) et une expertise en synthèse pour préparer la molécule (et ses dérivés) et établir de façon non ambiguë sa structure. De façon plus générale, il est clair que les chercheurs de la section interviendront de plus en plus dans l'identification des acteurs biomacromoléculaires (protéines en particulier) mis en jeu dans une activité biologique donnée pour les raisons indiquées plus haut.

En ce qui concerne l'étape 4, des problèmes subsistent pour la production de protéines en grandes quantités ; même si les méthodes sont maintenant accessibles, trop peu d'équipes sont armées pour attaquer efficacement ce problème qui inclut aussi le marquage isotopique des protéines. Pour cette étape aussi, l'implication des chimistes devrait augmenter à la fois sur l'expression des protéines et sur la synthèse des ARN qui représente un défi et qui est peu développée en France.

Avec les étapes 5 à 9, on arrive à des domaines où la section est très fortement représentée, même si ceci est relativement récent. Les étapes 7 et 9 concernent l'élaboration d'outils chimiques pour le vivant, un domaine majeur de la section 20 depuis de nombreuses années. Ceci devrait rester vrai pour les années à venir avec, dans beaucoup de cas, une approche plus raisonnée compte tenu d'une connaissance plus détaillée des cibles biologiques.

Le plan qui suit correspond à l'enchaînement des étapes 5, 6, 7, 8 et 9 pour lesquelles l'implication de la section est très importante.

1 - STRUCTURE ET DYNAMIQUE DES BIOMOLÉCULES

1. 1 BIOMOLÉCULES ET BIOMACROMOLÉCULES

Ces dix dernières années ont vu un développement sans précédent de nos connaissances sur les structures tridimensionnelles (3D) des macromolécules biologiques comme les protéines et les acides nucléiques, grâce à des développements technologiques considérables en radiocristallographie et en RMN. L'étude structurale des biomacromolécules est l'objet principal de ce chapitre ; il ne faut toutefois pas oublier que la découverte et l'établissement de la **structure de biomolécules**

plus petites jouant aussi des rôles majeurs au niveau des organismes vivants (comme les hormones, les médiateurs ou, de façon plus générale, les molécules “signal”) sont loin d’être terminés.

L'exemple récent de la découverte de NO comme molécule “signal” jouant un rôle important au niveau des systèmes cardiovasculaire, immunitaire et nerveux central illustre bien le chemin qui reste à parcourir. La recherche de nouveaux “médiateurs”, soit à partir de l'étude des schémas de biosynthèse, soit à partir de l'étude des fonctions biologiques, est bien sûr à encourager. Cela concerne également la découverte de nouvelles biomolécules révélées par l'étude de biomarqueurs fossiles présents dans les échantillons géologiques (sédiments, sols, pétroles). Ainsi la découverte des hopanoïdes bactériens et l'étude de leur rôle dans l'édification des membranes a récemment conduit à la mise en évidence d'une nouvelle voie générale de biosynthèse des polyterpènes. La participation du chimiste à cet effort de recherche est importante à la fois au niveau de la détection (mise au point des techniques d'analyse de traces), de la détermination de structure (techniques spectroscopiques et synthèse), des études de réactivité et de la synthèse d'analogues. Il reste beaucoup à faire dans le domaine des médiateurs peptidiques et lipidiques (en plus des prostaglandines, leucotriènes et autres lipoxines), et peut-être aussi à propos de cette nouvelle classe de “médiateurs” très simples au niveau moléculaire qui passent sans problème les barrières cellulaires, comme NO, CO ou l'éthylène. Les médiateurs à base de sucres restent aussi source de découverte. La mise en évidence des éliciteurs oligosaccharidiques (facteurs *Nod*) produits par les bactéries symbiotiques des plantes pour la réduction de l'azote en ammoniac constitue un bel exemple de réussite d'une collaboration entre biologistes moléculaires et chimistes français.

En ce qui concerne les macromolécules biologiques, les progrès technologiques récents et à venir laissent penser que d'ici l'an 2000, plus de 10 000 structures de protéines seront disponibles. Plus généralement, les structures d'un grand nombre d'acides nucléiques ainsi que de complexes protéine-protéine et acide nucléique-protéine seront disponibles au cours de la prochaine décennie. Ce développement est à mettre en paral-

lèle avec les progrès réalisés dans le décryptage des génomes ; ceux de plusieurs bactéries, levures et plantes sont déterminés ou en bonne voie de l'être, et celui du génome humain a fait des progrès remarquables. Tout cela conduit à une accumulation de résultats sur tous les fronts qu'il faut apprendre à gérer et à exploiter.

1. 2 LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA STRUCTURE ET DE LA DYNAMIQUE DES BIOMACROMOLÉCULES

L'analyse structurale a bénéficié de développements technologiques importants dans le domaine de la **radiocristallographie** avec, en particulier, l'utilisation des synchrotrons de troisième génération, et de la **cristallogénèse**. L'utilisation du rayonnement synchrotron à l'ESRF de Grenoble offre des possibilités remarquables : très grande rapidité d'acquisition, utilisation de cristaux plus petits, meilleure résolution (jusqu'à 1,2Å) et accès à des études de dynamique et de cinétique. Le projet SOLEIL (petit synchrotron qui doit remplacer LURE) devrait être complémentaire de l'ESRF, avec des possibilités supplémentaires intéressantes dans le domaine de l'infra-rouge. La **cristallisation et la structure des systèmes membranaires** (en particulier protéines membranaires) restent des problèmes difficiles malgré les réussites spectaculaires concernant le système photosynthétique et, plus récemment, la résolution de la structure de deux cytochromes-oxydases. Il convient donc de soutenir au niveau français des projets de **cristallisation et de structure des protéines membranaires**, comme c'est le cas dans beaucoup d'autres pays.

L'analyse structurale des biomacromolécules a aussi beaucoup bénéficié des **progrès de la RMN**, puisque l'utilisation d'aimants de plus en plus puissants a permis de résoudre les structures 3D en solution de protéines de masse moléculaire de 20 à 30 kDa. Son domaine d'application semble limité aux macromolécules de masse inférieure à 40 kDa ; il faut toutefois suivre les possibilités offertes par l'utilisation de très hauts champs (fréquence ^1H de l'ordre de 1000 MHz), des cryosondes ou des gaz hyperpolarisés (Xe, He). L'utilisation de la **RMN du**

solide pourrait permettre l'étude de systèmes de taille supérieure, en particulier après marquage isotopique adéquat. À cet égard, il convient de signaler que, d'une façon générale, les **techniques de marquage isotopique des biomacromolécules** sont encore insuffisamment développées par manque de moyens matériels. Elles sont pourtant indispensables pour la plupart des études de radiocristallographie (problème du phasage) et de RMN, en particulier pour les études de dynamique et de cinétique.

Un certain nombre de problèmes structuraux associés à l'étude de très gros systèmes biologiques nécessitent l'utilisation de stratégies complémentaires comme la **microscopie électronique** ou à **champ proche**, ainsi que les **techniques de visualisation *in situ***, notamment par fluorescence.

La RMN *in vivo* a connu un grand succès en permettant, entre autres, une visualisation du fonctionnement du cerveau dans des conditions non invasives. L'objectif actuel est l'introduction d'une dimension chimique, c'est-à-dire l'identification et le dosage des métabolites *in vivo*.

La **spectrométrie de masse** permet, depuis quelques années et grâce à l'utilisation de technologies nouvelles d'ionisation, l'analyse de molécules de haute masse moléculaire (plusieurs centaines de kDaltons) ainsi que de leurs complexes avec des effecteurs ou avec d'autres macromolécules ; elle est devenue l'une des techniques majeures d'analyse en biologie structurale. Son utilisation pour l'identification d'effecteurs de petite taille à l'échelle de la nano-, voire de la picomole, est aussi très importante. Il faut maintenir le niveau d'équipement des laboratoires spécialisés et faciliter le développement des techniques nouvelles (analyseurs à confinement ionique et résonance cyclotronique, analyseurs tandem et hybrides) faisant appel à des concepts qui sont loin d'avoir été exploités à leurs limites.

Les **méthodes théoriques de modélisation et de dynamique moléculaires** constituent depuis peu un support essentiel de la conceptualisation des biomacromolécules. Elles sont indispensables pour la construction et le raffinement des modèles de structure à partir des données expérimentales de

radiocristallographie et de RMN. Elles sont très précieuses dans la **prévision des structures 3D** de macromolécules pour lesquelles de telles données n'existent pas et jouent un rôle majeur dans les simulations de leur dynamique moléculaire. Des progrès importants restent à réaliser pour la prise en compte des effets de l'environnement (aqueux et membranaires) de ces macromolécules, et pour l'augmentation de l'échelle de temps des simulations dynamiques (au-delà de la nanoseconde). Ce type de techniques doit apporter beaucoup à notre compréhension du **repliement des protéines**, de la dynamique structurale des ADN et des ARN, et de la formation de complexes entre macromolécules. Il serait utile d'intéresser à ces approches des physiciens et des informaticiens qui peuvent apporter des contributions importantes tant au niveau des concepts que des méthodes.

La **bioinformatique**, avec l'exploitation des banques de structures et des banques de séquences des biomacromolécules, va devenir un outil majeur d'accès à l'information. L'exploitation des banques de structure des protéines permet de jeter les bases d'une **taxonomie structurale des protéines** (ou de leurs motifs structuraux), outil précieux pour identifier des fonctions et reconnaître des filiations phylogéniques. Pour développer efficacement ce type d'outils, il importe de renforcer la coordination des bioinformaticiens avec les biochimistes et les généticiens.

1. 3 THÉMATIQUES

À côté de la détermination de nouvelles structures de protéines solubles et d'acides nucléiques qui va se poursuivre dans les années à venir, la détermination de structures plus complexes est un défi majeur pour l'avenir.

La question des **protéines membranaires** a déjà été évoquée. La détermination de leur structure ainsi que de la nature de leur interaction avec la membrane sont des problèmes majeurs difficiles qui impliquent des études de cristallogénèse, de biochimie des protéines (notamment des récepteurs) et de modélisation.

Un autre domaine à développer est celui des **glycoprotéines** dont l'étude structurale est difficile (faible résolution des structures jusqu'alors obtenues en radiocristallographie, relative rareté des effets Overhauser en RMN des glycoconjugués). L'analyse fine de structures oligosaccharidiques constitue donc, associée à la modélisation, une bonne base pour prévoir celles des glycoconjugués. L'autre aspect important est la dynamique des systèmes oligosaccharidiques ; la mobilité du reste saccharidique autour de la liaison à la protéine peut jouer un grand rôle dans la fonction de la glycoprotéine. Là encore, la modélisation peut aider à comprendre les relations entre structure et fonction des glycoprotéines.

La biologie structurale va de plus en plus s'intéresser à des systèmes intégrés faisant intervenir des **complexes entre biomacromolécules**. La résolution des structures de tels complexes est importante pour notre connaissance des paramètres régissant la **reconnaissance moléculaire entre biomacromolécules**. Les études d'**interactions protéine-protéine** doivent apporter beaucoup, en particulier dans les mécanismes de transduction de signaux. De nombreuses structures de **complexes entre fragments d'ADN et protéines de régulation** ont été récemment résolues. Toutes ces structures ont bouleversé nos connaissances et notre approche de la reconnaissance entre acides nucléiques et protéines. Étant donné que la résonance magnétique nucléaire a ses limites, la diffraction des rayons X a encore un bel avenir. En effet, si des structures d'assemblages nucléoprotéiques de plus en plus importants et pertinents au niveau biologique sont publiées, cela reste encore éloigné du domaine moléculaire dans le cas des complexes impliquant plusieurs protéines et l'ADN. Au niveau de la transcription, il sera absolument nécessaire d'analyser la structure des complexes non seulement binaires (acide nucléique + protéine) mais également ternaires et quaternaires (ADN, ARN, plusieurs protéines). Un domaine en pleine expansion, et dans lequel la France est absente au niveau structural, est celui des enzymes qui agissent topologiquement sur l'ADN : topoisomérases, intégrases, résolvases.

2 - RÉACTIVITÉ ET FONCTION DES BIOMOLÉCULES

Ces deux termes recouvrent l'ensemble des processus intervenant dans le fonctionnement des biomolécules, ce qui implique des phénomènes de reconnaissance moléculaire et des réactions chimiques avec coupure et/ou formation de liaisons covalentes.

2. 1 RECONNAISSANCE MOLÉCULAIRE

Il s'agit aussi bien des interactions macromolécule-macromolécule (ADN-protéine, protéine-protéine, protéine-membrane) que des interactions entre macromolécules et biomolécules de petite taille (ligands). Ces interactions sont à la base de la production et de la transmission des signaux biologiques. Leur étude fait intervenir les méthodes spectroscopiques d'analyse structurale indiquées plus haut, ainsi que d'autres comme les spectroscopies infra-rouge, Raman et de fluorescence et, bien sûr, la modélisation moléculaire. Les interactions biomacromolécule-ligand sont une préoccupation centrale de la section 20. En l'absence très fréquente de structure 3D de la macromolécule, la caractérisation de la conformation active du ligand fait appel à la fois aux méthodes structurales et à la synthèse d'analogues contraints. La définition du pharmacophore et l'étude des relations structure/activité constituent la principale stratégie de la recherche pharmacologique. Si la modélisation moléculaire doit continuer à jouer son rôle dans cette recherche, la bioinformatique destinée à caractériser les motifs structuraux au sein d'une famille de récepteurs représente un domaine considérable à développer.

2. 2 RÉACTIVITÉ

Il est clair que la connaissance de la structure 3D d'une biomacromolécule, même résolue à moins de 2Å, n'est qu'un point de départ dans la **détermination de la réactivité et de la fonction**

de cette macromolécule et dans l'élaboration de moyens pour les contrôler. Les progrès de nos connaissances sur la réactivité des biomolécules vont dépendre non seulement d'un accès facilité à de nombreuses biomolécules en quantités suffisantes, mais aussi de la diversité et de la puissance des outils d'investigation disponibles.

Les études de type cinétique enzymatique restent indispensables comme préalables à une première caractérisation des réactions impliquées. L'apport du chimiste est important à ce stade où l'étude des **effets stéréochimiques ou isotopiques**, utilisant des substrats modifiés en fonction du problème à traiter, reste une étape souvent indispensable. Il est urgent que de nouvelles équipes, de chimistes en particulier, s'intéressent à la caractérisation de la réactivité des biomolécules (enzymes, mais aussi ribozymes ou transporteurs divers) en utilisant l'ensemble des moyens disponibles à l'heure actuelle. Il s'agit, bien sûr, des approches cinétiques utilisant diverses spectroscopies (à ce propos, le manque de spécialistes capables de mener à bien des études cinétiques détaillées est à noter), et en particulier des cinétiques rapides basées sur des méthodes d'irradiation laser ou de radiolyse pulsée, ainsi que des études stéréochimiques et isotopiques mentionnées plus haut. Mais il s'agit aussi de la mise à profit de toutes les possibilités de la biologie moléculaire pour modifier la macromolécule biologique et sa réactivité locale (mutagenèse dirigée, utilisation de protéines chimères, modification et évolution de la réactivité par des techniques d'évolution par modification aléatoire des ADN). À l'inverse, la chimie de synthèse peut apporter beaucoup par la **préparation de substrats modifiés** destinés à répondre à une question précise. C'est par exemple le cas des "**horloges radicalaires**", molécules conduisant par la réaction enzymatique étudiée à un radical dont l'évolution se fait à une vitesse connue, et qui permettent la détermination précise des vitesses de certaines étapes enzymatiques.

Parmi les méthodes, quelquefois sophistiquées, indiquées ci-dessus, beaucoup ont été appliquées avec succès le plus souvent à des systèmes purifiés et solubles. Beaucoup de progrès restent à faire pour leur application à des systèmes plus complexes et un peu plus proches d'une situation *in*

vivo, comme les **complexes multi-enzymatiques** faisant intervenir un "effet tunnel" dans les transferts de substrats, de cofacteurs ou d'électrons, les systèmes hétérogènes (membranaires par exemple) ou les systèmes intégrés où la réaction étudiée est remplacée dans son contexte métabolique avec toutes les régulations que cela implique.

Le développement récent de la **cristallographie Laue résolue dans le temps** devrait permettre de visualiser les réactions des macromolécules à l'échelle atomique. Elle implique la génération du substrat au sein du cristal et permet, par la réalisation d'une série de clichés X, de visualiser la catalyse en direct. Cette approche, encore peu explorée, nécessite la synthèse de molécules, par exemple photolabiles, reconnues par la protéine et capables de générer le substrat de façon quasi instantanée. Une bonne connaissance de la photochimie de ces molécules et de la spectroscopie associée aux méthodes d'analyse de structure (laser + synchrotron) permet donc, en principe, la visualisation des intermédiaires structuraux en temps réel. Un certain nombre de problèmes non triviaux, comme ceux associés à la diffusion dans le cristal, restent cependant à résoudre.

De récentes approches combinant mécanique quantique et dynamique moléculaire dans la modélisation de la réactivité dans le site actif de macromolécules semblent pleines de promesses.

Pour certaines biomolécules, une autre méthode a été utilisée avec succès au cours de ces dix dernières années ; il s'agit de la synthèse de **modèles chimiques de leur site actif** responsable de la réactivité. Cette approche a donné de bons résultats dans le cas des enzymes comportant un cofacteur qui peut être suivi par différentes techniques spectroscopiques. C'est souvent les cas des métalloprotéines. Ceci a contribué, en particulier, à une amélioration spectaculaire de notre compréhension du **rôle des métaux en biologie**.

3 - CONTRÔLE DES BIOMOLÉCULES : APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DES MÉDICAMENTS ET DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES

L'un des buts majeurs des chercheurs de la section 20 est la mise au point de nouvelles molécules capables de contrôler une fonction biologique donnée. Le contrôle d'une protéine, par exemple, peut se faire soit au niveau de la protéine elle-même (contrôle de l'activité), soit au niveau du gène codant pour cette protéine (contrôle de sa biosynthèse). Une fois mises au point, souvent à partir d'études *in vitro*, ces molécules doivent être optimisées pour pouvoir être utilisées *in vivo* (résolution des problèmes de vectorisation, biodisponibilité et toxicologie) et devenir des médicaments ou des produits phytosanitaires. Si la plupart de ces substances sont des molécules de petite taille, il convient de signaler l'utilisation d'un nombre croissant de biomacromolécules (protéines, vaccins naturels ou synthétiques, acides nucléiques en thérapie génique) dans ces domaines, ainsi que les possibilités entrevues avec l'utilisation de polymères synthétiques comme médicaments.

3. 1 DIFFÉRENTES STRATÉGIES DE RECHERCHE D'UNE NOUVELLE MOLECULE ACTIVE

La recherche de nouvelles molécules actives vis-à-vis soit d'une cible biomacromoléculaire donnée, soit d'une fonction biologique mesurable *in vitro* ou *in vivo*, fait intervenir plusieurs types de stratégies. Le criblage systématique d'un grand nombre de molécules issues d'extraits naturels ou de composés de synthèse reste une approche efficace pour la découverte de séries originales. Elle bénéficie de plus en plus, dans le milieu industriel, du développement de tests biologiques robotisés et

de la création d'une grande diversité structurale des molécules synthétisées. La recherche d'une telle diversité a, dans un premier temps, conduit à la construction de banques de peptides ou d'oligonucléotides, puis à la construction de **banques combinatoires chimiques** permettant de combiner un très grand nombre d'unités de base. Dans ce contexte, la connaissance d'un "pharmacophore" (paramètres structuraux et physico-chimiques déterminant l'activité biologique d'une classe de molécules) permet de rechercher dans une chimiothèque existante de nouvelles têtes de série à activité biologique donnée. Cette connaissance peut aussi être utilisée pour définir la plate-forme structurale autour de laquelle des nouvelles banques de composés peuvent être synthétisées par chimie combinatoire. Les études de relations structure/activité connaissent un renouveau avec la prise en compte de paramètres liés à la structure tridimensionnelle des ligands. L'évaluation de la diversité structurale d'une bibliothèque de produits virtuels ou de synthèse commence également à jouer un rôle capital dans l'élaboration de stratégies de chimie combinatoire. Il semble que des outils satisfaisants aient déjà été développés par des sociétés spécialisées et que leur application relève essentiellement du milieu industriel.

L'approche rationnelle qui intègre le choix d'une cible biologique, la connaissance de son mécanisme d'action, et la mise au point de molécules de structures déterminées pour la contrôler, peut être plus facilement rattachée à des recherches fondamentales sur cette cible. Son importance relative devrait augmenter, au moins en recherche publique, du fait de la progression de nos connaissances des cibles.

Quelle que soit l'approche choisie, la **synthèse des molécules** reste une étape clé à améliorer pour atteindre la molécule visée, qu'il s'agisse de **synthèse organique totale**, d'**hémisynthèse** impliquant des modifications chimiques de molécules naturelles ou de **biotransformations**. À ce propos, l'utilisation de microorganismes dont certaines étapes de biosynthèse ont été modifiées par génie génétique pour introduire des substrats non naturels (**mutasynthèse**) offre des possibilités intéressantes pour l'accès à des molécules complexes dans la série des antibiotiques ou des antitumoraux.

3. 2 LES CIBLES

Le **contrôle des ADN ou des ARN par des oligonucléotides naturels ou modifiés** a fait des progrès considérables ces dernières années ; il s'agit d'une des voies importantes de la **thérapie génique**, un défi majeur de la prochaine décennie. Le développement des stratégies de régulation artificielle de l'expression des gènes (stratégies "anti-sens" et "antigènes") a par ailleurs conduit à la synthèse de très nombreux analogues possédant des activités sur des systèmes biologiques complexes meilleures que les oligoribo- ou oligodésoxyribonucléotides conventionnels. Ont ainsi été produits des dérivés résistants aux nucléases, ou possédant une forte affinité pour la séquence complémentaire, ou plus aptes à franchir les membranes cellulaires. Une méthode basée sur la connaissance des réactivités et utilisable pour bloquer le fonctionnement d'un acide nucléique est de provoquer sa coupure irréversible à un site donné. De nombreuses découvertes ont été faites au cours de la dernière décennie dans ce domaine. Elles concernent le mécanisme d'action de médicaments (bléomycine), de produits naturels cytotoxiques (néocarzinostatine ou calichéamycine), de ribozymes et de complexes de métaux de transition capables de produire, au contact des acides nucléiques, des radicaux hydroxyle ou des entités métal-oxo de haut degré d'oxydation. Le développement des recherches dans le domaine des coupures sélectives de séquences données devrait aboutir à la synthèse rationnelle de nouveaux médicaments si les biologistes, chimistes et pharmacologues réussissent à établir les synergies indispensables pour maîtriser les nombreux paramètres impliqués i) dans la reconnaissance moléculaire entre les molécules actives (oligonucléotides modifiés ou autres) et les acides nucléiques, ii) les mécanismes permettant d'obtenir des coupures spécifiques, sans dommage irréversible pour les séquences de composition voisine, et iii) la pénétration de ces molécules dans le noyau.

Le **contrôle des enzymes** peut se faire grâce à des molécules qui augmentent leur activité (effecteurs allostériques ou inducteurs de leur biosynthèse) ou qui bloquent cette activité (inhibiteurs). La recherche d'**inducteurs sélectifs** agissant au niveau de la transcription est à encourager, mais

reste difficile du fait d'un relatif manque de connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués. C'est pourquoi la majorité des études porte sur la recherche d'**inhibiteurs sélectifs des enzymes cibles**. Des inhibiteurs réversibles très sélectifs, soit mimant l'état de transition de la réaction enzymatique, soit agissant comme ligands du site actif métallique de métalloenzymes, ont été mis au point. Lorsque cette approche utilise la connaissance de la structure de la cible, son efficacité est grande, comme en témoignent les résultats obtenus dans l'inhibition de la protéase du VIH-1 : en moins de cinq ans, trois molécules très actives ont reçu l'autorisation de mise sur le marché. L'intérêt d'une autre classe d'inhibiteurs, les inhibiteurs irréversibles de type substrat-suicide, réside dans leur spécificité puisqu'ils devront non seulement être reconnus par l'enzyme ciblée, mais aussi subir le début de la catalyse enzymatique. Les quelques rares exemples de succès (tel l'acide clavulanique utilisé dans le traitement des infections bactériennes, la difluorométhyl ornithine dans celui de la maladie du sommeil ou l'acide vinyl- aminobutyrique dans le traitement de l'épilepsie) doivent stimuler une telle approche, même si le problème des effets toxiques possibles associés à une réaction auto-immune reste posé.

Le **contrôle des récepteurs** est basé sur la reconnaissance moléculaire de leurs sites actifs par divers effecteurs. L'étude structurale des récepteurs membranaires, qui jouent un rôle clé dans la transmission d'un signal du milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule, est le plus souvent difficile. Des approches par modélisation moléculaire sont donc nécessaires.

3. 3 PASSAGE D'UNE MOLÉCULE ACTIVE *IN VITRO* À UNE MOLÉCULE EFFICACE *IN VIVO*

Dans la longue route qui doit conduire d'une molécule active découverte à partir de tests *in vitro*, à une molécule active efficace *in vivo*, il s'agit d'apprécier (ou mieux de prévoir) la biodisponibilité (pénétration et répartition dans l'organisme), le devenir métabolique et les éventuels effets toxiques

des molécules sélectionnées. Ce devenir métabolique, en particulier chez l'Homme, peut être prévu, au moins en partie, grâce à l'utilisation des enzymes humaines du métabolisme des xénobiotiques, exprimées récemment dans divers systèmes hétérologues. Les mêmes systèmes permettent aussi de prévoir certains effets toxiques liés à une activation métabolique. On est beaucoup plus démuné à l'heure actuelle pour prévoir la pénétration et la distribution des molécules dans l'organisme.

Diverses méthodes sont utilisées pour diriger plus efficacement les molécules vers leur cible biologique. Les premières consistent à modifier chimiquement la molécule active pour augmenter sa biodisponibilité (on manque encore malheureusement de connaissances de base pour faire cela de façon rationnelle), ou pour la **diriger vers une cible biologique donnée**. C'est dans cet objectif que se situe l'élaboration de précurseurs de substances actives ("**prodrugs**") dont on espère qu'ils seront transformés de façon sélective en substance active au niveau de la cible (la stratégie "ADEPT" (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy) en est un exemple). Les autres méthodes sont basées sur l'incorporation du principe actif dans un système de protection et de transport (système particulière ou macromolécule) permettant soit une libération contrôlée, soit une distribution modifiée (vectorisation) du principe actif. Ce point sera plus développé dans le chapitre 5.

4 - APPLICATIONS DES BIOMACROMOLÉCULES

Le nombre de biomacromolécules utilisables en tant que telles comme **médicaments ou produits phytosanitaires** ne fait que croître ; il s'agit en particulier de protéines, d'acides nucléiques (thérapie génique) ou de polysaccharides. Un problème majeur de leur utilisation est leur transport jusqu'aux cibles biologiques (passage difficile des membranes et hydrolyse rapide). La résolution de ce problème permettrait de profiter de leurs potentialités énormes en thérapeutique.

Un autre domaine d'application des biomacromolécules est celui de **l'environnement**. Ainsi, l'utilisation d'anticorps est en cours pour le **dosage de substances toxiques** dans les eaux ou les sols. De plus, des microorganismes ou certains systèmes enzymatiques sont utilisés à des fins de destruction de ces polluants (**dépollution**). Il faut cependant garder à l'esprit que l'étude des polluants et de leur devenir doit être étroitement liée à celle de la matière organique présente dans les écosystèmes naturels dont il convient d'améliorer la connaissance. Ceci concerne notamment la mise en évidence de biomarqueurs spécifiques reflétant les conditions de dépôt et l'étude structurale des constituants macromoléculaires d'origine biologique auxquels les polluants sont souvent associés.

Enfin, la **découverte de nouveaux catalyseurs** sélectifs et efficaces, qu'ils soient d'origine biologique ou chimique est un défi majeur de l'industrie pour les années à venir. Il s'agit en effet de remplacer progressivement tous les processus stoechiométriques, générateurs de quantités importantes de sous-produits polluants pour l'environnement, en processus catalytiques "propres". La section 20 est impliquée dans cet effort de recherche principalement pour la mise au point de biocatalyseurs et de catalyseurs biomimétiques ou bioinspirés.

Les **biocatalyseurs** en question peuvent être des **microorganismes entiers** utilisés pour des biotransformations, ou des **biomacromolécules** (enzymes, abzymes, ribozymes).

4. 1 ENZYMES

En ce qui concerne les systèmes enzymatiques, la recherche s'oriente dans deux directions : l'optimisation d'activités existantes et la recherche de nouvelles activités. La mutagenèse dirigée est un outil important pour la mise au point d'enzymes plus efficaces. Les nouvelles techniques de mutagenèse "fenêtre" ou d'évolution artificielle de la protéine par mutations aléatoires du gène devraient apporter beaucoup pour l'obtention d'une **activité catalytique optimisée à partir d'une enzyme existante**. La recherche de nouvelles activités enzymatiques est importante au

plan fondamental pour la découverte de réactions nouvelles (dont certaines encore inconnues en chimie) ou de solutions nouvelles pour réaliser une réaction donnée. Elle l'est aussi au plan appliqué pour **diverses biotransformations** encore difficiles à réaliser comme le transfert d'un sucre sur un composé donné, la modification sélective d'un antibiotique ou la dégradation oxydante d'un polluant inerte chimiquement. Les applications de ces nouveaux catalyseurs biologiques sont à prévoir non seulement en **biotechnologie**, **chimie fine** ou **dépollution**, mais aussi, dans des cas favorables, en **chimie industrielle**. On peut citer l'exemple de la production d'acrylamide développée au Japon à l'échelle industrielle par hydrolyse de l'acrylonitrile grâce à une nitrile hydratase de microorganisme.

La mise au point de nouveaux systèmes catalytiques efficaces a aussi de nombreuses applications potentielles en pharmacologie ou toxicologie, ainsi que dans le domaine du diagnostic.

Ces activités nouvelles devraient être trouvées, par exemple, à partir d'une meilleure connaissance des voies de **biosynthèse** chez les plantes et de l'étude des microorganismes. Le criblage de nouvelles souches capables de réaliser une réaction donnée reste une source importante de telles activités ; il est souhaitable que l'isolement de telles souches s'accompagne de la caractérisation des enzymes impliquées et de l'identification des gènes correspondants afin de pouvoir rebondir vers une connaissance moléculaire de la réactivité et son éventuelle amélioration. Ceci nécessite une collaboration entre les équipes industrielles qui trouvent ces souches souvent par criblage et des équipes de recherche publique intéressées par la compréhension des bases moléculaires de la réactivité.

L'étude des **organismes "extrémophiles"** semble aussi une source potentielle intéressante de nouvelles réactivités, dans la mesure où peu de recherches ont été réalisées jusqu'alors dans ce domaine. Pour ne citer que l'exemple le plus frappant, la stabilité dans l'eau bouillante des protéines issues de microorganismes hyperthermophiles n'a pas reçu d'explication au niveau moléculaire, pas plus que la stabilité de certains métabolites réputés fragiles (anhydrides, phosphates...). Indépendam-

ment de l'utilisation pratique de ces enzymes thermostables, la quantification de cette stabilité ainsi que la réalisation de modèles mimant l'environnement rencontré dans ces milieux biologiques inhospitaliers devraient apporter un début de compréhension de ces phénomènes. Cette recherche associe clairement les aspects structuraux et cinétiques. Les études comparatives dans les conditions standard et les conditions extrêmes pouvant donner des indications susceptibles d'apporter un éclairage sur la base de ces différences sont à encourager.

Finalement, la recherche d'activités catalytiques de protéines qui sont réputées inactives à l'heure actuelle est un domaine à explorer. La récente mise en évidence d'une activité catalytique de l'albumine en est un exemple.

4. 2 ABZYMES

Les anticorps catalytiques ou "abzymes" sont une illustration des capacités de la chimie combinatoire dans la production d'anticorps contre une molécule de synthèse conçue pour mimer un intermédiaire de la catalyse. Le système immunitaire de la souris se charge de générer la famille d'immunoglobulines G capables de reconnaître cet antigène, et le test de criblage sélectionnera la molécule dotée d'une activité catalytique. Cette approche a été appliquée à des réactions d'hydrolyse, d'oxydoréduction, de cyclisation... Bien que très séduisant sur un plan conceptuel, le développement de la recherche dans ce domaine se heurte à deux difficultés : i) elle doit être capable, dans ses objectifs ou ses concepts, de s'attaquer à des réactions nouvelles ; ii) elle nécessite la mise en place d'une structure lourde capable d'assurer de façon efficace à la fois la synthèse des haptènes, la production d'anticorps monoclonaux, l'évaluation biochimique de leur activité et l'ingénierie des IgG obtenues. Toute approche nouvelle dans la sélection des anticorps catalytiques ou dans le type de transformation chimique recherchée est susceptible d'apporter un éclairage nouveau à ce domaine qui reste en grande partie l'apanage de quelques groupes américains.

4. 3 RIBOZYMES

Les ribozymes sont des ARN que l'on rencontre à l'état naturel dans divers ARN cellulaires ou viraux et qui ont en commun une activité catalytique de coupure des ARN au niveau de séquences déterminées. Ces nouvelles molécules, qui ont un large potentiel d'applications thérapeutiques (cancérologie, maladies virales...), sont remarquables dans la mesure où elles sont constituées uniquement de nucléotides. Toutefois, pour développer leurs applications, il faut tenter de résoudre les problèmes fondamentaux soulevés par l'emploi des oligonucléotides dans les diverses stratégies antigènes : stabilité en milieu biologique, pénétration cellulaire, routage, ciblage (reconnaissance et réactivité).

L'effort majeur devrait porter sur les petits ribozymes (ribozymes en tête de marteau, ribozymes en épingle à cheveux, ribozyme du virus de l'hépatite delta) et sur le développement de ribozymes artificiels. Ces molécules pourraient être des oligonucléotides qui, après reconnaissance, seraient capables d'induire une réaction de coupure de l'ARN cible, et cela de façon indépendante du pH ou de la concentration en cations divalents.

5 - SYSTÈMES CHIMIQUES MIMANT LES BIOMOLÉCULES (APPLICATIONS EN CATALYSE, VECTORISATION, BIOMATÉRIAUX)

5. 1 CATALYSE

La mise au point de systèmes chimiques biomimétiques reproduisant la nature d'un site actif enzymatique a beaucoup contribué récemment à notre connaissance de la structure, des propriétés

spectroscopiques et de la réactivité des sites actifs d'enzymes à cofacteur, comme les métalloenzymes. À cet égard, il est intéressant de noter que la nature des sites actifs d'enzymes importantes comme la cytochrome-oxydase, la cyclooxygénase ou la méthane-monooxygénase dont les structures aux rayons X ont été déterminées très récemment, avait été très largement prévue à partir d'études enzymologiques, spectroscopiques et biomimétiques. Des catalyseurs biomimétiques reproduisant les réactions de certaines enzymes, en particulier les hémoprotéines type peroxydases ou cytochromes P₄₅₀, les enzymes à fer non-héminique ou à cuivre et les enzymes à vitamine B₁₂ ont été décrits. Les applications dans le domaine de la catalyse d'oxydation sont nombreuses et déjà réalisées dans certains domaines de la chimie fine (médicaments). Même si les sélectivités des systèmes biomimétiques restent pour l'instant moins bonnes que celles des enzymes correspondantes, leur facilité d'accès et leur mise en œuvre dans des conditions très diverses (solvant, température) en font des outils d'application plus facile. À partir d'une bonne compréhension du mécanisme enzymatique à imiter, il est possible de passer à des systèmes modèles chimiques, dits "bioinspirés". Dans ce cas, contrairement aux systèmes biomimétiques, le site actif du catalyseur bioinspiré peut être très différent de celui de l'enzyme qu'il imite ; il n'a de commun que le mécanisme global de fonctionnement. La mise au point de catalyseurs bioinspirés peut, dès lors, profiter de la grande diversité des entités chimiques (éléments autres que C, N, H ou P ; gamme de métaux beaucoup plus vaste que celle utilisée par les êtres vivants). Le niveau de diversité potentielle des catalyseurs bioinspirés est donc plus grand que celui des enzymes.

5. 2 VECTORISATION

La compréhension des processus d'interactions entre un effecteur et les membranes, les fluides biologiques et les espèces qu'il est susceptible de rencontrer durant son parcours *in vivo* est capitale pour moduler les processus d'adsorption, la distribution tissulaire et l'interaction avec la cible biologique. Un certain nombre de biomacromolécules permettent le transport, le ciblage et le pas-

sage transmembranaire de médiateurs de structure déterminée. La mise au point de polymères artificiels capables de jouer un ou plusieurs de ces rôles en mimant, au moins en partie, les mécanismes des biomacromolécules, est une voie de recherche intéressante. L'élaboration de **nouveaux systèmes d'administration et de transport des médicaments, de nature particulière** (nanoparticules polymères, liposomes, micelles...) ou **macromoléculaires** (polymères synthétiques), est un enjeu important où une collaboration entre chimistes et physiciens semble indispensable. Ceci pourrait faciliter à terme une utilisation en thérapeutique de composés biologiques comme les peptides, les protéines, les oligonucléotides ou les gènes, qui sont très actifs et très sélectifs, mais posent des problèmes majeurs de pénétration et de stabilité *in vivo*.

5. 3 BIOMATÉRIAUX

Les biomatériaux sont des matériaux qui travaillent au contact de tissus vivants animaux ou humains. Le domaine couvre pratiquement tous les composés (métaux, alliages, céramiques et autres composés minéraux, polymères d'origine naturelle et polymères de synthèse) qui ont été ou seront testés à des fins thérapeutiques. La recherche des dernières décennies visait à comprendre les phénomènes d'interactions entre matière inerte et matière vivante, cette dernière ayant comme particularité de toujours réagir sur des bases de défense et d'adaptation. La tendance actuelle est différente. Elle consiste à chercher à tirer parti des phénomènes en jeu, notamment les comportements des tissus et autres éléments vivants de façon à trouver les matériaux les plus biofonctionnels et biocompatibles.

Les risques de transmission de virus ou d'autres éléments pathogènes susceptibles d'être présents dans les biomatériaux d'origine animale ou humaine (collagène, fibrine et autres protéines) nécessitent la mise au point de biomatériaux synthétiques de substitution.

Dans le domaine des biomatériaux solides, la création d'interactions (par fonctionnalisation et par

tout autre activation de surface) avec les tissus vivants remplace progressivement la recherche de matériaux inertes. L'étude des comportements tissulaires à l'interface matière artificielle-matière vivante et des interactions avec les protéines et autres éléments du sang doit continuer à être soutenue tout en favorisant les rapprochements entre les fondamentalistes et les utilisateurs qui sont les cliniciens. En effet, plus que dans d'autres domaines, la recherche n'aura d'intérêt que si elle est exploitable dans ses applications, en l'occurrence en thérapie humaine. Les contraintes imposées par celle-ci doivent donc être systématiquement prises en compte, même pour des travaux très en amont. L'exploitation efficace de la pluridisciplinarité sous-entend des efforts d'organisation interdisciplinaire importants comprenant le développement de la recherche chirurgicale.

L'exploitation de la matière molle (gels, hydrogels, agrégats et micelles macromoléculaires, assemblages moléculaires) doit être développée, de même que l'étude des composites matière inorganique-matière organique. Dans ce contexte, la chimie, la physico-chimie et la physique des biomatériaux dans les milieux aqueux sont à privilégier.

Les domaines de la médication des prothèses (association de matériaux à des principes actifs tels que antibiotiques, hormones, etc.) et des systèmes à libération contrôlée de principes actifs devraient être à la base des innovations scientifiques et technologiques des décennies à venir. Plus les systèmes seront petits (microparticules, nanoparticules, micelles et agrégats, macromolécules), plus les interactions avec les éléments constituant les milieux vivants seront importantes. L'étude de ces interactions est capitale dans un domaine qui devrait ouvrir la porte à l'exploitation de substances artificielles bioactives (surfaces organiques ou minérales, macromolécules bioactives, systèmes dégradables et biodégradables, etc.) ou furtives, c'est-à-dire capable d'éviter une reconnaissance par les défenses naturelles des organismes vivants.

L'aide thérapeutique temporaire (supports résorbables, médicaments macromoléculaires) prendra de l'importance dans les vingt prochaines années. Il faut dès maintenant se préparer à répondre à cette demande.

Enfin, le domaine des systèmes hybrides composés de matière artificielle combinée à des cellules ou des tissus vivants dans le but de tirer parti de

l'activité biologique de ces derniers (libération d'hormones, d'enzymes etc.) devrait être aussi un secteur de recherche important pour le siècle futur.