ACADÉMIE NATIONALE DE PHARMACIE
SANTÉ PUBLIQUE - MÉDICAMENT - PRODUITS DE SANTÉ - BIOLOGIE - SANTÉ ET ENVIRONNEMENT
Fondée le 3 août 1803 sous le nom de Société de Pharmacie de Paris
Reconnue d'utilité publique le 5 octobre 1877

« 2014 : l'année de la cristallographie »

Séance thématique

Mardi 18 février 2015

Le Président Jean-Luc DELMAS ouvre cette séance thématique en rappelant que les Nations-Unies ont décidé que 2014 serait l'année de la cristallographie. Les philosophes et mathématiciens ont été interpellés, dès la Grèce antique, par les cristaux. Au 18ème siècle, il est à noter la découverte fortuite de la maille cristalline par l'abbé Haüy puis celle des rayons X et leur diffraction autorisant l'analyse structurale.Aujourd'hui, des méthodes de calculs de plus en plus performants ayant recours à l'informatique et l'amélioration des techniques de cristallisation permettent de résoudre des structures de plus en plus complexes touchant ainsi bien à la minéralogie qu'à la physique, la chimie ou la biologie.

Le Professeur Alain TOMAS, à son tour, rappelle qu'il y a 100 ans le physicien VON LAÜE, avec deux autres collègues, mettait en évidence la diffraction des rayons X par un cristal de sulfate de cuivre. Il obtiendra le prix Nobel de physique.Tous les travaux qui s'en suivront seront ainsi récompensés par l'attribution de 30 prix Nobel et marqueront le caractère interdisciplinaire de la cristallographie.

Les quatre conférences proposées présentent les aspects contemporains de la cristallographie intéressant le domaine de la santé.

« Analyses structurales des récepteurs aux opiacés par cristallographie aux rayons X »
Sébastien GRANIER, *Institut de Génomique Fonctionnelle, UMR 5203*

Les trois récepteurs des opiacés (OR), mu, delta et kappa, sont impliqués dans l'action de la morphine, de l'héroïne et de peptides endogènes comme les endorphines et les enképhalines. Ils constituent une cible privilégiée pour traiter notamment les douleurs intenses, mais aussi les troubles neurologiques et psychiatriques. Ces protéines membranaires appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Pour mieux comprendre la pharmacologie des récepteurs aux opiacés, l'approche par cristallographie aux rayons X permet d'appréhender la structure tridimensionnelle des mu-OR et delta-OR. Le problème est que ces protéines membranaires sont très difficiles à cristalliser. Il faut faciliter la cristallogenèse, stabiliser la protéine mais il faut aussi produire beaucoup de protéines membranaires. Toutes les techniques qui permettent d'obtenir la cristallisation sont présentées. Est aussi discuté ce que nous enseignent ces structures sur les mécanismes moléculaires de la reconnaissance des récepteurs OR par les ligands morphiniques antagonistes.
Les directions actuelles de la recherche vont porter sur l'étude des interfaces observées dans la structure du cristal de protéine transmembranaire, sur la modulation de l'activité du récepteur avec le moins d'effets secondaires possibles. Il faut aussi comprendre comment les OR sont activés par les molécules agonistes, le concept d'efficacité des ligands et la modulation allostérique.

QUESTIONS - RÉPONSES - COMMENTAIRES
Claude MONNERET (Q): lors de l'ingénierie de la protéine membranaire, vous ajoutez une partie soluble. N'y a-t-il pas des risques de modification structurale ?
(R) :c'est une étape cruciale et délicate. Il faut pouvoir modifier la protéine hydrophobe avec une partie hydrophile sans modifier la structure de cette protéine. Nous possédons des outils qui anticipent ces problèmes, testent et valident la fonctionnalité des protéines de fusion. Les mouvements des domaines transmembranaires ne sont pas gênés. Des méthodes de contrôles biophysiques permettent de le vérifier.

Alain ASTIER (Q) : quelle est la part de la modélisation moléculaire dans la détermination des couples ligand-récepteur ?
(R) : *il y a* plus *de 800 RCPG (récepteurs couplés aux protéines G) et on ne connaît pas la structure de tous les RCPG. Une approche intéressante est la modélisation moléculaire. Il faut du recul par rapport au modèle à utiliser.On arrive à faire des modèles de récepteurs dont on n'a pas la structure mais qui sont proches du OR (récepteur des opiacées) mu ou delta*..

Alain BERDEAUX (Q) : pour un récepteur donné, pouvez-vous différencier plusieurs états conformationnels en cristallographie quand on fait agir des ligands de structure différente sur ce récepteur ?
(R) : en cristallographie, pour stabiliser les états conformationnels, on utilise des « nanobodies ». Pour les obtenir, on injecte les lamas avec des ligands spécifiques. On développe aussi des approches de RMN. Différents ligands induisent au niveau de certains domaines des conformations différentes, ce qui est à la base des différences d'efficacité.

Alain BERDEAUX(Q) : pourquoi le lama ?
(R) : on s'est aperçu qu'il possédait un anticorps particulier constitué uniquement de chaînes lourdes. Avec la PCA, on cherche le domaine qui lie l'antigène. Ces domaines sont très petits (5 KDa), stables, faciles à produire et reconnaissent des épitopes très conventionnels. On utilise aussi le requin.

« Organisations moléculaires para-cristallines dans les tissus biologiques : une opportunité pour les recherches pharmaceutique, cosmétique et médicale »

Jean DOUCET, *CNRS, Laboratoire de Physique des Solides, Université Paris-Sud 11*

Dans la plupart des tissus biologiques, qu'ils soient épithéliaux, conjonctifs ou musculaires, certaines protéines, notamment les protéines fibreuses et certains lipides sont organisés de manière ordonnée, quasi cristalline. L'organisation est liée à la fonction du tissu. Les arrangements moléculaires y sont assez réguliers pour conduire à des figures de diffraction de rayon X suffisamment définies pour servir de marqueur de l'intégrité structurale des molécules, pour caractériser leurs modifications induites par divers stress – biochimique, mécanique, thermique, biologique – ou encore pour suivre l'effet de traitements. Ces possibilités sont de plus en plus explorées par les acteurs des secteurs pharmaceutique, cosmétique et médical, privés et universitaires, pour optimiser le développement de nouveaux produits ou pour mieux comprendre les fonctions des tissus. L'architecture partiellement cristallisée des tissus est intimement liée à leurs fonctions tout en étant compatible avec la déformabilité qui est indispensable aux mouvements, caractéristique essentielle du vivant qui ne permettrait pas d'obtenir une structure cristalline rigide. En fait, la nature a su sélectionner « les aspects cristallins » qui lui conviennent. La présentation est illustrée d'exemples choisis couvrant divers tissus et organes : épiderme, derme, cheveu, muscle, rein.

QUESTIONS - RÉPONSES - COMMENTAIRES
Claude MONNERET (Q) :vous avez dit « nous sommes des cristaux ». Hervé THIS, spécialiste de la chimie moléculaire dit pour sa part « nous sommes des gels ». Mais alors qui sommes-nous ?
(R) :*on est partiellement cristallisé et on est un peu « gel » car on est à 80% composé d'eau. Ce gel est structuré. L'eau est dans le tissu et fait partie intégrante de la structure cristallisée.*

Jean-Claude CHAUMEIL (Q) : les différents traitements capillaires conduisent à des changements de structure des cheveux : permanentes, défrisage, décrêpage … Le décrêpage est-il définitif ?
(R) :*c'est la chimie du soufre qui est visée ici avec mise en jeu de phénomènes d'oxydo-réduction. Le décrêpage « casse » le cheveu donc le phénomène est irréversible mais le cheveu repousse.*

« La radiocristallographie, un outil incontournable pour décrire la thermodynamique du polymorphisme cristallin »

René CÉOLIN, *membre de l'Académie nationale de Pharmacie*

La thermodynamique du polymorphisme cristallin vise à déterminer sans ambiguïté la hiérarchie de stabilité des polymorphes d'une espèce chimique dans des conditions données. Si la chaleur peut être appréhendée aisément par la calorimétrie, il n'en est pas de même du travail qui nécessite une connaissance précise des différences de volume. A travers des exemples choisis, notamment de médicaments, on montre comment on utilise la radio-cristallographie pour construire des diagrammes pression-température décrivant le polymorphisme. Grâce aux progrès rapides de la radiocristallographie des monocristaux et surtout des poudres, il est devenu possible de déterminer les stabilités relatives des polymorphes de médicaments de façon non ambiguë. Grâce à une thermodynamique classique et non biaisée, l'industriel peut le faire avec les méthodes désormais courantes de caractérisation du solide.

QUESTIONS - RÉPONSES - COMMENTAIRES
Jean-Claude CHAUMEIL (Q): lorsqu'on réalise des formes galéniques avec des polymorphes et qu'on apporte, par exemple, une énergie liée à la compression, on change la forme cristalline des polymorphes. Est-ce prévisible ?

(R) : *non. C'est bien le problème. La cristallographie sait prédire et calculer toutes les structures cristallines mais ne sait pas dire quelle va être la forme qui va se faire. La cristallographie ne sait pas déterminer la contribution de la densité électronique d'une impureté par rapport à un corps pur. Une impureté bien sélectionnée va induire une forme cristalline. Donc c'est imprévisible. Il faut expérimenter, observer.*

Jean-Claude CHAUMEIL (Q): pour les glycérides utilisés comme excipients de suppositoires, il y a des formes métastables qui apparaissent au chauffage. Quand on répète l'expérience, la forme métastable a disparu et on trouve la forme stable. Peut-on l'expliquer ?
(R) : quand on chauffe, on élève la pression de vapeur ainsi que la réactivité. On incite l'état énergétique à adopter un état de moindre tension de vapeur. Ainsi des polymorphes métastables disparaissent complétement dès qu'on produit la forme stable.

«La cristallographie des macromolécules à l'heure de la génomique»

Nicolas LEULLIOT, *Laboratoire de cristallographie et RMN biologiques UMR 8015 CNRS,Université Paris Descartes*

Le domaine de la cristallographie des molécules biologiques a subi des changements profonds ces 20 dernières années. Un exemple de l'apport de la cristallographie pour les macromolécules est représenté par le ribosome. C'est la plus grosse machine moléculaire de la cellule. Il a été cristallisé en 1980 et sa structure résolue par cristallographie en 2000. Par ailleurs, avec le développement de la génomique et le projet de séquençage du génome, le nombre de séquences ainsi que le nombre de génomes séquencés explose. Le recours à la bioinformatique est nécessaire pour donner un sens à toutes ces séquences génomiques. Ainsi, le rôle de la génomique structurale est de déterminer toutes les structures du génome. Le génome humain c'est 30000 protéines. De grands consortiums travaillent à l'échelle mondiale sur les projets de génomique structurale et chaque projet se spécialise dans une cible déterminée.
Pour faire de la cristallographie, il faut des protéines solubles et pures. Les différentes étapes sont passées en revue. Elles utilisent beaucoup de robotisation et d'automatisation : clonage, expression et production pour améliorer la solubilité des protéines, cristallisation et cristallographie, traitement des données et résolution de structures. Cependant, à partir de plusieurs milliers de structures sélectionnées au départ, on n'arrive à cristalliser que quelques centaines de protéines. Les premiers projets ont contribué à structurer des « protéines simples ». Aujourd'hui, on s'oriente de plus en plus vers des cibles d'intérêt biomédical.
La cristallographie n'est plus une science cloisonnée. Elle s'insère dans la biologie structurale intégrative faisant intervenir des méthodes de basse résolution en solution, la RMN et la microscopie électronique.
Au delà des protéines seules, la génomique structurale s'intéresse aux complexes de protéines. Les complexes protéines-protéines représentent des cibles thérapeutiques potentielles notamment avec l'apparition de la médecine personnalisée.

TABLE RONDE

Alain ASTIER (Q): quelle est la spécificité de ces méthodes ? Quelle est la sensibilité de ces approches pour mettre en évidence des petites modifications structurales, par exemple des instabilités de protéines. Peuvent-elles être vues sur des grosses protéines ?
Nicolas LEULLIOT (R) :pour voir des petites modifications, il faut avoir des données à haute résolution. Il faut faire beaucoup d'essais. Le fait de multiplier les essais, le nombre de constructions, permet de faire des avancées sur des projets plus ciblés tels que voir de petites modifications.

Jean-Roger CLAUDE (Q): vous n'avez pas cité la protéomique. N'avez-vous pas besoin de cet outil pour obtenir un matériau bien séparé, propre ?
Nicolas LEULLIOT (R) :*en ce qui nous concerne, les quantités dont on a besoin sont de l'ordre du mg de protéines, donc des quantités faibles. Pour voir si un échantillon cristallise, on utilise effectivement des méthodes de protéomique couplées à des protéolyses ménagées.Toutes les techniques complémentaires peuvent être utilisées. Tout dépend de l'effort à mettre pour résoudre la structure.*

Alain GOUYETTE (Q) : vous avez cité comme un « Graal » la médecine de précision. Comment prenez-vous en compte les polymorphismes génétiques ?
Nicolas LEULLIOT (R) :la question plus générale est « comment utiliser toute cette information » ? La modélisation joue un grand rôle mais lorsqu'il y a un mutant dans une protéine, on ne sait pas ce que cela donne en pratique. Il faut d'abord exprimer la protéine. Avant d'avoir la structure,préalablement avec des échantillons de protéines, on fait des études biochimiques. Lorsqu'il y a fixation d'une drogue à une protéine qui présente

une mutation, la cristallographie peut révéler des choses non visibles et permettrepotentiellement d'optimiser les drogues.

Alain GOUYETTE (Q): on est sur des échelles de temps différentes : d'un côté l'analyse bio-cristallographique et de l'autre le malade qui est dans son lit.
Nicolas LEULLIOT (R) : oui, mais la plupart des cibles sont le plus souvent connues. Une modification de la protéine (un mutant par exemple) n'entraîne pas un retour de l'analyse au début.

Jean-Roger CLAUDE (Q): avez-vous connaissance dans l'industrie pharmaceutique de laboratoires dédiés à l'utilisation de ces méthodologies utilisables pour construire le dossier scientifique d'un nouveau produit dans le but d'obtenir l'AMM ?
René CÉOLIN (R) : il en existe. La cristallographie des petites molécules a fait un bond en avant ces dernières années sur deux points : la résolution instrumentale, c'est-à-dire l'informatique et les logiciels de résolution de structures. C'est l'industrie pharmaceutique qui a financé ces progrès.

Jean-Michel GUILLON (Q): la cristallographie est-elle utilisée pour évaluer les dommages structuraux causés par les médicaments ? Avez-vous des exemples ?
Jean DOUCET (R) : des exemples de suivi de principes actifs se trouvent plus facilement en cosmétologie qu'en pharmacie. Ce ne sont pas les mêmes règles qui s'appliquent. De grandes entreprises pharmaceutiques utilisent aujourd'hui la cristallographie des protéines et l'organisation cristalline des lipides pour développer des produits de dermo-cosmétique. Ce n'est pas habituel pour les médicaments. Il s'agit d'un problème de culture.

Alain BERDEAUX (Q): vous avez montré une analogie de structure entre récepteur mu et récepteur muscarinique. Par la structure obtenue en cristallographie, pouvez-vous dire pourquoi le récepteur mu activé emprunte la voie de la béta-arrestine alors que ce n'est pas le cas avec le récepteur muscarinique ?
Sébastien GRANIER (R) : je n'ai pas la réponse aujourd'hui. Il faut essayer de comprendre d'un point de vue structural ce qui se passe dans un récepteur et pas dans l'autre. C'est l'objet des recherches des prochaines années.

Alain ASTIER (Q) : en ce qui concerne le polymorphisme des petites molécules, notamment pour le contrôle qualité des matières premières, la Pharmacopée ne recommande pas spécifiquement l'utilisation de la cristallographie ? Pourquoi ? Existe-t-il d'autres méthodes plus simples ?
René CÉOLIN (R) : je ne sais toujours pas pourquoi la cristallographie n'est pas reconnue à sa juste place.
Il s'agit d'une question de culture. Les Allemands ont développé la science des cristaux. La France a la culture médicale du principe actif qui agit en solution. Donc l'état solide n'intéresse pas. Autre chose, la simplicité. On peut contrôler par l'infra rouge, le point de fusion. Mais aujourd'hui la cristallographie permet pour un même coût d'avoir des informations que ne donnent ni l'infrarouge, ni les techniques spectroscopiques. Elle permet notamment une caractérisation précise du principe actif qui va être mis sur le marché.

CONCLUSION

Les quatre conférences de la séance thématique intitulée « 2014 : l'année de la cristallographie » ont illustré l'apport de cette science aux domaines du médicament, de la cosmétologie, de la biologie et de la génomique. Ceci a été rendu possible par le développement de méthodes de résolution structurale rendues de plus en plus performantes par l'utilisation de l'informatique. Arrivée à un état de maturité, la cristallographie n'est cependant pas une science « achevée » assimilable à une technique de luxe. Pour preuve, la révélation de l'existence des phases incommensurables, puis celle, des quasi-cristaux dans les années 80, qui ont mis à mal le dogme de la stricte périodicité cristalline. L'exploration toujours plus fine de la matière réserve encore bien des surprises.

La séance est levée à 17h05.

* *

*

Jean-Luc DELMAS — *Président*

Agnès ARTIGES — *Secrétaire Général*