



FACULTÉ DES SCIENCES

**ANALYSE ET MODÉLISATION DE NOUVEAUX
INHIBITEURS NON NUCLÉOSIDIQUES DE LA
TRANSCRIPTASE INVERSE DU VIRUS DE
L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 (VIH-1)**

Dissertation présentée par
SANDRO BOLAND
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du Jury :

Prof. F. Durant (Promoteur)
Prof. L. Hevesi (FUNDP, Namur)
Prof. J-M. André (FUNDP, Namur)
Prof. A. Burny (ULB, IBMM, Gosselies)
Dr. J. Wouters (Institut de Recherches Wiame, Bruxelles)

2004

© Presses universitaires de Namur & Sandro Boland
Rempart de la Vierge, 13
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,
hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,
est strictement interdite pour tous pays.

Imprimé en Belgique
ISBN: 2-87037-443-7
Dépôt légal: D / 2004 / 1881 / 14

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences
Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgique

**ANALYSE ET MODELISATION DE NOUVEAUX INHIBITEURS NON NUCLEOSIDIQUES DE LA
TRANSCRIPTASE INVERSE DU VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 (VIH-1)**

par Sandro Boland

Résumé

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent pathogène responsable du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA). A l'heure actuelle, le traitement des patients infectés par le VIH est basé sur l'emploi de substances chimiques destinées à perturber les différentes étapes du cycle de réplication du virus (chimiothérapie). Même si elles permettent d'améliorer l'état de santé des patients et d'augmenter leur espérance de vie, ces thérapies restent coûteuses, contraignantes et imparfaites. La recherche de nouveaux composés plus efficaces reste donc d'actualité.

Ce travail de thèse est dédié à la conception rationnelle et à l'étude d'inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH-1 (INNTI) une enzyme essentielle au cycle de réplication de ce virus. Les molécules étudiées dérivent du cycle 2-pyridinone dont sont déjà issues plusieurs familles d'INNTI décrites dans la littérature.

La conception rationnelle de molécules d'intérêt pharmaceutique nécessite une bonne compréhension des interactions mises en jeu entre la macromolécule cible et ses ligands. Etant donné qu'aucune structure cristallographique d'un complexe TI-pyridinone n'est disponible dans la littérature, la première partie de ce travail est consacrée à la proposition d'un mode d'interaction TI-pyridinone et à la rationalisation des relations structure-activité liées à cette famille de molécules. Les informations recueillies lors de cette étude théorique sont ensuite exploitées dans le but d'aider au développement d'une nouvelle série d'inhibiteurs.

Dissertation doctorale en Sciences Chimiques
27 Février 2004
Laboratoire de Chimie Moléculaire Structurale (Profs. F. Durant et G. Evrard)
Promoteur : Prof. F. Durant

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences
Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium

**ANALYSIS AND MOLECULAR MODELING OF NEW NON NUCLEOSIDE REVERSE
TRANSCRIPTASE INHIBITORS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 (HIV-1)**

by Sandro Boland

Abstract

Human Immunodeficiency Virus (HIV) is the causative agent of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Treatment of HIV-infected patients is currently based on the use of chemical compounds that interfere with various steps of the viral replication cycle (chemotherapy). Although these therapies allow for a significant improvement of a patient's health, they nonetheless remain imperfect and expensive. Research for new and improved anti-HIV compounds is therefore necessary.

This Ph. D. thesis is dedicated to the rational design and analysis of new non nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase (NNRTI), a key enzyme in HIV lifecycle. Most of the studied compounds are derived from the 2-pyridinone ring, that is part of several NNRTI families.

Rational drug design usually requires a good understanding of the main interactions between the macromolecular target (RT) and its ligands. However, no crystal structure of a RT-pyridinone complex has been reported yet. Our first objective was therefore to build a theoretical model describing RT-pyridinone interactions and providing a better understanding of structure-activity relationships among pyridinones. The information obtained in this theoretical model was then used in order to develop new and potent inhibitors.

Ph.D. thesis in Chemistry
February 27, 2004
Laboratoire de Chimie Moléculaire Structurale (Profs. F. Durant and G. Evrard)
Advisor : Prof. F. Durant

Remerciements

Dieu t'a offert 86400 secondes aujourd'hui. En as tu utilisé une pour dire « merci » ?

(William Arthur Ward)

Nous y voilà! Après plus de quatre ans d'un travail de thèse donc je garderai une foule de souvenirs, voici venu pour moi le moment de remercier les personnes qui m'ont amené à ces résultats et celles qui m'ont accompagné pendant cette longue période, qui m'a apporté nombre de joies et de satisfactions.

« A tout seigneur tout honneur ! » Même si cette expression peut parfois paraître grandiloquente, elle n'est pas trop forte pour remercier comme il se doit mon promoteur, le professeur François Durant, pour m'avoir permis de travailler sur ce projet de recherche et pour m'avoir accordé sa confiance à de multiples reprises. Au risque de paraître peu original, je tiens particulièrement à souligner ses indéniables qualités humaines et didactiques, ainsi que son attachement à la recherche multidisciplinaire. Toutes ces choses ont grandement contribué à ce que durant cinq années, j'évolue dans un environnement qui m'a permis de m'épanouir.

Puisque j'en suis à parler de qualités humaines, je profite de l'occasion pour saluer le professeur Guy Evrard, dont la gentillesse est trop rarement soulignée et pour le remercier de m'avoir introduit dans le domaine de la cristallographie, une technique qui s'est avérée très utile dans ce projet.

Je me dois ensuite de remercier tous ceux qui ont activement pris part à ce projet de recherches. Tout d'abord, les dirigeants de chaque laboratoire : le professeur Laszlo Hevesi, le professeur Arsène Burny et le docteur Carine van Lint, qui ont parrainé cette collaboration, y compris dans les moments les plus difficiles, où les résultats se faisaient désirer. Ensuite, tous les chercheurs qui ont vécu avec moi ce projet au jour le jour. Au laboratoire CMO, Kiet, qui est à l'origine de ce projet et qui a assuré la synthèse de plusieurs des molécules décrites dans ce travail (et de beaucoup d'autres...) et Benoît, dont l'efficacité est inversement proportionnelle au temps de parole (très restreint) qu'il emploie lors des réunions. Au laboratoire de virologie

moléculaire, Valérie, Dominique, Stéphane et Dinis, qui ont travaillé avec une grande patience sur les aspects plus biologiques de ce projet. Et, « *last but not least* » tous mes « compagnons d'armes » successifs (je dirais « *compagnes* », si le terme n'était pas aussi ambigu !) au sein du laboratoire de chimie moléculaire structurale : Florence, Marie, Audrey et « Kiki » (pardon... Christine !), ainsi que Mme Bernadette Norberg, dont la contribution dans la détermination des structures par DRX mérite d'être honorée.

Je terminerai cette partie plus « professionnelle » des remerciements en saluant les deux derniers membres de mon Jury, qui n'ont pas encore été cités. Tout d'abord, le professeur Jean-Marie André, dont les qualités didactiques sont également bien connues parmi les étudiants du département de chimie. J'espère que l'attention que j'ai tenté de porter à la clarté de ce manuscrit fera honneur à celle qu'il met en œuvre dans ses cours. Enfin, le docteur Johan Wouters, dont le cours sur la conception rationnelle de molécules d'intérêt pharmaceutique m'a de toute évidence été très utile tout au long de ces dernières années.

Sur un plan plus personnel, j'aimerais également remercier (parfois avec une petite « *private joke* ») nombre de personnes et j'espère ne pas trop en oublier dans la longue liste qui va suivre.

Je commence évidemment par tous les membres (et plusieurs ex-membres) du laboratoire CMS, même si certains ont déjà été cités. Merci donc à Florence et Marie, qui m'ont accueilli en tant que mémorant (je leur laisse l'entière responsabilité de tout nouveau délire relatif à ma coupe de cheveux de l'époque), à Audrey, Fred et Kiki (qui mériterait en plus de son titre de docteur une médaille de rédactrice en chef, pour nombre de services rendus), à Fabrice, Christine et Bernadette, à Caroline et Raphaël (dont j'attends toujours de voir les aventures au Kenya), à Valérie et à mes trois mémorants : Nicolas, Caroline et Marie. C'est également avec un plaisir tout particulier que j'attribue une mention spéciale à Catherine, qui supporte avec gentillesse mes accès de pessimisme et mon humour un peu particulier (parfois teinté d'une « légère » dose de cynisme) et ce depuis la première candidature.

Merci également à tous les autres amis et amies qui m'ont entouré au cours de ces dernières années et qui m'ont donc apporté leur soutien, par leurs mots, leurs gestes ou leur humour. Je commence par Fabian et David, puisque je les connais depuis déjà bien longtemps (pour reprendre une expression consacrée, cela doit dater de la « 3^e bac à sable ») et qui ont toujours gardé le contact avec moi ; ainsi que par « *il dottore* » Nicolas (qui partage avec moi une réputation bien particulière dans une région du Nord de l'Italie). Merci également à tous les camarades de cette promotion 1999 (et à certains de leurs compagnons et compagnes), et plus particulièrement à Kiki et Catherine, Antoine, Diane (« Titinne »), Nathalie (et Guillaume), Aline (et Manu), Valérie et Fabrice (« Flaf »). Et puis restent tous les autres : John, Max, Oli, Tamara, Laurence (« Lolo »), Fifi (dont tout le monde a oublié le vrai prénom !), Marie (encore une !), ainsi que Jules, Mireille, Yves et Catherine (oui, encore une !), Philippe, Chantal, Rudy et Mariette, Ruggero et Flora et enfin Caroline (ma co-voitureuse).

Merci à Trisha, qui mérite une place à part, y compris pour les encouragements quotidiens et la multitude de petits mots gentils que j'ai reçus tout au long de cette période de rédaction.

Je conclurai enfin cette longue liste par toutes ces personnes irremplaçables qui constituent ma famille parmi lesquelles plusieurs qui s'en sont allées bien trop tôt. Tout d'abord mes parents, Jean-Pierre (« *Il padre* ») et Mirka (« *Mirka, Ti amo !* »), qui m'ont toujours encouragé et soutenu, quelles que soient les difficultés ; Aurélien mon frère (qui est bien plus courageux que moi à son âge) et Caroline (je sais, c'est la quatrième, mais celle-ci c'est ma belle sœur !). Ensuite mes grands parents, qui par leur travail et leur courage ont contribué à bâtir une vie meilleure pour leurs enfants et petits enfants : Amour (quel beau prénom !), Germaine, Pierro (« le patron ») et Pierina (dite « *Peperina* »). Puis mon parrain Claudio, Liliane Nicolas et Luca. Et bien d'autres encore, des deux côtés de la famille, parmi lesquels ma marraine Bernadette, Gaston, Cédric et Isabelle, Giovanni et Lina, Michel et Orietta et enfin Egidio et Giselda.

En guise de prologue...

« La vérité ne peut être contenue dans un seul rêve »

(proverbe arabe)

Ces quatre années de thèse m'ont permis de me plonger dans un travail multidisciplinaire et d'aborder plusieurs aspects de la conception de molécules d'intérêt biologique, tantôt très théoriques, tantôt plus appliqués. L'éternel indécis, un peu touche à tout, que je suis a ainsi trouvé matière à satisfaire sa curiosité, même si le fait d'être confronté à plusieurs disciplines m'a parfois enlevé l'occasion de m'intéresser à chacune d'elles autant qu'elles le méritent ou que je l'aurais souhaité.

Parallèlement à la formation scientifique, ces quatre années m'ont également donné l'occasion de prendre part à un projet rassemblant plusieurs groupes de recherche et d'apprécier nombre d'aspects d'un travail en équipe, avec ses joies et ses mauvais jours, ses avantages et ses déboires. En me souvenant de quelques épisodes de ce petit périple, je me dis qu'il a également été plus qu'enrichissant sur le plan humain. J'en retiendrai également que dans toute entreprise de ce genre, le résultat obtenu est bien plus que la somme du travail fourni par chacun des acteurs.

Je me dois ainsi, avant toute chose, de reconnaître que certains aspects de ce travail seraient restés une collection de coordonnées, de chiffres et d'images sans l'apport de tous ceux avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer. Pour que les résultats décrits dans ce manuscrit prennent tout leur sens, j'y ai donc associé, à plusieurs reprises, une série de données qui ne sont pas uniquement le fruit de ma contribution, en empruntant parfois quelques raccourcis. Afin d'éloigner toute ambiguïté, je tiens à préciser dès cette première page que chaque molécule originale citée dans le cadre de la conception rationnelle d'inhibiteurs de type pyridinone a été synthétisée au laboratoire de chimie des matériaux organiques, tandis que les valeurs d'activité biologique qui y sont associées ont été mesurées au laboratoire de virologie moléculaire.

Table des matières

<u>1 : Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)</u>	1
<u>1.1. Introduction</u>	1
1.1.1. <u>Plus de 20 ans de SIDA</u>	1
1.1.2. <u>Situation actuelle de l'épidémie</u>	4
<u>1.2. Aspects biologiques de l'infection par le VIH</u>	6
1.2.1. <u>L'infection par le VIH</u>	6
1.2.2. <u>Structure d'une particule virale</u>	8
1.2.3. <u>Le génome du VIH-1</u>	9
1.2.3.1. Structure générale	9
1.2.3.2. Les séquences LTR	10
1.2.3.3. <i>gag</i>	10
1.2.3.4. <i>pol</i>	10
1.2.3.5. <i>env</i>	15
1.2.3.6. Les gènes « annexes »	16
1.2.4. <u>Le cycle de vie du VIH</u>	17
1.2.4.1. Reconnaissance de la cellule hôte	17
1.2.4.2. Pénétration dans la cellule	19
1.2.4.3. Rétrotranscription du génome viral	20
1.2.4.4. Intégration dans le génome de la cellule hôte	21
1.2.4.5. Transcription du génome et expression des protéines virales	23
1.2.4.6. Formation de nouvelles particules virales	24
1.2.4.7. Maturation des particules virales	25
<u>1.3. Les thérapies anti-VIH</u>	25
1.3.1. <u>Les vaccins</u>	26
1.3.2. <u>Les chimiothérapies</u>	28
1.3.2.1. Inhibiteurs de l'adsorption du virus	28
1.3.2.2. Antagonistes des co-récepteurs	30

1.3.2.3. Inhibiteurs de la fusion des membranes	32
1.3.2.4. Agents s'attaquant à la nucléocapside virale	33
1.3.2.5. Inhibiteurs de la transcriptase inverse	34
1.3.2.5.1. Inhibiteurs nucléosidiques	34
1.3.2.5.2. Inhibiteurs non nucléosidiques	38
1.3.2.5.3. Inhibiteurs de dimérisation	43
1.3.2.5.4. Inhibiteurs de l'activité RNase H	44
1.3.2.6. Inhibiteurs de l'intégrase	45
1.3.2.7. Inhibiteurs de la transcription et de la transactivation	47
1.3.2.8. Inhibiteurs de la protéase virale	48
1.3.3. <u>Les traitements antiviraux actuels</u>	50
1.3.4. <u>Les inconvénients des thérapies actuelles</u>	52
1.3.4.1. Le coût	52
1.3.4.2. La résistance virale	55
1.3.4.3. La persistance du virus	57
1.3.4.4. Les effets secondaires et le facteur humain....	60

Chapitre 2 : Objectifs et stratégies

77

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

83

3.1. <u>Diffraction de rayons X</u>	83
3.1.1. <u>Rappels théoriques</u>	83
3.1.2. <u>Prise d'un spectre de diffraction de rayons X</u>	87
3.1.3. <u>Détermination de la structure cristalline d'un composé</u>	88
3.1.4. <u>Affinement de la structure</u>	90
3.1.5. <u>Quelles limites à la DRX ?</u>	90
3.1.6. <u>Les bases de données structurales</u>	91
3.2. <u>Méthodes de mécanique quantique</u>	92
3.2.1. <u>En termes simples....</u>	92

3.3. Méthodes de mécanique moléculaire	94
3.3.1. <u>Les champs de forces</u>	95
3.3.2. <u>Algorithmes de minimisation</u>	98
3.4. Analyse conformationnelle	99
3.4.1. <u>La manière forte : recherche systématique</u>	100
3.4.2. <u>La méthode douce : dynamique moléculaire</u>	101
3.4.3. <u>« Recuit » simulé, ou <i>simulated annealing</i></u>	104
3.5. Docking	106
3.5.1. <u>Monte Carlo</u>	106
3.5.2. <u>Algorithmes génétiques</u>	108
3.5.3. <u>Autodock 3.0</u>	110
3.5.4. <u>Affinement des solutions</u>	110
3.6. Calcul du logP	112
3.7. Calcul de l'énergie de solvation d'un composé	113
3.8. Tests biologiques	115
3.8.1. <u>Test <i>in vitro</i> d'inhibition enzymatique</u>	115
3.8.2. <u>Mesure du pouvoir antiviral <i>ex vivo</i></u>	116
3.8.3. <u>Evaluation de la cytotoxicité des molécules</u>	116

<u>Chapitre 4 : Elaboration d'un modèle théorique de l'interaction TI- pyridinone</u>	119
--	------------

4.1. Modèles d'interaction TI-pyridinone proposés dans la littérature	120
4.1.1. <u>Le pharmacophore « <i>butterfly</i> »</u>	120
4.1.2. <u>Modèle de Jourdan <i>et al</i></u>	125
4.1.3. <u>Modèle de Tucker <i>et al</i></u>	127
4.1.4. <u>Modèle de Mager</u>	128
4.1.5. <u>Pyridinones <i>Curie et Janssen</i></u>	139
4.1.6. <u>Conclusion</u>	130
4.2. Proposition d'un modèle d'interaction pour les Pyridinones <i>Merck</i>	130
4.2.1. <u>Analyse conformationnelle des pyridinones de la série <i>Merck</i></u>	130

4.2.1.1. Balayage conformationnel <i>ab initio</i>	131
4.2.1.2. Utilisation de la CSD	135
4.2.1.3. Etude par mécanique moléculaire	136
4.2.1.4. Conclusions de l'étude conformationnelle des pyridinones <i>Merck</i>	141
4.2.2. <u>Docking de pyridinones de la série <i>Merck</i></u>	142
4.2.2.1. Validation du programme <i>Autodock</i>	142
4.2.2.2. Recherches préliminaires	143
4.2.2.3. Variations sur le cycle pyridinone	146
4.2.2.4. Variations sur le spacer	155
4.2.2.5. Variations sur le cycle secondaire	160
4.2.3. <u>Conclusion sur les pyridinones de la série <i>Merck</i></u>	163
4.3. <u>Proposition d'un modèle d'interaction pour les pyridinones <i>Curie</i></u>	164
4.3.1. <u>Correspondance au pharmacophore</u>	164
4.3.2. <u>Docking des pyridinones <i>Curie</i></u>	166
4.3.3. <u>Conclusion sur la modélisation des pyridinones <i>Curie</i></u>	172
4.4. <u>Proposition d'un modèle d'interaction pour les pyridinones <i>Janssen</i></u>	173
4.4.1. <u>Correspondance au pharmacophore</u>	173
4.4.2. <u>Docking de pyridinones <i>Janssen</i></u>	174
4.4.3. <u>Conclusion sur les pyridinones <i>Janssen</i></u>	177
4.5. <u>Conclusion sur l'étude théorique d'inhibiteurs de type pyridinone.</u>	178

<u>Chapitre 5 : Conception rationnelle de nouveaux INNTI de type pyridinone.</u>	183
---	------------

5.1. <u>Etude d'une série d'analogues des pyridinones <i>Merck</i></u>	183
5.1.1. <u>Etude cristallographique</u>	185
5.1.2. <u>Analyse conformationnelle des pyridinones de la série E</u>	187
5.1.2.1. Etude par calculs <i>ab initio</i>	187
5.1.2.2. Utilisation de la CSD	191
5.1.2.3. Etude par dynamique moléculaire	193
5.1.3. <u>Docking des composés de la série E</u>	194

5.1.4. <u>Conclusion sur la modélisation des pyridinones de la série E</u>	196
5.2. <u>Contribution à la synthèse de pyridinones substituées en position 4</u>	197
5.2.1. <u>Réaction avec POCl₃</u>	198
5.2.2. <u>Réaction d'acylation</u>	201
5.2.3. <u>Formation d'un intermédiaire sulfonate</u>	203
5.2.4. <u>Réactions d'alkylation</u>	205
5.2.5. <u>Conclusion</u>	208
5.3. <u>Optimisation des dérivés 4-cycloalkoxy-pyridinone</u>	208
5.3.1. <u>Optimisation du groupe en position 4</u>	209
5.3.1.1. Taille du cycle	209
5.3.1.2. Substitution du cycle	213
5.3.2. <u>Optimisation du groupe en position 3</u>	221
5.3.3. <u>Conclusion sur l'optimisation des dérivés 4-(cycloalkoxy)pyridinone</u>	228
5.4. <u>Activité des composés de la série Z sur les souches mutantes du virus</u>	229
5.4.1. <u>Relations structure-activité face à la souche Tyr188Cys</u>	230
5.4.2. <u>Activité sur la souche Tyr181Cys</u>	235
5.4.3. <u>Conclusion</u>	236
5.5. <u>Prédiction de propriétés pharmacocinétiques</u>	236
5.5.1. <u>Absorption</u>	237
5.5.2. <u>Distribution</u>	239
5.5.3. <u>Cytotoxicité et indice de sélectivité</u>	241
5.5.4. <u>Conclusion sur la prédiction des propriétés pharmacocinétiques</u>	243
5.6. <u>Conclusion</u>	243

Chapitre 6 : Conclusions et perspectives

247

Annexes

Chapitre 1 : Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

« Je n'ai jamais rencontré d'homme si ignorant qu'il n'ait rien à m'apprendre »
(Galilée)

1.1. Introduction

Ce travail de thèse traite dans une large part du **Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise (SIDA)**, et plus précisément de la conception et de l'étude de molécules synthétiques destinées à s'attaquer au **Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)**, responsable de cette pathologie. Cette recherche est réalisée grâce à l'exploitation de connaissances qui ont trait non seulement à la chimie, mais aussi à la biologie, la physique, la pharmacologie ou même l'informatique. Le problème du SIDA est donc abordé d'un point de vue théorique, qui est souvent bien éloigné de celui des personnes confrontées aux réalités médicales, sociales et humaines de la maladie.

L'aspect fondamental des recherches présentées dans ce travail ne doit cependant pas faire oublier ces réalités. C'est pourquoi cette introduction se doit de rappeler quelques faits relatifs à l'épidémie du SIDA.

1.1.1. Plus de 20 ans de SIDA

L'épidémie de SIDA est, en 2004, largement entrée dans sa troisième décennie (figure 1). C'est en effet à la **fin de l'année 1980** et au début de 1981 que sont rapportés les premiers cas suspects de déficiences immunitaires graves parmi les populations homosexuelles américaines^[1]. Ceci mène en fin **1981** à une première **définition d'un syndrome de l'immunodéficience acquise**^[2], qui deviendra le SIDA. A cette époque, la forte tendance du SIDA à sévir parmi les populations homosexuelles^[3] lui vaut dans un premier temps le nom de « *Gay Related Immune Deficiency* » (GRID)^[4, 5]. Les premiers cas de déficiences immunitaires chez les consommateurs de drogues injectables sont cependant identifiés dès décembre

1981^[6]. Un peu plus d'un an plus tard, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), responsable du SIDA, est identifié presque simultanément par les professeurs Montagnier^[7] et Gallo^[8]. Les médecins constatent alors qu'il se transmet par les relations sexuelles et par le sang et qu'en l'absence de traitement, l'infection par le VIH mène lentement mais irrémédiablement à la mort du patient. Le **SIDA**, qui constitue la **phase terminale** de ce processus, résulte de la **destruction progressive des défenses immunitaires**. Il conduit le patient à contracter de multiples **infections dites « opportunistes »**, normalement inoffensives pour un sujet sain (Pneumonies *p. carinii*, méningite à cryptocoque,...), ou à développer des lymphomes et des sarcomes de Kaposi.

Très vite, on découvre que le SIDA n'est pas limité aux USA et qu'une épidémie, qui touche également les populations hétérosexuelles, sévit déjà en Afrique^[9]. En 1985, au moins un cas de SIDA a été rapporté sur chaque continent. En l'absence de traitement efficace, l'heure est dans un premier temps à la **prévention**, qui passe par la promotion du préservatif, la sensibilisation à la maladie et la mise en place de structures de dépistage. En **1985**, aux USA, le **premier test HIV** est développé par la firme Abott et approuvé par la Foods and Drugs Administration^[10]. Un examen systématique des dons de sang est alors instauré. Dans d'autres pays cependant, les dangers liés au SIDA sont parfois gravement sous-estimés par une partie du milieu scientifique (on parle parfois de « porteurs sains », dont 10% seulement développeront un SIDA clinique dans les cinq ans) et les autorités sanitaires. En outre, des rivalités éclatent entre les différentes firmes pharmaceutiques qui commercialisent les tests de dépistage. Ces facteurs sont parfois à l'origine de retards dans la mise en place du dépistage, ce qui cause plusieurs contaminations par le virus. C'est ainsi qu'éclate en France le scandale du « sang contaminé »^[11].

Les efforts de la communauté scientifique dans le domaine de la lutte contre le SIDA se traduisent par un nombre important de programmes de recherche. Le **premier médicament antirétroviral** agissant sur le VIH, l'**AZT**, est découvert en **1985**^[12] et commercialisé aux USA dès 1987. Le premier traitement destiné à réduire les risques de transmission mère-enfant est développé en 1994. A partir de 1996, l'introduction de nouvelles classes de médicaments mène à l'abandon des traitements classiques au profit des **multithérapies** (Highly Active AntiRetroviral Therapy, ou HAART)^[13], qui combinent plusieurs

types de molécules actives contre le VIH. Ces avancées ont un impact majeur sur l'espérance de vie et la qualité de vie des patients, sans pour autant permettre leur guérison.

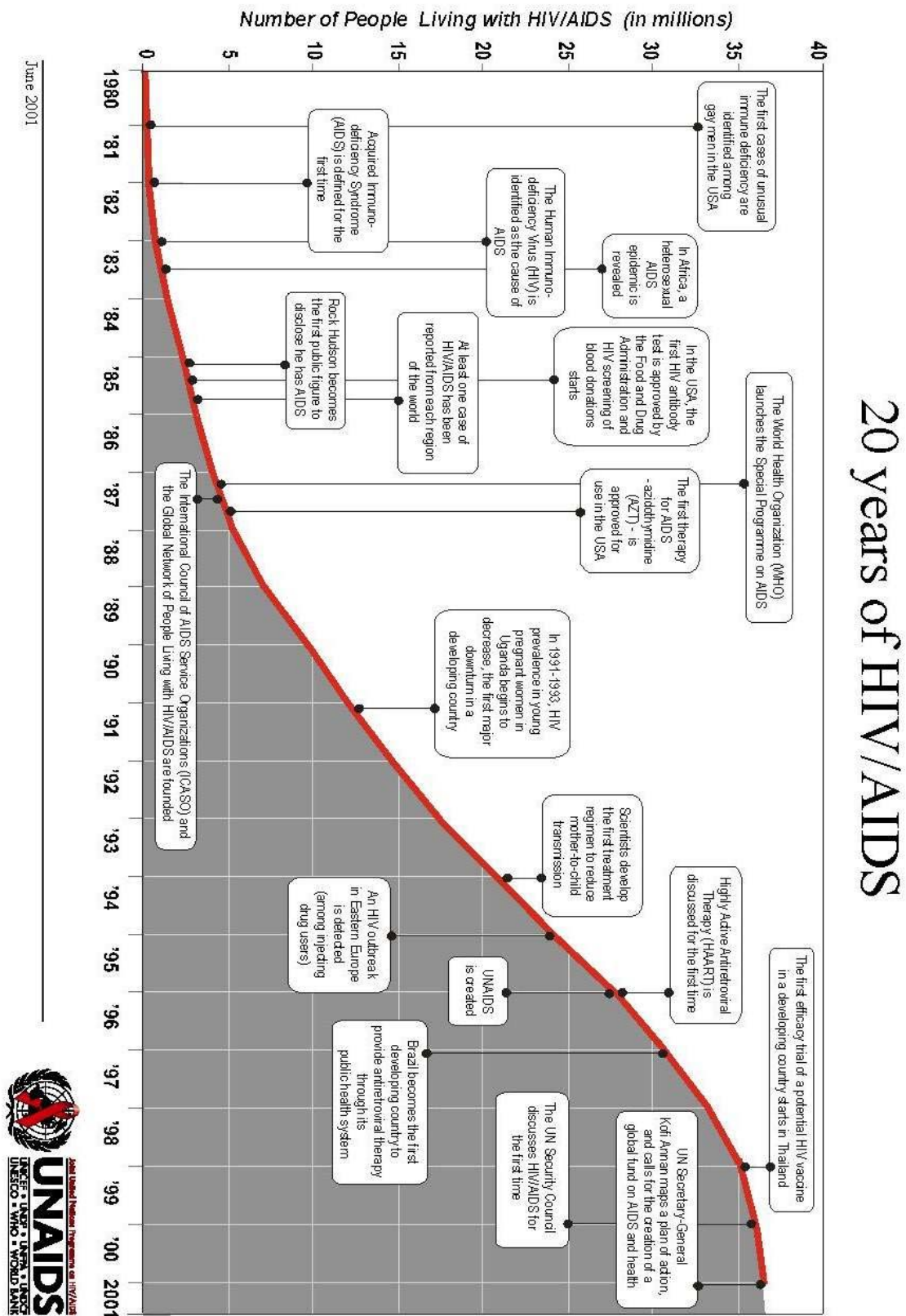


Figure 1 : Bref historique de l'épidémie de SIDA (source : UNAIDS)

Les progrès réalisés dans les domaines du suivi médical et de la prévention ne parviennent cependant pas à mettre un terme à l'**expansion rapide de l'épidémie**. Le cap des cinq millions de malades est franchi début 1988. Celui des dix millions en 1990. Fin 1993, ce sont déjà vingt millions de personnes qui sont porteuses du VIH. Comme c'est le cas la plupart du temps, la maladie frappe d'abord les populations les plus pauvres, les moins éduquées et les moins informées. Même si certains succès locaux sont obtenus sur le front de la prévention ou celui de la distribution des médicaments dans les pays en voie de développement, ces avancées sont encore insuffisantes au regard de la progression actuelle du SIDA dans le monde. Il faut pourtant attendre le 20^e année de l'épidémie pour que le conseil de sécurité de l'ONU discute du SIDA pour la première fois.

1.1.2. Situation actuelle de l'épidémie^[14]

En 2003, l'épidémie de SIDA a causé plus de 3 millions de décès. Parallèlement, 5 millions de personnes ont contracté le VIH cette même année, ce qui porte à environ **40 millions** le nombre total de malades dans le monde.

70% des personnes contaminées et plus de 77% des décès sont localisés en Afrique Subsaharienne. Dans certains des pays les plus touchés, comme le Botswana ou le Zimbabwe, ce sont plus de 30% de la population adulte qui sont infectés par le VIH (figure 2). C'est dès lors la survie économique et sociale de ces pays qui est elle même menacée, comme le montrent les crises alimentaires, liées au SIDA, auxquelles ils doivent faire face. De nombreux pays d'Afrique Subsaharienne doivent relever des défis considérables non seulement pour assurer le traitement, la prise en charge et le soutien des millions d'individus vivant avec le VIH, mais aussi pour maintenir et élargir les actions de prévention, qui restent dans cette région la seule stratégie efficace à une large échelle pour endiguer l'épidémie.

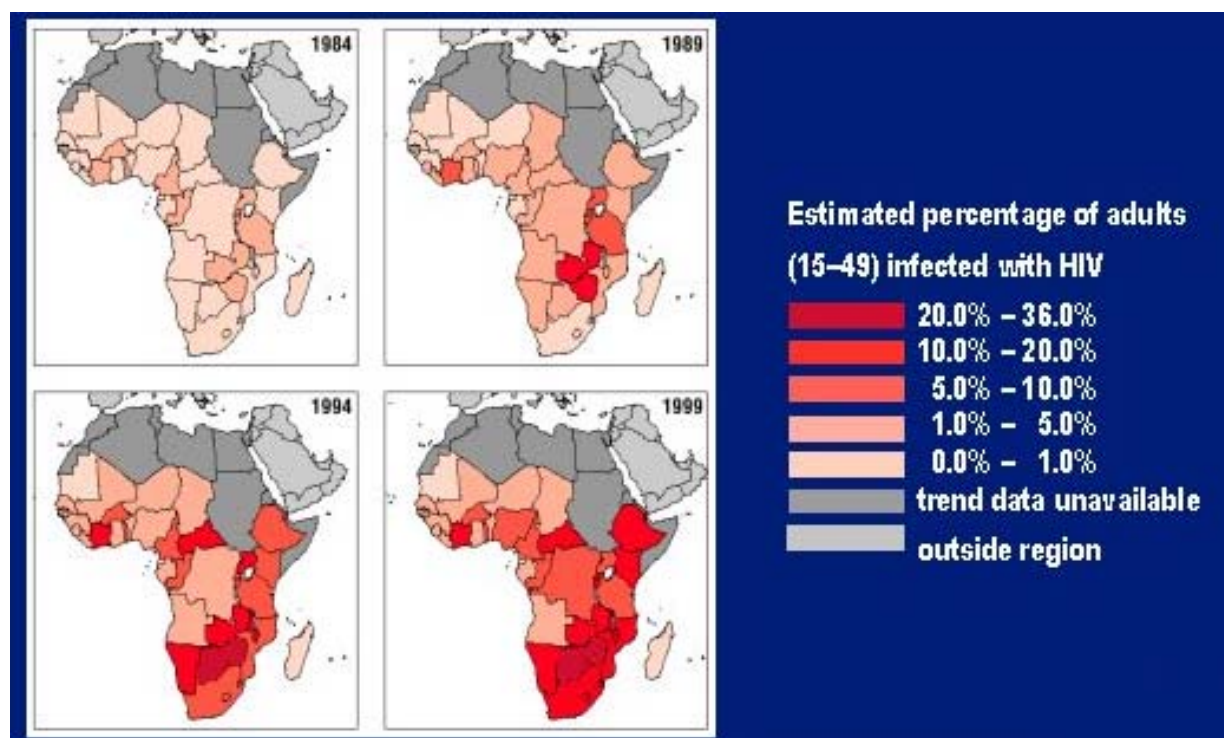


Figure 2 : Situation de l'épidémie de SIDA sur le continent Africain (source : UNAIDS)

La situation dans le reste du monde, bien qu'elle soit moins dramatique, reste préoccupante. Dans plusieurs pays des Caraïbes, le SIDA est devenu la première cause de mortalité. Les chances de maîtriser l'épidémie en Asie diminuent rapidement. Plus de 4 millions de personnes vivent actuellement avec le VIH en Inde, le total le plus élevé du monde après l'Afrique du Sud. Un million de chinois ont déjà été contaminés par le virus et ce nombre pourrait passer à 10 millions d'ici la fin de la décennie. Quant à l'Europe Orientale et l'Asie centrale, elles ont le triste privilège de connaître la croissance de l'épidémie la plus rapide au monde. En comparaison, la situation des pays à revenu élevé est enviable, mais une augmentation des comportements à risque démontre la nécessité de renouveler régulièrement les actions de prévention.

Au vu de ces chiffres (résumés à la figure 3), il apparaît clairement que parallèlement aux actions de prévention, l'étude du virus de l'immunodéficience humaine et le développement de nouveaux traitements antiviraux reste une priorité majeure.

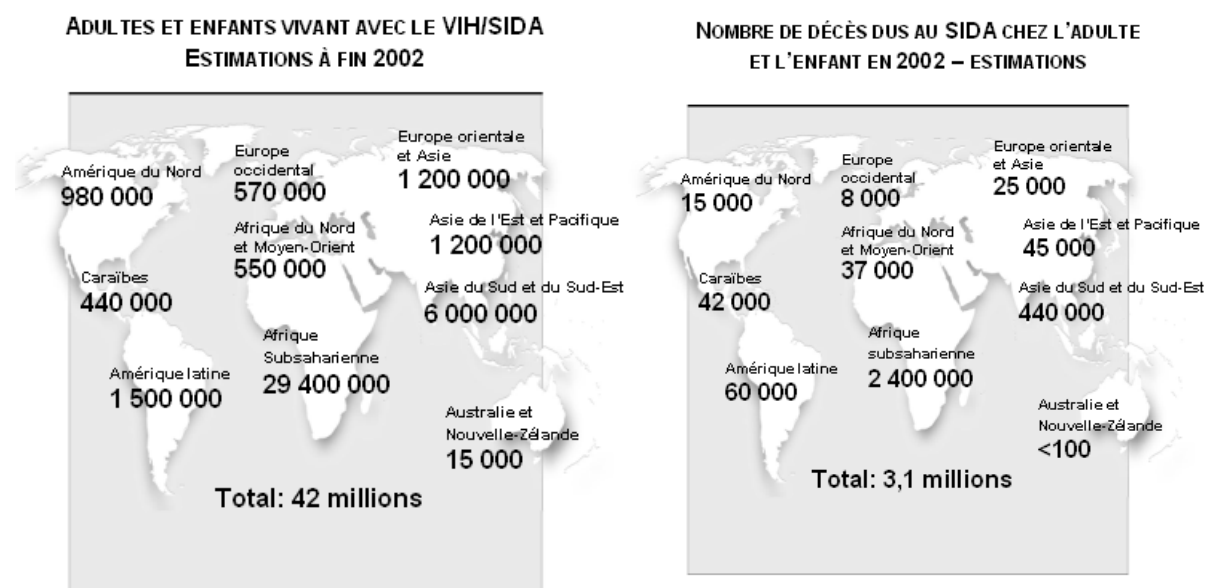


Figure 3 : Nombre de personnes contaminées par le VIH et de décès dus au SIDA (source : UNAIDS).

1.2. Aspects biologiques de l'infection par le VIH

Ce travail de thèse portant sur l'étude de molécules destinées à combattre l'infection par le VIH-1, il est indispensable de s'attarder un instant sur ses aspects les plus biologiques. La connaissance précise des multiples mécanismes mis en jeu lors de la réplication de ce virus et de ses nombreux effets sur l'organisme infecté constitue cependant un très large sujet de recherches, dont l'étendue dépasse de très loin le cadre de ce projet. Les paragraphes qui suivent visent donc à exposer à un lecteur chimiste, parfois peu familier avec les arcanes de la biologie moléculaire, le contexte global dans lequel s'inscrit ce projet. Un accent particulier y est mis sur la transcriptase inverse, une enzyme qui joue un rôle central dans les travaux réalisés.

1.2.1. L'infection par le VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine est un **rétrovirus** de la famille des **lentivirus**, tout comme les virus de l'immunodéficience bovine (VIB), féline (VIF) et simienne (VIS)^[15]. Le terme rétrovirus désigne un virus dont le **patrimoine génétique est constitué d'ARN simple brin**. Afin de pouvoir infecter leurs cibles, les rétrovirus doivent **rétrotranscrire** cet ARN simple brin sous forme d'un ADN double brin. Cette opération est réalisée à l'aide d'une enzyme qui leur

est spécifique, la **transcriptase inverse (TI)**. Le brin d'ADN produit est par la suite intégré au génome d'une cellule hôte.

La plupart des rétrovirus s'attaquent aux vertébrés, même si certains ont été découverts chez les insectes et les mollusques. Ils peuvent causer des **tumeurs malignes**, des **désordres neurologiques** ou encore des **déficiences immunitaires**, comme c'est le cas pour le VIH. D'autres peuvent infecter un organisme sans porter atteinte à sa santé. Jusqu'en 1980, les rétrovirus sont considérés comme de bons modèles pour étudier les mécanismes du cancer chez les animaux et non comme des agents pathogènes susceptibles d'affecter l'être humain^[15]. Ce point de vue change radicalement avec la découverte en 1980^[16] et 1982^[17] du HTLV (Human T-cell Leucemia Virus), suivie de près par celle du virus de l'immunodéficience humaine^[7]. Par la suite, on constate également que le patrimoine génétique de certains rétrovirus est présent, entièrement ou partiellement, dans le génome humain.

Il existe deux formes principales du VIH : le **VIH-1** et le **VIH-2**^[18]. Le VIH-1 est la forme la plus courante dans les pays industrialisés, tandis que le VIH-2 est principalement localisé en Afrique Subsaharienne. Il existe toutefois une certaine variété dans le patrimoine génétique de ces deux espèces. On a ainsi identifié onze sous-types (« *clades* ») du VIH-1. A cela s'ajoutent de multiples variantes et souches mutantes.

Le VIH s'attaque de manière presque exclusive aux cellules humaines porteuses des **récepteurs CD4** (cellules CD4+), qui sont principalement des **lymphocytes T** et des **macrophages**. Ces cellules (et tout particulièrement les lymphocytes) sont pour la plupart rapidement détruites, soit par le **bourgeonnement** massif de nouveaux virions, qui endommage considérablement la membrane cellulaire^[19], soit par les **attaques des lymphocytes T cytotoxiques**^[20]. La **formation de syncytia**^[21] (fusion de deux cellules induite par la présence de protéines d'enveloppe du VIH à la surface de la cellule infectée) et la capacité du VIH à provoquer l'**apoptose** (destruction programmée d'une cellule) chez certaines cellules proches d'une cellule hôte^[20] contribuent également à l'affaiblissement des défenses immunitaires.

Après infection par le virus, le taux de cellules CD4⁺ du patient diminue rapidement (figure 4), tandis que sa charge virale augmente de manière exponentielle. Cette première période constitue la **phase aiguë** de l'infection. Après quelques semaines, un équilibre s'établit suite à la réaction du système immunitaire. Il marque le début d'une longue **phase asymptomatique**, caractérisé par un état presque **stationnaire** de la charge virale et du système immunitaire. Ce n'est généralement qu'au bout de plusieurs années que cet équilibre est rompu et que le patient évolue vers un **SIDA** clinique, caractérisé par une virémie en forte augmentation et par un taux de cellules CD4⁺ extrêmement bas, qui permet l'apparition de **maladies opportunistes**^[22].

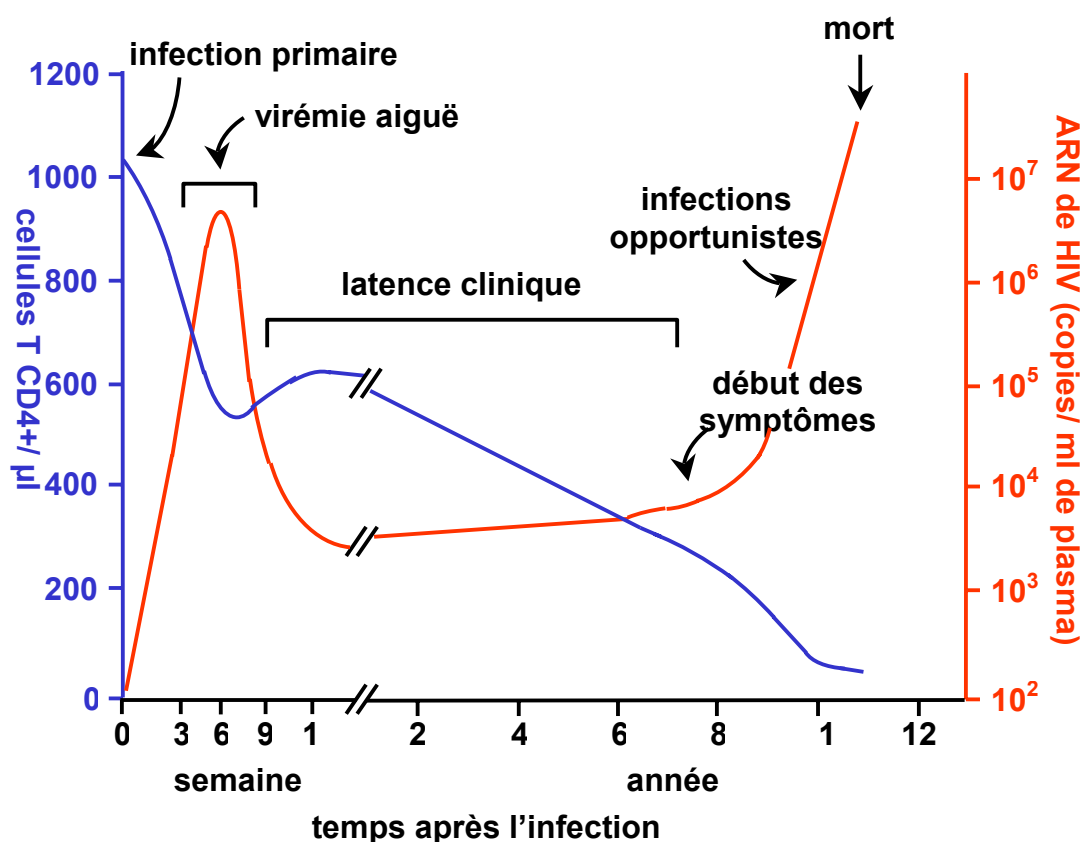


Figure 4 : Evolution, au cours du temps, de la charge virale d'un patient et de son taux de cellules CD4+^[22]

1.2.2. Structure d'une particule virale^[23]

Une particule virale du VIH-1 (figure 5) mesure une centaine de nanomètres de diamètre et sa masse est d'environ $2.5 \cdot 10^8$ Da. Son **enveloppe externe** est constituée d'une double couche lipidique riche en cholestérol, associée d'une part à une **glycoprotéine de surface (SU, ou gp120)** trimérique, responsable de la reconnaissance des cellules ciblées par le VIH et d'autre

part à une **glycoprotéine transmembranaire (TM, ou gp41)**, elle aussi sous forme de trimère, qui joue un rôle important dans la pénétration du virus dans ces cellules. Une **protéine de matrice (MA, ou p17)** forme la partie externe du cœur viral. A l'intérieur de cette matrice se trouve la **capside virale**, construite par l'assemblage de **protéines de capsid (CA, ou p24)**. Elle contient les **deux brins d'ARN** qui constituent le génome viral, associés à une **protéine de nucléocapside (NC, ou p7)**. Elle renferme également les trois enzymes virales indispensables à la réplication que sont la **transcriptase inverse (TI)**, l'**intégrase (IN)** et la **protéase (PR)**, ainsi que plusieurs protéines virales annexes et de la cyclophiline A^[24], appartenant à une précédente cellule hôte.

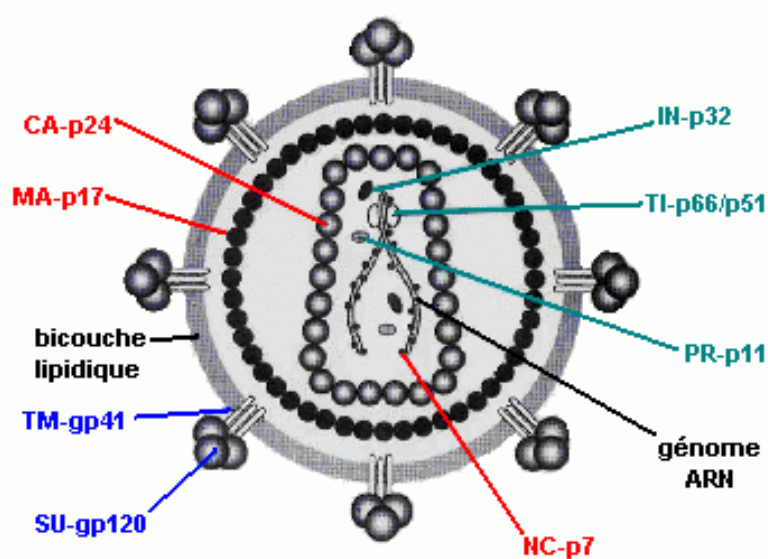


Figure 5 : Structure schématique d'une particule virale du VIH-1^[23].

1.2.3. Le génome du VIH-1

1.2.3.1. Structure générale^[23]

Le génome du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (figure 6) est long d'environ **9800 bases**. Il contient trois gènes principaux (*gag*, *pol* et *env*), communs à tous les rétrovirus, ainsi que plusieurs gènes annexes. Comme pour l'ensemble des rétrovirus (mais contrairement à d'autres catégories de virus), ce génome est diploïde. Etant constitué d'ARN, il doit être rétrotranscrit par la transcriptase inverse pour que la cellule hôte puisse être effectivement infectée.

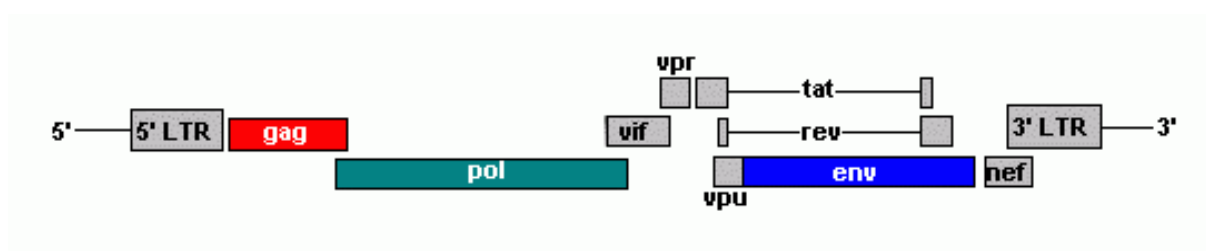


Figure 6 : Représentation schématique du génome du VIH-1

1.2.3.2. Les séquences LTR

Une fois rétrotranscrit, le génome du VIH-1 est bordé de part et d'autre d'une **séquence LTR** (Long Terminal Repeat), qui est présente chez tous les rétrovirus. Ces régions du génome sont essentielles à la réplication du virus. Elles permettent d'une part d'initier la transcription inverse du génome grâce à un **site d'amorçage** désigné *primer binding site*, ou PBS. Elle facilitent également, au cours de ce processus, le transfert d'un brin d'ADN en cours de synthèse d'une extrémité à l'autre du génome viral. Enfin, elles contiennent de nombreuses séquences capables d'interagir avec des facteurs de transcription de la cellule hôte (ex : NF- κ B, NFAT,...)^[15]. La LTR 5' joue ainsi le rôle de promoteur de la **transcription** du génome viral par la cellule hôte.

1.2.3.3. gag

Le gène **gag** (pour « *group antigen* ») code pour une polyprotéine de 55kDa (Gag, p55), qui est exprimée à partir d'un ARNm non épissé. **Gag** peut être clivé par la protéase en plusieurs autres protéines, qui permettent de structurer la particule virale. La protéine de **matrice** (MA, p17), qui forme la partie externe du cœur viral, est dérivée du domaine N-terminal myristoylé^[25] et hydrophobe de Gag, ce qui l'amène à interagir avec la double couche lipidique du virus. Deux autres produits de ce clivage sont la protéine de **capside** (CA, p24) et la protéine de **nucléocapside** (NC, p7). Cette dernière est destinée à recouvrir le brin d'ARN viral. Elle le stabilise grâce à deux doigts de zinc^[26], permet son incorporation dans de nouvelles particules virales et facilite sa transcription inverse^[27]. Enfin, un polypeptide p6 joue le rôle de médiateur entre p55 et la protéine accessoire Vpr, ce qui permet l'intégration de cette dernière dans la

particule virale^[28]. p6 comporte également un domaine essentiel à la libération de nouveaux virions par la cellule hôte^[29].

1.2.3.4. *pol*

Les protéines codées par le gène ***pol*** comprennent la **protéase** virale, l'**intégrase** et la **transcriptase inverse**. Le gène *pol* n'est jamais exprimé de manière indépendante, mais sous forme d'une polyprotéine de fusion Gag-Pol^[30], générée suite à une lecture alternative des ARNm (« *frame shifting* ») viraux par les ribosomes. Cet événement, qui est déclenché par un motif D'ARN spécifique^[31], ne se produit que pour environ 5% des ARNm viraux traduits. Les précurseurs Gag et Gag-Pol sont donc produits au rythme d'environ 20 Gag pour 1 Gag-Pol. Par la suite, la protéase virale sépare les domaines Gag et Pol du polypeptide et clive Pol en protéines fonctionnelles.

La **protéase virale** (PR, p11) est une **aspartyl protéase**^[32] de 99 acides aminés, qui exerce son activité sous forme de **dimère**. Elle catalyse le **clivage des polyprotéines** Gag et Gag-Pol à des positions spécifiques, pour libérer les protéines virales sous une forme fonctionnelle. Cette maturation conditionne le caractère infectieux des nouveaux virions. La structure de la protéase (figure 7) a été déterminée par diffraction de rayons X dès 1989^[33, 34], ce qui a grandement facilité la conception rationnelle de nouveaux inhibiteurs.

L'**intégrase** (IN, p32) permet l'**intégration du double brin d'ADN** produit par la transcriptase inverse (provirus) dans l'ADN d'une cellule hôte. Sa structure complète n'a pas pu être déterminée par diffraction de rayons X, bien que plusieurs domaines aient déjà été caractérisés par cette méthode. On sait cependant que IN exerce son activité sous forme d'un **multimère**. Son action est essentielle à la réplication virale. Les gènes viraux ne peuvent en effet être exprimés de manière efficace à partir de l'ADN viral non intégré^[35].

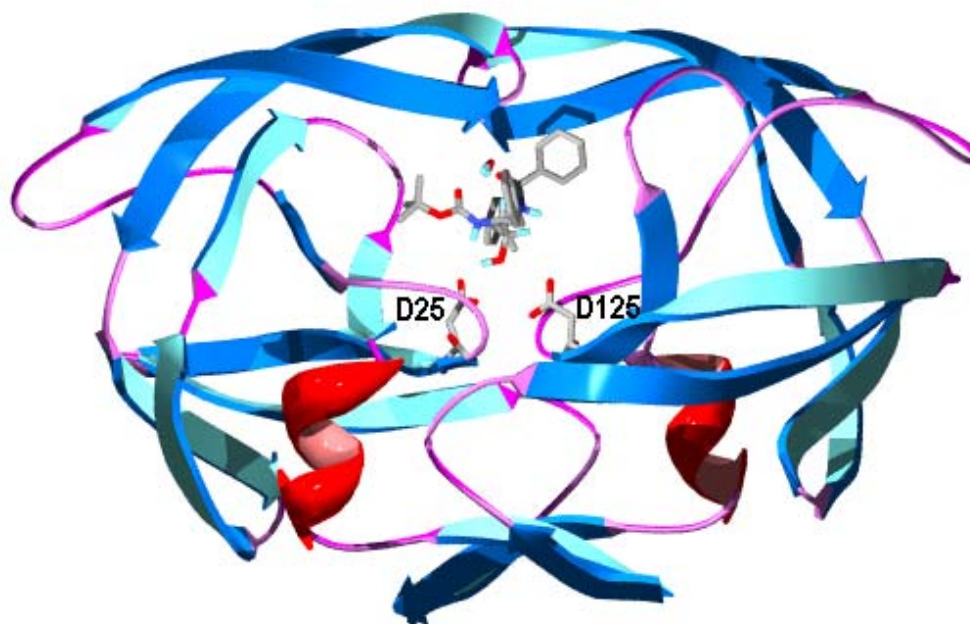


Figure 7 : Structure schématique de la protéase du VIH-1, complexée à un inhibiteur peptidique et position des résidus catalytiques Asp25 et Asp225.

La **transcriptase inverse** (TI) de 66 kDa est une enzyme fondamentale des rétrovirus. Son action permet la **rétrotranscription du génome viral**, constitué d'ARN simple brin, en un ADN double brin. Pour ce faire, la TI exerce les activités d'ADN polymérase ARN et ADN dépendante et de RNase H, sous forme d'un **hétérodimère** p66/p51^[36, 37] dont la structure a été déterminée par diffraction de rayons X^[38, 39] (figure 8). La sous-unité p66 contient 560 résidus et peut être subdivisée en cinq domaines (doigts, paume, pouce, connexion et RNase H), désignés par analogie à une main droite^[40]. Elle est responsable des activités ADN polymérase et RNase H de l'enzyme. La sous-unité p51 du dimère provient du clivage d'une unité p66 par la protéase virale. Les résidus ôtés correspondent au domaine RNase H de la p66. Bien que leur structure primaire soit identique, p66 et p51 possèdent des structures tertiaires très différentes. Les trois **résidus catalytiques, Asp110, Asp185 et Asp186**, clairement exposés dans le cas de la p66, sont littéralement enterrés au sein de p51. Ceci explique l'absence d'activité catalytique chez p51.

Le **site catalytique** de l'activité polymérase de la TI ^[41] (figure 9) comporte d'une part un motif d'acides aminés **YMDD** (Tyr183-Met184-Asp185-Asp186), conservé chez les ADN polymérases et d'autre part deux ions Mg^{2+} , qui y sont maintenus grâce à leur interaction avec les résidus

Asp110, Val111, Asp185 et Asp186 (figure 9a). Le **nucléoside triphosphate** destiné à être intégré au brin d'ADN en croissance est pour sa part stabilisé grâce à des **interactions ioniques** avec les deux ions Mg^{2+} et avec les résidus Lys65 et Arg72, ainsi que par des **ponts hydrogène** formés avec les groupements NH des résidus Asp113, Ala114 et Tyr115 (figure 9b). Les brins d'ADN/ARN du génome viral jouent également un rôle dans ce complexe. On observe en effet des interactions de **π -stacking** entre le nucléotide et la dernière base du brin d'ADN en cours de synthèse (amorce). Le brin à transcrire (matrice) permet, grâce aux **interactions de Watson-Crick**, de former une ultime série de ponts hydrogène et de sélectionner le nucléoside triphosphate à intégrer au brin d'ADN en croissance (figure 9c).

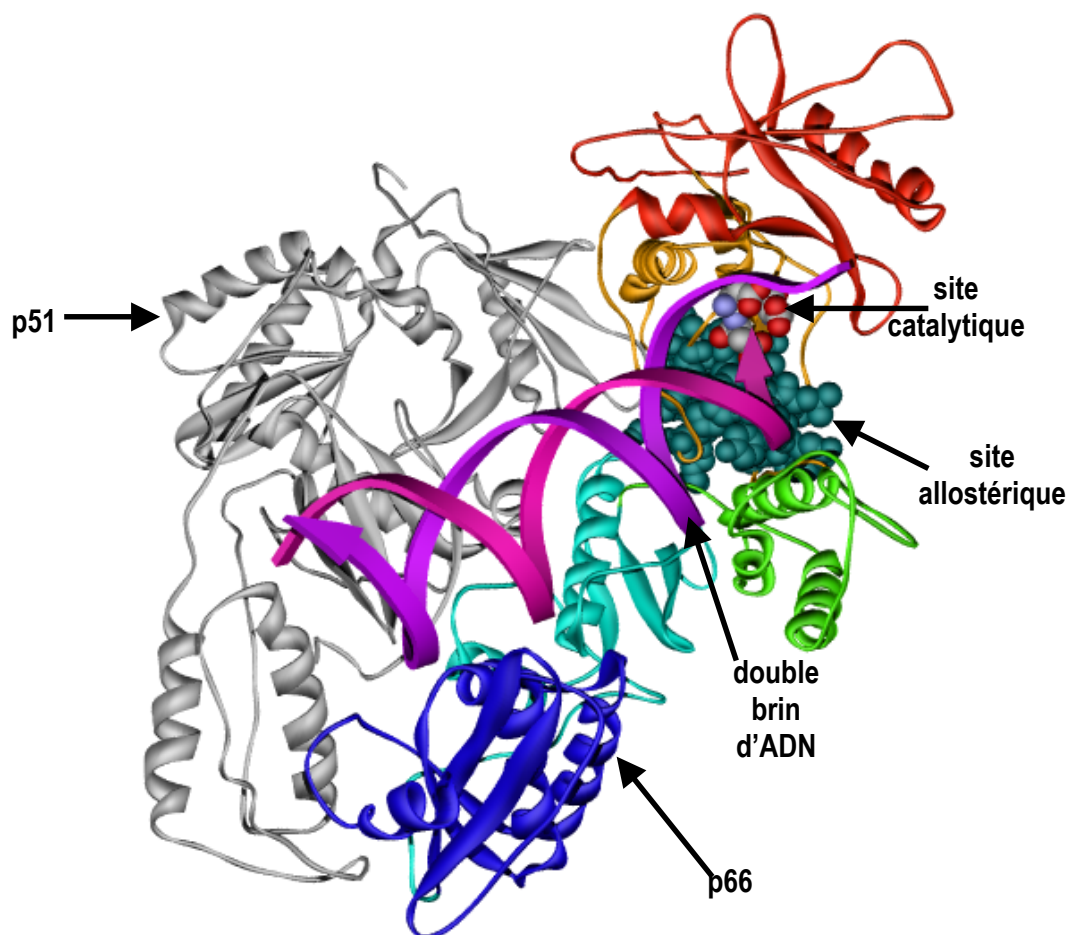


Figure 8 : Structure cristallographique de la transcriptase inverse du VIH-1, isolée sous forme d'un dimère p66/p51. Les cinq domaines de la sous-unité p66 peuvent être définis par rapport à une main droite : doigts (rouge), paume (orange), pouce (vert), connexion (orange) et RNase H (bleu). La sous-unité p51 est ici représentée en gris. Le complexe contient un double brin d'ADN (magenta et violet), qui interagit avec le site catalytique ADN polymérase (couleurs par atomes). On constate également la présence d'un site allostérique (gris-vert).

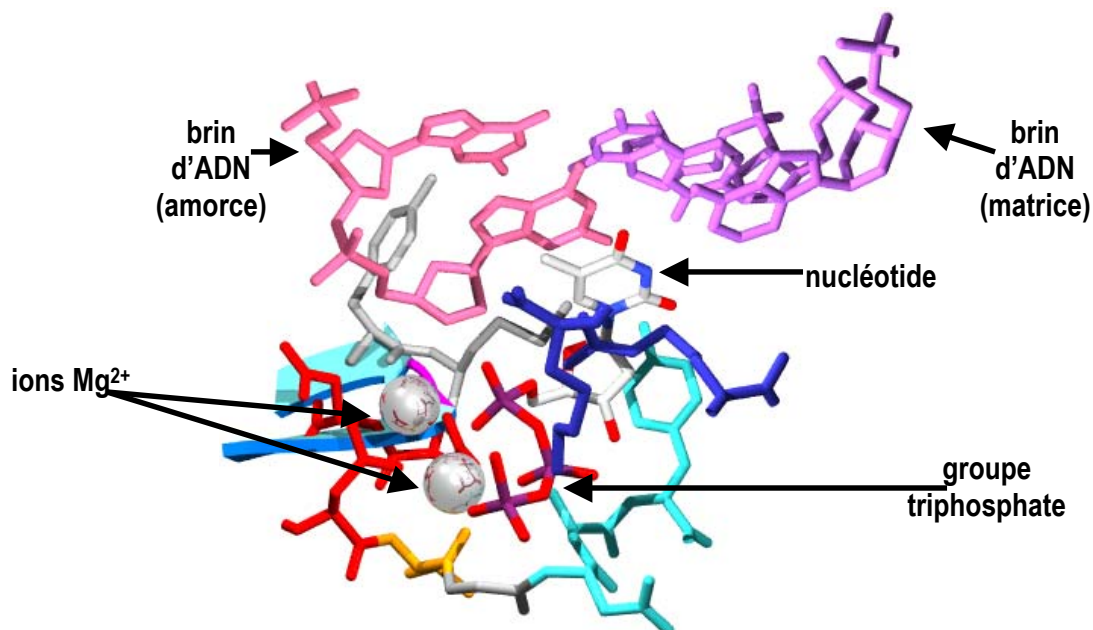


Figure 9 : Structure du site catalytique de la transcriptase inverse du VIH-1. Un nucléoside triphosphorylé y est maintenu par un ensemble d'interactions, qui incluent du π -stacking (avec le brin d'ADN rose), des interactions de Watson-Crick (avec le brin d'ADN violet), des ponts hydrogène (avec les résidus cyans), et des interactions ioniques avec l'enzyme (avec les résidus bleus) et avec deux ions Mg^{2+} . Ces ions Mg^{2+} sont eux-mêmes stabilisés par des interactions de type charge-charge (avec Asp110, Asp185 et Asp186, en rouge) et charge-dipôle (avec résidu orange).

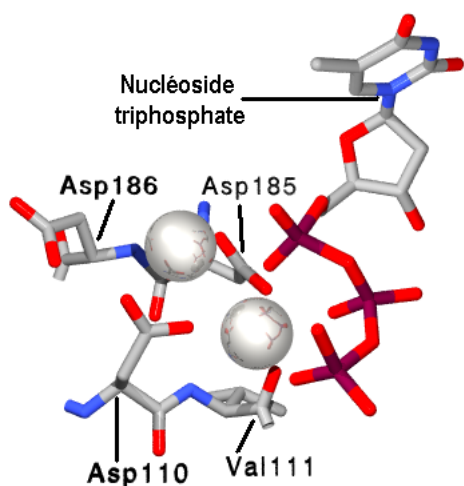


Figure 9a : Stabilisation des deux ions Mg^{2+} du site catalytique par les résidus Asp110, Val111, Asp185 et Asp186. Ces ions interagissent avec le nucléoside triphosphate.

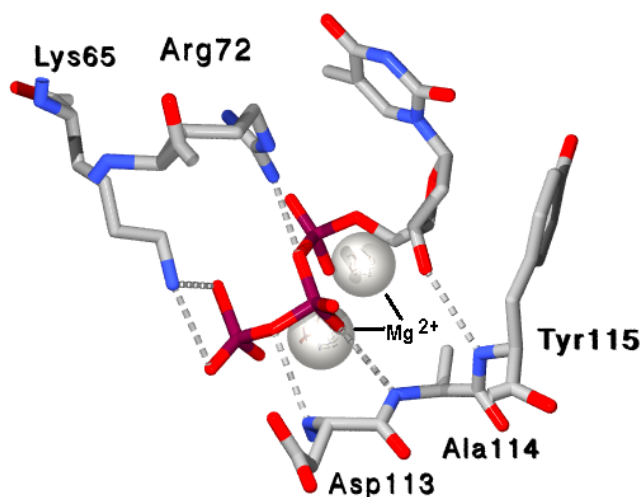


Figure 9b : Stabilisation du nucléoside triphosphate par les résidus Lys65, Arg72, Asp113, Ala114 et Tyr115 et par deux ions Mg^{2+} .

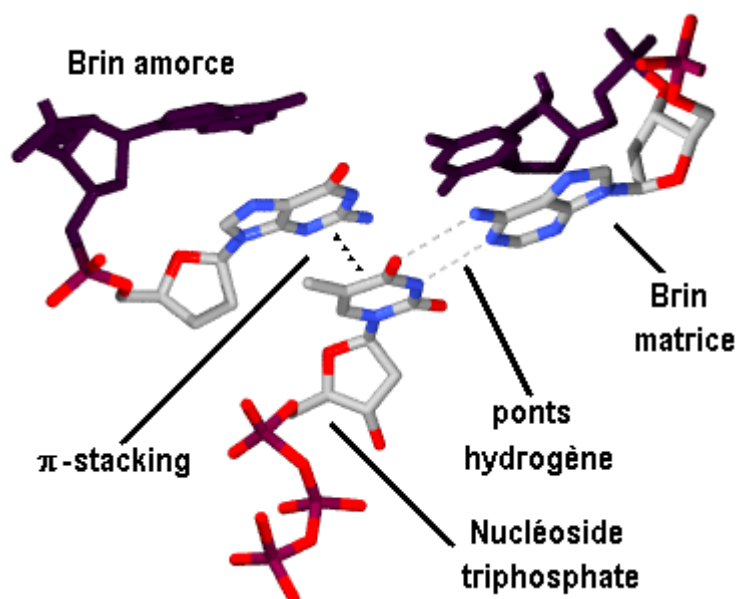


Figure 9c : Le nucléoside triphosphate est stabilisé au sein du site catalytique grâce à des interactions de π -stacking avec le brin amorce et des ponts hydrogène avec le brin matrice

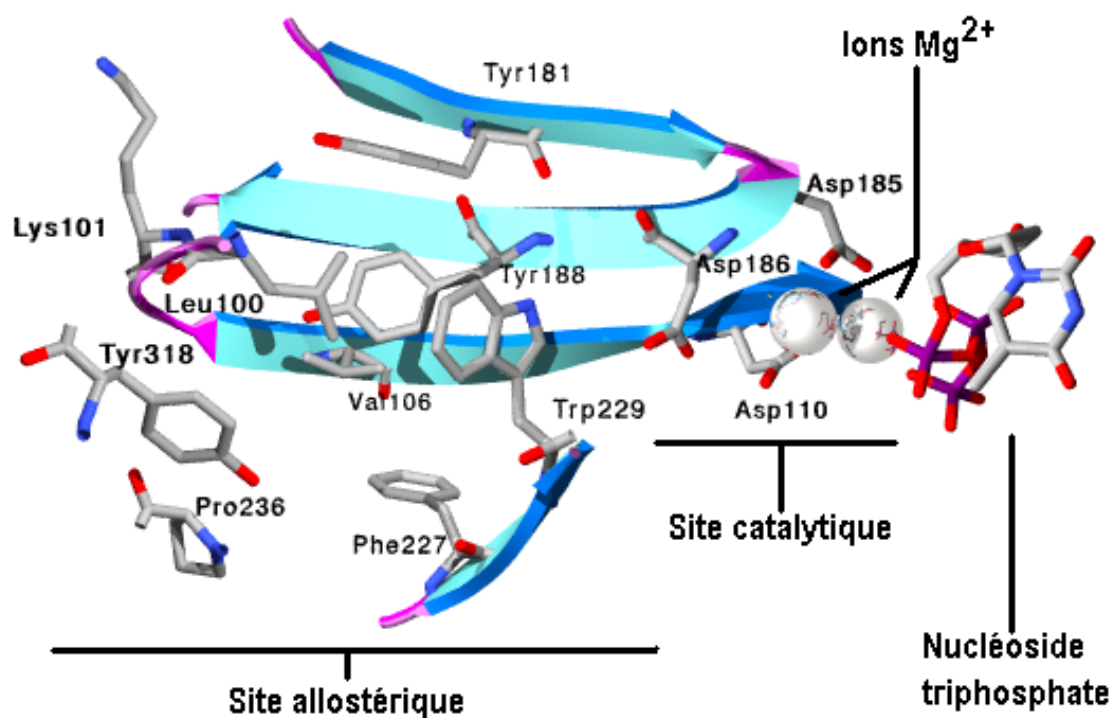


Figure 9d : Le site allostérique de la transcriptase inverse du VIH est localisé à proximité du site catalytique de l'activité ADN polymérase

La transcriptase inverse du VIH-1 possède également un **site allostérique**^[42] (figure 9d), principalement **hydrophobe** et localisé à environ 10Å du site catalytique^[43]. Il comprend les résidus Leu100, Lys101, Lys103, Val106, Tyr181, Tyr188, Phe227, Trp229, Pro236 et Tyr318. Il peut être exploité par certains inhibiteurs de la TI, mais son rôle originel reste cependant obscur. En effet, ce site n'existe ni sur la TI du VIH-2, ni sur les TI d'aucun autre rétrovirus^[25].

Enfin, un site RNase H, situé dans le domaine du même nom, permet la dégradation du brin d'ARN transcrit.

Une caractéristique importante de la TI est sa **faible fidélité** de transcription^[44]. En effet, elle commet fréquemment des erreurs dans le choix du nucléotide intégré au brin d'ADN et est de plus dépourvue de toute activité correctrice. Ceci favorise l'apparition fréquente de souches virales mutantes, susceptibles de présenter une résistance accrue aux traitements antiviraux.

1.2.3.5. *env*

Le précurseur **Env** de 160 kDa (gp160) est exprimé à partir d'un ARNm épissé issu du gène **env**. Après synthèse, il doit être glycosylé (addition de 25 à 30 chaînes d'hydrates de carbones) pour conférer au virus son caractère infectieux^[45]. Une protéase cellulaire clive ensuite Env en protéines d'enveloppe. La **glycoprotéine de surface** (SU, gp120) qui résulte de cette opération permet la reconnaissance spécifique des récepteurs CD4 et des co-récepteurs portés par les cellules cibles du VIH-1^[46]. Elle est présente sous forme de trimère à la surface de la particule virale et comporte cinq **domaines variables** (désignés V1 à V5), dont certains sont essentiels à la réplication du virus. Sa structure a été déterminée par diffraction de rayons X^[47]. La **glycoprotéine transmembranaire** (TM, gp41) est également rencontrée sous forme de trimère et interagit étroitement avec gp120. Elle permet la fusion de la membrane cellulaire et de la membrane virale, ce qui permet l'introduction du contenu viral dans le cytoplasme de la cellule infectée.

1.2.3.6. Les gènes « annexes »

En plus des trois gènes principaux, communs à tous les rétrovirus, le génome du VIH-1 possède plusieurs autres gènes, plus spécifiques. Deux d'entre eux, **tat** et **rev**, codent pour des **protéines de régulation**. La protéine **Tat** (transactivateur de la transcription) permet principalement d'augmenter la **transcription** du génome viral par la cellule hôte^[48]. La protéine **Rev** (Regulator of Viremia) est pour sa part destinée à promouvoir l'**export d'ARNm viraux** incomplètement épissés hors du noyau cellulaire^[49]. Cette opération est essentielle à l'expression des précurseurs Gag, Gag-Pol et Env, produits à partir de ces ARNm.

Quatre gènes « accessoires » sont également inclus dans le génome viral. Les protéines qui en sont issues, même si elles ne sont pas toujours indispensables au virus (tout au moins dans des expériences *ex vivo*), augmentent grandement son caractère infectieux. **Vif** (Viral Infectivity Factor) protège le brin d'ADN issu de la transcription inverse des effets d'une protéine endogène (CEM15/APOBEC3G) qui tend à y introduire de nombreuses mutations^[50]. **Vpu** (Viral protein U) induit la dégradation des récepteurs CD4 de la cellule hôte et favorise la libération de particules virales^[51]. **Vpr** (Viral Protein R) permet de bloquer le cycle cellulaire durant la phase (G2) où la transcription du génome viral est maximale^[52]. Enfin, **Nef** (Negative Effector) est une protéine de 24 kDa aux multiples fonctions, qui tendent à modifier l'environnement cellulaire en vue d'optimiser la production de particules virales (blocage de l'apoptose, changement de l'état d'activation de la cellule,...) (voir point 1.2.4.5.).

1.2.4. Le cycle de vie du VIH

En tant que **rétrovirus**, le virus de l'immunodéficience humaine ne peut assurer seul sa subsistance et sa réplication. Il doit pour ce faire infecter une **cellule hôte** dont il détourne les fonctions en vue de produire de nouveaux virions. Comprendre ce processus nécessite la connaissance non seulement des gènes du VIH-1 et des fonctions qui y sont associées, mais aussi de la manière dont ces éléments interagissent avec ceux de la cellule hôte.

Le **cycle de vie du VIH-1** (résumé à la figure 10) comprend sept étapes principales : la **reconnaissance** de la cellule hôte, la pénétration du virus au sein de la cellule par **fusion des membranes**, la **rétrotranscription** du génome viral en un ADN double brin, son **intégration** au sein du génome de la cellule hôte, la **transcription** du génome viral en vue de l'expression de polyprotéines, l'**assemblage** et la libération de virions immatures et enfin la **maturation** de ces nouvelles particules.

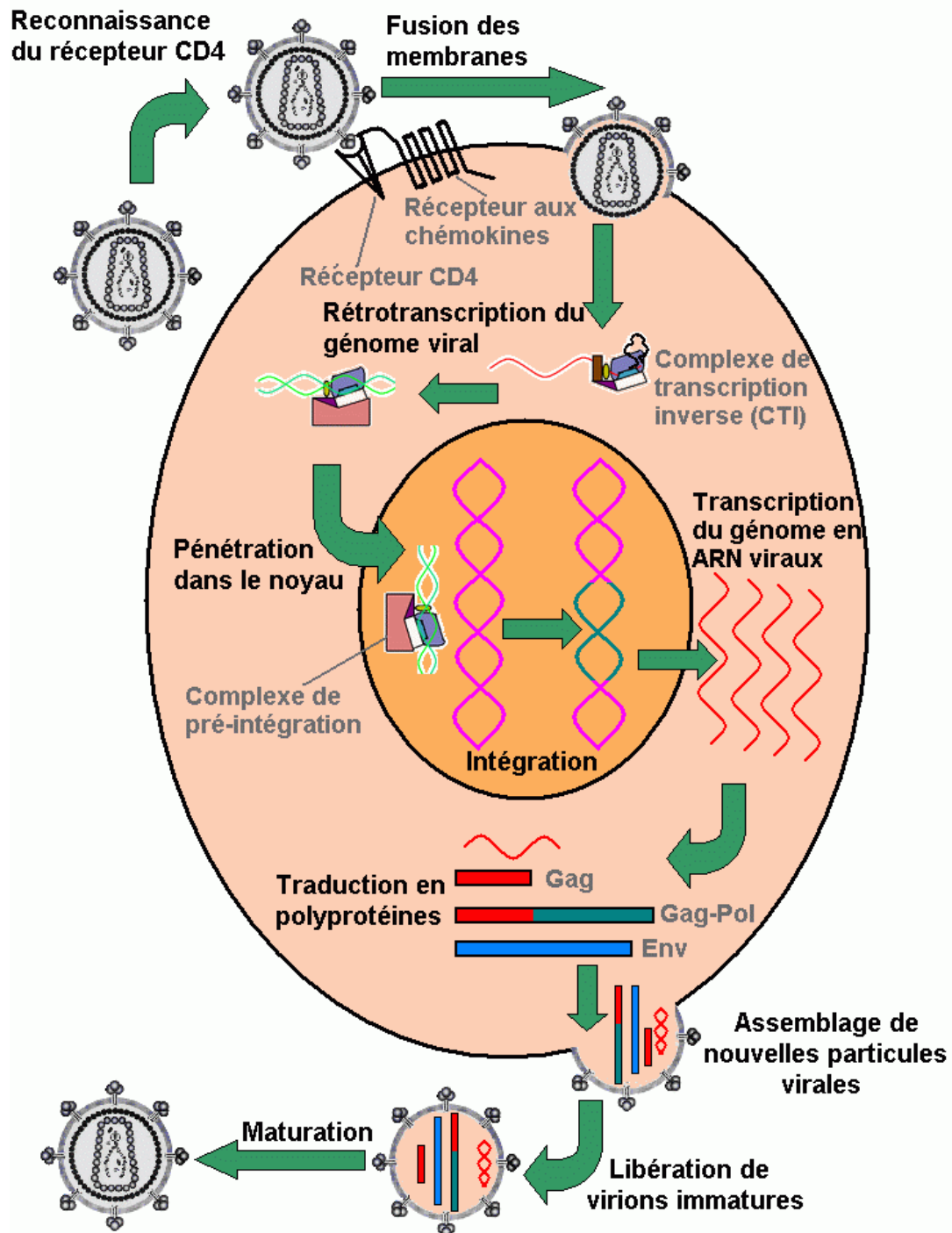


Figure 10 : Cycle de réplication du VIH-1

1.2.4.1. Reconnaissance de la cellule hôte

La première étape du cycle de vie du virus consiste en une **interaction peu spécifique** entre une boucle (V3) de la **glycoprotéine de surface** (gp120, ou SU), qui est chargée positivement et le **sulfate d'héparan**, chargé négativement et présent à la surface de nombreuses lignées cellulaires.^{[53] [54]} Ceci permet une **première adsorption** du virus. Le VIH-1 s'attaque cependant de manière quasiment exclusive à des lignées cellulaires porteuses du **récepteur CD4**^[55], c'est à dire principalement des **lymphocytes T** et certains **macrophages**. Cette **reconnaissance spécifique** est également l'œuvre de SU et implique un nombre limité de résidus conservés^[56]. Un grand nombre de contacts entre le récepteur CD4 et gp120 sont par contre réalisés grâce au **squelette peptidique** de la glycoprotéine^[47]. Ceci explique le fait que plusieurs résidus du domaine de liaison à CD4 puissent être modifiés sans pour autant altérer l'affinité de SU pour ce récepteur.

L'interaction entre SU et la protéine CD4 a pu être mise en évidence par plusieurs manipulations biochimiques. Ainsi, les anticorps spécifiques des récepteurs CD4 bloquent l'infection par le VIH. De même, les récepteurs CD4 solubles sont également capables de neutraliser les particules virales^[57, 58]. L'expérience inverse peut également être réalisée. En effet, l'expression de récepteurs CD4 à la surface de certaines lignées cellulaires normalement insensibles à l'infection par le VIH rend ces dernières permissives au virus. Enfin, la structure cristallographique d'un complexe gp120-CD4 a pu être déterminée par diffraction de rayons X^[47].

1.2.4.2. Pénétration dans la cellule

Même si elle est indispensable à l'infection par le VIH, la liaison d'une glycoprotéine SU (gp120) à un récepteur CD4 n'est pas suffisante pour lui permettre d'entrer efficacement dans la cellule hôte. Elle provoque cependant chez SU une série de **changements de conformation** qui lui permettent d'interagir avec les **récepteurs aux chémokines**. Bien qu'une douzaine d'entre eux aient été identifiés en tant que co-récepteurs possibles du VIH-1, seuls deux jouent réellement un rôle *in vivo*^[59]. Le premier, **CXCR4** (aussi appelé fusine), permet l'entrée des souches virales

responsables de l'**infection des lymphocytes T** (le virus est alors dit X4 ou T-tropique). Le deuxième est désigné **CCR5** et est un récepteur naturel des chémokines MIP-1 et RANTES. Il est employé par les variétés s'attaquant aux **macrophages** (souches dites R5 ou macrophage-tropiques). Les deux sortes de virus (R5 ou X4), peuvent être rencontrées chez le même patient, mais sont généralement présentes à des périodes différentes de la maladie. Les virus de type R5 sont en effet souvent considérés comme responsables de la transmission du virus par voie intraveineuse ou mucosale, tandis que les souches X4 sont d'avantage rencontrées lorsque le patient évolue vers le SIDA^[60]. Ceci explique pourquoi une **délétion** de 32 paires de bases dans le gène codant pour CCR5 confère aux individus homozygotes pour cette mutation (1 à 2% de la population caucasienne) une **immunité virtuelle** à l'infection par le VIH^[61, 62].

Les interactions entre SU, le récepteur CD4 et les récepteurs aux chémokines induisent un autre **changement de conformation**, cette fois chez la **glycoprotéine gp41** (TM), qui est le médiateur majeur de l'entrée du virus^[63]. L'ouverture du trimère TM projette trois **domaines de fusion** peptidiques lipophiles, qui s'incrustent dans la membrane cellulaire. Ils provoquent la fusion des membranes du virus et de la cellule hôte et permettent ainsi au cœur viral de pénétrer dans la cellule.

1.2.4.3. Rétrotranscription du génome viral

Une fois à l'intérieur de la cellule, le cœur viral est ouvert, afin de permettre la **transcription inverse** du génome d'ARN. Celle-ci est en effet principalement réalisée à l'intérieur de la cellule, même si il a été établi qu'elle peut être initiée dans les virions libres^[64]. L'ouverture génère un **complexe de transcription inverse** (CTI)^[65, 66], composé non seulement de la transcriptase inverse et du génome d'ARN viral, mais aussi d'autres protéines virales (IN, MA, NC et Vpr), de plusieurs protéines de la cellule hôte et d'un ARN-t^{Lys}. Ce complexe interagit, *via* la protéine de matrice (MA), avec des filaments d'actine^[67]. Le double brin d'ADN produit est protégé par Vif, qui permet de contrer les effets d'une protéine cellulaire (CEM15/APOBEC3G) qui tend à y introduire des mutations ^[68, 69].

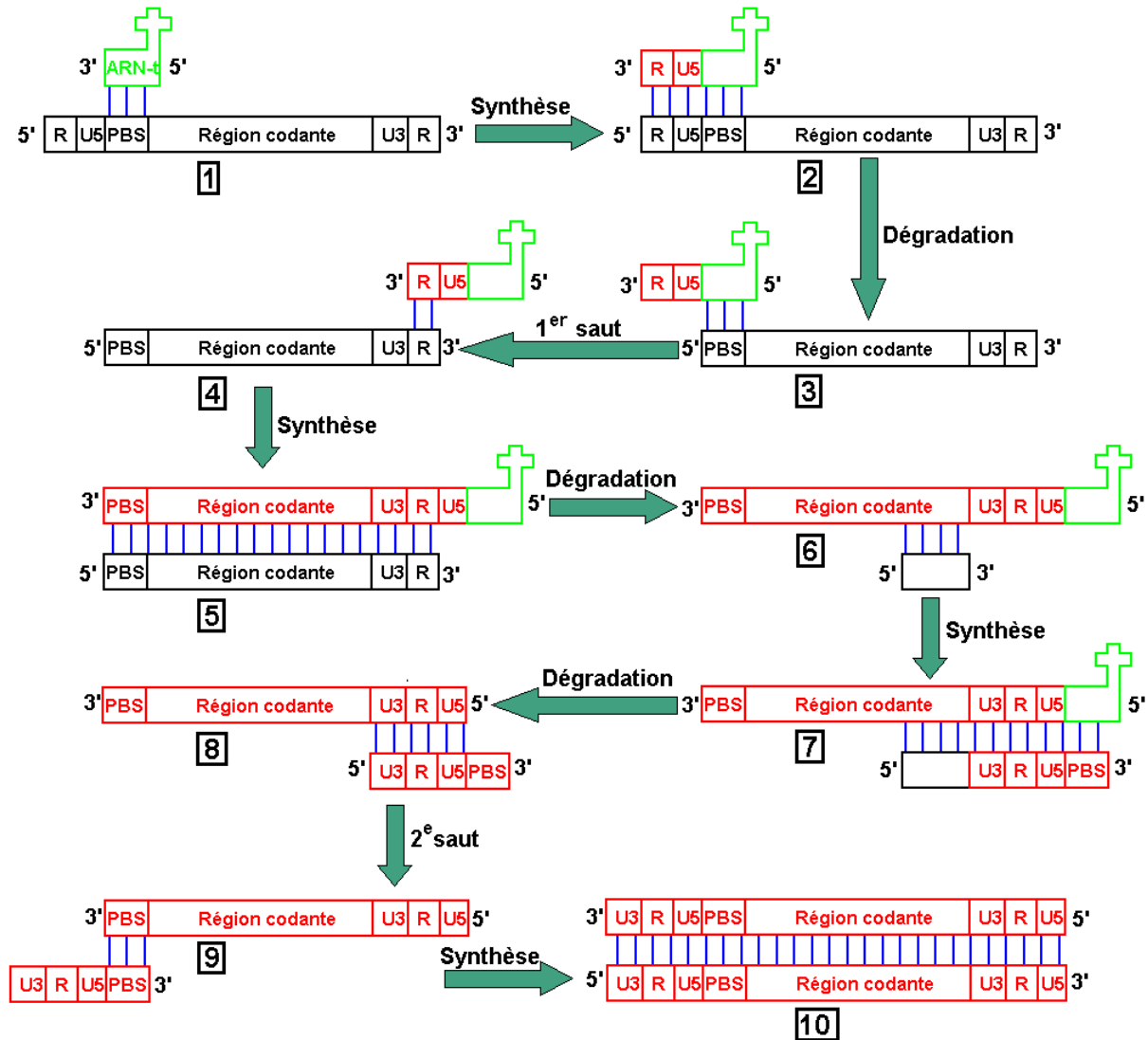


Figure 11 : Schéma simplifié du processus de transcription inverse. La synthèse du 1^{er} brin d'ADN est initiée grâce à un ARN-t (1), qui s'apparie à une séquence spécifique (PBS). Après une première phase d'élongation (2) et de dégradation (3), un premier saut est réalisé (4), de manière à pouvoir continuer la synthèse du premier brin d'ADN (5). La matrice d'ARN est alors partiellement dégradée, de manière à laisser une séquence amorce pour la synthèse du 2^e brin (6). Les opérations de synthèse (7), de dégradation (8) et de saut (9) sont ensuite répétées pour fournir deux chaînes d'ADN appariées au niveau de leur PBS. La poursuite du processus de synthèse permet d'obtenir un provirus d'ADN double brin (10).

La rétrotranscription du génome viral fait appel aux **activités ADN polymérase et RNase H** de la TI. Elle est réalisée grâce à l'**incorporation** successive de **nucléosides triphosphorylés** dans un brin d'ADN en croissance. Cette opération est sélective, grâce aux interactions de Watson-Crick qui assurent que le brin synthétisé soit la copie exacte, mais en négatif, de son modèle. La seule répétition de cette opération n'est cependant pas suffisante pour mener à bien

le processus complet de rétrotranscription. D'une part, la synthèse d'une nouvelle chaîne d'ADN ne peut être initiée que si une séquence d'acides nucléiques, désignée **amorce**, ou **primer** est déjà appariée au brin à transcrire, qui est appelé **matrice**, ou **template**. En début de transcription, ce rôle d'initiateur est joué par un ARN-t^{Lys}, qui fait partie intégrante du CTI et qui se lie à un motif d'ARN spécifique (PBS ; ou *Primer Binding Site*) située à l'extrémité 3' de la séquence LTR 5' du génome viral. D'autre part, ce génome doit être rétrotranscrit sous forme d'**ADN double brin**. Il est donc nécessaire de **dégrader** progressivement la matrice d'ARN utilisée pour la synthèse du premier brin d'ADN, tout en conservant une séquence amorce capable d'initier la synthèse du second. Ceci est réalisé grâce à la fonction **RNAse H** de la TI. Au final, le processus de transcription inverse (figure11) est donc un enchaînement complexe de synthèses, de dégradations et de sauts.

1.2.4.4. Intégration dans le génome de la cellule hôte

Afin d'être **intégré** dans le génome de la cellule hôte, l'ADN synthétisé par transcription inverse doit tout d'abord être conduit vers le **noyau** de la cellule hôte. Cette prise en charge est réalisée grâce à la formation d'un **complexe de pré-intégration** (CPI), composé des protéines virales IN, MA, Vpr et TI et de la protéine cellulaire HMGI(Y)^[70]. Ce CPI est capable de migrer vers le noyau, en tirant parti des microtubules^[71].

Contrairement aux autres rétrovirus, les lentivirus peuvent intégrer une séquence d'ADN dans le génome d'une cellule hôte sans que celle-ci soit en phase de division^[72]. Cette capacité des lentivirus en fait d'ailleurs des vecteurs très étudiés dans le cadre de la thérapie génique^[73, 74]. Pour ce faire, le complexe de pré-intégration, qui contient le provirus d'ADN, doit dans un premier temps franchir la membrane nucléaire, alors que sa taille (environ 28 nm) est le double de celle d'un pore nucléaire^[75]. L'import du CPI dans le noyau réclame donc bon nombre d'interactions, et il n'est donc pas étonnant qu'au moins trois protéines virales impliquées dans ce complexe (MA, IN et Vpr) possèdent un **signal de localisation nucléaire** (SLN)^[76-78]. Ces signaux interagissent avec la karyophérine α , qui prend en charge le CPI et le dirige vers le noyau. En outre, une zone du génome viral caractérisée par une triple hélice d'ADN (« **DNA**

flap ») pourrait permettre la liaison à une protéine cellulaire contenant un SLN supplémentaire^[79].

Une fois le CPI à l'intérieur du noyau, le provirus peut être intégré dans le génome de la cellule hôte. Pour ce faire, l'**intégrase** doit tout d'abord ôter deux nucléotides à chaque extrémité 3' du provirus d'ADN^[70]. Cette première étape est en fait réalisée peu après la transcription inverse du génome viral. L'ADN génomique est ensuite clivé au niveau du site d'intégration. Le choix de ce site est probablement davantage conditionné par son **accessibilité** que par la reconnaissance d'une séquence spécifique^[80, 81]. Enfin, une activité **ligase** crée un seul lien covalent entre chaque extrémité du provirus et l'ADN génomique (réaction de **transfert de brin**). La réalisation de ces trois opérations nécessite la présence de cations métalliques divalents, tels que Mg^{2+} ^[82]. Une fois le transfert de brin effectué, les enzymes cellulaires réparent le site d'intégration.

1.2.4.5. Transcription du génome et expression des protéines virales

L'intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte ne conduit pas systématiquement à la production immédiate de nouvelles particules virales^[83]. Il est possible que l'infection de la cellule soit suivie d'une **phase de latence**, durant laquelle le génome du VIH-1 n'est pas exprimé. Un des facteurs qui conditionnent cette expression est l'**activité de la cellule hôte**. Il est par exemple bien établi que le VIH peut rester à l'état latent dans les lymphocytes T au repos, et ce pendant plusieurs années (voir point 1.3.4.3 : la persistance du virus). Un autre facteur est le **site d'intégration** du génome viral. Un provirus incorporé dans une zone de la chromatine où la transcription est réprimée tend à se montrer moins productif^[84]. Dans la plupart des cas cependant, plusieurs provirus ont été intégrés et il est probable qu'au moins un d'entre eux soit situé dans une zone active du point de vue de la transcription. D'autres causes doivent donc être trouvées pour expliquer le phénomène de latence.

L'une d'entre elles est le rôle des **facteurs de transcription cellulaires** capables de se lier à la séquence LTR du génome viral. On sait ainsi que la présence de facteurs comme NF- κ B ou

NFAT permet de favoriser la transcription du génome viral^[85]. Leur absence peut donc induire une phase de latence. Enfin, une expression efficace du génome viral nécessite la présence, en quantité suffisante, de la **protéine virale Tat** (transactivateur de la transcription). Tat se lie à l'ARN viral produit lors de la transcription, en interagissant avec une séquence désignée *TAR* (Transactivation Response element)^[86] et recrute un complexe (P-TEFb) contenant la cycline T1 et la protéine kinase (Cdk9)^[87]. Ce complexe phosphoryle alors l'ARN polymérase II, ce qui augmente d'un facteur 1000 le taux de transcription du génome viral^[88].

Une fois initiée, la transcription du génome du VIH-1 peut conduire à plus d'une douzaine de transcrits différents^[89]. Les ARNm complètement **épissés**, issus des gènes *nef*, *rev* et *tat*, sont libres de quitter immédiatement le noyau de la cellule hôte^[90]. Ces gènes viraux sont les premiers à être traduits en protéines et constituent donc les **gènes précoces** du VIH. Les ARN non épissés ou incomplètement épissés ne peuvent par contre être traduits qu'en présence d'une quantité suffisante de la protéine **Rev**^[90], qui joue le rôle de **facteur d'export nucléaire**. Ils contiennent les **gènes tardifs** du VIH-1. Certains brins d'ARN ne seront pas traduits et constitueront le matériel génétique de futurs virions.

Si Tat et Rev agissent sur la transcription du génome viral et son expression, **Nef** a pour rôle de modifier l'environnement que constitue la cellule hôte, de manière à **optimiser la réplication** du virus^[59]. Il peut par exemple diminuer l'expression des récepteurs CD4 à la surface de la cellule^[91] ou causer des réarrangements dans le cytosquelette^[92]. Son action n'est cependant pas limitée à l'intérieur de la cellule hôte. Nef joue en effet un rôle à la fois offensif et défensif vis à vis du milieu extérieur. Offensif, car en activant l'expression de FasL, Nef favorise l'apoptose des cellules voisines qui expriment le récepteur Fas^[93]. Ceci inclut des lymphocytes T cytotoxiques, qui pourraient éliminer la cellule infectée. Défensif, car Nef diminue l'expression du complexe d'histocompatibilité de classe I (MHCI), ce qui évite la détection de la cellule infectée par les lymphocytes T cytotoxiques CD8+^[94]. En outre, Nef a la capacité de bloquer l'apoptose de la cellule hôte^[95, 96]. Tous ces mécanismes contribuent à prolonger la vie de la cellule hôte et donc à augmenter la production de nouveaux virions. D'autres facteurs contribuent également à la modification de l'environnement intracellulaire. Ainsi, **Vpr** bloque le

cycle cellulaire dans la phase G2^[52, 97], c'est à dire au moment ou la transcription du virus est maximale^[98].

1.2.4.6. Formation de nouvelles particules virales

L'**assemblage** et le **bourgeonnement** de nouvelles particules virales ont lieu au niveau de la membrane cellulaire. Ce processus est dirigé par les polyprotéines Gag, Gag-Pol et, dans une moindre mesure, Env. La formation d'une particule virale immature requiert l'assemblage d'environ **1500 précurseurs Gag**^[99]. Elle est facilitée par une protéine cellulaire (HP68), qui agit en tant que chaperonne et facilite les changements de conformation de Gag^[100]. L'incorporation de la protéine Vif est également essentielle à la production de particules virales infectieuses. Les dernières étapes du bourgeonnement des particules virales dépendent d'un processus d'**ubiquitination** et de la protéine **TSG 101**, associée au *tumor supressor gene 101*. TSG 101 se lie à une séquence d'acides aminés (PTAP) présente au sein de Gag et reconnaît les ubiquitines, ce qui permet la libération de virions^[101, 102]. TSG 101 s'associe en temps normal avec d'autres protéines cellulaires, pour permettre la **formation de corps vésiculaires** dont le contenu est dégradé par les lysosomes^[103]. Le VIH a donc détourné ce processus naturel de bourgeonnement pour permettre la libération de nouveaux virions.

1.2.4.7. Maturation des particules virales

Les particules virales libérées par la cellule infectée sont dans un premier temps non infectieuses et doivent encore subir une phase de **maturation**. La première étape de ce processus est la formation d'un **dimère** de précurseurs Gag-Pol, au niveau des domaines correspondant à la protéase virale. Le dimère peut alors s'autocliner, pour libérer une **protéase mature**^[104]. Ce processus est le fruit d'un équilibre bien précis dans l'expression des polyprotéines. Ainsi, une expression trop élevée de Gag-Pol provoque l'activation intracellulaire de la protéase, ce qui interfère avec l'assemblage des particules virales^[105]. Une fois la protéase virale libérée, les précurseurs Gag et Gag-Pol sont convertis en **protéines structurales et**

fonctionnelles, ce qui donne au virion sa structure définitive. La nouvelle particule virale est alors capable de s'attaquer à une cellule porteuse du récepteur CD4.

1.3. Les thérapies anti-VIH

L'étude approfondie du VIH a permis de mieux comprendre son cycle de vie. Ces informations ont mené à la recherche et au développement de nombreux traitements destinés à combattre ce virus. Ceux-ci peuvent être classés en deux grandes catégories : les **vaccins** et la **chimiothérapie**. La première est une **approche immunologique** et vise soit à empêcher l'infection en préparant l'organisme à une exposition au VIH, soit à combattre l'infection en stimulant les mécanismes immunitaires du patient. La deuxième se base sur l'**emploi de substances chimiques** destinées à enrayer la réplication du virus.

1.3.1. Les vaccins

Dans le contexte d'une épidémie de SIDA qui prend des proportions alarmantes, la découverte d'un **vaccin** anti-VIH **prophylactique** (préventif) ou **thérapeutique** constituerait une véritable bouée de sauvetage pour un grand nombre de pays. Ceci est tout spécialement vrai pour les pays en voie de développement, qui ne peuvent se permettre les frais liés à la distribution de médicaments très coûteux aux millions de personnes touchées. Le développement de tels vaccins, même si il a été rapidement envisagé, s'est cependant heurté à plusieurs **obstacles** majeurs^[106]. La **persistance du virus** intégré dans les cellules infectées en phase de latence (et plus particulièrement au sein des lymphocytes T CD4+ au repos)^[107] rend très difficile l'éradication du VIH de l'organisme d'un patient. La grande **variabilité du virus** (il existe 11 sous-types du VIH-1 dans le monde) complique fortement la recherche d'un immunogène capable d'induire une réponse efficace face aux différentes variantes du VIH. Enfin, le taux d'erreur élevé de la transcriptase inverse provoque l'apparition de nombreuses **souches virales mutantes**, qui peuvent échapper au contrôle immunologique induit par un vaccin^[108].

En dépit de toutes ces difficultés, des avancées significatives ont été faites dans le domaine de la vaccination contre le VIH. Des études d'immunoprotection menées sur des macaques rhésus exposés au **SHIV** (une forme hybride du VIH et du VIS) ont livré des résultats prometteurs. Bien que l'**infection par le SHIV** ne puisse être empêchée par ces vaccins, le taux de cellules CD4+ chez les animaux vaccinés est rapidement **stabilisé**, tandis que la **charge virale** est maintenue à un niveau relativement faible^[109]. Ces animaux ne sont donc plus sujets aux déficiences immunitaires caractéristiques du SIDA.

En ce qui concerne les essais réalisés sur l'être humain, l'utilisation d'une forme inactivée du VIH soulève logiquement de nombreuses questions liées à la sécurité et à la fiabilité d'un tel vaccin. La recherche s'est donc principalement concentrée sur d'autres solutions basées soit sur la **production d'anticorps**, soit sur l'**induction d'une réponse** des cellules CD4+ et CD8+ à l'infection^[106].

La plupart des vaccins déclenchant la **production d'anticorps** utilisent des **formes recombinantes des protéines d'enveloppe** gp160 ou gp120^[110]. Les anticorps résultant de cette stimulation se révèlent le plus souvent efficaces contre la plupart des souches virales, excepté la souche R5^[111]. Une fois encore, la recherche d'anticorps capables de neutraliser un large éventail de souches virales constitue la clé du développement de ces vaccins^[112, 113]. La principale difficulté rencontrée réside dans le fait que les **épitopes les mieux conservés** de gp120 sont **très peu accessibles** ^[114] et ne sont exposés que de façon transitoire, lors du changement de conformation qui permet à gp120 d'interagir avec le récepteur CD4 et les récepteurs aux chémokines. Il est donc nécessaire d'utiliser soit des **protéines d'enveloppe modifiées** dans lesquelles les domaines les mieux conservés de gp120 sont accessibles, soit des **protéines de fusion gp120-CD4**^[110].

Une autre possibilité, très étudiée, réside dans des vaccins induisant une **forte réponse des cellules CD4+ et CD8+** ainsi qu'une **sécrétion de chémokines**, qui sont capables d'interférer avec l'entrée du virus dans la cellule^[110]. Une telle stratégie pourrait permettre de contrôler la

charge virale du patient après infection par le VIH. Ainsi, des études préliminaires sur des macaques indiquent que l'induction des cellules T cytotoxiques contre des protéines précoces du VIH telles que Tat, Rev ou Nef peut permettre d'**éliminer les cellules infectées** avant que le virus ne puisse compléter son cycle de réplication^[115, 116]. D'autres tests, réalisés cette fois sur des volontaires humains, indiquent que des combinaisons de lipopeptides contenant les épitopes des protéines Env, Gag, Pol et Nef provoquent des réponses immunitaires très favorables au niveau de la **prolifération et de l'activité des lymphocytes**^[117]. Enfin, une nouvelle génération de vaccins utilisant des séquences d'ADN véhiculées par divers vecteurs viraux a également livré plusieurs résultats prometteurs^[118].

Suite à ces nombreux progrès, plusieurs vaccins font l'objet d'essais cliniques. Des vaccins prophylactiques ont atteint le stade des essais cliniques de phase III, tandis que plusieurs autres, tant préventifs que thérapeutiques, ont débuté les phases I et II^[106]. La recherche d'un vaccin efficace contre le VIH est cependant loin d'être terminée. Les candidats actuellement examinés doivent encore démontrer leurs **bénéfices à long terme**, notamment en ce qui concerne les problèmes liés aux mutations du virus et à l'apparition de nouvelles souches virales^[119]. L'échec récent du premier vaccin préventif parvenu au stade des essais cliniques de phase III^[120] soulève plusieurs inquiétudes à ce sujet. De même, la plupart des études de vaccination actuellement réalisées n'utilisent qu'un seul des multiples sous-types du VIH présents dans le monde^[106]. Le **spectre d'activité antivirale** des différents candidats doit donc encore être évalué de manière exhaustive. Par conséquent, la prévention et la chimiothérapie restent pour l'instant les seules armes disponibles dans la lutte contre le VIH.

1.3.2. Les chimiothérapies

Dans l'attente d'un vaccin efficace, la lutte contre le VIH est actuellement basée sur l'emploi de molécules (pour la plupart synthétiques) capables de **ralentir la prolifération du virus**, ou idéalement de la **bloquer**. Cette approche a permis d'augmenter significativement la qualité et l'espérance de vie des patients.

En théorie, chaque étape du cycle de vie du virus (cf. point 1.2.4) constitue une **cible potentielle** dans le cadre du traitement de l'infection par le VIH et de nombreuses classes de composés perturbant le cycle de réplication du VIH ont déjà été identifiées. On trouve ainsi les inhibiteurs de l'adsorption du virus, les antagonistes des co-récepteurs viraux, les inhibiteurs de la fusion des membranes, les agents s'attaquant au brin d'ARN viral et à sa nucléocapside, les inhibiteurs de la transcription inverse, de l'intégration du génome, de la transcription des gènes et de la protéase virale. Trois cibles, la **glycoprotéine transmembranaire** (gp41, TM), la **transcriptase inverse** (TI) et la **protéase virale** (PR) ont pour l'instant permis des applications thérapeutiques concrètes. Les autres ont mené à des résultats prometteurs, qui doivent encore être éprouvés dans le cadre d'essais cliniques.

1.3.2.1. Inhibiteurs de l'adsorption du virus

La première étape du cycle de réplication du VIH consiste en une **adsorption non spécifique** à la surface de la cellule. Elle est basée sur des **interactions électrostatiques** entre la boucle V3 de la glycoprotéine de surface (gp120 SU) du VIH, qui est chargée positivement et le sulfate d'héparan, chargé négativement. Cette adsorption peut être empêchée grâce à une variété de **substances polyanioniques** synthétiques, telles que des polysulfates, des polysulfonates, des polycarboxylates, des polyphosphates ou des polyoxométalates^[121], qui masquent le domaine V3 de gp120^[122, 123]. Plusieurs composés naturels, tels que les analogues du cosalane ou certains polysaccharides sulfatés (sulfate de dextran ou de pentosan), possèdent également cette capacité^[121]. La seule caractéristique structurale nécessaire à cette inhibition semble être une **densité adéquate de charges négatives**^[124]. Le **large spectre d'activité antivirale** de ces composés^[125] ainsi que leur capacité à empêcher l'infection d'une cellule saine par le VIH les rendent propices à une **utilisation préventive**, visant à empêcher la transmission du VIH par voie sexuelle.

Les **récepteurs CD4 solubles**, qui se lient à la glycoprotéine de surface SU, figurent parmi les premiers agents antiviraux testés sur le VIH^[57, 58]. Bien que ceux-ci montrent une très bonne activité sur plusieurs souches virales utilisées en laboratoire, ils se révèlent nettement moins

efficaces sur les variétés isolées en milieu clinique^[126]. Ceci est plus que probablement dû à la présence de **souches mutantes**, qui présentent une plus faible affinité pour le récepteur CD4. Des variétés présentant un facteur de résistance important ont ainsi été identifiées.

Récemment, plusieurs autres **molécules peptidiques** interférant avec la liaison des protéines d'enveloppe du VIH au récepteur CD4 ont été identifiées. CD4M33 est un peptide de 17 acides aminés destiné à imiter la protéine CD4 et à interagir de manière optimale avec gp120. Il s'y lie avec une affinité comparable à celle du récepteur original. Pro-542 est une protéine de fusion combinant les éléments structuraux de CD4 à ceux de l'immunoglobuline IgG2. Contrairement aux récepteurs CD4 solubles, Pro-542 est capable de neutraliser une large gamme d'isolats du VIH-1, ce qui lui vaut d'être étudiée en essais cliniques de phase II^[127].

1.3.2.2. Antagonistes des co-récepteurs

L'infection d'une cellule cible par le VIH nécessite non seulement la reconnaissance spécifique du récepteur CD4 par SU-gp120, mais aussi l'interaction de SU avec l'un des co-récepteurs du virus. Outre les **chémokines**, qui sont les ligands naturels de ces co-récepteurs, plusieurs types de molécules sont en mesure de bloquer ce processus et constituent donc des agents antiviraux potentiels.

TAK-779 (figure 12) est la première molécule non peptidique à avoir été identifiée comme antagoniste du récepteur CCR5, utilisé par les souches R5 du VIH, qui s'attaquent aux macrophages^[128, 129]. Il possède une activité antivirale de l'ordre du nanomolaire contre ces souches, mais n'a aucun effet sur les variétés X4 du virus, qui agissent sur les lymphocytes T. Son site de liaison est extracellulaire et localisé à proximité des hélices transmembranaires de CCR5. Le cation ammonium y interagit avec les chaînes latérales de résidus chargés négativement^[127, 130].

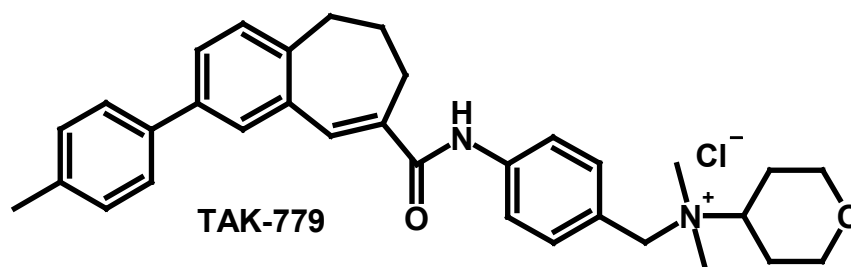


Figure 12 : Structure du composé TAK-779 (antagoniste du récepteur CCR5)

Le développement de TAK-779 a été abandonné suite à la **faible biodisponibilité** de ce composé. D'autres antagonistes du récepteur CCR5 aux propriétés plus favorables font par contre l'objet d'études cliniques. Parmi eux, **SCH-D** (figure 13), dont la structure est dérivée de celle d'un ligand du récepteur muscarinique M2, se révèle un candidat prometteur. Cette molécule possède en effet un **fort pouvoir antiviral** ($EC_{50} = 0.5 \text{ nM}$), associé à une **bonne biodisponibilité**. De plus, son action se révèle **synergique** à celle de composés actuellement utilisés pour le traitement de l'infection par le VIH, comme l'AZT ou l'Enfuvirtide (Fuzeon®)^[127].

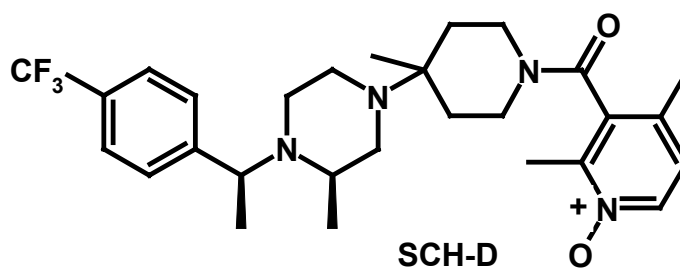


Figure 13 : Structure du composé SCH-D (antagoniste du récepteur CCR5)

Parallèlement aux antagonistes du récepteur CCR5, d'autres composés agissent en tant qu'**antagonistes du récepteur CXCR4** (fusine), utilisé par les souches X4 du VIH. Les molécules de type **bicyclam**^[131], telles que AMD 3100^[132] (figure 14), sont les représentants les plus connus de cette famille. Plusieurs d'entre elles bloquent sélectivement l'infection par les virus X4 dans une gamme de concentration de l'ordre du nanomolaire^[133], tout en restant non toxiques pour les cellules hôtes jusqu'à plus de 100 μM . Les bicyclams agissent en se fixant à une **région de CXCR4 chargée négativement**, qui comprend les résidus Asp171 et Asp262. Le remplacement d'un de ces résidus par un acide aminé neutre provoque d'ailleurs une forte

perte d'activité chez ces composés^[127]. Le développement de AMD3100 a été interrompu au stade des essais cliniques de phase II, suite aux **effets secondaires** (cardiotoxicité) engendrés par son utilisation et à un **manque d'activité *in vivo***. D'autres antagonistes du récepteur CXCR4, qu'ils soient apparentés aux bicyclams ou issus d'autres familles chimiques, comme le **KRH-1636**^[127] (figure 14), sont actuellement à l'étude.

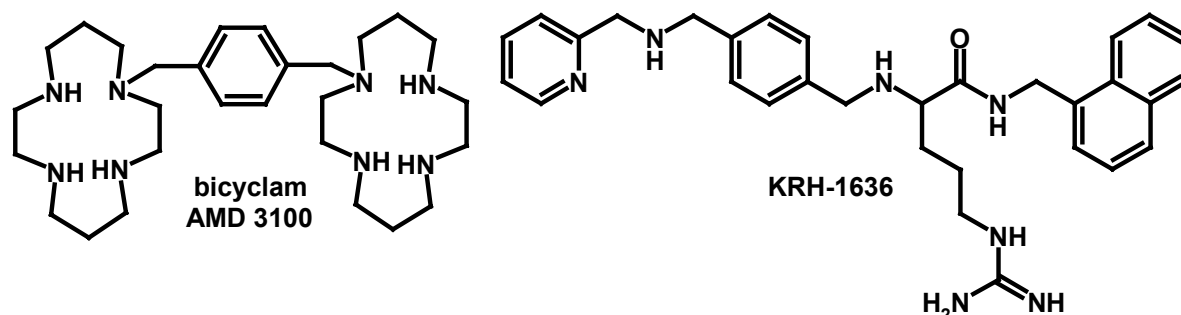


Figure 14 : Structure de deux antagonistes du récepteur CXCR4 : AMD 3100 et KRH-1636

1.3.2.3. Inhibiteurs de la fusion des membranes

La **fusion** de la membrane cellulaire et de la membrane virale, qui permet l'entrée du cœur du virus au sein de la cellule est réalisée grâce à la glycoprotéine de surface gp41, qui projette plusieurs domaines lipophiles appelés peptides de fusion dans la membrane cellulaire. Lors de ce processus de fusion, plusieurs domaines de gp41 sont accessibles à des inhibiteurs. Le plus connu d'entre eux est le **T20 (Enfuvirtide, Pentafuside, Fuzeon®)**, un peptide de 36 acides aminés qui **mime les résidus 127 à 162** de la glycoprotéine gp41 du VIH-1. Le Fuzeon® bloque totalement la formation de syncytia (qui est une des conséquences de l'action de gp41) à des concentrations qui vont de 1ng/ml à 10ng/ml, très nettement inférieures à son seuil de toxicité^[134]. Les **bénéfices cliniques** liés à ce composé^[135] lui ont permis d'être récemment approuvé par la *U.S. Foods and Drugs Administration* (13/3/2003) et la Communauté Européenne (27/5/2003).

Cet inhibiteur, découvert par la firme Trimeris^{Inc}, possède un mode d'action et un profil de résistance qui diffèrent totalement de ceux des autres antiviraux actuellement utilisés, tout en

agissant en synergie avec eux. Il est donc particulièrement indiqué dans le cas de patients dont la thérapie antivirale a été mise en échec par l'apparition de souches mutantes du VIH. Plusieurs inconvénients sont cependant liés à sa structure chimique. La préparation d'un peptide de 36 acides aminés requiert en effet une **synthèse difficile** (106 étapes) et coûteuse. Comme la plupart des peptides, il présente une **biodisponibilité très faible par voie orale** et doit donc être administré par **injection sous-cutanée**. De plus, son activité antivirale est environ 100 fois plus faible face au VIH-2, suite au taux d'identité assez bas (42%) entre la séquences du récepteurs gp41 du VIH-1 sur laquelle est basée le Fuzeon® et la séquence correspondante du VIH-2^[127]. Enfin, plusieurs cas de **résistance** du virus à ce composé ont déjà été mis en évidence lors des phases d'essais cliniques. Le **T-1249**, également découvert par Trimeris^{Inc}, est un peptide de 39 acides aminés combinant des éléments structuraux présents chez les récepteurs gp41 du VIH-1, du VIH-2 et du VIS^[127]. Il est également capable d'enrayer le processus de fusion des membranes, en se liant à un domaine de gp41 différent de celui exploité par le Fuzeon®. Son activité antivirale lui est nettement supérieure. Des essais cliniques de phase II ont donc été initiés avec cette nouvelle molécule. Comme son précurseur, il devrait cependant présenter les inconvénients inhérents à une molécule peptidique (difficultés de synthèse, faible biodisponibilité,...). Pour ces raisons, un intérêt particulier est également porté à la recherche de composés plus stables et de poids moléculaire plus faible. Ceci a récemment permis la découverte de **ADS-J1**^[127] (figure 15), une des premières molécules non peptidiques à inhiber le processus de fusion de la membrane virale à des concentrations de l'ordre du µg/ml.

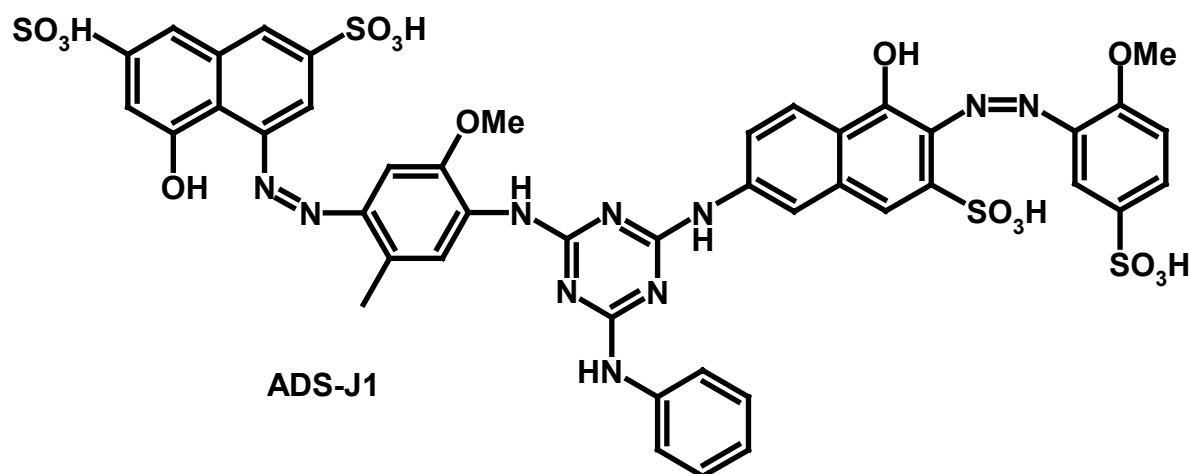


Figure 15 : Structure du composé ADS-J1, inhibiteur de fusion non peptidique

1.3.2.4. Agents s'attaquant à la nucléocapside virale

Les deux doigts de zinc de la protéine de nucléocapside sont la cible d'agents destinés à **éjecter le zinc**, comme la 3-nitrosobenzamide (NOBA), la 2,2'-dithiobisbenzamide (DIBA)^[136] ou l'azadicarbonamide^[137, 138] (ADA, figure 16). De telles molécules sont susceptibles de perturber le cycle de réplication du virus lors de la libération du brin d'ARN viral (*uncoating*), de la dissolution de la capside ou encore de l'assemblage de nouveaux virions. Les effets de ces agents sur les premières étapes du cycle de vie du VIH pourraient également être attribués à la **formation de liens intermoléculaires** entre plusieurs protéines NC-p7 (*cross-linkage*)^[139]. Bien que ces composés aient un indice de sélectivité assez faible par rapport à ceux d'autres catégories d'antiviraux^[140], le dérivé ADA est parvenu au stade des essais cliniques de phase 2 et montre une certaine efficacité sur des patients pour lesquels une thérapie antivirale classique a été mise en échec par les mutations du virus^[141].

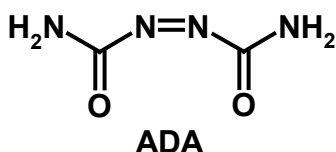


Figure 16 : azadicarbonamide

1.3.2.5. Inhibiteurs de la transcriptase inverse

La transcriptase inverse du VIH est une des cibles virales les plus étudiées dans le cadre du développement de nouveaux traitements. Quatre classes d'inhibiteurs de la transcriptase inverse ont pour l'instant été découvertes.

1.3.2.5.1. Inhibiteurs nucléosidiques

Les **inhibiteurs nucléosidiques** de la transcriptase inverse (**INTI**), également appelés **analogues de nucléosides** ou **2',3'-didésoxynucléosides (ddN)**^[142] constituent l'une des plus importantes classes d'agents antiviraux destinés à combattre le VIH. Ils sont aussi, d'un point

de vue historique, parmi les premiers composés à avoir démontré une capacité à enrayer la réplication du virus^[12, 142]. Ceci explique pourquoi l'AZT, qui constitue le prototype de cette famille, fut commercialisé dès 1987, soit deux ans à peine après sa découverte.

Les INTI possèdent pour la plupart une structure très similaire à celle des nucléosides naturels qui constituent l'ADN (figure 17). On retrouve ainsi une **base purique** (ddl, Abacavir) ou **pyrimidinique** (AZT, D4T, 3TC, ddC) qui peut être modifiée chimiquement, associée à un cycle à cinq pièces similaire au désoxyribose. Les INTI se distinguent cependant par l'**absence de groupement hydroxy en position 3'**.

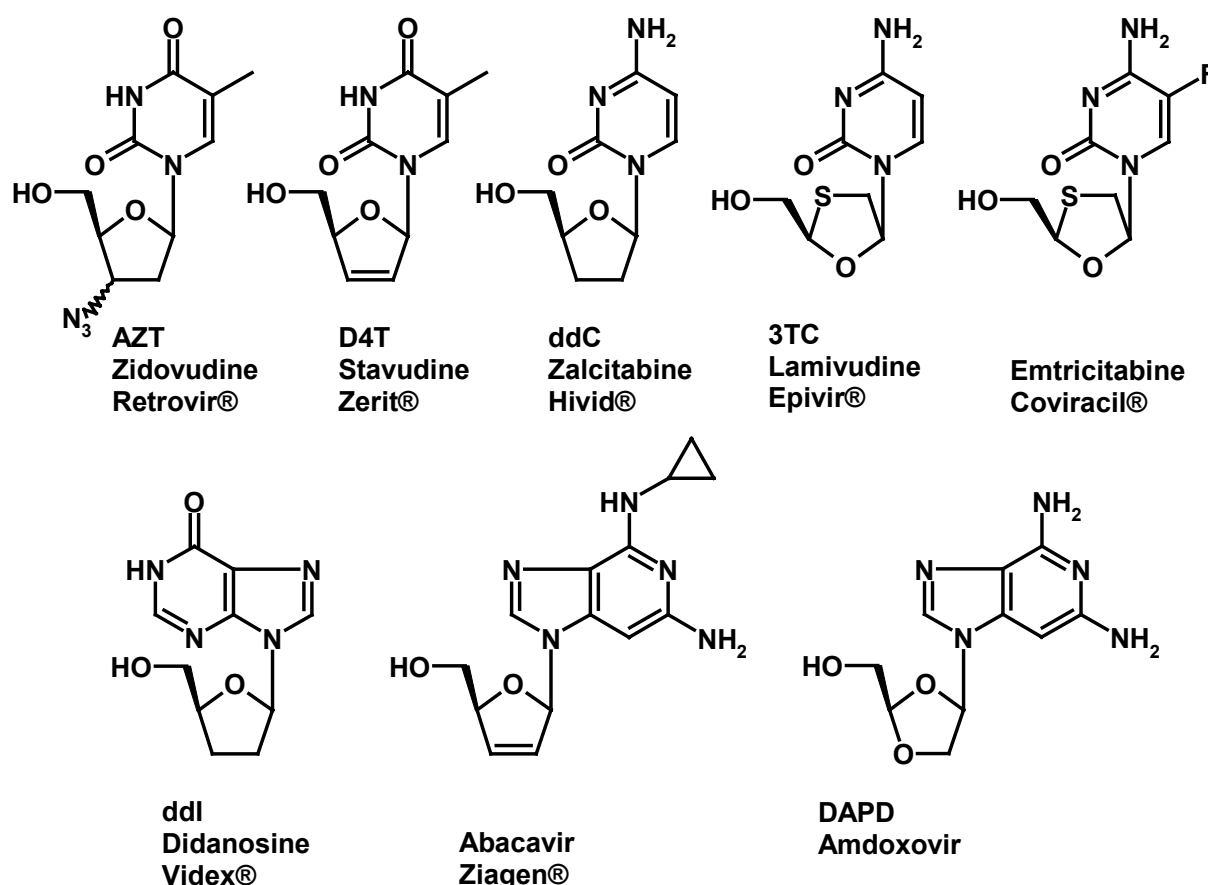


Figure 17 : Inhibiteurs nucléosidiques de transcriptase inverse (INTI)

Les INTI exercent leur activité antivirale en tant que **substrats alternatifs** de la transcriptase inverse. A ce titre, ils agissent au niveau du **site catalytique** de l'activité ADN polymérase de l'enzyme et se comportent comme des **inhibiteurs compétitifs** vis à vis des nucléosides naturels. Une fois **triphosphorylés** à l'intérieur de la cellule grâce à l'action des kinases cellulaires^[12, 143], les INTI peuvent être **incorporés** dans un brin d'ADN en cours de synthèse, à la place d'un nucléoside naturel. Ne possédant pas de fonction hydroxy en position 3', ils sont par contre incapables de former une nouvelle liaison avec un nouveau nucléotide. Le processus de transcription est dès lors bloqué et le brin d'ADN produit est donc incomplet et non fonctionnel (figure 18).

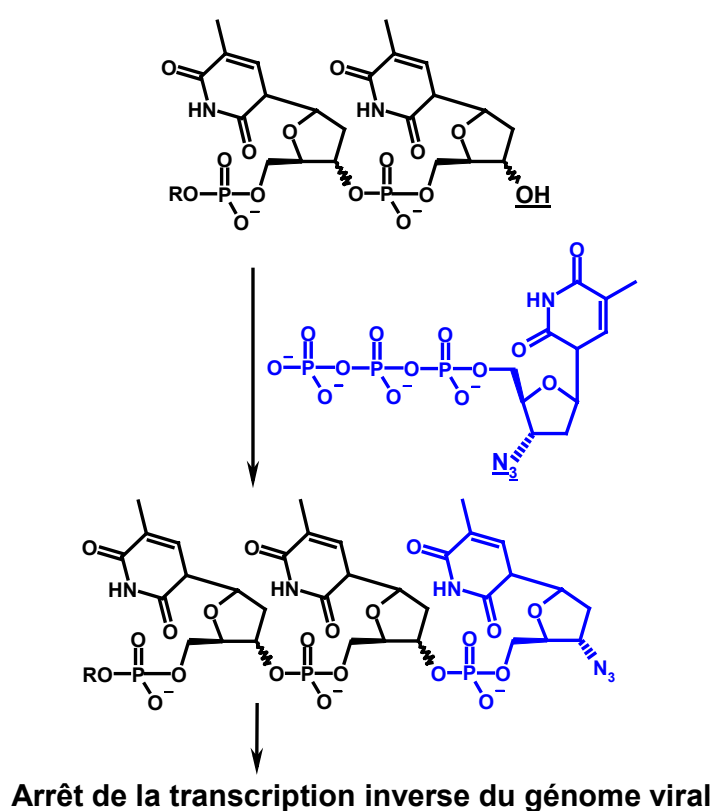


Figure 18 : Mécanisme d'action des INTI : Incorporation dans un brin d'ADN en croissance

Bien que beaucoup d'INTI inhibent la réplication du virus à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, et soient largement utilisés dans le cadre des thérapies anti-VIH, plusieurs **inconvénients** sont liés à leur utilisation.

Certaines de ces contraintes sont d'ordre métabolique^[144]. D'une part, les INTI agissant en tant qu'inhibiteurs compétitifs, de très hautes concentrations intracellulaires en nucléosides naturels tendent à diminuer leur activité antivirale. D'autre part, les INTI doivent **obligatoirement** être **triphosphorylés** par les kinases cellulaires avant d'être incorporés dans un brin d'ADN en croissance. La **première** phosphorylation est souvent l'étape la plus difficile et peut se révéler problématique pour certains inhibiteurs, dont le D4T. De plus, l'activité nucléoside kinase de certaines cellules au repos peut être trop faible pour phosphoryler les INTI en suffisance, même dans le cas de molécules comme l'AZT, qui présentent une bonne activité pour les kinases.

Plusieurs **stratégies** ont été envisagées pour permettre de surmonter cette première étape de phosphorylation^[121] (figure 19). Ainsi, les **ANP** (*acyclic nucleoside phosphonates*) tels que la **PMEA** peuvent être considérés comme des **analogues de nucléosides monophosphate**, pour lesquels le groupe phosphate a été intégré à la molécule en tant que phosphonate. Une autre possibilité réside dans l'emploi de **prodrogues** (prodrugs), c'est à dire de molécules qui, une fois métabolisées, libèrent le composé actif recherché. Cette approche s'est révélée fructueuse tant avec les ANP qu'avec les INTI classiques et l'une de ces prodrogues, le Tenofovir disoproxil fumarate, a été récemment approuvée par la *Food and Drugs Administration*.

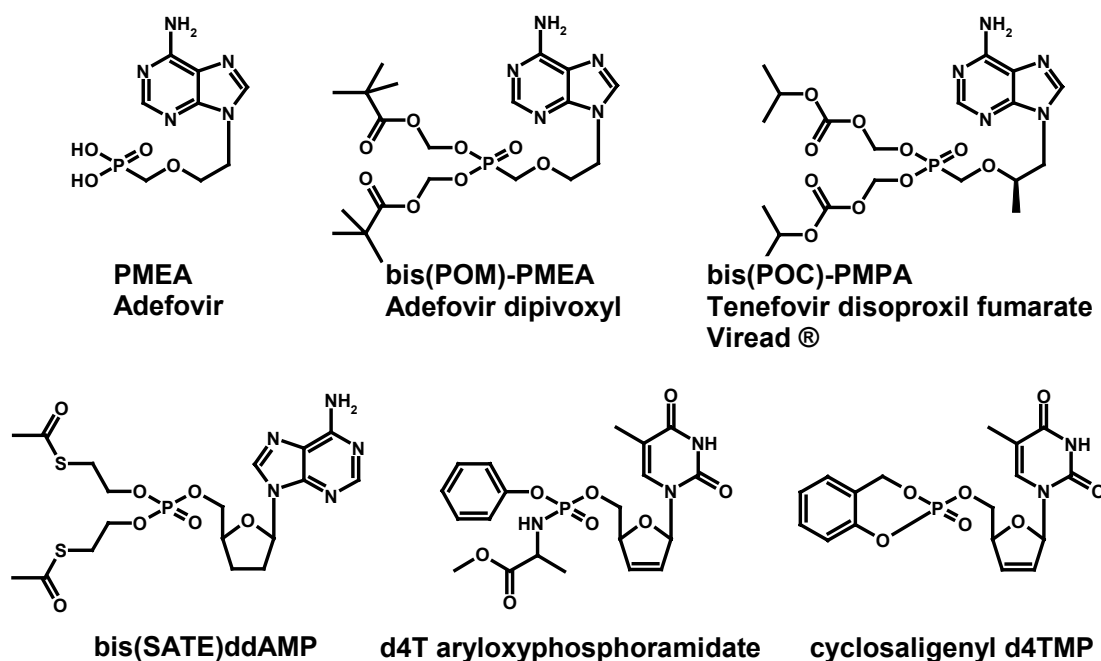


Figure 19 : Exemples d'INTI ne nécessitant pas la première étape de phosphorylation.

Un autre inconvénient des INTI est leur **faible sélectivité**. De par leurs analogies structurales avec les nucléosides naturels, ils sont susceptibles d'interagir avec la plupart des enzymes chargées d'incorporer, de métaboliser ou de phosphoryler ces nucléosides, soit en les inhibant, soit en jouant leur rôle de substrat alternatif. Il n'est donc pas étonnant que les INTI soient caractérisés d'une part par un **large spectre d'activité antivirale** (ils inhibent la réplication de plusieurs autres virus dont le VIS ou le virus de l'hépatite B) et d'autre part par une **toxicité** assez importante. Les INTI sont ainsi à l'origine de nombreux **effets secondaires**, qui vont de la diarrhée ou des vomissements aux cas graves d'anémie, d'hépatite ou de neuropathie périphérique^[145].

1.3.2.5.2. Inhibiteurs non nucléosidiques

Le terme « **inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse** » (INNTI) regroupe une large gamme de composés dont le premier représentant, le HEPT, est identifié dès 1989^[146]. Cette découverte est rapidement suivie par celle de dérivés des benzodiazépines (TIBO^[147], Névirapine^[148]), des pyridinones^[149], des bis-hétéroaryl-pipérazines (BHAP)^[150], des isoindolinones^[151, 152] et des thiocarboxanilides^[153] (figure 20). A l'heure actuelle, **plus d'une trentaine de familles chimiques** sont reconnues pour leurs propriétés d'INNTI^[154].

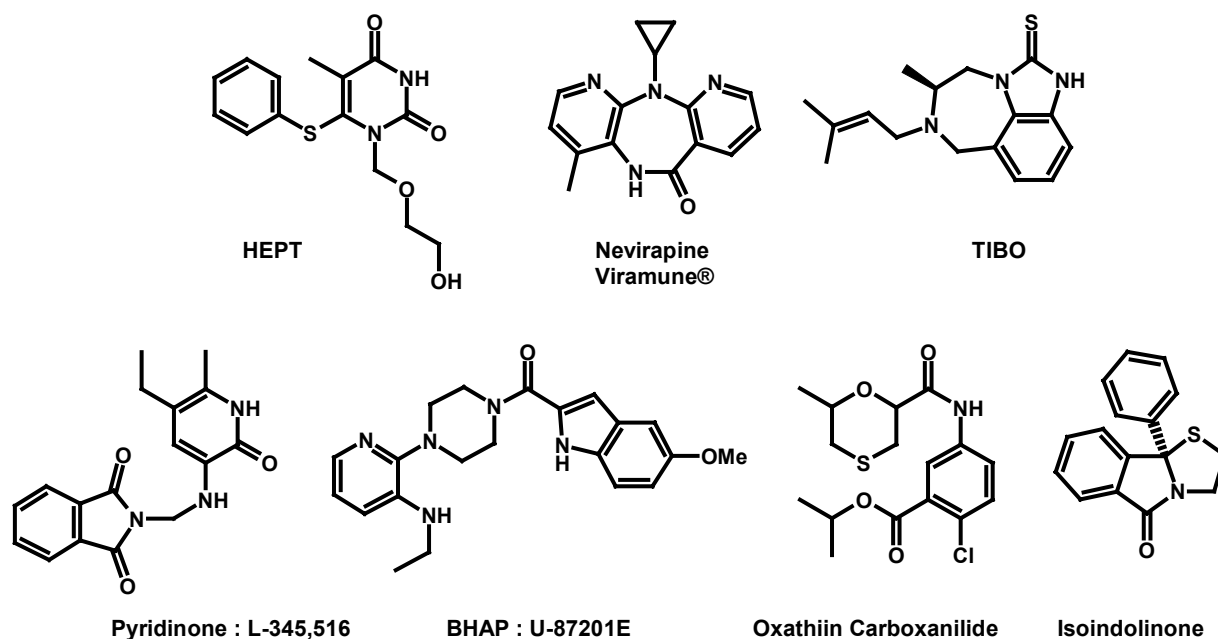


Figure 20 : Exemples d'INNTI de première génération, découverts entre 1990 et 1993

Plusieurs molécules aux propriétés antivirales attractives ont fait l'objet d'études cliniques (figure 21). En 1997, la **Névirapine** devient le premier INNTI inclus dans les thérapies anti-VIH. Deux autres, la **Delavirdine**^[155] et l'**Efavirenz**^[156], ont depuis lors été approuvés par la *US Foods and Drugs Administration*. D'autres, comme le TMC-125^[157], la Capravirine^[158] ou le Calanolide A^[159] sont en cours d'évaluation. Un nombre important de composés, comme l'Emivirine^[160], la pyridinone L-697,661^[161], le UC-781^[162], la Talviraline^[163] ou le Loviride^[164] ont cependant été abandonnés.

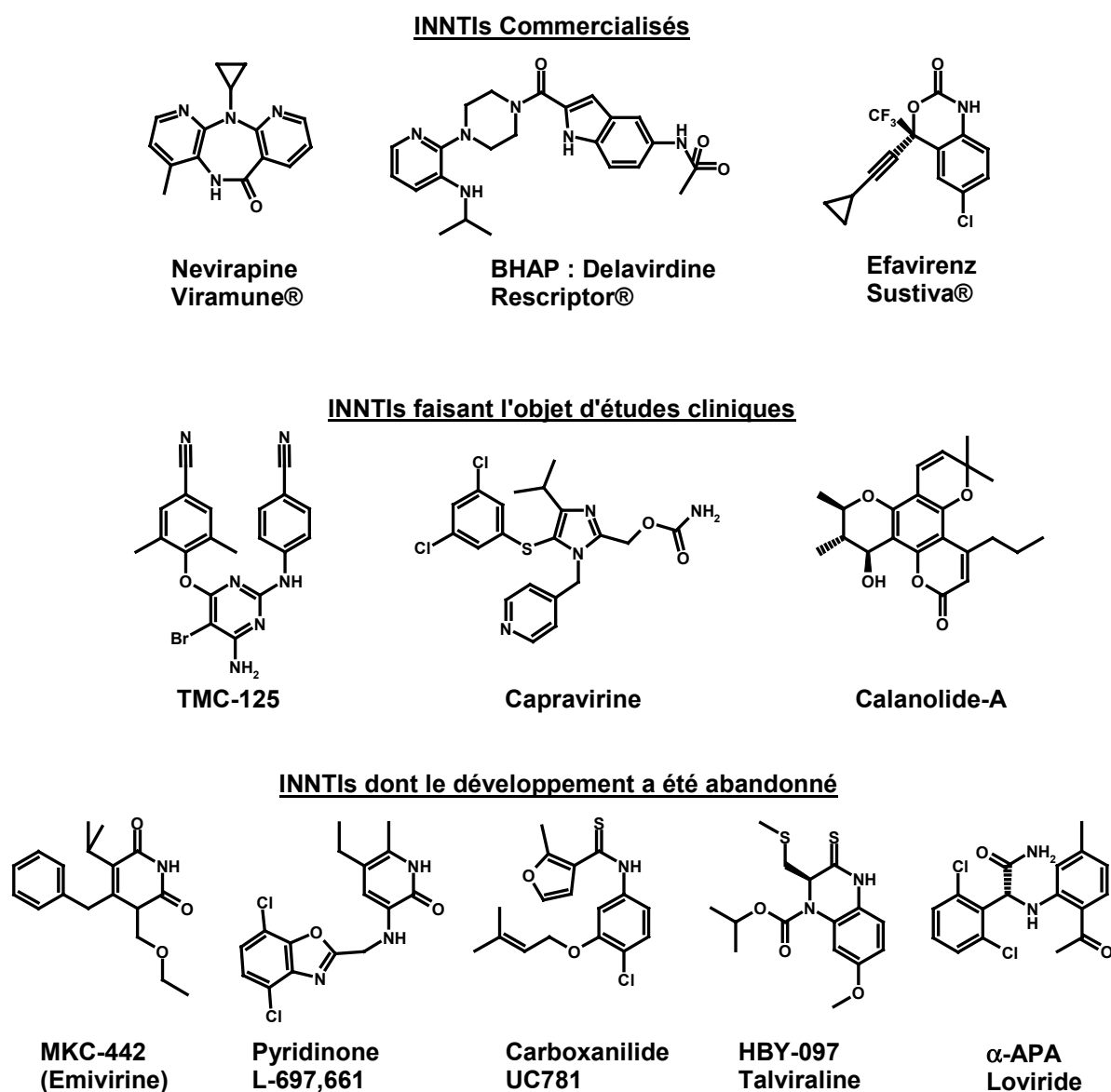


Figure 21 : Exemples d'INNTI ayant fait l'objet d'essais cliniques

Le **site de liaison** des INNTI est rapidement caractérisé grâce à des expériences de **marquage d'affinité** (*affinity labeling*)^[165, 166] et de **mutagenèse dirigée** ^[167], à l'isolation et au séquençage de **souches virales résistantes**^[168] et, dès 1995, à la détermination de structures de **complexes TI/INNTI** par diffraction de rayons X ^[43, 169]. Ces travaux révèlent que, malgré leur grande diversité, les INNTI se lient à un même **site allostérique**, localisé à environ 10Å du site catalytique. Les INNTI partagent également le même mode d'action (figure 22) : leur liaison au site allostérique cause un **changement de conformation** de plusieurs résidus de la TI, parmi lesquels Tyr181 et Tyr188. La **déformation** qui en résulte se répercute sur le **site actif**, ce qui inhibe l'activité ADN polymérase de l'enzyme^[170]. En outre, cette déformation semble rigidifier certaines zones de la TI (notamment du domaine « pouce »)^[40, 171, 172], ce qui empêcherait la translocation du brin d'ARN lors de la transcription inverse.

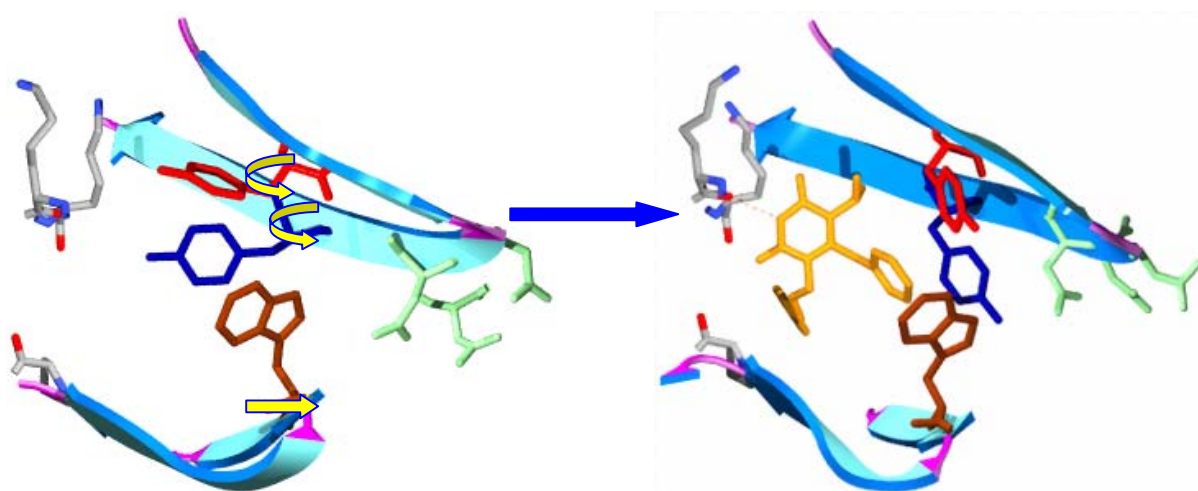


Figure 22 : Mode d'action des INNTI : La liaison d'un INNTI au site allostérique de la TI engendre un changement de conformation dans l'enzyme, qui implique notamment les résidus Tyr181 (rouge), Tyr188 (bleu) et Trp229

Parce qu'ils exploitent un même site de liaison, les INNTI possèdent plusieurs caractéristiques biochimiques et pharmacologiques communes. L'une des plus importantes est leur **action sélective** sur la transcriptase inverse du VIH-1. En effet, le site de liaison des INNTI est **caractéristique de la transcriptase inverse du VIH-1** et n'existe ni sur la TI du VIH-2, ni sur les TI d'autres rétrovirus. En général, les INNTI ne possèdent donc aucun pouvoir antiviral sur des virus tels que le VIH-2 ou les virus de l'immunodéficience bovine, féline ou simienne. Dans le cas de certains composés particulièrement puissants, une faible inhibition de la TI du VIH-2

ou du VIS a pu être mise en évidence^[173, 174]. Ces activités restent dans le meilleur des cas entre cent et mille fois plus faibles que celles observées face au VIH-1^[175].

Une des conséquences principales de la grande spécificité des INNTI est que ces composés sont en général **mieux tolérés** que les INTI^[144]. Cette faible toxicité constitue d'ailleurs un de leurs principaux atouts sur le plan thérapeutique. Certains effets secondaires leurs sont cependant associés, tels que des éruptions cutanées, de légers troubles gastrointestinaux ou, dans le cas de l'Efavirenz, de faibles effets sur le système nerveux central (vertiges, insomnie, euphorie,...) qui s'atténuent après quelques semaines.

Contrairement aux analogues de nucléosides qui, en dehors d'un système cellulaire, sont totalement inactifs sous leur forme non phosphorylée, les INNTI ne nécessitent aucune activation métabolique avant d'exercer leur activité^[144]. Ils peuvent ainsi inhiber la TI dans des systèmes *in vitro* où seule cette enzyme est présente.

Etant donné que les INNTI interagissent avec une région de la TI distincte du site catalytique, leur liaison n'interfère généralement pas avec celle des substrats naturels de l'enzyme^[176], ce qui se traduit le plus souvent par une **inhibition non compétitive**. Des cas d'inhibition incompétitive* ou même compétitive ont cependant été rapportés ^[177]. Cette variation est sans doute due au fait qu'un composé puisse se lier préférentiellement soit à l'enzyme libre, soit au complexe enzyme/template^[42, 149], soit encore au complexe enzyme/template/nucléoside triphosphate^[178] (figure 23). Cette différence d'affinité pour les différentes formes de la TI peut même être constatée au sein d'une même famille de dérivés, comme dans le cas des inhibiteurs de type carboxanilide^[179].

Le pouvoir inhibiteur d'un INNTI peut varier en fonction de la séquence d'ARN transcrite^[180]. Ce comportement n'est pas lié au type de nucléoside intégré mais bien à la **structure secondaire** du *template* transcrit ^[181].

* Inhibition incompétitive : l'inhibiteur a une plus forte affinité pour le complexe enzyme-substrat que pour l'enzyme libre

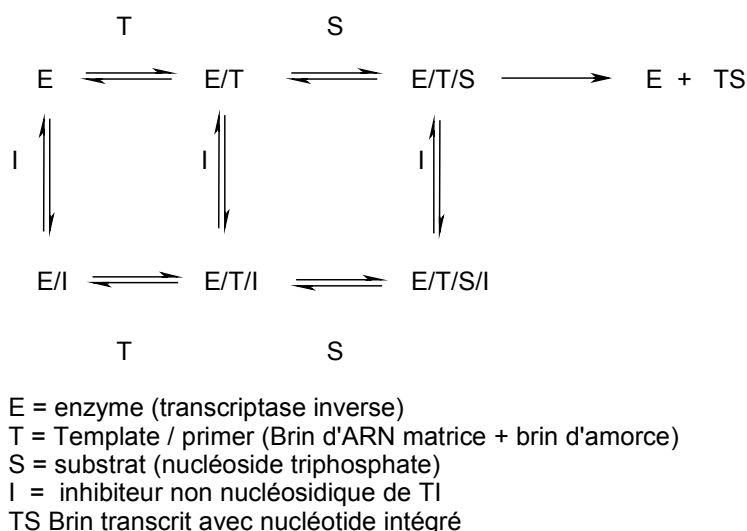


Figure 23 : Un INNTI peut se lier soit à l'enzyme libre, soit au complexe enzyme/template, soit encore au complexe enzyme/template/nucléoside triphosphate

Les **mutations** nécessaires à l'émergence d'un virus résistant aux INNTI sont différentes de celles relevées dans le cas des analogues de nucléosides. Bien que le spectre d'activité d'un inhibiteur face aux mutations de la TI puisse évidemment varier d'un composé à l'autre, les INNTI se révèlent très souvent assez **sensibles** aux modifications du site allostérique^[182]. Un phénomène de **résistance croisée** (une mutation conférant une résistance à plusieurs INNTI), qui implique les mutations **Lys103Asn** et/ou **Tyr181Cys**^[177] a également été mis en évidence pour la plupart des INNTI. La faible toxicité de ces composés permet cependant d'envisager leur utilisation à des concentrations largement supérieures à leur seuil d'activité, de manière à supprimer au maximum la réplication virale et à empêcher la percée (« *viral breakthrough* ») d'une espèce résistante. ^[183]

Enfin, le mécanisme d'action des INNTI étant distinct de celui des analogues de nucléosides, des inhibiteurs de protéase^[184] ou des inhibiteurs de fusion, ils peuvent donc être utilisés en combinaison avec ces différentes catégories de molécules. Le pouvoir antiviral de cette association se révèle souvent supérieur à celui qui peut être prédit par simple addition des effets de chaque composé isolé. Il existe donc une **synergie** entre les constituants de la combinaison.

La très grande **variété structurale** des INNTI rend difficile la définition des critères stéréoelectroniques indispensables à l'inhibition de la TI. Le modèle le plus couramment cité est le **pharmacophore « butterfly »** (figure 24), proposé pour la première fois en 1993^[151]. Il est principalement composé d'un **cycle aromatique** et d'un **système π délocalisé** (cyclique ou non) formant entre eux un angle d'environ 110° , ainsi que d'un **groupe hydrophobe** de faible volume, destiné à engendrer une **contrainte stérique** sur le résidu Tyr181, ce qui favorise à la fois la liaison de l'inhibiteur et la déformation allostérique. Ce modèle simple a contribué à l'identification de plusieurs familles d'INNTI, mais ne peut être considéré comme exhaustif. En effet, de nombreux INNTI ne correspondent pas à ces prérequis et possèdent malgré tout une bonne activité antivirale. De même, les critères repris dans le pharmacophore *butterfly* sont très généraux et un grand nombre de composés qui remplissent ces conditions sont pour leur part dénués de toute activité. Ces limitations seront détaillées ultérieurement.

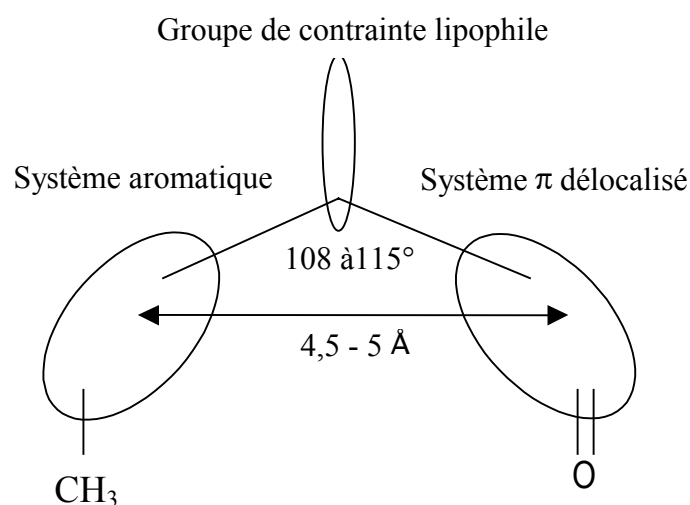


Figure 24 : Le pharmacophore « *butterfly* »

1.3.2.5.3. Inhibiteurs de dimérisation

Il est généralement admis que la transcriptase inverse du VIH-1 exerce ses activités enzymatiques sous forme d'un **hétérodimère p66/p51**, bien que l'activité de dimères p66/p66 ou p51/p51 ait déjà été mise en évidence^[37]. Par conséquent, **l'inhibition de la dimérisation** de la TI constitue une cible potentielle d'intervention dans la lutte contre le VIH-1. Plusieurs

peptides, issus du domaine « connexion » de l'enzyme et longs de 15 à 19 acides aminés sont effectivement en mesure d'empêcher cette dimérisation^[185]. Comme discuté au point 1.3.2.3 (inhibiteurs de fusion), l'utilisation de peptides en tant qu'agents antiviraux présente cependant plusieurs difficultés, ce qui tend à favoriser le développement de composés synthétiques non peptidiques. Le **TSAOe³T** (figure 25) est une des rares molécules de ce type identifiées. Bien que sa structure soit celle d'un **nucléoside modifié**, les dérivés de type TSAO ont rapidement été caractérisés en tant qu'inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, car ils ne nécessitent aucune activation métabolique et inhibent la TI selon un mécanisme non compétitif vis à vis des substrats naturels. Cependant, il est maintenant bien établi que le mode d'action du TSAOe³T est lié à une diminution (d'environ 4 kcal/mole) de la stabilité du dimère p66/p51 formé par les deux sous unités de la TI^[186]. Ce comportement est donc bien distinct de celui des autres INNTI qui, à l'inverse, tendent à favoriser le processus de dimérisation^[187].

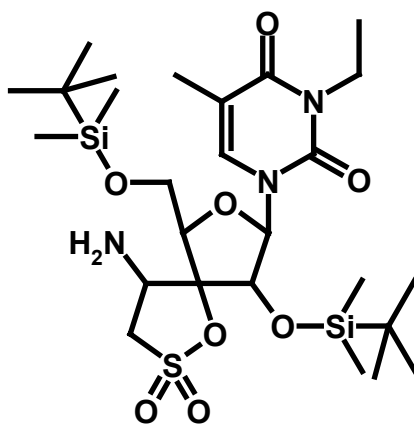


Figure 25 : Structure du TSAOe³T, inhibiteur de dimérisation de la TI

1.3.2.5.4. Inhibiteurs de l'activité RNase H

Parallèlement aux nombreux inhibiteurs de l'activité ADN polymérase de la TI qui ont été développés, quelques **inhibiteurs de l'activité RNase H** de l'enzyme ont également été identifiés, tels que l'illimaquinone^[188], l'ortho-phénantroline^[189] ou l'AZT monophosphate^[190]. Le site catalytique RNase H est cependant situé dans une **large cavité** destinée à accueillir de longues chaînes d'acides nucléiques et n'offre que peu d'opportunités pour la liaison d'une molécule de faible poids moléculaire. Ceci explique pourquoi l'activité de la plupart des composés identifiés est trop faible pour être exploitée (IC₅₀ > 50μM). Une famille de **N-acyl**

hydrazones dotées de propriétés plus attractives a néanmoins été découverte en 1997^[191]. La N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphtaldéhyde hydrazone (BBNH, figure 26), qui constitue le chef de file de cette série, inhibe la réplication virale avec une EC₅₀ de 1.5µM.

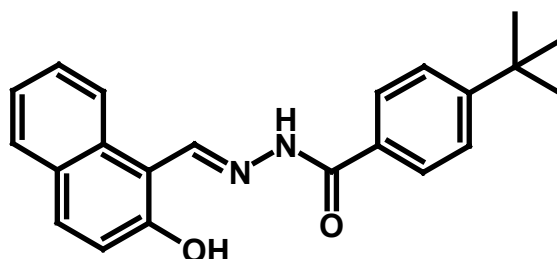


Figure 26 : N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphtaldéhyde hydrazone (BBNH)

1.3.2.6. Inhibiteurs de l'intégrase

L'**intégration** du provirus d'ADN double brin au génome de la cellule hôte est un processus clé de l'infection d'une cellule hôte par le VIH et est indispensable à la réplication virale. A ce titre, elle constitue *a priori* une cible de choix pour les chimiothérapies anti-VIH. De nombreux composés possèdent *in vitro* un pouvoir inhibiteur de l'intégrase, parmi lesquels des polyamides, des composés aromatiques polyhydroxylés ou encore des thiazolothiazépines^[192]. Beaucoup d'entre eux ne sont cependant efficaces que dans un test enzymatique et leur activité *ex vivo* est soit masquée par leur cytotoxicité, soit liée à leur action sur une cible moléculaire autre que IN.

L'**acide L-chicorique** (figure 27) est un cas typique de **pseudo-inhibiteur de l'intégrase**. Bien que cette molécule soit capable d'inhiber IN dans un test enzymatique *in vitro*, son activité antivirale *ex vivo* est liée à son interaction avec la glycoprotéine de surface gp120 (SU)^[193]. Son mode d'action est similaire à celui des molécules polyanioniques et les mutations engendrant une résistance à ces composés suppriment également le pouvoir antiviral de l'acide L-chicorique.

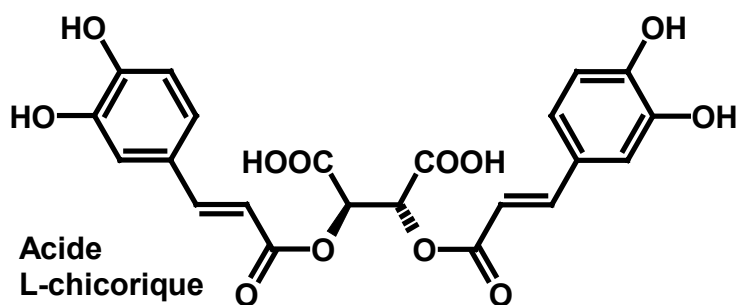


Figure 27 : L'acide L-chicorique, un pseudo-inhibiteur de l'intégrase

En 1999, la **structure d'un des domaines de l'IN**, complexé à l'inhibiteur 5CITEP (figure 28) a été déterminée par diffraction de rayons X^[194], ce qui a ouvert la voie à la conception rationnelle de nouveaux inhibiteurs sur base de la structure de cette enzyme. Depuis lors, plusieurs autres **dicétoacides** (figure 28) ont été identifiés en tant qu'inhibiteurs de la réaction de **transfert de brin** réalisée par l'intégrase^[195], dont les dérivés L-731,988^[196] et S-1360^[197]. Des mutations dans IN engendrent une résistance à l'action de ces composés, à la fois *in vitro* et *ex vivo*, ce qui indique que leur activité antivirale est bel et bien liée à l'inhibition de IN^[198]. Le mécanisme d'action des dérivés de type dicétoacide est lié à leur **interaction avec un cation divalent** (Mg^{2+}) présent dans le site actif de IN^[198]. Bien que le S-1360 ait atteint le stade des essais cliniques de phase II, son développement a été abandonné en 2003. D'autres inhibiteurs d'intégrase prometteurs sont cependant étudiés, dont le **L-870,810**^[199], qui est actuellement évalué dans le cadre d'essais cliniques de phase I.

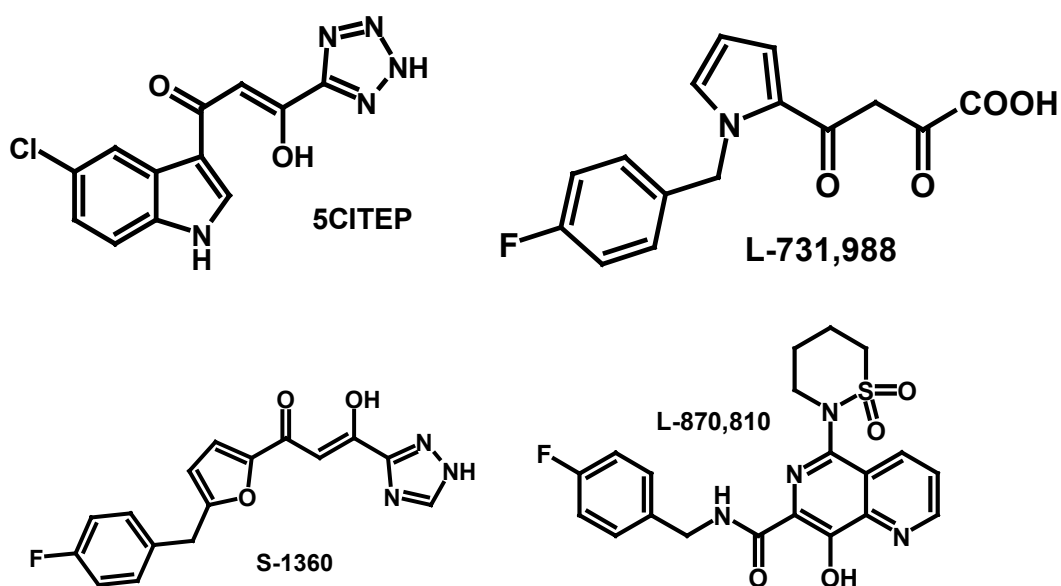


Figure 28 : Inhibiteurs de l'intégrase de type dicétoacide

Récemment, plusieurs pyranodipyrimidines ont été identifiées en tant qu'inhibiteurs de la réaction de transfert de brin catalysée par l'intégrase^[200]. Les activités (de l'ordre du micromolaire) de ces composés, dont le V-165 (figure 29) constitue le chef de file, sont cependant nettement plus faibles que celles des dicétoacides.

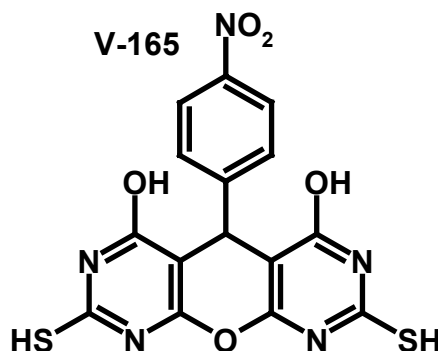


Figure 29 : Structure de la pyranodipyrimidine V-165

1.3.2.7. Inhibiteurs de la transcription et de la transactivation

L'expression des gènes du VIH peut être inhibée par des composés interagissant avec des facteurs cellulaires qui se lient à la séquence LTR du génome viral et qui sont nécessaires à un niveau de transcription basal, tels que NF- κ B^[201]. Une action plus spécifique peut cependant être espérée de la part de molécules bloquant la **transactivation** de la transcription par Tat. Cette protéine remplissant une multitude de fonctions, elle représente une cible attractive pour une intervention thérapeutique.

Plusieurs composés inhibent la réplication du VIH en interférant avec la transcription des gènes (figure 30). Ainsi, l'effet de la **fluoroquinoline** K37 est lié à l'inhibition de Tat^[202] et d'autres transactivateurs^[203]. La **Temacrazine**, une bis-triazoloacridone, bloque pour sa part la transcription des gènes viraux sans influencer celle des gènes cellulaires^[204]. La résistance à ce composé est liée à des modifications dans la séquence LTR du génome viral. Le **flavopiridol**, un inhibiteur de Cdk (*Cyclin dependant kinase*) et de P-TEFb, est étudié pour ses propriétés antiprolifératives dans le cadre de la lutte contre le cancer. Tat formant un complexe avec P-TEFb, l'action du flavopiridol inhibe la réplication du VIH^[205]. Enfin, plusieurs analogues

peptidiques mimant certains domaines de Tat sont également en mesure de bloquer la transactivation de la transcription^[121].

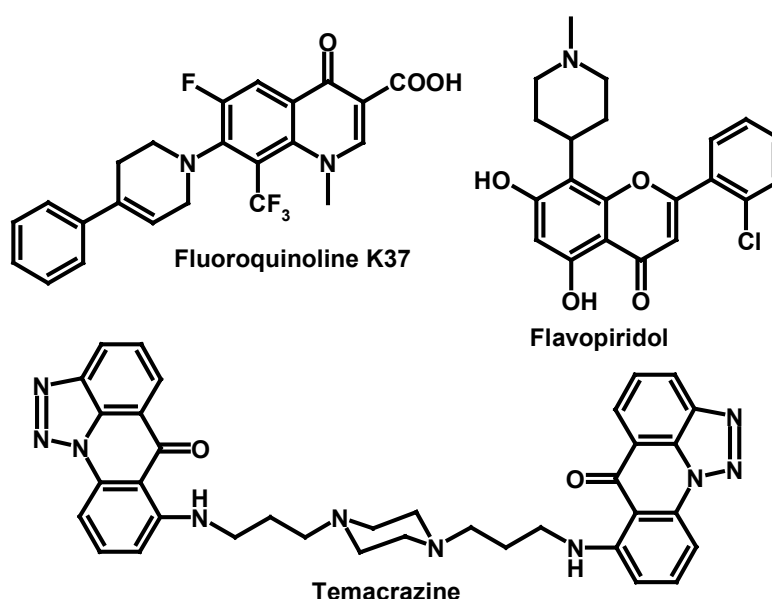


Figure 30 : Inhibiteurs de la transcription du génome du VIH

1.3.2.8. Inhibiteurs de la protéase virale

Les **inhibiteurs de la protéase virale** (IPR) bloquent le **clivage** des précurseurs Gag et Gag-Pol en protéines structurales et fonctionnelles. De ce fait, ils empêchent la **maturation** des particules virales, ce qui supprime leur caractère infectieux^[206]. Un grand nombre d'inhibiteurs de protéase, y compris les six composés qui font actuellement l'objet d'applications cliniques, agissent en tant que molécules **peptidomimétiques**, dans lesquelles un lien hydroxyéthylène inerte remplace la liaison peptidique normalement clivée par la protéase^[207]. L'ajout des inhibiteurs de protéase à la gamme des traitements antirétroviraux est à l'origine de progrès importants dans la prise en charge des patients infectés par le VIH. La grande majorité des traitements **HAART** (Highly Active AntiRetroviral Therapy) incluent à présent ces molécules^[13].

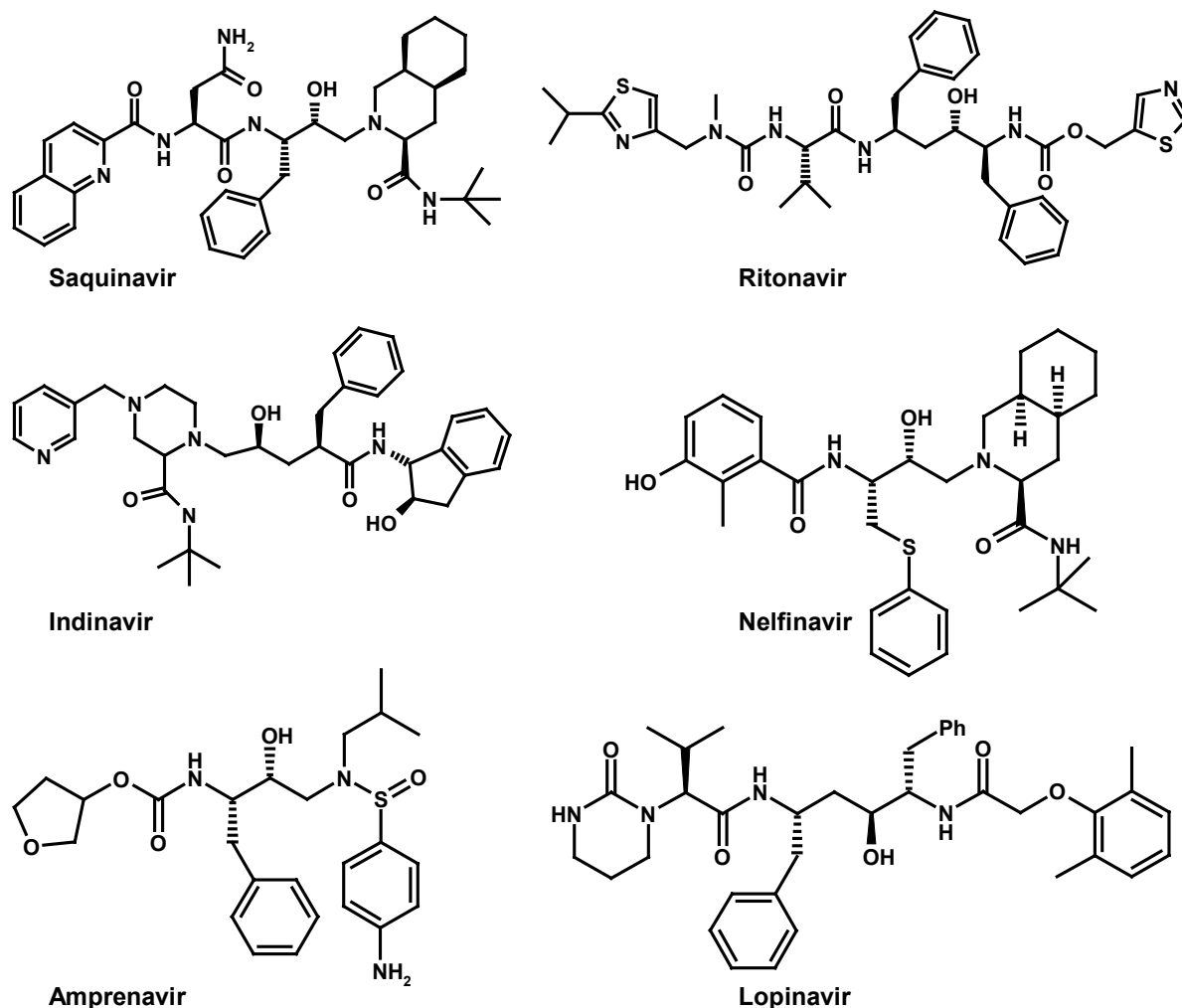


Figure 31 : Inhibiteurs peptidomimétiques de la protéase du VIH

Plusieurs problèmes sont cependant associées à ces composés. Les effets secondaires engendrés par les inhibiteurs de protéase vont des troubles gastro-intestinaux (fréquents) aux cas d'hyperlipidémie ou d'hyperglycémie (plus rares) ou de **lipodystrophie** (changement de la répartition des masses grasses dans le corps du patient)^[208].

Les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de ces molécules sont également un problème complexe^[208]. D'une part, les composés peptidomimétiques sont souvent caractérisés par une **faible biodisponibilité** et peuvent être rapidement métabolisés. Ainsi, la biodisponibilité du Saquinavir n'est que de 12%, alors que son temps de demi-vie plasmatique n'excède pas une à deux heures. D'autre part, la plupart des inhibiteurs de protéase interagissent avec les cytochromes p450 et tendent à inhiber certaines enzymes de cette famille. La prise régulière de ces composés tend donc à influencer le **métabolisme** des autres

médicaments absorbés. Ceci permet cependant l'utilisation d'une combinaison de médicaments judicieusement choisie de manière à augmenter les concentrations plasmatiques d'un inhibiteur.

Enfin, comme pour la plupart des médicaments antirétroviraux destinés à combattre le VIH-1, l'efficacité à long terme des inhibiteurs de protéase peut être compromise par l'apparition de **souches mutantes** du virus.

Les limitations des inhibiteurs peptidomimétiques de protéase ont encouragé la recherche et le développement de nouvelles molécules non peptidiques (figure 32) possédant un profil pharmacologique plus attractif. Ainsi, le **DMP-450** (Mozenavir) est une urée cyclique^[209, 210] caractérisée par une bonne biodisponibilité. Ce composé a fait l'objet d'essais cliniques de phase I, II et III et semble à la fois efficace aux doses testées et bien toléré par les sujets prenant part à ces études. Cependant, sa concentration plasmatique ne peut être augmentée grâce à la prise simultanée d'un autre IPR. De plus, le Mozenavir ne présente qu'une faible activité sur les virus déjà résistants au Ritonavir ou à l'Indinavir.

Le **Tipranavir** (PNU-140690) est une autre molécule non peptidique dont le principal avantage est de conserver une activité antivirale exploitable face à des souches virales résistantes à la plupart des inhibiteurs de protéase actuellement commercialisés^[211, 212]. Il présente donc un intérêt tout particulier pour le développement de nouvelles thérapies destinées à combattre plus efficacement le VIH.

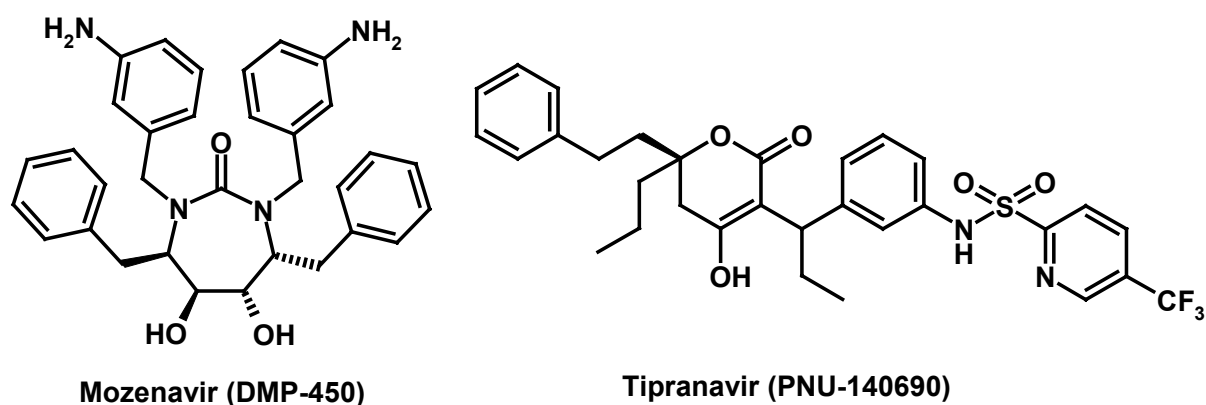


Figure 32 : Inhibiteurs non peptidiques de la protéase du VIH

1.3.3. Les traitements antiviraux actuels

A l'heure actuelle, 17 molécules s'attaquant au cycle de réplication du VIH-1 sont utilisées dans le cadre des thérapies antirétrovirales. Treize d'entre elles ont été commercialisées au cours des dix dernières années. Ces composés agissent soit au niveau de la **transcriptase inverse**, soit à celui de la **protéase**, soit à celui du processus de **fusion des membranes**.

L'expérience acquise dans le domaine de la lutte contre le VIH a depuis plusieurs années démontré qu'un traitement antirétroviral optimal doit être basé non pas sur l'emploi d'un seul médicament, mais bien sur la **combinaison** de plusieurs substances actives contre le virus^[13, 208]. Le succès de cette stratégie a mené à l'abandon des monothérapies, au profit des **thérapies combinatoires**, également appelées **multithérapies** ou **highly active antiretroviral therapy (HAART)**. Outre leur efficacité accrue, les régimes HAART assurent également un meilleur suivi des effets secondaires rencontrés ou de la résistance du virus, en permettant de remplacer un des composés entrant dans leur composition, en fonction de l'état général du patient.

Trois types d'associations peuvent être envisagées^[144]. Les combinaisons de **1^{er} niveau** utilisent deux composés inhibant des **étapes** différentes du cycle de réplication (ex : un inhibiteur de protéase et un inhibiteur de transcriptase inverse). Les combinaisons de **2nd niveau** font appel à des molécules agissant sur des **sites** différents d'une même protéine (INTI et INNTI). Les combinaisons de **3^e niveau** ont recours à des inhibiteurs possédant un même mécanisme d'action, mais un **profil de résistance** différent (deux INTI, deux IP, ...)

Les multithérapies les plus couramment prescrites comportent deux ou trois INTI, associés à un INNTI^[213] ou un inhibiteur de protéase^[13]. D'autres régimes, plus agressifs, utilisent deux inhibiteurs de protéase ou combinent trois classes de molécules actives. La plupart des traitements les plus courants offrent cependant une bonne activité antivirale et permettent de laisser de côté une classe de molécules (INNTI ou IP) qui pourra être utilisée en cas d'échec du

premier traitement. La commercialisation récente du Pentafuside (Fuzeon®), le premier composé bloquant le processus de fusion de la membrane virale a permis d'élargir la gamme des combinaisons de premier niveau possibles.

L'avènement des thérapies combinatoires a contribué à améliorer considérablement l'état de santé du patient. Leur **application rigoureuse** entraîne normalement une baisse très importante de la virémie, qui se traduit souvent par une **charge virale indétectable** par les techniques de mesure les plus courantes (<50 copies d'ARN viral / ml de sang). Elles restent cependant entachées de nombreuses imperfections.

1.3.4. Les inconvénients des thérapies actuelles

1.3.4.1. Le coût

Bien que les considérations économiques puissent paraître triviales, le **prix** des traitements anti-VIH est un facteur limitant de la lutte contre le SIDA. Les médicaments antirétroviraux, toutes catégories confondues, sont vendus dans les pays industrialisés à des prix (tableau 33) qui les rendent totalement **inaccessibles** aux populations les plus défavorisées du globe, qui sont aussi les plus touchées. Ainsi, la plupart des INTI et INNTI coûtent entre 3000 et 5000\$ par an et par patient. Les inhibiteurs de protéase ont longtemps constitué la catégorie la plus onéreuse d'antirétroviraux, puisque plusieurs d'entre eux sont proposés à plus de 6000\$ par an et par patient. Le pentafuside (Fuzeon®), dont la synthèse est particulièrement complexe, est à présent commercialisé dans une gamme de prix allant de 10000 à 15000\$ par an et par patient.

En 2002, seuls 30000 patients Africains (0.1% des personnes infectées) avaient accès à un traitement antirétroviral^[214]. Les **problèmes économiques** liés à la distribution de médicaments antirétroviraux aux populations les plus démunies (Afrique, Asie du Sud-Est,...) ont conduit de nombreuses organisations à militer pour une baisse de ces tarifs. Ceci a incité plusieurs compagnies à rendre ces médicaments plus accessibles aux pays les plus pauvres. En outre,

d'autres firmes pharmaceutiques, principalement asiatiques et Sud-Américaines, ont entrepris de produire ces molécules sous une **forme générique**, à des prix parfois nettement inférieurs à ceux affichés par les détenteurs des brevets^[215, 216] (tableau 34). Durant plusieurs années, les producteurs de médicaments génériques, ainsi que les pays à faible revenu qui souhaitent les importer, se sont fréquemment heurtés aux **pressions** juridiques et politiques exercées par les compagnies et les pays détenant les brevets^{[217] [218]}.

Composé	Nom commercial	Compagnie détentrice	Catégorie	Prix par an et par patient (\$)
Tenofovir	Viread	Gilead	INTI	5200
ddl	Videx	Bristol Myers	INTI	3500
D4T	Zerit	Bristol Myers	INTI	3549
3TC	Epivir	Glaxo	INTI	3271
AZT+3TC	Combivir	Glaxo	INTI	7093
AZT+3TC+Abacavir	Trizivir	Glaxo	INTI	10800
Nevirapine	Viramune	Boehringer	INNTI	3508
Efavirenz	Sustiva, Stocrin	Du-pont-Merck	INNTI	4730
Indinavir	Crixivan	Merck	IP	6016
Nelfinavir	Viracept	Roche	IP	6700
Ritonavir	Norvir	Abbott	IP	6600
Pentafuside (T20)	Fuzeon	Roche	Inhib. de fusion	10000-15000

Tableau 33 : Prix de quelques médicaments antirétroviraux dans les pays européens

Médicament	Prix Cipla (Inde) (\$)	Prix Hetero (Inde) (\$)	Meilleure offre de la compagnie détentrice du brevet (2001) (\$)
Zerit	70	47	252
Epivir	190	98	232
Crixivan	ND	2300	600
Combivir	635	293	730
Stocrin	ND	1179	500
Viramune	340	202	483

Tableau 34 : Prix de quelques médicaments antirétroviraux proposés sous forme générique par des firmes indiennes

L'accord sur les aspects des droits de propriété intellectuelle touchant au commerce (**ADPIC**, TRIPS dans sa version anglophone)^[219], contracté en 1995 dans le cadre de l'Organisation Mondiale du Commerce, ouvre cependant la voie à la production de médicaments antiviraux moins coûteux. Selon ces accords, un laboratoire acceptant de négocier avec un pays tiers peut obtenir des royalties en échange d'une autorisation de production locale (**licence volontaire**). En cas de refus de la part du laboratoire, un état souverain peut décider de faire fabriquer la copie d'un produit désiré par un industriel local (**licence obligatoire**). En 2001, la **déclaration de Doha**^[220] autorise pleinement les pays en voie de développement à recourir aux licences obligatoires, tout particulièrement dans le cas de problèmes de santé majeurs tels que le SIDA, la tuberculose, le paludisme ou d'autres épidémies. L'accord ADPIC stipule cependant que la distribution de ces copies doit être **limitée au marché local**. En conséquence, l'**exportation** des médicaments génériques produits dans le cadre de licences obligatoires et leur **importation** par des pays en voie de développement incapables de les fabriquer est normalement **interdite**. La déclaration de Doha a donc été complétée le 30 Août 2003, par une nouvelle déclaration de l'OMC sur la propriété intellectuelle^[221, 222]. Ce complément prend la forme d'une **exemption accordée jusqu'en 2016 aux pays les moins développés**. Désormais, tout pays membre de l'OMC est autorisé à exporter des produits pharmaceutiques fabriqués dans le cadre d'une licence obligatoire. Tout pays membre de l'OMC est également autorisé à recourir à l'importation de ces produits. Ces accords ouvrent donc la voie à une meilleure prise en charge des personnes infectées par le VIH dans les pays du Tiers-Monde, même si plusieurs des molécules les plus récentes ne sont pas encore disponibles sous une forme générique.

1.3.4.2. La résistance virale

La **résistance** du virus aux traitements antirétroviraux est l'un des problèmes les plus importants auxquels doivent faire face les patients, les médecins et les scientifiques chargés d'élaborer de nouveaux médicaments. Elle est causée par l'apparition de **souches mutantes** du virus, qui se révèlent moins sensibles aux molécules antivirales que ne l'était la forme originale.

Les mutations causant cette résistance sont la conséquence de la très haute **cadence de réplication** du VIH^[223-225], du taux important d'**erreurs de rétrotranscription** commises par la transcriptase inverse^[44, 226] et de l'**absence d'activité correctrice** de cette enzyme. Ainsi, chez un patient non traité, la charge virale est fréquemment comprise entre 10^3 et 10^6 virions/ml de sang. Un nombre important de cellules CD4⁺ est donc infecté quotidiennement. Dans chacune d'elles, au moins deux copies du génome viral, longues d'environ 10000 bases, sont rétrotranscrites par la TI avec un taux d'erreur qui va de $1/10^4$ à $1/10^5$ par nucléotide. En considérant que 10^8 cellules peuvent être infectées au cours d'une seule journée, on constate que ce taux est suffisant pour générer en 24 h toutes les **mutations ponctuelles** (une seule base modifiée) possibles dans un génome de 10000 bases^[227], ainsi qu'environ 1% des **doubles mutations** envisageables. Ces variations peuvent par la suite s'accumuler au cours des cycles viraux successifs^[228]. Pour ces raisons, on considère souvent qu'un patient n'est pas infecté par une souche virale unique, mais par un large ensemble de **quasi espèces**.

Les souches virales générées suite aux erreurs de transcription inverse ne sont pas toutes susceptibles de mener à l'apparition d'un virus résistant. Certaines variations peuvent se révéler **délétères** pour le virus, par exemple parce qu'elles modifient un acide aminé essentiel à l'activité d'une enzyme virale^[229, 230]. La réplication de cette nouvelle souche sera donc nettement pénalisée, voir impossible. Un grand nombre de modifications sont **neutres** et n'interfèrent ni avec la réplication du virus, ni avec l'action d'un médicament. Enfin, certaines mutations pénalisent la liaison d'une molécule antivirale avec sa cible macromoléculaire. Elles confèrent alors aux souches virales qui la portent un **avantage sélectif** sur les autres formes du virus et constituent des **mutations de résistance**. La pression sélective exercée par un traitement antirétroviral va ainsi favoriser l'émergence des souches les **mieux adaptées**, c'est à dire celles portant une ou plusieurs mutations de résistance. A terme, ces variétés représenteront la majorité de la population virale.

Les composés utilisés dans le cadre de la lutte contre le SIDA ne sont pas égaux au niveau de la résistance virale. Pour certains, une seule mutation suffit à causer une perte d'activité antivirale importante et une souche résistante est alors sélectionnée parmi les nombreuses

espèces présentes chez le patient, parfois en l'espace de quelques semaines. Ces médicaments ne possèdent donc qu'une **faible barrière génétique** à la résistance. Ceci est le cas pour de nombreux INNTI^[144]. Pour d'autres, l'accumulation de plusieurs mutations est nécessaire avant que la sensibilité du virus au composé antirétroviral ne soit réellement affectée^[156, 158]. On parle alors de médicaments qui offrent une **haute barrière génétique** à la résistance. Aux problèmes de barrière génétique s'ajoute celui de la **résistance croisée** (*cross resistance*). Bien qu'une mutation de résistance à un composé ne confère aucun avantage sélectif au virus face à des médicaments possédant un mode d'action différent, il est possible qu'elle rende inefficace une grande part des molécules qui interagissent avec le même site de liaison. Ceci est le cas pour de nombreux INNTI, qui sont particulièrement affectés par les mutations Tyr181Cys^[231] et Lys103Asn^[232].

D'une manière générale, la résistance à un inhibiteur de la transcriptase inverse peut être engendrée par trois types de mécanismes. Le plus évident consiste en une déstabilisation du complexe TI-inhibiteur, suite à une modification d'un ou plusieurs acides aminés du site de liaison. Certaines mutations suppriment des contributions essentielles à la stabilisation du ligand au sein du complexe TI-inhibiteur (perte d'une interaction de π -stacking, d'un contact hydrophobe)^[231], tandis que d'autres introduisent des conflits stériques en remplaçant un acide aminé par un autre de volume plus important. D'autres possibilités de résistance ont cependant été rapportées. Ainsi, la mutation Lys103Asn implique la formation d'un pont hydrogène supplémentaire dans la TI libre, qui doit être brisé pour permettre la formation d'un complexe TI-INNTI. L'effet net de cette mutation est donc de stabiliser la forme libre de la TI par rapport à la forme complexée. L'interaction de l'INNTI avec le site de liaison n'est par contre que très peu perturbée^[232]. Enfin, certaines mutations peuvent permettre de conserver l'activité catalytique de la TI, même après formation du complexe enzyme-inhibiteur. C'est par exemple le cas des doubles mutations D67N/K70R ou T215F/K219Q, qui permettent à la TI d'extraire un inhibiteur nucléosidique (AZT) déjà intégré dans un brin d'ADN en cours de croissance, et donc de reprendre son activité polymérase même après action de l'inhibiteur^[233, 234].

La lutte contre les souches résistantes du VIH est devenue un aspect important de la recherche antirétrovirale. La plupart des molécules actuellement développées par les compagnies pharmaceutiques sont sélectionnées non seulement pour leur activité sur les formes les plus courantes du virus, mais également en fonction de leur effet sur les souches mutantes fréquemment rencontrées. L'apparition de ces variantes mutantes du VIH peut également être empêchée ou retardée par une thérapie antirétrovirale appropriée. En maintenant la réplication du VIH à des valeurs minimales, les thérapies combinatoires limitent le nombre de quasi-espèces qui peuvent être générées suite aux erreurs de rétrotranscription^[235]. De plus, ces traitements associent plusieurs molécules de manière à ce qu'un virus présentant une résistance à l'un des médicaments puisse encore être supprimé par les autres composés présents.

1.3.4.3. La persistance du virus

Malgré leur apport indéniable à l'état de santé des patients, les traitements antiviraux actuels ne permettent pas d'éradiquer le VIH de l'organisme^[107]. Cette **Infection chronique** par le virus constitue sans doute leur plus importante limitation. Elle trouve en partie son origine dans le mode d'action du virus. Une fois le **génome viral intégré** à celui de la cellule hôte (*cf* point 1.2.4.4.), celle-ci est en effet contaminée de manière **permanente** et aucun composé chimique n'est pour l'instant en mesure d'inverser ce processus. Cette nouvelle source potentielle de virions ne sera éliminée que lorsqu'elle succombera suite aux contraintes provoquées par la réplication virale ou qu'elle sera détruite par les cellules du système immunitaire.

L'intégration du génome viral n'est cependant pas la seule raison expliquant la persistance du virus dans l'organisme. En effet, la **durée de demi-vie** des cellules produisant les particules virales est **très courte**^[224] (environ 24h), tout comme celle des particules virales présentes dans le plasma sanguin. En bloquant la réplication virale et en empêchant l'infection de nouvelles cellules, un traitement antirétroviral efficace devrait donc mener à une baisse importante de la virémie. Une chute d'environ deux ordres de grandeur de la charge virale dans le plasma sanguin est de fait observée dans les quelques jours qui suivent le début d'un traitement^[236].

Elle est cependant suivie d'une nouvelle décroissance, significativement plus lente. Cette deuxième baisse est représentative de l'élimination d'autres cellules infectées ^[236] qui possèdent un temps de demi-vie plus important (entre une et quatre semaines). Parmi ces cellules se trouvent des **macrophages**.

La prise en compte de cette seconde source de virus ne permet cependant pas de comprendre la persistance à très long terme du VIH. En théorie, le rythme de décroissance de cette source reste assez rapide pour envisager une élimination totale du VIH après deux ou trois années de traitement^[236]. Il existe donc dans l'organisme infecté des **compartiments** ou des **lignées cellulaires** dans lesquels le virus est **implanté de manière très stable**, tout en restant capable de reconstituer une charge virale importante en cas d'arrêt du traitement. Ces sites sont fréquemment désignés sous le nom de **réservoirs viraux**. De manière très schématique, ils peuvent être regroupés en deux grands types : les **réservoirs cellulaires** et les **réservoirs anatomiques**^[107].

Les **réservoirs cellulaires** sont principalement composés de **lymphocytes T CD4+ au repos**. Ils sont les principaux responsables de la persistance à très long terme du VIH. Dans un organisme sain, les lymphocytes T naïfs sont produits au niveau du thymus et restent au repos jusqu'au moment où ils sont activés par un antigène. Ils peuvent alors proliférer et remplir leurs fonctions. Certaines des cellules activées peuvent par la suite revenir au repos. Leur rôle est alors de **persister pendant de longues périodes**, afin de constituer une sorte de **mémoire immunitaire** qui permet en cas de besoin une réponse rapide face à l'antigène précédemment identifié^[237]. En cas d'infection par le VIH, certains des lymphocytes T contaminés peuvent être **placés au repos** avant d'être détruits par le virus^[238, 239]. Ils deviennent alors une **source latente** de virions, qui perdure pendant plusieurs années. Dans cet état, les cellules infectées n'expriment aucun des gènes du VIH, et ne peuvent donc être repérées par le système immunitaire. Le temps de demi-vie de ce réservoir étant estimé à au moins **44 mois** (la décroissance observée n'est en fait pas significativement différente de zéro), l'éradication du virus qui y est implanté demanderait donc au mieux plus de 60 ans d'une thérapie antivirale très efficace^[107, 240]. Il n'est cependant pas établi si la durée de vie exceptionnelle de ce réservoir,

qui dépasse de très loin celle des lymphocytes T placés au repos dans des conditions normales ($t_{1/2} = 6$ mois) est la conséquence d'une division des lymphocytes ou d'une réplication virale résiduelle^[107].

Un second type de réservoir, dont l'action est sans doute coordonnée à celle du premier, est constitué par les **réservoirs anatomiques**. Les organes lymphoïdes, le système nerveux central et le système reproducteur sont des exemples de réservoirs anatomiques potentiels^[241-243]. En effet, bien que les thérapies antirétrovirales parviennent à supprimer presque complètement la réplication du VIH dans le plasma sanguin, il est possible qu'elles perdent de leur efficacité au sein de ces sites. Ainsi, les **concentrations** en INTI^[244] ou en IP^[245, 246] dans le fluide cérébrospinal sont généralement plus faibles que celles relevées dans le plasma sanguin. Ceci est dû aux difficultés éprouvées par ces composés pour traverser la **barrière hématoencéphalique**. Des observations similaires ont été réalisées quant à la présence d'inhibiteurs de protéase dans le liquide séminal^[247]. Ces organes, dans lesquels la réplication du VIH est encore possible, constitueraient donc une seconde source stable de particules virales.

En plus d'être responsables de la persistance à long terme du virus, les réservoirs viraux jouent un rôle dans l'apparition de souches virales mutantes, liée à la réplication du virus. En outre, l'ensemble des espèces virales représentatives peuvent être conservées dans les lymphocytes T au repos^[248]. Ceci confère au virus une « **mémoire** » **des mutations** qui lui permettent d'échapper à l'action des médicaments antirétroviraux.

Plusieurs stratégies sont actuellement à l'étude pour pallier les problèmes posés par les réservoirs viraux. Des médicaments antirétroviraux possédant de meilleures **propriétés de distribution** dans l'organisme pourraient permettre une action plus efficace au niveau des réservoirs anatomiques. En ce qui concerne les réservoirs cellulaires, deux pistes importantes sont envisagées. La première vise à établir un **contrôle du système immunitaire** sur la réplication du VIH, grâce à des **interruptions structurées** du traitement antiviral^[249, 250]. Le

patient, serait alors en mesure d'abandonner (totalement ou partiellement) ces thérapies, même s'il resterait infecté. Les résultats les plus prometteurs dans ce domaine ont surtout été obtenus sur des patients soumis à un traitement HAART efficace dès le début de l'infection. La deuxième approche a une vocation **curative**. Elle vise à **activer les lymphocytes T au repos**, de manière à ce que les cellules infectées qui composent le réservoir cellulaire expriment les gènes du VIH et soient détruites, soit par le virus, soit par le système immunitaire^[251]. Pour être efficace, cette stratégie doit bien sûr être **combinée à une thérapie antirétrovirale puissante**, qui empêche toute nouvelle infection de cellules saines.

1.3.4.4. Les effets secondaires et le facteur humain....

En marge de tous les problèmes d'ordre scientifique ou médical associés aux thérapies actuelles s'ajoutent ceux rencontrés au niveau du patient. Pour qu'un traitement antirétroviral soit efficace, il est essentiel qu'il soit **planifié** de manière à maximiser la **biodisponibilité** et la **concentration intracellulaire** de ses composants. Ce programme doit alors être rigoureusement suivi. L'**adhésion** du patient au traitement qui lui est prescrit peut cependant poser problème, car les multithérapies sont coûteuses et parfois complexes. Elles obligent le patient à absorber quotidiennement et à heures fixes un nombre important de comprimés, qui contiennent plusieurs grammes de substances chimiques. Certains médicaments doivent être pris à jeun, d'autres durant un repas et d'autres encore imposent des restrictions alimentaires. Certaines molécules peptidiques récemment développées, comme le Fuzeon®, doivent être administrées par injection sous-cutanée. A ces contraintes d'organisation s'ajoutent les multiples **effets secondaires** liés aux composés antiviraux, qui incitent le patient à interrompre son traitement. Ces interruptions sont cependant préjudiciables à son état de santé, car elles augmentent le risque d'apparition d'un virus résistant et se soldent fréquemment par une hausse importante de la virémie. La commercialisation de molécules antivirales exigeant **une seule prise quotidienne**, tels que la Didanosine (Videx®) ou de médicaments combinant en un seul comprimé plusieurs substances actives (Trizivir®) facilite nettement l'adhésion du patient à la thérapie qui lui a été prescrite.

Bibliographie

1. Hymes, K.B.; J.B. Greene; A. Marcus; e. al., *Kaposi's sarcoma in homosexual men: A report of eight cases*. Lancet, 1981. **2**: p. 598-600.
2. Gottlieb, M.S.; R. Schroff; H.M. Schanker; e. al., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. The New England Journal of Medicine, 1981. **305**: p. 1425-1431.
3. Altman, L.K., *Rare cancer seen in 41 Homosexuals*, in *The New York Times*. 1981
4. Brennan, R.O.; D.T. Durack, *Gay Compromise syndrome*. Lancet, 1981. **2**(1338-1339).
5. Altman, L.K., *New Homosexual Disorder Worries Officials*, in *the New York Times*. 1982
6. Masur, H.; M.A. Michelis; J.B. Greene; I. Onorato; R.A. Stouwe; R.S. Holzman; G. Wormser; L. Brettman; M. Lange; H.W. Murray; S. Cunningham-Rundles, *An Outbreak of community acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction*. The New England Journal Of Medicine, 1981. **305**(24): p. 1431-1438.
7. Barré-Sinoussi, F.; J.C. Chermann; F. Rey; M.T. Nugeyre; S. Chamaret; J. Gruest; C. Dauguet; C. Axler-Blin; F. Brun-Vezinet; C. Rozioux; W. Rozenbaum; L. Montagnier, *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**: p. 869-871.
8. Gallo, R.C.; P.S. Sarin; E.P. Gelmann; M. Robert-Guroff; E. Richardson; V.S. Kalyanaraman; D. Mann; G.D. Sidhu; R.E. Stahl; S. Zolla-Pazner; J. Leibowitch; M. Popovic, *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**: p. 865-867.
9. Van de Perre, P.; R. D.; P. Lepage; e. al., *Acquired Immune Deficiency Syndrome in Rwanda*. Lancet, 1984. **2**: p. 62-65.
10. Pear, R., *AIDS Blood Test to be Available in 2 to 6 Weeks*, in *the New-York Times*. 1985
11. Le Solleu, B., 1985 : *Cette année là*, France-Ouest.<http://www.france-ouest.com/sang-contamine/annee.htm>
12. Mitsuya, H.; K.J. Weinhold; P.A. Furman; M. St Clair; S. Nusinoff-Lehrman; R.C. Gallo; D. Bolognesi; D.W. Barry; S. Broder, *3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U) : An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1985. **82**: p. 7096-7100.
13. Holodniy, M.; V. Miller, *Human immunodeficiency virus*, in *Practical guidelines in antiviral therapy*, C.A.B.B.G.J. Galasso, Editor. 2002, Elsevier Science. p. 95-125.
14. *Le point sur l'épidémie de SIDA*. 2003, UNAIDS.<http://www.unaids.org>
15. Rübsamen-Waigmann, H., *The retrovirus family and the human immunodeficiency virus : molecular targets for therapy and existing drugs*, in *Antivirals against AIDS*, R.E.U.J.K.H. Rübsamen-Waigmann, Editor. 2000, Marcel Dekker, Inc: New York - Basel. p. 1-32.
16. Poiesz, B.J.; F.W. Ruscetti; A.F. Gazdar; P.A. Bunn; J.D. Minna; R.C. Gallo, *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1980. **77**(12): p. 7415-7419.
17. Yoshida, M.; I. Myoshi; Y. Hinuma, *Isolation and characterization of retrovirus (ATLV) from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1982. **79**: p. 2031-2035.
18. Clavel, F.D.; D. Guetard; F. Brun-Vezinet; S. Chamaret; F. Rey; M.O. Santos-Ferreira; A.G. Laurent; C. Danguet; C. Katlama; C. Rosieux, *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 1986. **233**: p. 343-346.
19. Leonard, R.; D. Zagury; I. Desportes; J. Bernard; e. al, *Cytopathic effect of human immunodeficiency virus in T4 cells is linked to the last stage of virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1988. **85**(10): p. 3570-3574.

20. Alimonti, J.B.; T.B. Ball; K.R. Fowke, *Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS*. Journal of general Virology, 2003. **84**: p. 1649-1661.
21. Sodroski, J.; W.C. Goh; C. Rosen; K. Campbell; W. Haseltine, *Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity*. Nature, 1986. **322**: p. 470-474.
22. Fauci, A.S.; R.C. Desrosiers, *Pathogenesis of HIV and SIV*. Retroviruses, 1997: p. 587-635.
23. Ratner, R., *HIV life cycle and genetic approaches*. Perspective in drug discovery and design, 1993. **1**: p. 3-22.
24. Franke, E.K.; H.E. Yuan; J. Luban, *Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions*. Nature., 1994. **372**(6504): p. 359-62.
25. Bryant, M.; L. Ratner, *Myristoylation-dependant replication and assembly of human immunodeficiency virus 1*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1990. **87**: p. 523-527.
26. Roques, B.P.; N. Morellet; H. de Rocquigny; H. Démémé; W. Schueler; N. Jullian, *Structure, biological functions and inhibition of the HIV-1 proteins Vpr and NCp7*. Biochimie, 1997. **79**(673-680).
27. Lapadat-Tapolsky, M.; H. de Rocquigny; D. Van Gent; e. al, *Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle*. Nucleic Acids Res., 1993. **21**: p. 831-839.
28. Paxton, W.; R.I. Connor; N.R. Landau, *Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: Requirement for the p6 region of gag and mutational analysis*. J. Virol., 1993(67): p. 7229-7237.
29. Garnier, L.; L.J. Parent; B. Rovinski; S.X. Cao; J.W. Wills, *Identification of retroviral late domains as determinants of particle size*. J Virol., 1999. **73**(3): p. 2309-20.
30. Jacks, T.; M.D. Power; F.R. Masiarz; e. al, *Characterization of a ribosomal frameshifting in HIV-1 Gag-Pol expression*. Nature, 1988. **331**: p. 280-283.
31. Parkin, N.T.; M. Chamorro; H.E. Varmus, *Human immunodeficiency virus type-1 gag-pol frameshifting is dependant on m-RNA secondary structure : Demonstration by expression in vivo*. J. Virol., 1992. **66**: p. 5147-5151.
32. Ashorn, P.; T.J. McQuade; S. Thaisrivongs; e. al., *An inhibitor of the protease blocks maturation of human and simian immunodeficiency viruses and spread of infection*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1990. **87**: p. 7472-7476.
33. Miller, M.; M. Jaskolski; J.K. Rao; e. al., *Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family*. Nature, 1989. **337**: p. 576-579.
34. Navia, M.A.; P.M. Fitzgerald; B.M. McKeever; e. al., *Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1*. Nature, 1989. **337**: p. 615-620.
35. Wiskerchen, M.; M.A. Muesing, *Human immunodeficiency virus type 1 integrase : Effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells*. J. Virol., 1995. **69**: p. 376-386.
36. Le Grice, S.F.J., *Human immunodeficiency virus reverse transcriptase*, in *Reverse Transcriptase*, A.M.S.S.P.G. eds, Editor. 1993, Cold Spring Harbor laboratory press: Cold Spring Harbor, NY. p. 163-191.
37. Basu, A.; S. Basu; M.J. Modak, *Structure-activity analyses of HIV-1 Reverse transcriptase*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992. **183**(3): p. 1131-1138.
38. Rodgers, D.W.; S.J. Gamblin; B.A. Harris; S. Ray; J.S. Culp; J.S. Hellmig; D.J. Woolf; C. Debouck; S.C. Harrison, *The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1995. **92**(1222-1226).
39. Jacobo-Molina, A.; J. Ding; R.G. Nanni; A.D. Clark; X. Lu; C. Tantillo; R.L. Williams; G. Kamer; A.L. Ferris; P. Clark; A. Hizi; S.H. Hughes; E. Arnold, *Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0Å resolution shows bent DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1993. **90**: p. 6320-6324.

40. Kohlstaedt, L.A.; J. Wang; J.M. Friedman; A.P. Rice; T.A. Steitz, *Crystal Structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor*. Science, 1992. **256**: p. 1783-1790.
41. Huang, H.; R. Chopra; G.L. Verdine; S.C. Harrison, *Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase : implications for drug resistance*. Science, 1998. **282**: p. 1669-1675.
42. Debyser, Z.; R. Pauwels; K. Andries; J. Desmyter; M.J. Kukla; P.A.J. Janssen; E. De Clercq, *An antiviral target on reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 revealed by tetrahydroimidazo-[4,5,1-j,k][1,4]benzodiazepin-2(1H)-one and -thione derivatives*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1991. **88**(1451-1455).
43. Ren, J.; R. Esnouf; E. Garman; D. Somers; C. Ross; I. Kirby; J. Keeling; G. Darby; Y. Jones; D. Stuart, *High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes*. Nature Structural Biology, 1995. **2**(4): p. 293-302.
44. Roberts, J.D.; K. Bebenek; T.A. Kunkel, *The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1*. Science, 1988. **242**: p. 1171-1173.
45. Capon, D.J.; R.H. Ward, *The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis*. Annu Rev Immunol., 1991. **9**: p. 649-678.
46. Landau, N.R.; M. Warton; D.R. Littman, *The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4*. Nature, 1988. **334**: p. 159-153.
47. Kwong, P.D.; R. Wyatt; J. Robinson; R.W. Sweet; J. Sodroski; W.A. Hendrickson, *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. Nature., 1998. **393**(6686): p. 648-59.
48. Feinberg, M.B.; D. Baltimore; A.D. Frankel, *The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1991. **88**: p. 4045-4049.
49. Malim, M.H.; B.R. Cullen, *Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes*. Mol Cell Biol., 1993. **13**(10): p. 6180-9.
50. Stopak, K.; C.M. de Noronha; W. Yonemoto; W.C. Greene, *HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability*. Molecular Cell, 2003. **12**: p. 591-601.
51. Schubert, U.; S.P. Bour; A.V. Ferrer-Montiel; e. al, *The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains*. J. Virol., 1996. **70**: p. 809-819.
52. Emerman, M., *Vpr and the cell cycle*. Curr. Biol., 1996. **6**: p. 1096-1103.
53. Ugolini, S.; I. Mondor; Q.J. Sattentau, *HIV-1 attachment: another look*. Trends in microbiology, 1999. **7**(4): p. 144-9.
54. Mondor, I.; S. Ugolini; Q.J. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans*. Journal of Virology, 1998. **72**(5): p. 3623-34..
55. Klatzmann, D.; E. Champagne; S. Chamaret; J. Gruest; D. Guetard; T. Hercend; J.C. Gluckman; L. Montagnier, *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. Nature, 1984. **312**: p. 767-768.
56. Kowalski, M.; J. Potz; L. Basiripour; T. Dorfman; W.C. Goh; E. Terwilliger; A. Dayton; C. Rosen; W. Haseltine; J. Sodroski, *Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1*. Science, 1987. **237**(4820): p. 1351-1355.
57. Hussey, R.E.; N.E. Richardson; M. Kowalski; N.R. Brown; H.-C. Chang; R.F. Siliciano; T. Dorfman; B.D. Walker; J. Sodroski; E.L. Reinherz, *A soluble CD4 protein selectively inhibits HIV replication and syncytium formation*. Nature, 1988. **331**: p. 78-81.

58. Deen, K.C.; J.C. McDougal; R. Inacker; G. Folena-Wasserman; J. Arthos; J. Rosenberg; P.J. Maddon; A. R.; R.W. Sweet, *Soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection*. Nature, 1988. **331**: p. 82-63.
59. Doms, R.W.; D. Trono, *The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield*. Genes Dev., 2000. **14**(21): p. 2677-88.
60. Scarlatti, G.; E. Tresoldi; A. Bjorndal; R. Fredriksson; C. Colognesi; H.K. Deng; M.S. Malnati; A. Plebani; A.G. Siccardi; D.R. Littman; E.M. Fenyo; P. Lusso, *In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression*. Nat Med., 1997. **3**(11): p. 1259-65.
61. Martinson, J.J.; N.H. Chapman; D.C. Rees; Y.T. Liu; J.B. Clegg, *Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion*. Nat Genet., 1997. **16**(1): p. 100-3.
62. Liu, R.; W.A. Paxton; S. Choe; D. Ceradini; S.R. Martin; R. Horuk; M.E. MacDonald; H. Stuhlmann; R.A. Koup; N.R. Landau, *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection*. Cell., 1996. **86**(3): p. 367-77.
63. Chan, D.C.; P.S. Kim, *HIV entry and its inhibition*. Cell., 1998. **93**(5): p. 681-4.
64. Ventura, M.; L. Tarrago-Litvak; V. Dolle; C.H. Nguyen; M. Legraverend; H.J.A. Fleury; S. Litvak, *Effect of nucleoside analogs and non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase on cell-free virions*. Archives of Virology, 1999. **144**(3): p. 513-523.
65. Karageorgos, L.; P. Li; C. Burrell, *Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection*. AIDS Res Hum Retroviruses., 1993. **9**(9): p. 817-23.
66. Wu, X.; H. Liu; H. Xiao; J.A. Conway; E. Hehl; G.V. Klapana; V. Prasad; J.C. Kappes, *Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex*. Journal of Virology, 1999. **73**(3): p. 2126-2135.
67. Bukrinskaya, A.; B. Brichacek; A. Mann; M. Stevenson, *Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton*. J Exp Med., 1998. **188**(11): p. 2113-25.
68. Harris, R.S.; K.N. Bishop; A.M. Sheehy; H.M. Craig; S.K. Petersen-Mahrt; I.N. Watt; M.S. Neuberger; M.H. Malim, *DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection*. Cell., 2003. **113**: p. 803-809.
69. Lecossier, D.; F. Bouchonnet; C. F.; A.J. Hance, *Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein*. Science, 2003. **300**: p. 112.
70. Miller, M.D.; C.M. Farnet; F.D. Bushman, *Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition*. J Virol., 1997. **71**(7): p. 5382-90.
71. McDonald, D.; M.A. Vodicka; G. Lucero; T.M. Svitkina; G.G. Borisy; M. Emerman; T.J. Hope, *Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells*. J Cell Biol., 2002. **159**(3): p. 441-52.
72. Weinberg, J.B.; T.J. Matthews; B.R. Cullen; M.H. Malim, *Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes*. J Exp Med., 1991. **174**(6): p. 1477-82.
73. Imren, S.; P. E.; K.A. Westerman; R. Pawliuk; M.E. Fabry; C.J. Eaves; B. Cavilla; L.D. Wadsworth; Y. Beuzard; E.E. Bouhassira; R. Russel; I.M. London; R.L. Nagel; P. Leblouch; R.K. Humphries, *Permanent and panerythroid correction of murine β thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2002. **99**(22): p. 14380-14385.
74. Poeschla, E.; P. Corbeau; F. Wong-Staal, *Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1996. **93**: p. 11395-11399.
75. Pemberton, L.F.; G. Blobel; J.S. Rosenblum, *Transport routes through the nuclear pore complex*. Curr Opin Cell Biol., 1998. **10**(3): p. 392-9.

76. Gallay, P.; T. Hope; D. Chin; D. Trono, *HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway*. Proc Natl Acad Sci USA., 1997. **94**(18): p. 9825-30.
77. Bukrinsky, M.I.; S. Haggerty; M.P. Dempsey; N. Sharova; A. Adzhubel; L. Spitz; P. Lewis; D. Goldfarb; M. Emerman; M. Stevenson, *A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells*. Nature., 1993. **365**(6447): p. 666-9.
78. Heinzinger, N.K.; M.I. Bukinsky; S.A. Haggerty; A.M. Ragland; V. Kewalramani; M.A. Lee; H.E. Gendelman; L. Ratner; M. Stevenson; M. Emerman, *The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells*. Proc Natl Acad Sci USA., 1994. **91**(15): p. 7311-5.
79. Zennou, V.; C. Petit; D. Guetard; U. Nerhbass; L. Montagnier; P. Charneau, *HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap*. Cell., 2000. **101**(2): p. 173-85.
80. Carteau, S.; C. Hoffman; F. Bushman, *Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration : centromeric alphoid repeats are a disfavored target*. J. Virol., 1998. **72**: p. 4005-4014.
81. Stevens, S.W.; J.D. Griffith, *Sequence analysis of the human DNA flanking sites of human immunodeficiency virus type 1 integration*. J. Virol., 1996. **70**: p. 6459-6462.
82. Bushman, F.D.; R. Craigie, *Activities of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Integration Protein In vitro: Specific Cleavage and Integration of HIV DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(4): p. 1339-1343.
83. Adams, M.; L. Sharmeen; J. Kimpton; J.M. Romeo; J.V. Garcia; B.M. Peterlin; M. Groudine; M. Emerman, *Cellular latency in human immunodeficiency virus-infected individuals with high CD4 levels can be detected by the presence of promoter-proximal transcripts*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1994. **91**(9): p. 3862-6.
84. Jordan, A.; P. Defechereux; E. Verdin, *The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation*. Embo J., 2001. **20**(7): p. 1726-38.
85. Jones, K.A.; B.M. Peterlin, *Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter*. Annu Rev Biochem., 1994. **63**: p. 717-43.
86. Kao, S.Y.; A.F. Calman; P.A. Luciw; B.M. Peterlin, *Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product*. Nature., 1987. **330**(6147): p. 489-93.
87. Wei, P.; M.E. Garber; S.M. Fang; W.H. Fischer; K.A. Jones, *A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity; loop-specific binding to TAR RNA*. Cell., 1998. **92**(4): p. 451-62.
88. Price, D.H., *P-TEFb; a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol., 2000. **20**(8): p. 2629-34.
89. Saltarelli, M.J.; E. Hadziyannis; C.E. Hart; J.V. Harrison; B.K. Felber; T.J. Spira; G.N. Pavlakis, *Analysis of human immunodeficiency virus type 1 mRNA splicing patterns during disease progression in peripheral blood mononuclear cells from infected individuals*. AIDS Res Hum Retroviruses., 1996. **12**(15): p. 1443-56.
90. Cullen, B.R., *Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways*. Virology., 1998. **249**(2): p. 203-10.
91. Glushakova, S.; J. Munch; S. Carl; T.C. Greenough; J.L. Sullivan; L. Margolis; F. Kirchhoff, *CD4 down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef correlates with the efficiency of viral replication and with CD4(+) T-cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo*. J Virol., 2001. **75**(21): p. 10113-7.
92. Geyer, M.; O.T. Fackler; B.M. Peterlin, *Structure--function relationships in HIV-1 Nef*. EMBO Rep., 2001. **2**(7): p. 580-5.

93. Xu, X.N.; B. Laffert; G.R. Screaton; M. Kraft; D. Wolf; W. Kolanus; J. Mongkolsapay; A.J. McMichael; A.S. Baur, *Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain*. J Exp Med., 1999. **189**(9): p. 1489-96.
94. Collins, K.L.; B.K. Chen; S.A. Kalams; B.D. Walker; D. Baltimore, *HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes*. Nature., 1998. **391**(6665): p. 397-401.
95. Geleziunas, R.; W. Xu; K. Takeda; H. Ichijo; W.C. Greene, *HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell*. Nature., 2001. **410**(6830): p. 834-8.
96. Greenway, A.L.; D.A. McPhee; K. Allen; R. Johnstone; G. Holloway; J. Mills; A. Azad; S. Sankovich; P. Lambert, *Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis*. J Virol., 2002. **76**(6): p. 2692-702.
97. Jowett, J.B.; V. Planelles; B. Poon; N.P. Shah; M.L. Chen; I.S. Chen, *The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle*. J Virol., 1995. **69**(10): p. 6304-13.
98. Goh, W.C.; M.E. Rogel; C.M. Kinsey; S.F. Michael; P.N. Fultz; M.A. Nowak; B.H. Hahn; M. Emerman, *HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo*. Nat Med., 1998. **4**(1): p. 65-71.
99. Wilk, T.; I. Gross; B.E. Gowen; T. Rutten; F. de Haas; R. Welker; H.G. Krausslich; P. Boulanger; S.D. Fuller, *Organization of immature human immunodeficiency virus type 1*. J Virol., 2001. **75**(2): p. 759-71.
100. Zimmerman, C.; K.C. Klein; P.K. Kiser; A.R. Singh; B.L. Firestein; S.C. Riba; J.R. Lingappa, *Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids*. Nature., 2002. **415**(6867): p. 88-92.
101. Garrus, J.E.; U.K. von Schwedler; O.W. Pornillos; S.G. Morham; K.H. Zavitz; H.E. Wang; D.A. Wettstein; K.M. Stray; M. Cote; R.L. Rich; D.G. Myszka; W.I. Sundquist, *Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding*. Cell., 2001. **107**(1): p. 55-65.
102. VerPlank, L.; F. Bouamr; T.J. LaGrassa; B. Agresta; A. Kikonyogo; J. Leis; C.A. Carter, *Tsg101; a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes; binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag)*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2001. **98**(14): p. 7724-9.
103. Katzmann, D.J.; M. Babst; S.D. Emr, *Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex; ESCRT-I*. Cell., 2001. **106**(2): p. 145-55.
104. Louis, J.M.; N.T. Nashed; K.D. Parris; A.R. Kimmel; D.M. Jerina, *Kinetics and mechanism of autoprocessing of human immunodeficiency virus type 1 protease from an analog of the Gag-Pol polyprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1994. **91**: p. 7970-7974.
105. Krausslich, H.G., *Human immunodeficiency proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1991. **88**: p. 3213-3217.
106. McMichael, A.; T. Hanke, *HIV vaccines 1983-2003*. Nature Medicine, 2003. **9**(7): p. 874-880.
107. Blankson, J.N.; D. Persaud; R.F. Silciano, *The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection*. Annu Rev Med., 2002. **53**: p. 557-593.
108. McMichael, A., *T-cell responses and viral escape*. Cell., 1998. **93**: p. 673-676.
109. Barouch, D.H.; e. al, *Control of viremia and prevention of AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination*. Science, 2000. **290**: p. 486-492.
110. Klein, M., *Pospects and challenges for prophylactic and therapeutic HIV vaccines*. Vaccine, 2003. **21**: p. 616-619.
111. Mulligan, M.J.; J. Weber, *Human trials of HIV-1 vaccines*. AIDS, 1999. **13**(Suppl A): p. S105-S112.

112. Moore, J.P.; P.W. Parren; D.R. Burton, *Genetic subtypes, humoral immunity and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development*. Journal of Virology, 2001. **75**: p. 5721-5729.
113. Burton, D.R.; P.W. Parren, *Vaccines and the induction of functional antibodies : Time to look beyond the molecules of natural infection?* Nature Medicine, 2000. **6**: p. 123-125.
114. Wyatt, R.; e. al, *The antigenic structure of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein*. Nature, 1998. **393**: p. 705-711.
115. Osterhaus, A.D.; e. al, *Vaccination with Rev and Tat against AIDS*. Vaccine, 1999. **17**: p. 2713-2714.
116. Ensoli, B.; A. Cafaro, *HIV-Tat vaccines*. Virus Res., 2002. **82**: p. 91-101.
117. Gahery-Ségard, H.; e. al, *Multiepitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type A lipopeptide vaccine*. J. Virol., 2000. **74**: p. 1694-1703.
118. Shiver, J.W.; e. al, *Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity*. Nature, 2002. **415**: p. 331-335.
119. Barouch, D.H.; J. Kunstman; M.J. Kuroda; J.E. Schmitz; S. Santra; F.W. Peyerl; G.R. Krivulski; e. al, *Eventual AIDS Vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes*. Nature, 2002. **415**: p. 335-339.
120. Cao, H.; e. al, *Immunogenicity of a recombinant human immunodeficiency virus (HIV)-canarypox vaccine in HIV-seronegative Ugandan volunteers : results of the HIV Network for Prevention Trials 007 Vaccine study*. Journal of infectious diseases, 2003. **187**: p. 887-895.
121. De Clercq, E., *New developments in anti-HIV chemotherapy*. Biochimica et Biophysica Acta, 2002. **1587**(2-3): p. 258-275.
122. Gallaher, W.R.; J.M. Ball; R.F. Garry; A.M. Martin-Amedee; R.C. Montelaro, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1995. **11**: p. 191-202.
123. Moulard, M.; H. Lortat-Jacob; I. Mondor; G. Roca; R. Wyatt; J. Sodroski; L. Zhao; W. Olson; P.D. Kwong; Q.J. Sattentau, *J. Virol.*, 2000. **74**: p. 1948-1960.
124. Santhosh, K.C.; G.C. Paul; E. De Clercq; C. Pannecoque; M. Witvrouw; T.L. Loftus; J.A. Turpin; R.W. Buckheit; M. Cushman, *J. Med. Chem.*, 2001. **44**: p. 703-714.
125. Lüscher-Mattli, M., *Antiviral Chem. Chemother.*, 2000. **11**: p. 249-259.
126. Klasse, P.J.; J.P. Moore, *Quantitative model of antibody- and soluble CD4-mediated neutralization of primary isolates and T-cell line-adapted strains of human immunodeficiency virus type 1*. Journal of Virology, 1996. **70**: p. 3668.
127. Esté, J.A., *Virus entry as a target for anti-HIV infection*. Current Medicinal Chemistry, 2003. **10**: p. 1617-1632.
128. Baba, M.; O. Nishimura; N. Kanzaki; M. Okamoto; H. Sawada; Y. Iizawa; M. Shiraishi; Y. Aramaki; K. Okonogi; Y. Ogawa; K. Meguro; M. Fujino, *A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1999. **96**(10): p. 5698-703.
129. Shiraishi, M.; Y. Aramaki; M. Seto; H. Imoto; Y. Nishikawa; N. Kanzaki; M. Okamoto; H. Sawada; O. Nishimura; M. Baba; M. Fujino, *Discovery of novel, potent, and selective small-molecule CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents: synthesis and biological evaluation of anilide derivatives with a quaternary ammonium moiety*. Journal of Medicinal Chemistry, 2000. **43**(10): p. 2049-63.
130. Dragic, T.; A. Trkola; D.A. Thompson; E.G. Cormier; F.A. Kajumo; E. Maxwell; S.W. Lin; W. Ying; S.O. Smith; T.P. Sakmar; J.P. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000. **97**: p. 5639-5644.
131. Bridger, G.J.; R.T. Skerlj; S. Padmanabhan; S.A. Martellucci; G.W. Henson; S. Struyf; M. Witvrouw; D. Schols; E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, 1999. **42**: p. 3971-3981.
132. Schols, D.; S. Struyf; J. Van Damme; J.A. Esté; G. Henson; E. De Clercq, *J. Exp. Med.*, 1997. **186**: p. 1383-1388.

133. De Clercq, E.; N. Yamamoto; R. Pauwels; J. Balzarini; M. Witvrouw; K. De Vreese; Z. Debyser; B. Rosenwirth; P. Peichl; R. Datema; D. Thornton; R. Skerlj; F. Gaul; S. Padmanabhan; G. Bridger; G. Henson; M. Abrams, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994. **38**: p. 668-674.
134. Wild, C.T.; D.C. Shugars; T.K. Greenwell; C.B. McDanal; T.J. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994. **91**: p. 9770-9774.
135. Kilby, J.M.; S. Hopkins; T.M. Venetta; B. DiMassimo; G.A. Cloud; J.Y. Lee; L. Alldredge; E. Hunter; D. Lambert; D. Bolognesi; T. Matthews; M.R. Johnson; M.A. Nowak; G.M. Shaw; M.S. Saag, *Nat. Med.*, 1998. **4**: p. 1302-1307.
136. Witvrouw, M.; J. Balzarini; C. Pannecouque; S. Jhaumeer-Laulloo; J.A. Esté; D. Schols; P. Cherepanov; J.C. Schmit; Z. Debyser; A.M. Vandamme; J. Desmyter; S.R. Ramadas; E. De Clercq, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997. **41**: p. 262-268.
137. Druillenec, S.; B.P. Roques, *HIV-1 NCp7 as a target for the design of novel antiviral agents*. *Drug News Perspect.*, 2000. **13**(6): p. 337-349.
138. Rice, W.G.; J.A. Turpin; M. Huang; D. Clanton; R.W. Buckheit; D.G. Covell; A. Wallqvist; N.B. McDonnell; R.N. DeGuzman; M.F. Summers; L. Zalkow; J.P. Bader; R.D. Haugwitz; E.A. Sausville, *Nat. Med.*, 1997. **3**: p. 341-345.
139. Turpin, J.A.; C.A. Schaeffer; S.J. Terpening; L. Graham; M. Bu; W.G. Rice, *Antiviral Chem. Chemother.*, 1997. **8**: p. 60-69.
140. Huang, M.; A. Maynard; J.A. Turpin; L. Graham; G.M. Janini; D.G. Covell; W.G. Rice, *J. Med. Chem.*, 1998. **41**: p. 1371-1381.
141. Goebel, F.D.; R. Hemmer; J.C. Schmit; J.R. Bogner; E. De Clercq; M. Witvrouw; C. Pannecouque; R. Valeyev; M. Vandeveld; H. Margery; J.P. Tassignon, *Aids*, 2001. **15**: p. 33-45.
142. Mitsuya, H.; S. Broder, *Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus (HTLV III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1986. **83**: p. 1911-1915.
143. Furman, P.A.; J.A. Fyfe; M. St Clair; K.J. Weinhold; J.L. Rideout; G.A. Freeman; S. Nusinoff-Lehrman; D. Bolognesi; S. Broder; H. Mitsuya; D.W. Barry, *Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5' triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1986. **83**: p. 8333-8337.
144. De Clercq, E., *Toward Improved Anti-HIV Chemotherapy: Therapeutic Strategies for Intervention with HIV Infections*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1995. **38**(14): p. 2491-517.
145. Parniak, M.; N. Sluis-Cremer, *Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase*, in *HIV-1 : Molecular biology and pathogenesis*. 2000, Academic Press. p. 67-109.
146. Miyasaka, T.; H. Tanaka; M. Baba; H. Hayakawa; R.T. Walker; J. Balzarini; E. De Clercq, *A new lead fr specific anti-HIV-1 agents : 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1989. **32**: p. 2507-2509.
147. Pauwels, R.; K. Andries; J. Desmyter; D. Schols; M.J. Kukla; H.J. Breslin; A. Raeymaekers; J. Van Gelder; R. Woestenborghs; J. Heykants; K. Schellekens; M.A. Janssen; E. De Clercq; P.A.J. Janssen, *Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives*. *Nature*, 1990. **343**: p. 470-474.
148. Merluzzi, V.J.; K.D. Hargrave; M. Labadia; K. Grozinger; M.T. Skoog; J.C. Wu; C.K. Shih; K. Eckner; S. Hattox; J. Adams; A.S. Rosenthal; R. Faanes; R.J. Eckner; R.A. Koup; J.L. Sullivan, *Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor*. *Science*, 1990. **250**: p. 1411-1413.
149. Goldman, M.E.; J.H. Nunberg; J.A. O'Brien; J.C. Quintero; W.A. Schleif; K.F. Freund; S.L. Gaul; W.S. Saari; J.S. Wai; et al., *Pyridinone derivatives: specific human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitors with antiviral activity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991. **88**(15): p. 6863-7.

150. Romero, D.L.; M. Busso; C.K. Tan; F. Reusser; J.R. Palmer; S.M. Poppe; P.A. Aristoff; K.M. Downey; A.G. So; L. Resnick; W.G. Tarpley, *Nonnucleoside inhibitors that potently and specifically block human immunodeficiency virus type 1 replication*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1991. **88**: p. 8806-8810.
151. Schäfer, W.; W.-G. Friebe; H. Leinert; A. Mertens; T. Poll; W. von der Saal; H. Zilch; B. Nuber; M.L. Ziegler, *Non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase : Molecular modeling and X-Ray structure investigations*. Journal of Medicinal Chemistry, 1993. **36**(726-732).
152. Ren, J.; R.M. Esnouf; A.L. Hopkins; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Crystallographic analysis of the binding modes of thiazoloisindolinone non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase and comparison with modeling studies*. J. Med. Chem., 1999. **42**(19): p. 3845-51.
153. Bader, J.P.; J.B. Mc Mahon; R.J. Schultz; V.L. Narayanan; J.B. Pierce; O.S. Weislow; M.C. F.; S.F. Stinson; M.R. Boyd, *Oxathiin carboxanilide, a potent inhibitor of human immunodeficiency virus reproduction*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1991. **88**: p. 6740-6744.
154. De Clercq, E., Antiviral Res., 1998. **38**: p. 153-179.
155. Esnouf, R.M.; J. Ren; A.L. Hopkins; C.K. Ross; E.Y. Jones; D.K. Stammers; D.I. Stuart, *Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1997. **94**(8): p. 3984-9.
156. Ren, J.; J. Milton; K.L. Weaver; S.A. Short; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Structural Basis for the Resilience of Efavirenz (DMP-266) to Drug Resistance Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase*. Structure (London), 2000. **8**(10): p. 1089-1094.
157. Andries, K.; M.-P. de Béthune; M.J. Kukla; H. Azijn; P. Lewis; P.A.J. Janssen. in *Abstracts of the 40th interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000. Toronto, Canada.
158. Ren, J.; C. Nichols; L.E. Bird; T. Fujiwara; H. Sugimoto; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Binding of the second generation non-nucleoside inhibitor S-1153 to HIV-1 reverse transcriptase involves extensive main chain hydrogen bonding*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(19): p. 14316-20.
159. Creagh, T.; J.L. Ruckle; D.T. Tolbert; J. Giltner; D.A. Eiznhamer; B. Dutta; M.T. Flavin; Z.Q. Xu, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001. **45**: p. 1379-1386.
160. Hopkins, A.L.; J. Ren; R.M. Esnouf; B.E. Willcox; E.Y. Jones; C. Ross; T. Miyasaka; R.T. Walker; H. Tanaka; D.K. Stammers; D.I. Stuart, *Complexes of HIV-1 reverse transcriptase with inhibitors of the HEPT series reveal conformational changes relevant to the design of potent non-nucleoside inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 1996. **39**(8): p. 1589-600.
161. Saari, W.S.; J.M. Hoffman; J.S. Wai; T.E. Fisher; C.S. Rooney; A.M. Smith; C.M. Thomas; M.E. Goldman; J.A. O'Brien; et al., *2-Pyridinone derivatives: a new class of nonnucleoside, HIV-1-specific reverse transcriptase inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 1991. **34**(9): p. 2922-5.
162. Borkow, G.; J. Barnard; T.W. Nguyen; B. A.; M.A. Wainberg; M.A. Parniak, *Chemical barriers to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection : Retroviral activity of UC781, a thiocarboxanilide nonnucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase*. Journal of Virology, 1997. **71**(4): p. 3023-3030.
163. Hsiou, Y.; K. Das; J. Ding; A.D. Clark; J.-P. Kleim; M. Rösner; I. Winkler; G. Riess; S.H. Hughes; E. Arnold, *Structures of Tyr188Leu mutant and wild type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBY-097 : Inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance*. J. Mol. Biol., 1998. **284**(313-323).
164. Pauwels, R.; K. Andries; Z. Debyser; P. Van Daele; D. Schols; P. Stoffels; K. De Vreese; R. Woestenborghs; A.M. Vandamme; C.G.M. Janssen; J. Anne; G. Cauwenbergh; J. Desmyter; J. Heykants; M.A. Janssen; E. De Clercq; P.A.J. Janssen, *Potent and highly selective human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) inhibition by a series of α -anilinophenylacetamide derivatives targetted at HIV-1 reverse transcriptase*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1993. **90**(1711-1715).

165. Wu, J.C.; T.C. Warren; J. Adams; e. al, *A novel dipyridodiazepinone inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase acts through a nonsubstrate binding site*. *Biochemistry*, 1991. **30**: p. 2022-2026.
166. Cohen, K.A.; J. Hopkins; R.H. Ingraham; e. al, *Characterization of the binding site for nevirapine (BI-RG-587), a nonnucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**: p. 14670-14674.
167. Condra, J.H.; E.A. Emini; L. Gotlib; D.J. Graham; A.J. Schlabach; J.A. Wolfgang; R.J. Colonna; V.V. Sardana, *Identification of the human immunodeficiency virus reverse transcriptase residues that contribute to the activity of diverse nonnucleoside inhibitors*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992. **36**(7): p. 1441-6.
168. Sardana, V.V.; E.A. Emini; L. Gotlib; D.J. Graham; D.W. Lineberger; W.J. Long; A.J. Schlabach; J.A. Wolfgang; J.H. Condra, *Functional analysis of HIV-1 reverse transcriptase amino acids involved in resistance to multiple nonnucleoside inhibitors*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**(25): p. 17526-30.
169. Ren, J.; R. Esnouf; A. Hopkins; C. Ross; Y. Jones; D. Stammers; D. Stuart, *The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with 9-chloro-TIBO: lessons for inhibitor design*. *STRUCTURE*, 1995. **3**(9): p. 915-26.
170. Esnouf, R.; J. Ren; C. Ross; Y. Jones; D. Stammers; D. Stuart, *Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors*. *NATURE STRUCTURAL BIOLOGY*, 1995. **2**(4): p. 303-8.
171. Temiz, N.A.; I. Bahar, *Inhibitor binding alters the directions of domain motions in HIV-1 reverse transcriptase*. *Proteins : Structure, Function and genetics*, 2002. **49**: p. 61-70.
172. Hsiou, Y.; J. Ding; K. Das; A.D. Clark; S.H. Hughes; E. Arnold, *Structure of unliganded reverse transcriptase at 2.7Å resolution : implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms*. *Structure*, 1996. **4**(7): p. 853-860.
173. Buckheit, R.W.; K. Watson; V. Fliakas-Boltz; J. Russel; T.L. Loftus; M.C. Osterling; J.A. Turpin; L.A. Pallansch; E.L. White; S.-H. Lee; J.-W. Oh; H.-S. Kwon; S.-G. Chung; E.-H. Cho, *SJ-3366, a unique and highly potent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that also inhibits HIV-2*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001. **45**(2): p. 393-400.
174. Ren, J.; J. Diprose; J. Warren; R.M. Esnouf; L.E. Bird; S. Ikemizu; M. Slater; J. Milton; J. Balzarini; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Phenylethylthiazolylthiourea (PETT) non-nucleoside inhibitors of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases. Structural and biochemical analyses*. *J. Biol. Chem.*, 2000. **275**(8): p. 5633-9.
175. Witvrouw, M.; C. Pannecouque; K. Van Laethem; J. Desmyter; E. De Clercq; A.M. Vandamme, *Activity of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV-2 and SIV*. *AIDS*, 1999. **13**: p. 1477-483.
176. Spence, A.R.; W.M. Kati; K.S. Anderson; K.A. Johnson, *Mechanism of inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase by Nonnucleoside inhibitors*. *Science*, 1995. **267**: p. 988-993.
177. Debyser, Z.; K. De Vreese; P.P. Knops-Gerrits; V. Baekelandt; R. Bhikhabhai; B. Strandberg; R. Pauwels; J. Anne; J. Desmyter; E. De Clercq, *Kinetics of different human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptases resistant to human immunodeficiency virus type 1-specific reverse transcriptase inhibitors*. *Molecular Pharmacology*, 1993. **43**(4): p. 521-6.
178. Maga, G.; D. Ubiali; R. Salvetti; M. Pregnotato; S. Spadari, *Selective interaction of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor Efavirenz and its thio-substituted analog with different enzyme-substrate-complexes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000. **44**(5): p. 1186-1194.
179. Fletcher, R.S.; K. Syed; S. Mithani; G.I. Dimitrienko; M.A. Parniak, *Carboxanilide derivative non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase interact with different mechanistic forms of the enzyme*. *Biochemistry*, 1995. **34**: p. 4036-4042.

180. Carroll, S.S.; D.B. Olsen; C.D. Bennett; L. Gotlib; D.J. Graham; J.H. Condra; A.M. Stern; J.A. Shafer; L.C. Kuo, *Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by pyridinone derivatives. Potency, binding characteristics, and effect of template sequence*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(1): p. 276-81.
181. Olsen, D.B.; S.S. Carroll; J.C. Culberson; J.A. Shafer; L.C. Kuo, *Effect of template secondary structure on the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by a pyridinone non-nucleoside inhibitor*. Nucleic Acids Res., 1994. **22**(8): p. 1437-43.
182. Bacheler, L.T., *Resistance to non-nucleoside inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase*. Drug Resistance Updates, 1999. **2**: p. 56-67.
183. Balzarini, J.; A. Karlsson; M.J. Perez-Perez; M.J. Camarasa; E. De Clercq, *Knocking-out concentrations of HIV-1-specific inhibitors completely suppress HIV-1 infection and prevent the emergence of drug-resistant virus*. Virology, 1993. **196**(2): p. 576-85.
184. King, R.W.; K.R. M.; C.D. Reid; S.K. Erickson-Viitanen, *Potency of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) used in combination with other human immunodeficiency virus NNRTIs, NRTIs or protease inhibitors*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002. **46**(6): p. 1640-1646.
185. Divita, G.; T. Restle; R.S. Goody; J.C. Chermann; J.G. Baillon, *Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimerization using synthetic peptides derived from the connexion domain*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**: p. 13080-13083.
186. Sluis-Cremer, N.; G.I. Dimitrienko; J. Balzarini; M.J. Camarasa; M.A. Parniak, *Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimer destabilization by 1-{spiro[4"-amino-2",2"-dioxo-1",2"-oxathiole-5"3'-[2',5'-bis-o-(tert-butylidimethylsilyl)- β -D-ribofuranosyl]]}-3-ethylhyamine*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 1427-1433.
187. Tachedjian, G.; M. Orlova; S.G. Sarafianos; E. Arnold; S.P. Goff, *Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors are chemical enhancers of dimerization of the HIV type 1 reverse transcriptase*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2001. **98**(13): p. 7188-7193.
188. Loya, S.; R. Tal; K. Y.; A. Hizi, *Illimaquinone, a selective inhibitor of the RNase H activity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1990. **34**: p. 2009-2012.
189. Hizi, A.; M. Shaharabany; S. Loya, *Catalytic properties of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses types 1 and 2*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**: p. 6230-6239.
190. Tan, C.K.; R. Civil; A.M. Mian; A.G. So; K.M. Downey, *Inhibition of the RNase H activity of HIV reverse transcriptase by azidothymidilate*. Biochemistry, 1991. **30**: p. 4831-4835.
191. Borkow, G.; R.S. Fletcher; J. Barnard; D. Arion; D. Motakis; G.I. Dimitrienko; M.A. Parniak, *Inhibition of the ribonuclease H and DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase by N-(4-t-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone*. Biochemistry, 1997. **36**(3179-3185).
192. Pommier, Y.; C. March; N. Neamati, Antiviral Res., 2000. **47**: p. 139-148.
193. Pluymers, W.; N. Neamati; C. Pannecouque; V. Fikkert; C. Marchand; T.R. Burke; Y. Pommier; D. Schols; E. De Clercq; Z. Debyser; M. Witvrouw, Mol. Pharmacol., 2000. **58**: p. 641-648.
194. Goldgur, Y.; R. Craigie; G.H. Cohen; T. Fujiwara; T. Yoshinaga; T. Fujishita; H. Sugimoto; T. Endo; H. Murai; D. D.R., *Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: A platform for antiviral drug design*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(23): p. 13040-13043.
195. Pais, G.C.G.; T.R. Burke, *Novel aryl diketo-containing inhibitors of HIV-1 integrase*. Drugs of the Future, 2002. **27**(11): p. 1101-1111.
196. Hazuda, D.J.; P. Felock; M. Witmer; e. al, *Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells*. Science, 2000. **287**: p. 646-650.

197. Fujishita, T.T., T; Sato, A; Yamauchi, H, *Aromatic heterocycle compounds having HIV integrase inhibiting activities (patent to Shionogi and Co Ltd, Japan)*. 2000
198. Grobler, J.A.; K. Stillmock; B. Hu; M. Witmer; P. Felock; A.S. Espeseth; A. Wolfe; M. Egbertson; M. Bourgeois; J. Melamed; J.S. Wai; S. Young; J. Vacca; D.J. Hazuda, *Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(10): p. 6661-6666.
199. Young, S.A., N; Wai, J; Fisher, T; Zhuang, L; Embrey, M; Egbertson, M; Payne, L; Melamed, J; Gabryelski, L; Emini, E; Hazuda, D; et al. *Discovery of a potent HIV Integrase Inhibitor with potential clinical activity*. in *14TH INT CONF AIDS*. 2002.
200. Pannecouque, C.; W. Pluymers; B. Van Maele; V. Tetz; P. Cherepanov; E. De Clercq; M. Witvrouw; Z. Debyser, *New Class of HIV Integrase Inhibitors that Block Viral Replication in Cell Culture*. Current Biology, 2002. **12**(14): p. 1169-1177.
201. Daelemans, D.; A.M. Vandamme; E. De Clercq, *Antiviral Chem. Chemother.*, 1999. **10**: p. 1-14.
202. Baba, M.; M. Okamoto; M. Kawamura; M. Makino; T. Higashida; T. Takashi; Y. Kimura; T. Ikeuchi; T. Tetsuka; T. Okamoto, *Mol. Pharmacol.*, 1998. **53**: p. 1097-1103.
203. Okamoto, H.; T.P. Cujec; M. Okamoto; B.M. Peterlin; M. Baba; T. Okamoto, *Virology*, 2000. **272**: p. 402-408.
204. Turpin, J.A.; R.W. Buckheit; D. Derse; M. Hollingshead; K. Williamson; C. Palamone; M.C. Osterling; S.A. Hill; L. Graham; C.A. Schaeffer; M. Bu; M. Huang; W.M. Cholody; C.J. Michejda; W.G. Rice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998. **42**: p. 487-494.
205. Chao, S.H.; K. Fujinaga; J.E. Marion; R. Taube; E.A. Sausville; A.M. Senderowicz; B.M. Peterlin; D.H. Price, *Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication*. J Biol Chem., 2000. **275**(37): p. 28345-8.
206. Flexner, C., *N. Engl. J. Med.*, 1998. **338**: p. 1281-1292.
207. Lebon, F.; M. Ledecq, *Approaches to the design of effective HIV-1 protease inhibitors*. Current Medicinal Chemistry, 2000. **7**(4): p. 455-477.
208. Abu-Ata, O.; J. Slim; G. Perez; S.M. Smith, *HIV Therapeutics : Past, present, and future.*, in *HIV-1 : Molecular biology and pathogenesis*. 2000, Academic Press. p. 1-40.
209. Hodge, C.N.; P.E. Aldrich; L.T. Bacheler; C.H. Chang; C.J. Eyermann; S. Garber; M. Grubb; D.A. Jackson; P.K. Jadhav; B. Korant; P.Y. Lam; M.B. Maurin; J.L. Meek; M.J. Otto; M.M. Rayner; C. Reid; T.R. Sharpe; L. Shum; D.L. Winslow; S. Erickson-Viitanen, *Chem. Biol.*, 1996. **3**: p. 301-314.
210. Lam, P.Y.; Y. Ru; P.K. Jadhav; P.E. Aldrich; G.V. DeLucca; C.J. Eyermann; C.H. Chang; G. Emmett; E.R. Holler; W.F. Daneker; L. Li; P.N. Confalone; R.J. McHugh; Q. Han; R. Li; J.A. Markwalder; S.P. Seitz; T.R. Sharpe; L.T. Bacheler; M.M. Rayner; R.M. Klabe; L. Shum; D.L. Winslow; D.M. Kornhauser; D.A. Jackson; S. Erickson-Viitanen; C.N. Hodge, *J. Med. Chem.*, 1996. **39**: p. 3514-3525.
211. Poppe, S.M.; D.E. Slade; K.T. Chong; R.R. Hinshaw; P.J. Pagano; M. Markowitz; D.D. Ho; H. Mo; R.R. Gorman; T.J. Dueweke; S. Thaisrivongs; W.G. Tarpley, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997. **41**: p. 1058-1063.
212. Rusconi, S.; S. La Seta Catamancio; P. Citterio; S. Kurtagic; M. Violin; C. Balotta; M. Moroni; M. Galli; A. d'Arminio-Monforte, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000. **44**: p. 1328-1332.
213. Moyle, G., *The emerging roles of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in antiretroviral therapy*. Drugs, 2001. **61**(1): p. 20-26.
214. Medilinks, *Falling price of antiretrovirals*. 2002.<http://www.medilinks.org/Features/Articles/nov2002/arv2002update.asp>
215. Shankar, S.; B. Hirschler, *Indian firm offers HIV drugs for \$1 a day*. 2002.<http://www.hivandhepatitis.com/recent/misc/020801a.html>

216. Schoofs, M.; M. Waldholtz, *Price war breaks out over AIDS drugs in Africa as generics present challenge*. 2001, The Wall Street Journal. <http://www.aegis.com/news/wsj/2001/WJ010306>
217. Bornstein, D., *SIDA : Frémissements pour une exception sanitaire africaine*, in *l'Humanité*. 2000. <http://humanite.presse.fr/journal/2000-01-18/2000-01-18-218458>
218. 't Hoen, E., *Produits pharmaceutiques. Brevets, prix et patients.*, in *Chronique ONU (édition en ligne)*. 2003. <http://www.un.org/french/pubs/chronique/2003/numero2/0203p13.html>
219. OMC, *Comprendre l'OMC : Les accords; Propriété intellectuelle : protection et respect des droits*. 2003, OMC. http://www.wto.org/french/thewto_f/whatis_f/tif_f/agrm7_f.html
220. OMC, *Conférence Ministérielle, Quatrième session; Déclaration sur l'accord sur les ADPIC et la santé publique*. 2001, OMC: Doha
221. OMC, *Propriété intellectuelle : Une décision permet de lever le dernier obstacle constitué par les brevets à l'importation de médicaments bon marché*. 2003, OMC. http://www.wto.org/french/news_f/pres03_f/pr350_f.htm
222. OMC, *Mise en oeuvre du paragraphe 6 de la déclaration de Doha sur l'accord sur les ADPIC et la santé publique*. 2003. http://www.wto.org/french/tratop_f/trips_f/implem_para6_f.htm
223. Wei, X.; S.K. Ghosh; M.E. Taylor; e. al., *Viral dynamics in human immunodeficiency virus type I infection*. *Nature*, 1995. **373**: p. 117-122.
224. Ho, D.D.; A.U. Neumann; A.S. Perelson; W. Chen; J.M. Leonard; M. Markowitz, *Rapid Turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection*. *Nature*, 1995. **373**: p. 123-126.
225. Perelson, A.S.; A.U. Neumann; M. Markowitz; J.M. Leonard; D.D. Ho, *HIV-1 Dynamics in vivo : virion clearance rate, infected cell life-span and viral generation time*. *Science*, 1996. **271**: p. 1582-1586.
226. Mansky, L.M.; H.M. Temin, *Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type I than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase*. *Journal of Virology*, 1995. **69**: p. 5087-5094.
227. Coffin, J.M., *HIV Populations dynamics in vitro : implications for genetic variation, pathogenesis and therapy*. *Science.*, 1995. **267**: p. 483-489.
228. Schmit, J.-C.; J. Cogniaux; P. Hermans; C. Van Vaeck; S. Sprecher; B. Van Remoortel; M. Witvrouw; J. Desmyter; E. De Clercq; A.M. Vandamme, *Multiple drug resistance to nucleoside analogues and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors in an efficiently replicating human immunodeficiency virus type 1 patient strain*. *Journal of infectious diseases*, 1996. **174**(962-968).
229. Pelemans, H.; R. Esnouf; E. De Clercq; J. Balzarini, *Mutational analysis of Trp-229 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) identifies this amino acid residue as a prime target for the rational design of new non-nucleoside RT inhibitors*. *Molecular Pharmacology*, 2000. **57**: p. 954-960.
230. Pelemans, H.; R. Esnouf; H. Jonckheere; E. De Clercq; J. Balzarini, *Mutational analysis of Tyr-318 within the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(51): p. 34234-34239.
231. Ren, J.; C. Nichols; L. Bird; P. Chamberlain; K. Weaver; S. Short; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Structural Mechanisms of Drug Resistance for Mutations at Codons 181 and 188 in HIV-1 Reverse Transcriptase and the Improved Resilience of Second Generation Non-nucleoside Inhibitors*. *Journal of Molecular Biology*, 2001. **312**(4): p. 795-805.
232. Hsiou, Y.; J. Ding; K. Das; A.D. Clark; P.L. Boyer; P. Lewi; P.A.J. Janssen; J.-P. Kleim; M. Rösner; S.H. Hughes; E. Arnold, *The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT : a novel mechanism of drug resistance*. *J. Mol. Biol.*, 2001. **309**: p. 437-445.
233. Arion, D.; G. Borkow; N. Kaushik; S. Mc Cormick; M.A. Parniak, *Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido,3'-deoxythymidine (AZT) : Increased DNA polymerization processivity*

- and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. Biochemistry, 1998. 37: p. 15908-15917.*
234. Arion, D.; M.A. Parniak, *HIV resistance to zidovudine : The role of pyrophosphorolysis. Drug Resistance Updates, 1999. 2: p. 91-95.*
235. Philips, A.N., *HIV dynamics : Lessons from the use of antiretrovirals*, in *HIV and the new viruses*, H.B. Company, Editor. 1999, Academic Press: San Diego. p. 59-97.
236. Perelson, A.S.; P. Essunger; Y. Cao; e. al., *Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. Nature, 1997. 387: p. 188-191.*
237. Ahmed, R.; D. Gray, *Immunological memory and protective immunity : understanding their relation. Science, 1996. 272: p. 54-60.*
238. Chun, T.W.; D. Finzi; J. Margolick; e. al., *Fate of HIV-1 infected T-cells in vivo : rates of transition to stable latency. Nature Medicine, 1995. 1: p. 1284-1290.*
239. Chun, T.W.; L. Carruth; D. Finzi; e. al., *Quantitation of latent tissue reservoirs and total body load in HIV-1 infection. Nature, 1997. 387: p. 183-188.*
240. Finzi, D.; J.N. Blankson; R.F. Siliciano; e. al, *Latent infection of CD4+ T-cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. Nature Medicine, 1999. 5: p. 512-517.*
241. Poss, M.; A.G. Rodrigo; G.J. J.; G.H. Learn; D. de Vange Panteleeff; J.H.L. Martin; J. Bwayo; J.K. Kreiss; J. Overbaugh, *Evolution of envelope sequences from the genital tract and peripheral blood of women infected with clade A human immunodeficiency virus type 1. J. Virol., 1998. 72: p. 8240-8251.*
242. Kiessling, A.A.; L.M. Fitzgerald; D. Zhang; H. Chhay; D. Brettler; R.C. Eyre; J. Steinberg; K. McGowan; B.R. A., *Human immunodeficiency virus in semen arises from a genetically distinct virus reservoir. AIDS Res. Hum. Retrovir., 1998. 14 (Suppl. 1): p. S33-S41.*
243. Keys, B.; J. Karis; B. Fadeel; A. Valentin; G. Norkrans; L. Hagberg; C. F., *V3 sequences of paired HIV-1 isolates from blood and cerebrospinal fluid cluster according to host and show variation related to the clinical stage of disease. Virology, 1993. 196: p. 475-483.*
244. Foudraine, N.A.; R.M. Hoetelmans; J.M. Lange; e. al, *Cerebrospinal fluid HIV-1 RNA and drug concentrations after treatment with lamivudine plus zidovudine or stavudine. Lancet, 1998. 351: p. 1547-1551.*
245. Aweeka, F.; A. Jaywardene; S. Staprans; e. al, *Failure to detect nelfinavir in the cerebrospinal fluid of HIV-1 infected patients with of without AIDS dementia complex. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovir., 1999. 20: p. 39-43.*
246. Kravcik, S.; K. Galliciano; V. Roth; e. al., *Cerebrospinal fluid HIV RNA and drug levels with combination ritonavir and saquinavir. J. Acquir. Immune Defic. Syndr., 1999. 21: p. 371-375.*
247. Taylor, S.; A.S. Pereira, *Antiretroviral drug concentrations in semen of HIV-1 infected men. Sex Transm. Infect., 2001. 77: p. 4-11.*
248. Martinez-Picado, J.; N. Kartsonis; G.J. Hanna; e. al., *Antiretroviral resistance during successful therapy oh human immunodeficiency virus type 1 infectio. Proc Natl Acad Sci U S A., 2000. 97: p. 10948-10953.*
249. Ruiz, L.; J. Martinez-Picado; J. Romeu; e. al., *Structured treatments interruption in chronically HIV-1 infected patients after long term viral suppression. AIDS, 2000. 14: p. 397-403.*
250. Papasavvas, E.; G.M. Ortiz; R. Gross; e. al, *Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 and CD8 T cell responses in chronically infected persons after temporary treatment interruption. Journal of infectious diseases, 2000. 182: p. 766-775.*
251. Chun, T.W.; D. Engel; S.B. Mizell; e. al., *Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4+ T cells in HIV-1-infected patients recieving highly active anti-retroviral therapy. Nature Medicine, 1999. 5: p. 651-655.*

Chapitre 2 : Objectifs et stratégies

« Les résolutions sont comme les anguilles. On les prend aisément ; le diable est de les tenir ! »
(A. Dumas)

En 2004, le SIDA reste un problème de santé au niveau mondial. Malgré les efforts réalisés dans les domaines de la prévention et de l'encadrement des malades, l'épidémie continue à prendre une ampleur de plus en plus inquiétante. De plus, les traitements actuels souffrent de nombreuses imperfections et leur efficacité est mise en péril par l'apparition de souches mutantes résistantes. Le développement de nouvelles molécules permettant de lutter plus efficacement contre le VIH est donc toujours une nécessité .

C'est dans cette optique qu'un projet visant à **la recherche et à l'étude de nouveaux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH-1** a été initié conjointement aux Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix (**FUNDP**) et à l'Université Libre de Bruxelles (**ULB**). Il est le fruit d'une collaboration entre les laboratoires de **Chimie Moléculaire Structurale (CMS)** et de **Chimie des Matériaux Organiques (CMO)** des FUNDP avec le **Laboratoire de Virologie Moléculaire** et le **Service de Génétique Appliquée** de l'ULB. Au sein de ce groupe, la tâche dévolue au laboratoire CMS est d'analyser et de **rationaliser les relations structure-activité associées aux composés étudiés** et ainsi de **contribuer à la conception et à l'identification de nouveaux INNTI**.

Depuis plusieurs années, la **conception rationnelle** de molécules d'intérêt biologique et plus particulièrement **pharmaceutique** (« *rational drug design* ») peut être nettement facilitée par l'utilisation de procédures de **modélisation moléculaire** qui permettent de comparer les **propriétés structurales et électroniques** d'un ensemble de composés. On parle alors de **conception assistée par ordinateur** ou, en anglais, de **computer-aided drug design**. En identifiant les éléments d'une molécule essentiels à son activité biologique, une telle approche peut permettre de s'affranchir de la synthèse, systématique ou aléatoire, d'un grand nombre de

dérivés, et ainsi de **focaliser les efforts de recherche** vers les molécules les plus susceptibles de posséder des propriétés attractives. Cette stratégie a déjà été appliquée à plusieurs reprises au laboratoire CMS, par exemple dans le cadre de la conception d'antagonistes du récepteur au thombosane^[1], d'anti-hypertenseurs^[2] (antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine), de composés agissant sur le système nerveux central^[3] (inhibiteurs de la monoamine oxydase) ou encore d'inhibiteurs de la protéase du VIH^[4]. Nous entendons utiliser ces méthodes de conception rationnelle pour la recherche et l'étude de nouveaux INNTI.

Le choix des outils de modélisation moléculaire à utiliser dépend en grande partie des **informations structurales** disponibles (figure 1). Quatre principaux cas de figure se présentent, en fonction du degré de connaissance de la **cible macromoléculaire** et de son **ligand**^[5]. Si la structure de cette première est inconnue, on parle de **conception indirecte**. Dans ce cas, la recherche de nouveaux composés actifs se fera uniquement par l'étude et la comparaison de molécules dotées des propriétés biologiques recherchées. Cette méthode conduit généralement à la définition d'un **pharmacophore**, qui peut être considéré comme l'ensemble des caractéristiques stériques et/ou électroniques nécessaires à cette activité. Cette approche a été utilisée pendant plusieurs années dans le cadre de la conception d'INNTI et a débouché sur le pharmacophore « butterfly »^[6] (cf. point 1.3.2.5.2) et l'identification de plusieurs familles d'inhibiteurs. Elle reste encore de mise dans un grand nombre d'études.

		Structure de la cible (enzyme/ récepteur)	
		Inconnue (conception indirecte)	Connue (conception directe)
Composé (inhibiteur/ligand)	Inconnu	<i>Rational Screening</i> (criblage rationnel) <i>Similarity searching</i> (recherche par similarité)	<i>de novo design</i> (conception <i>de novo</i>)
	Connu	<i>Analog-Based Drug Design</i> (conception de molécules actives sur base des molécules analogues)	<i>Structure-Based Drug Design</i> (conception de molécules actives sur base de la structure de la cible)

Figure 1 : La stratégie de conception rationnelle utilisée dépend des connaissances structurales liées à la cible macromoléculaire et à son ligand^[5].

La **structure tridimensionnelle** d'un nombre croissant de cibles macromoléculaires est à présent connue grâce aux expériences de diffraction de rayons X ou de résonance magnétique nucléaire, ce qui peut également faciliter la conception de molécules actives. On parle alors de **conception directe sur base de la structure de la cible** (« *structure based drug design* ») ou de **conception de novo** (« *de novo design* ») suivant que l'on dispose ou non d'un ligand de départ à optimiser.

A l'heure actuelle, une soixantaine de structures tridimensionnelles de la transcriptase inverse du VIH-1 ont été déterminées par diffraction de rayons X et déposées dans la banque de données de protéines de Brookhaven (PDB). Ces données comprennent la TI seule^[7] ou complexée à un INNTI^[8], un brin d'acide nucléique ou un nucléotide^[9]. L'enzyme peut être présente sous sa forme la plus courante (« *wild type* ») ou sous forme mutée^[10]. Toutes ces informations peuvent être librement consultées et seront exploitées au cours de notre travail, qui s'inscrit donc dans le cadre d'une **conception directe**.

La plupart des molécules étudiées au cours de ce travail seront basées sur le **cycle 2-pyridinone**, dont sont dérivées plusieurs séries d'INNTI. Les composés de type pyridinone constituent une très large famille de molécules, dont certains membres ont également été étudiés pour leurs propriétés cardiotoniques ou antileucémiques. L'activité anti-VIH-1 de molécules dérivées de ce noyau est pour la première fois mise en évidence en 1991, au cours d'un programme de criblage lancé par la firme **Merck**^[11]. La molécule L-345,516 (figure 2) est alors identifiée comme étant un **inhibiteur spécifique et non compétitif** de la transcriptase inverse du VIH-1. Suite à son instabilité en milieu physiologique, de nombreux analogues du L-345,516 ont été synthétisés en vue d'obtenir des propriétés pharmacologiques plus favorables^[12] ^[13-17]. Un des dérivés issus de ces travaux, le **L-697,661** est parvenu au stade des essais cliniques de phase II^[18]. Son profil de résistance peu favorable^[19-21] a cependant mis un terme à son développement. Cette première série de composés reste la mieux connue et la plus étudiée^[22, 23] parmi celles basées sur le noyau pyridinone.

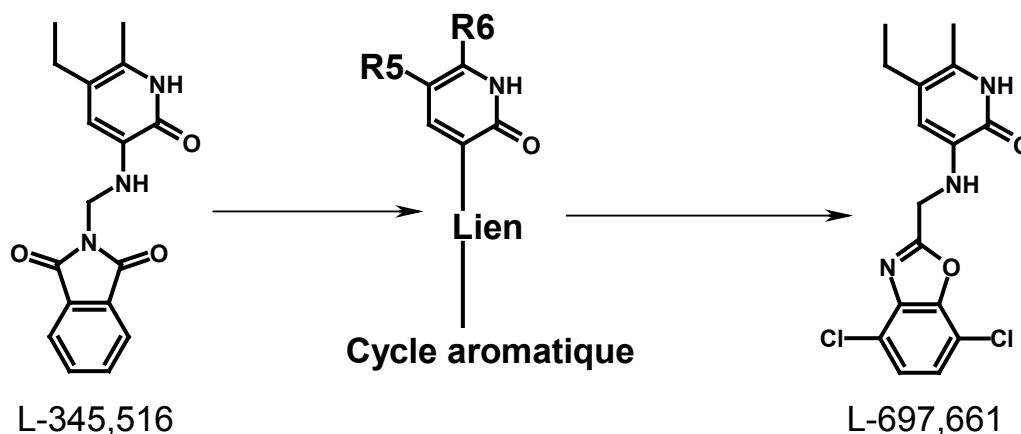


Figure 2 : Exemples de pyridinones synthétisées par la firme Merck

A partir de 1995, une deuxième série de pyridinones est étudiée par un groupe de chercheurs de l'institut Curie^[24-27]. La structure **4-(aryltio)pyridinone** ou **4-benzylpyridinone** (figure 3) de ces composés combine les éléments structuraux du HEPT et des pyridinones Merck. Plusieurs d'entre eux possèdent un profil pharmacologique intéressant, qui associe une **bonne activité antivirale** à une **faible toxicité** et à un **pouvoir virucide** attractif^[28]. Bien qu'aucune de ces molécules ne soit parvenue au stade des essais cliniques, l'ensemble de ces travaux a été protégé par plusieurs brevets.

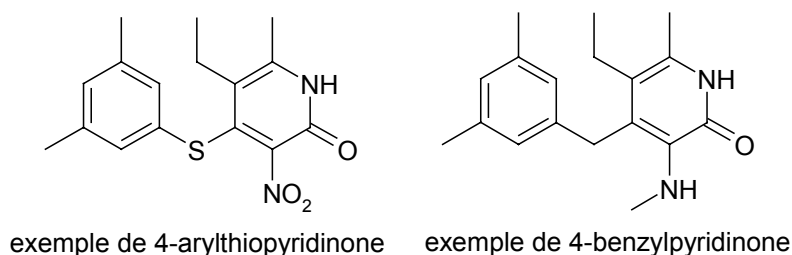


Figure 3 : Pyridinones synthétisées par l'institut Curie.

Enfin, la structure d'un dernier groupe de pyridinones a été récemment protégée par la firme **Janssen Pharmaceutica**^[29]. Ces composés découlent des travaux de l'institut Curie et l'hypothèse d'une correspondance entre les éléments structuraux du HEPT et des pyridinones Merck a de nouveau influencé leur conception. Plusieurs de ces molécules possèdent une activité antivirale attractive et se distinguent de la série Curie par les substituants placés en position 3 et 5 du cycle pyridinone et plus particulièrement par la présence d'un groupe iodo en position 3^[30].

Malgré le nombre important de travaux réalisés sur les 2-pyridinones, **aucune étude cristallographique** d'un complexe TI-pyridinone n'a été publiée à ce jour. De plus, seul un nombre très réduit de **modèles théoriques** décrivent les **interactions** mises en jeu entre la TI et ce type d'inhibiteur^[31-33]. La plupart d'entre eux ne tiennent pas compte des données structurales relatives à la TI qui sont à présent disponibles et pourraient donc comporter de **larges imperfections**. Il semble donc hasardeux de baser la conception d'une nouvelle série d'inhibiteurs uniquement sur ces hypothèses.

Pour ces raisons, il est indispensable de débiter notre recherche par une démarche de **rationalisation des relations structure-activité** lies aux différentes pyridinones décrites dans la littérature. Notre premier objectif est donc **d'élaborer un modèle d'interaction** TI-pyridinone qui constituera une **base fiable** pour le développement de nouveaux inhibiteurs. Tout d'abord, nous chercherons à déterminer le mode de liaison adopté par les dérivés 2-pyridinone au sein de la TI. Pour ce faire, nous aurons recours à divers outils de modélisation moléculaire, parmi lesquels l'analyse conformationnelle d'un ligand et l'utilisation d'algorithmes de *docking*. Le modèle d'interaction TI-pyridinone proposé devra non seulement être **cohérent** avec les données structurales mises en évidence chez d'autres catégories de composés (occupation de certaines zones importantes du site de liaison, formation de ponts hydrogène,...) mais également posséder un **aspect prédictif**. La pertinence des différentes hypothèses d'interaction sera donc jugée en les confrontant aux données expérimentales issues de la littérature. Au terme de cette première étape, nous espérons ainsi parvenir à une meilleure compréhension de l'interaction TI-pyridinone.

La seconde partie de ce travail vise à **exploiter** les informations livrées par l'étude théorique de pyridinones de la littérature, afin d'aider à la **conception rationnelle** et **efficace** de nouveaux dérivés. Ce processus ne sera pas basé sur une approche *de novo*, mais bien sur l'**optimisation** progressive de composés déjà synthétisés. Au début de ce projet, cinq structures de type pyridinone (figure 4) présentant plusieurs analogies structurales avec celles étudiées par la firme Merck ont été synthétisées par le docteur Kiet Le Van. Notre second objectif est donc de **rationaliser** les données biologiques relatives à ces composés et de proposer une série de **variations** successives qui conféreront aux dérivés issus de ces

premières molécules un **profil pharmacologique attractif**, combinant une activité antivirale puissante, une faible toxicité, une bonne biodisponibilité et une action efficace sur les souches mutantes du VIH-1. Ces propositions seront formulées sur base des résultats obtenus grâce à la modélisation moléculaire et à la diffraction de rayons X. Elles seront progressivement affinées grâce à l'évaluation biologique des composés synthétisés au laboratoire CMO.

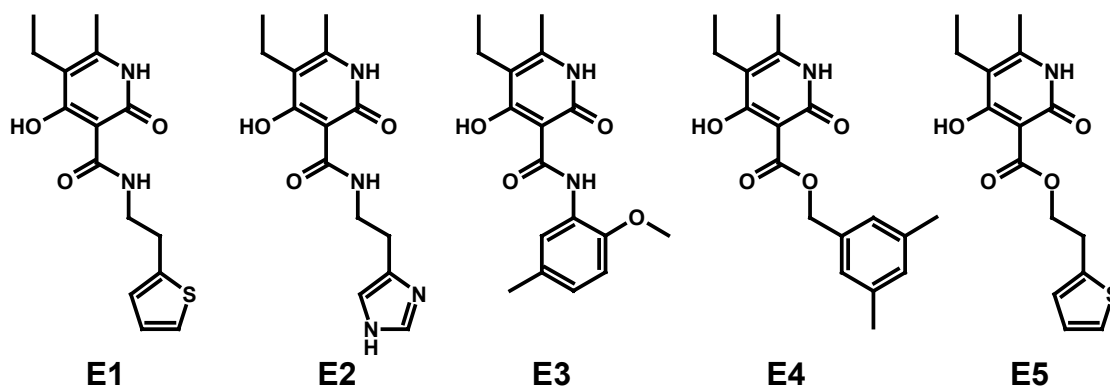


Figure 4 : Structure des cinq analogues des pyridinones de la série Merck

Au terme de ce travail, nous espérons donc d'une part avoir établi un modèle d'interaction capable de rendre compte de manière réaliste de l'interaction TI-pyridinone et d'autre part disposer d'une série d'inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase du VIH-1 dotés d'un fort pouvoir antiviral.

Bibliographie

1. Michaux, C.; J.-M. Dogné; S. Rolin; B. Masereel; J. Wouters; F. Durant, *A pharmacophore model for sulfonyl-urea (-cyanoguanidine) compounds with dual action, thromboxane receptor antagonists and thromboxane synthase inhibitors*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2003. **38**: p. 703-710.
2. Le Bourdonnec, B.; C. Cauvin; E. Meulon; S. Yous; J.-F. Goossens; F. Durant; R. Houssin; J.-P. Henichart, *Comparison of 3D Structures and AT1 Binding Properties of Pyrazolidine-3,5-diones and Tetrahydropyridazine-3,6-diones with Parent Antihypertensive Drug Irbesartan*. Journal of Medicinal Chemistry, 2002. **45**(21): p. 4794-4798.
3. Ooms, F.; R. Frederick; F. Durant; J.P. Petzer; N. Castagnoli; C.J. Van der Schyf; J. Wouters, *Rational approaches towards reversible inhibition of type B monoamine oxidase. Design and evaluation of a novel 5H-Indeno[1,2-c]pyridazin-5-one derivative*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2003. **13**(1): p. 69-73.
4. Lebon, F.; N. Boggetto; M. Ledecq; F. Durant; Z. Benatallah; S. Sicsic; R. Lapouyade; O. Kahn; A. Mouithys-Mickalad; G. Deby-Dupont; M. Reboud-Ravaux, *Metal-organic compounds: a new approach for drug discovery N1-(4-methyl-2-pyridyl)-2,3,6-trimethoxybenzamide copper(II)*

- complex as an inhibitor of human immunodeficiency virus 1 protease*. Biochemical Pharmacology, 2002. **63**(10): p. 1863-1873.
5. Wouters, J.; F. Ooms, *Small molecule crystallography in drug design*. Current Pharmaceutical Design, 2001. **7**(7): p. 529-545.
 6. Schäfer, W.; W.-G. Friebe; H. Leinert; A. Mertens; T. Poll; W. von der Saal; H. Zilch; B. Nuber; M.L. Ziegler, *Non-nucleoside unhibitors of HIV-1 reverse transcriptase : Molecular modeling and X-Ray structure investigations*. Journal of medicinal chemistry, 1993. **36**(726-732).
 7. Rodgers, D.W.; S.J. Gamblin; B.A. Harris; S. Ray; J.S. Culp; J.S. Hellmig; D.J. Woolf; C. Debouck; S.C. Harrison, *The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1995. **92**(1222-1226).
 8. Ren, J.; R. Esnouf; E. Garman; D. Somers; C. Ross; I. Kirby; J. Keeling; G. Darby; Y. Jones; D. Stuart, *High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes*. Nature Structural Biology, 1995. **2**(4): p. 293-302.
 9. Huang, H.; R. Chopra; G.L. Verdine; S.C. Harrison, *Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase : implications for drug resistance*. Science, 1998. **282**: p. 1669-1675.
 10. Ren, J.; J. Milton; K.L. Weaver; S.A. Short; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Structural Basis for the Resilience of Efavirenz (DMP-266) to Drug Resistance Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase*. Structure (London), 2000. **8**(10): p. 1089-1094.
 11. Goldman, M.E.; J.H. Nunberg; J.A. O'Brien; J.C. Quintero; W.A. Schleif; K.F. Freund; S.L. Gaul; W.S. Saari; J.S. Wai; et al., *Pyridinone derivatives: specific human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitors with antiviral activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(15): p. 6863-7.
 12. Saari, W.S.; J.M. Hoffman; J.S. Wai; T.E. Fisher; C.S. Rooney; A.M. Smith; C.M. Thomas; M.E. Goldman; J.A. O'Brien; et al., *2-Pyridinone derivatives: a new class of nonnucleoside, HIV-1-specific reverse transcriptase inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 1991. **34**(9): p. 2922-5.
 13. Goldman, M.E.; J.A. O'Brien; T.L. Ruffing; J.H. Nunberg; W.A. Schleif; J.C. Quintero; P.K.S. Siegl; J.M. Hoffman; A.M. Smith; E.A. Emini, *L-696,229 specifically inhibits human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and possesses antiviral activity in vitro*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1992. **36**(5): p. 1019-23.
 14. Hoffman, J.M.; J.S. Wai; C.M. Thomas; R.B. Levin; J.A. O'Brien; M.E. Goldman, *Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as HIV-1 specific reverse transcriptase inhibitors. 1. Phthalimidoalkyl and -alkylamino analogs*. Journal of Medicinal Chemistry, 1992. **35**(21): p. 3784-91.
 15. Saari, W.S.; J.S. Wai; T.E. Fisher; C.M. Thomas; J.M. Hoffman; C.S. Rooney; A.M. Smith; J.H. Jones; D.L. Bamberger; et al., *Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as HIV-1-specific reverse transcriptase inhibitors. 2. Analogs of 3-aminopyridin-2(1H)-one*. Journal of Medicinal Chemistry, 1992. **35**(21): p. 3792-802.
 16. Hoffman, J.M.; A.M. Smith; C.S. Rooney; T.E. Fisher; J.S. Wai; C.M. Thomas; D.L. Bamberger; J.L. Barnes; T.M. Williams; et al., *Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as HIV-1-specific reverse transcriptase inhibitors. 4. 3-[2-(Benzoxazol-2-yl)ethyl]-5-ethyl-6-methylpyridin-2(1H)-one and analogs*. Journal of Medicinal Chemistry, 1993. **36**(8): p. 953-66.
 17. Wai, J.S.; T.M. Williams; D.L. Bamberger; T.E. Fisher; J.M. Hoffman; R.J. Hudcosky; S.C. MacTough; C.S. Rooney; W.S. Saari; et al., *Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as specific HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. 3. Pyridyl and phenyl analogs of 3-aminopyridin-2(1H)-one*. Journal of Medicinal Chemistry, 1993. **36**(2): p. 249-55.
 18. Saag, M.S.; E.A. Emini; O.L. Laskin; e. al, *A short-term clinical evaluation of L-697,661, a non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. L-697,661 working group*. N. Engl. J. Med., 1993. **329**: p. 1065-1072.

19. Nunberg, J.H.; W.A. Schleif; E.J. Boots; J.A. O'Brien; J.C. Quintero; J.M. Hoffman; E.A. Emini; M.E. Goldman, *Viral resistance to human immunodeficiency virus type 1-specific pyridinone reverse transcriptase inhibitors*. Journal of Virology, 1991. **65**(9): p. 4887-92.
20. Schooley, R.T.; T.B. Campbell; D.R. Kuritzkes; e. al, *Phase I study of ombination therapy with L-697,661 and zidovudine. The ACTG 184 protocol team*. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovir., 1996. **12**: p. 363-370.
21. Staszewski, S.; F.E. Massari; A. Kober; e. al, *Combination Therapy with zidovudine prevents selection of human immunodeficiency virus type I variants expressing high-level resistance to L-697,661, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor*. J. Infect. Dis., 1995. **171**: p. 1159-1165.
22. Garg, R.; S.P. Gupta, *Quantitative structure-activity relationship studies on some anti-human-immunodeficiency-virus-1 (anti-HIV-1) drugs. Viral reverse transcriptase inhibitors*. Journal of Enzyme Inhibition, 1997. **12**(1): p. 1-12.
23. McGrath, C.F.; G.J. Tawa; B.T. Luke; G.E. Kellogg; D.W. Zaharevitz; N. Pattabiraman; R. Gussio, *A 3D-QSAR of pyridinone binding at the non-nucleoside binding site of HIV-1 reverse transcriptase: A hydropathic molecular dynamics approach*. Book of Abstracts, 216th ACS National Meeting, Boston, August 23-27, 1998: p. COMP-085.
24. Dolle, V.; E. Fan; C.H. Nguyen; A.-M. Aubertin; A. Kirn; M.L. Andreola; G. Jamieson; L. Tarrago-Litvak; E. Bisagni, *A New Series of Pyridinone Derivatives as Potent Non-Nucleoside Human Immunodeficiency Virus Type 1 Specific Reverse Transcriptase Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 1995. **38**(23): p. 4679-86.
25. Dolle, V.; C.H. Nguyen; M. Legraverend; A.-M. Aubertin; A. Kirn; M.L. Andreola; M. Ventura; L. Tarrago-Litvak; E. Bisagni, *Synthesis and antiviral activity of 4-benzyl pyridinone derivatives as potent and selective non-nucleoside human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 2000. **43**(21): p. 3949-3962.
26. Pontikis, R.; V. Dolle; J. Guillaumel; E. Dechaux; R. Note; C. HungNguyen; M. Legraverend; E. Bisagni; A.-M. Aubertin; D.S. Grierson; C. Monneret, *Synthesis and Evaluation of \"AZT-HEPT\", \"AZT-Pyridinone\", and \"ddC-HEPT\" Conjugates as Inhibitors of HIV Reverse Transcriptase*. Journal of Medicinal Chemistry, 2000. **43**(10): p. 1927-1939.
27. Andreola, M.-L.; C.H. Nguyen; M. Ventura; L. Tarrago-Litvak; M. Legraverend, *Antiviral activity of 4-benzyl pyridinone derivatives as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors*. Expert Opinion on Emerging Drugs, 2001. **6**(2): p. 225-238.
28. Ventura, M.; L. Tarrago-Litvak; V. Dolle; C.H. Nguyen; M. Legraverend; H.J.A. Fleury; S. Litvak, *Effect of nucleoside analogs and non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase on cell-free virions*. Archives of Virology, 1999. **144**(3): p. 513-523.
29. Benjahad, A.; J. Guillemont; E. Bisagni; G. Sanz; D.S. Grierson; C. Monneret; L. Decrane; D. Mabire; C.H. Nguyen, *Pyridinone and pyridinethione derivatives having HIV inhibiting properties (WO0224650)*. 2002
30. Benjahad, A.; J. Guillemont; K. Andries; C.H. Nguyen; D.S. Grierson, *3-Iodo-4-phenoxy pyridinones (IOPY's), a new family of highly potent non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2003. **13**(24): p. 4309-4312.
31. Jourdan, F.; J. Renault; C. Fossey; R. Bureau; D. Laduree; M. Robba; A.M. Aubertin; A. Kirn, *Design, synthesis and antiviral activity of new pyridinone derivatives*. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 1997. **8**(2): p. 161-172.
32. Mager, P.P., *Evidence of a butterfly-like configuration of structurally diverse allosteric inhibitors of the HIV-1 reverse transcriptase*. Drug Design and Discovery, 1996. **14**: p. 241-257.
33. Tucker, T.J.; W.C. Lumma; J.C. Culberson, *Development of nonnucleoside HIV reverse transcriptas einhibitors*. Methods Enzymol., 1996. **275**: p. 440-472.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

***« Je n'ai pas peur des ordinateurs. J'ai peur qu'ils viennent à nous manquer. »
(I. Asimov)***

Notre travail de thèse vise à la conception et à l'étude d'inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (TI) du VIH-1 dérivés du cycle 2-pyridinone. Suite à la présence de nombreuses structures cristallographiques de la TI dans la banque de données de protéines (PDB, voir point 3.1.6), nos travaux se baseront en grande partie sur la structure tridimensionnelle de cette enzyme. Cette approche nécessite l'emploi d'une variété de techniques, tant théoriques qu'expérimentales. Certaines, telles que la diffraction de rayons X, les méthodes *ab initio* ou l'analyse conformationnelle sont ici employées uniquement pour l'analyse des petites molécules. D'autres, comme les algorithmes de docking, seront utilisées pour étudier les interactions mises en jeu entre la TI et ses inhibiteurs. Ce chapitre se propose de détailler les techniques qui interviennent dans ce manuscrit, au même titre que les tests biologiques utilisés pour mesurer l'activité antivirale des composés étudiés.

3.1. Diffraction de rayons X

La diffraction de rayons X (DRX) est une des techniques expérimentales les plus puissantes pour la détermination de la **structure tridimensionnelle** d'un composé isolé ou d'un complexe. Elle permet, par la recherche des positions atomiques, de décrire une **configuration stable** (c'est à dire énergétiquement favorisée) d'un édifice moléculaire à l'**état cristallin**. Elle peut également renseigner sur le type d'**interactions** mises en jeu entre des molécules.

3.1.1. Rappels théoriques

Les rayons X (RX)^[1], sont des radiations dont la longueur d'onde est de l'ordre de l'Angström. Ils sont donc situés dans une gamme du spectre électromagnétique (figure 1) invisible pour l'œil humain. Suite à la fréquence élevée des rayons X, l'énergie associée à un photon X (de l'ordre

du keV) est de très loin supérieure à celle qui caractérise en chimie les liaisons covalentes (quelques eV). Les rayons X peuvent donc aisément arracher un électron d'une orbitale atomique ou moléculaire et à ce titre font donc partie des **radiations ionisantes**. Au laboratoire, une des méthodes les plus courantes pour obtenir les rayons X consiste à **accélérer des électrons** grâce à une différence de potentiel et à les faire entrer en **collision avec une anode métallique**, souvent constituée de cuivre ou de molybdène (figure 2). Bien que la plus grande partie de l'énergie du faisceau d'électrons soit dissipée sous forme de chaleur, deux types de rayons X sont alors produits : le rayonnement de freinage et l'émission caractéristique.

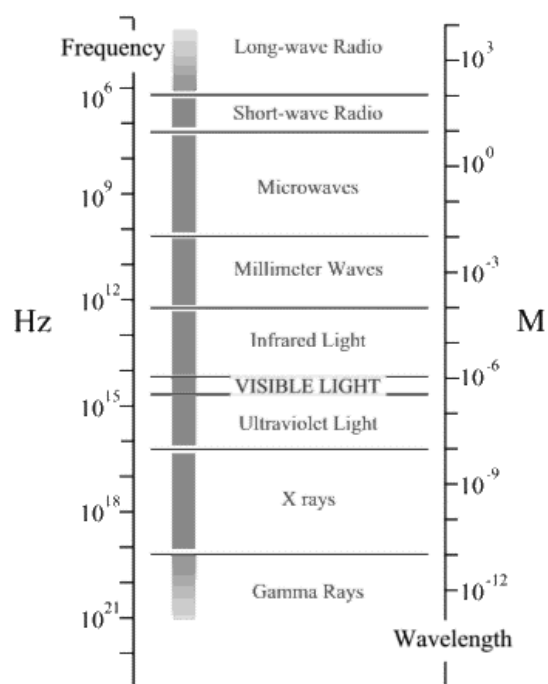
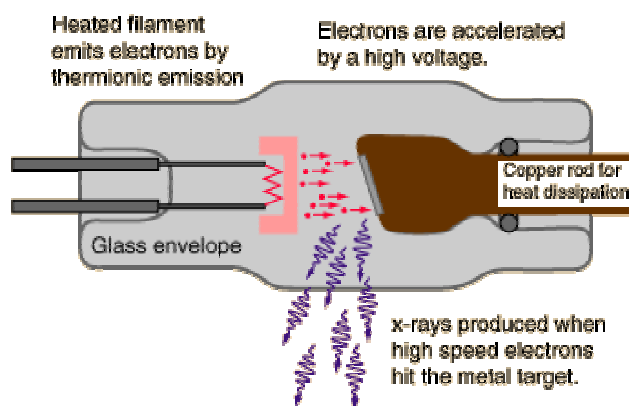


Figure 1 : Le spectre électromagnétique

Figure 2 : Schéma d'un appareil de production des rayons X par accélération d'électrons^[2]

Le « **rayonnement de freinage** » ou *brehmsstrahlung* provient de la décélération des électrons suite à leur rencontre avec l'anode métallique. En effet, toute charge électrique décélérée émet une radiation électromagnétique, qui est ici comprise dans la gamme de longueurs d'onde associée aux rayons X. Ce rayonnement est caractérisé par une **distribution**

continue (figure 3), qui est fonction de l'énergie du faisceau d'électrons incident. Ceci lui vaut également le nom de « **fond continu** ».

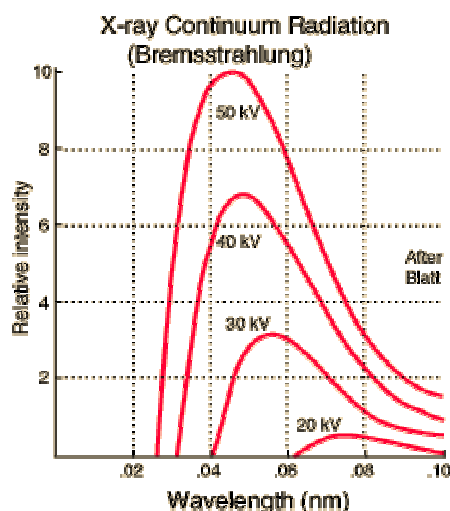


Figure 3 : Exemple de distribution du rayonnement de freinage en fonction de l'énergie du faisceau d'électrons incident^[3]

Les électrons accélérés peuvent également **éjecter un autre électron**, qui appartient aux **couches internes** (orbitales de cœur) d'un des atomes de la cible métallique. La **retombée** immédiate d'un électron de nombre quantique supérieur en vue de combler l'orbitale laissée vacante donne lieu à **l'émission d'un photon**, dont l'énergie est **quantifiée** et **caractéristique**. La radiation ainsi produite est également située dans la gamme de longueurs d'onde associée aux rayons X. Elle n'est cependant pas strictement monochromatique (figure 4). En effet, des électrons de nombre quantique n différent peuvent retomber sur l'orbitale laissée vacante. Ainsi, des électrons retombant d'une couche $n=2$ vers la couche $n=1$ émettent une raie K_{α} , tandis que ceux retombant d'une couche $n=3$ vers la couche $n=1$ produisent une raie K_{β} . La longueur d'onde utilisée lors des expériences de diffraction peut cependant être sélectionnée grâce à un monochromateur. Dans le cadre de ce travail, la raie K_{α} du cuivre ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) a été utilisée.

Lorsque les rayons X traversent un milieu matériel, ils peuvent donner lieu à plusieurs phénomènes physiques, dont la réfraction, la fluorescence, l'absorption, la diffusion, de Compton (diffusion inélastique, avec perte d'énergie pour la radiation incidente) ou encore à la **diffusion de Rayleigh** (diffusion élastique, sans perte d'énergie) qui est à l'origine du phénomène de diffraction. Cette dernière provient de la mise en vibration forcée des électrons

du milieu traversé, suivie de la réémission d'un rayonnement de même longueur d'onde. Dans un **milieu cristallin**, ce phénomène continu de diffusion se transforme en un phénomène discontinu de **diffraction**.

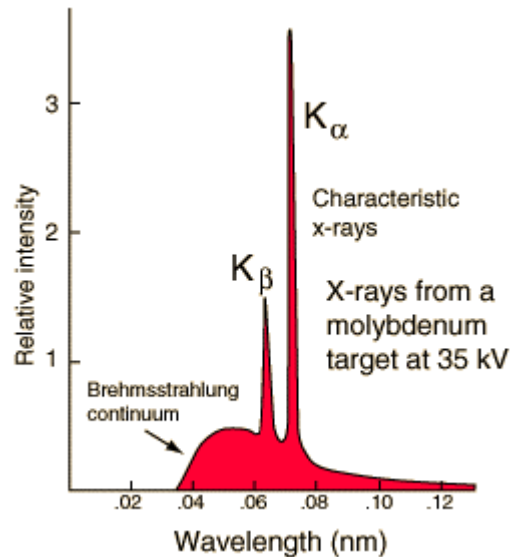


Figure 4 : La radiation émise par la retombée d'un électron sur une orbitale de niveau quantique inférieure n'est pas strictement monochromatique : exemple des raies K_{α} et K_{β} du molybdène^[4].

D'un point de vue chimique, un cristal peut être considéré comme un **réseau parfaitement ordonné**, constitué par la répétition quasi-infinie et **périodique**, dans les trois directions de l'espace, d'une même **unité structurale appelée maille**. En son sein, les rayons X sont renvoyés par les plans réticulaires comme par une série de miroirs partiellement réfléchissants. Il existe dès lors une différence de chemin parcouru entre deux rayons réfléchis par des plans réticulaires distincts, ce qui peut donner lieu à des interférences. Pour que l'intensité de la radiation réfléchie soit maximale, ces deux rayons devront repartir en **phase**, de manière à produire des **interférences constructives**. La différence de chemin optique parcouru doit donc être un multiple exact de la longueur d'onde qui caractérise les deux rayons. La loi de Bragg^[5] (figure 5) fixe des conditions précises pour l'observation d'un tel phénomène :

$$2d \sin\theta = n\lambda$$

où θ est l'angle d'incidence du rayon par rapport aux plans réticulaires, d est la distance qui sépare ces plans et λ est la longueur d'onde de la radiation. La principale conséquence de cette loi est qu'un faisceau de rayons X n'est renvoyé par un cristal que dans des directions de l'espace bien particulières, qui sont fonction de sa structure. C'est le phénomène de **diffraction**.

Une des conséquences de la loi de Bragg est que **le phénomène de diffraction ne peut être observé que si la taille de l'objet étudié est comparable à la longueur d'onde de la radiation utilisée**. Ceci explique pourquoi les rayons X, qui possèdent une longueur d'onde de l'ordre de l'Angström, sont utilisés pour l'étude des structures moléculaires.

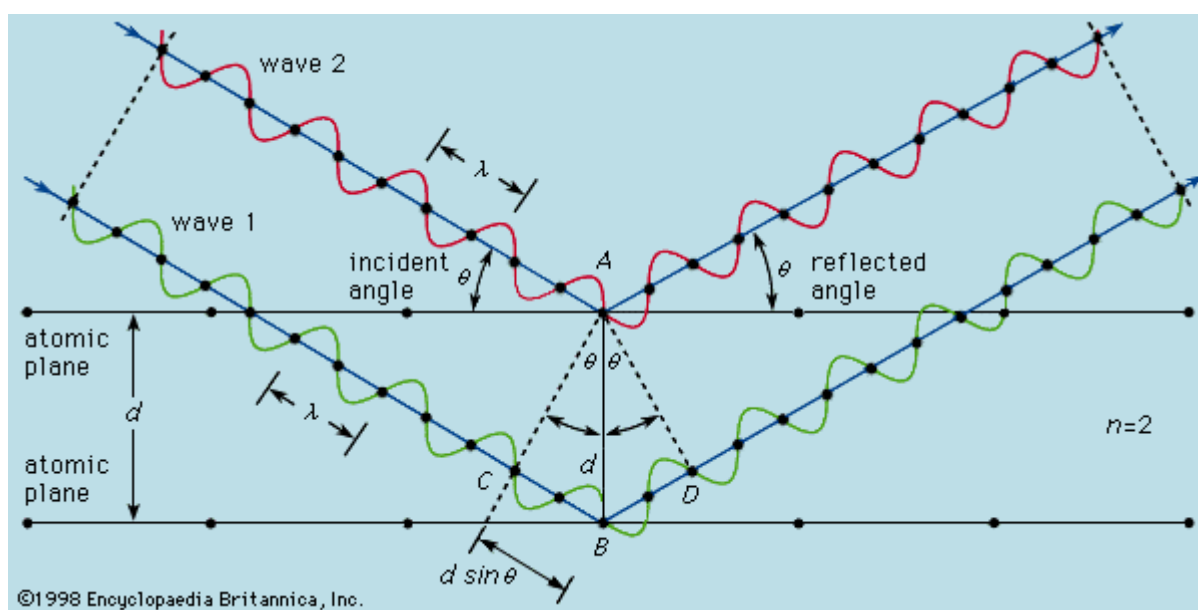


Figure 5 : Illustration schématique de la loi de Bragg^[5]

En analysant ces **directions** de diffraction, il est possible d'accéder aux **paramètres de maille** (volume, groupe spatial, multiplicité) d'un cristal. L'analyse des **intensités** des rayons diffractés permet pour sa part d'obtenir des informations sur la répartition de la **densité électronique** au sein du cristal.

3.1.2. Prise d'un spectre de diffraction de rayons X

Avant de procéder au relevé et à l'analyse des intensités qui caractérisent les différents rayons diffractés, il est indispensable de définir les paramètres de maille du cristal étudié, grâce à une première série de réflexions. Une fois ces paramètres établis, les directions de diffraction

associées aux rayons restants peuvent être prédites, ce qui permet une collecte plus aisée des intensités. Le diffractomètre utilisé est de type Enraf-Nonius CAD-4. Le programme Nonius^[6] qui lui est associé convertit les intensités diffractées en intensités observées suivant la relation :

$$I_o = V[NC - 2(BF_{gauche} + BF_{droite})]$$

où : I_o = intensité observée, V = Vitesse d'enregistrement, NC = nombre de « coups » mesurés au détecteur et BF = bruit de fond de l'enregistrement

Seules les réflexions dont l'intensité est supérieure au double de la déviation standard estimée (bruit de fond) sont collectées. Ces intensités sont ensuite converties en facteurs de structure, qui dépendent de la distribution des atomes dans la maille. Ceux-ci subissent alors diverses **corrections** destinées à prendre en compte des effets **géométriques** (facteurs de Lorentz et polarisation) et **physiques** (absorption, extinction primaire et secondaire et double réflexion de Renninger). Les normes des facteurs de structure observés $|F_o|$ corrigées par les facteurs de Lorentz et de polarisation sont ainsi :

$$|F_o| = \sqrt{\frac{I_o}{L \times P}} \quad \text{avec : } L = \frac{1}{\sin(2\theta)} \quad \text{et} \quad P = \frac{1 + \cos^2(2\theta)}{2}$$

Une analyse statistique permet enfin d'estimer à la fois le facteur d'échelle K qui relie les facteurs de structure observés (F_o) et les facteurs de structure calculés sur base des coordonnées atomiques (F_c), ainsi que le facteur de température global B qui décrit l'agitation thermique des atomes autour de leur position d'équilibre.

$|F_c|^2 = K|F_o|^2$ et $B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle$, avec $\langle u^2 \rangle$ = amplitude quadratique moyenne de la vibration atomique.

3.1.3. Détermination de la structure cristalline d'un composé

Le facteur de structure $F(H)$, dont le carré est proportionnel aux intensités des rayons diffractés, peut également être exprimé comme étant la somme vectorielle des facteurs de forme atomique f_k associés à chaque atome de la maille cristalline.

$$F(\vec{H}) = \sum_k f_k e^{i2\pi(\vec{r}_k \cdot \vec{H})}$$

avec : $\vec{r}_k$ = vecteur du réseau direct renseignant sur la position de l'atome k dans la maille, $\vec{H}$ = vecteur du réseau réciproque lié aux directions d'incidence et d'observation, ainsi qu'à la longueur d'onde.

Le milieu cristallin peut être considéré comme un ensemble périodique d'éléments de volume caractérisés par une densité électronique ρ . Leur pouvoir de diffusion est proportionnel au nombre d'électrons qu'ils contiennent. On peut dès lors écrire :

$$F(\vec{H}) = \int_V \rho(\vec{r}_k) e^{i2\pi(\vec{r}_k \cdot \vec{H})} d\tau, \text{ où } d\tau \text{ est l'élément de volume } dx dy dz, \text{ et } \vec{r}_k \cdot \vec{H} = hx + ky + lz$$

La **densité électronique** en tous points de la maille peut donc être déterminée en effectuant une **transformée de Fourier**, ce qui permet de localiser les atomes de la structure étudiée.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(\vec{H}) e^{-i2\pi(hx + ky + lz)}$$

Cependant, l'observation des intensités ne permet d'obtenir que la **norme** du facteur de structure. Dès lors, **l'information liée à la phase φ du facteur de structure est perdue**. Sa connaissance est pourtant indispensable à la détermination de la structure cristalline.

$$Fo = |Fo| e^{i\varphi}$$

Différentes techniques telles que les méthodes directes ou la méthode de Patterson permettent de résoudre ce problème. Le programme SHELXL^[7] est un des programmes permettant d'appliquer ces procédures. Une fois la phase déterminée, il est possible d'obtenir une première série de coordonnées atomiques approchant la structure réelle.

3.1.4. Affinement de la structure

Si la détermination du facteur de structure, et en particulier de sa phase, constitue l'une des difficultés principales de la radiocristallographie, le calcul inverse, qui consiste à calculer les facteurs liés à une structure connue, est par contre toujours possible.

$$F(\vec{H}) = \int_V \rho(r) e^{i2\pi(\vec{r} \cdot \vec{H})} d\tau = F_c$$

Où $d\tau$ est l'élément de volume $dx dy dz$

Ceci permet d'évaluer la qualité d'une hypothèse structurale en comparant le spectre de diffraction théorique à celui qui a été enregistré. La concordance entre les deux séries de données est traduite par un **indice de désaccord** (R), qui doit être minimisé.

$$R = \frac{\sum (|F_o| - |F_c|)}{\sum |F_o|}$$

avec $|F_c|$: norme du facteur de structure calculé à partir des coordonnées atomiques

L'**affinement** du modèle proposé est effectué *via* la méthode des moindres carrés et par séries de Fourier successives. Après plusieurs cycles d'itérations, on obtient finalement une structure qui rend compte au mieux des résultats expérimentaux.

L'analyse de la géométrie de la molécule et de la structure cristalline peut se faire grâce aux programmes PLATON^[8] et ORTEP^[9].

3.1.5. Quelle limites à la DRX ?

Malgré son apport indéniable à l'étude structurale de molécules (ou de macromolécules), la diffraction de rayons X possède plusieurs limitations dans le cadre de la conception de molécules d'intérêt pharmaceutique^[10]. La première est d'ordre expérimental : elle réside dans la nécessité d'**obtenir des monocristaux** capables de donner lieu à un phénomène de

diffraction satisfaisant. Si cette première étape peut souvent être franchie pour de petites molécules organiques (ou métallo-organiques), elle se révèle extrêmement limitante dans le cas des macromolécules et particulièrement dans celui des protéines membranaires. Un deuxième problème lié à la DRX est que cette technique ne fournit qu'une **image figée** de la structure étudiée. Même si la structure obtenue est une **conformation stable** de la molécule étudiée, il n'est pas certain qu'elle corresponde à la **conformation bioactive**, responsable de son activité biologique^[11]. Enfin, la structure observée est celle adoptée par la molécule suite aux **contraintes** liées à un milieu cristallin, qui peut être différente de celle présente en solution.

3.1.6. Les bases de données structurales

Les contraintes liés à la diffraction de rayons X peuvent être en partie surmontées grâce aux banques de données de cristallographie, qui représentent une source précieuse d'informations structurales. La **Cambridge Structural Database (CSD)**^[12] regroupe les **structures tridimensionnelles** de plus de 250000 molécules organiques ou métallo-organiques, déterminées par diffraction de rayons X. En plus d'offrir la possibilité d'examiner directement la structure d'une molécule ou de ses dérivés, cette banque de données permet de réaliser une **analyse statistique** sur les éléments structuraux liés à un fragment de molécule ou à une fonction chimique. Il est par exemple possible de rechercher les valeurs les plus fréquemment rencontrées pour un angle de torsion particulier. En cas de besoin, ces informations statistiques permettent de compléter judicieusement celles fournies par une structure figée, issue directement de la diffraction de rayons X.

La **Protein Data Bank**^[13] de Brookhaven contient plus de 23000 structures tridimensionnelles de protéines, dont la plupart ont été déterminées par diffraction de rayons X. Ces structures incluent non seulement des protéines isolées, mais également des complexes de type protéine/ADN, protéine/ligand ou protéine/protéine. Elles peuvent être librement téléchargées et exploitées. Ces données constituent souvent une aide inestimable à la recherche de composés d'intérêt pharmaceutique, puisqu'elles ouvrent la voie à la conception de nouvelles molécules actives sur base de la structure de la macromolécule cible (conception directe).

3.2. Méthodes de mécanique quantique^[14]

Les méthodes de modélisation basées sur la mécanique quantique visent à décrire le système étudié par une **fonction d'onde** qui peut théoriquement être déterminée par résolution de **l'équation de Schrödinger**. Cette équation relie les états stationnaires d'un système moléculaire et les énergies qui y sont associées à un opérateur Hamiltonien et à leur fonction d'onde. L'un des principaux avantages de la mécanique quantique, par rapport aux autres techniques de modélisation moléculaire, est qu'elle ne fait appel qu'à un nombre minimal d'approximations et considère de manière explicite les électrons de la molécule étudiée. Ceci permet le calcul de propriétés importantes telles que les charges atomiques, le potentiel électrostatique moléculaire ou la topologie et l'énergie des orbitales frontières (HOMO, LUMO...). Son principal inconvénient est d'être particulièrement coûteuse du point de vue du temps de calcul. Malgré ce problème, le traitement d'un système par mécanique quantique reste la méthode de référence pour le calcul des propriétés moléculaires, comme le rappelle cette citation de Burkert et Allinger^[15] :

"For calculating molecular properties, quantum chemistry seems to be the obvious tool to use. Calculations that do not use the Schrödinger equation are acceptable only to the extent that they reproduce the results of high level quantum mechanical calculations."

3.2.1. En termes simples....

Le point de départ de toute discussion en mécanique quantique est donc l'équation de Schrödinger.

$$\left[\frac{-h^2}{8\pi^2m} \nabla^2 + V \right] \Psi(r,t) = \frac{ih}{2\pi} \left(\frac{\partial \Psi(r,t)}{\partial t} \right)$$

où h est la constante de Planck et m est la masse de la particule traitée.

Dans sa forme indépendante du temps, cette équation peut être écrite :

$$H\Psi(r)=E\Psi(r)$$

Ces expressions font intervenir la **fonction d'onde** du système, ψ , qui en tant que telle n'a aucune signification physique. Son **carré** représente par contre une **probabilité de présence** d'un électron au sein d'un volume donné. La détermination de la fonction d'onde permet donc en théorie de calculer l'énergie associée au système auquel elle s'applique. Malheureusement, ce problème n'est soluble que pour quelques systèmes très simples, telles qu'une particule enfermée dans une boîte ou l'atome d'hydrogène. Dans le cas de systèmes polyélectroniques, il n'existe pas de solution exacte à cette équation et la fonction d'onde doit donc être estimée. Plusieurs approximations sont ainsi utilisées.

L'approximation de Born-Oppenheimer permet de traiter séparément le mouvement des noyaux et des électrons. Le terme d'énergie cinétique contenu dans l'opérateur hamiltonien (H) fait en effet intervenir, au sein de son dénominateur, la masse de la particule traitée. Les protons et les neutrons étant 1836 fois plus lourds qu'un électron, la contribution des noyaux atomiques dans cet opérateur peut être donc considérée comme négligeable. En pratique, ceci revient à postuler que les électrons, de masse beaucoup plus faible, peuvent s'adapter de manière quasiment instantanée aux changements de position des noyaux et que l'énergie d'une molécule peut donc être écrite comme une fonction des seules coordonnées nucléaires.

En ce qui concerne la détermination de la fonction d'onde, le **théorème des variations** indique que la valeur estimée de l'énergie d'un système, obtenue grâce à une fonction d'onde approximative, est toujours plus élevée que la valeur exacte. Afin de choisir la fonction d'onde la plus appropriée, **Hartree** et **Fock** proposent de considérer la fonction d'onde globale comme un produit d'orbitales monoélectroniques et de rechercher, par un **procédé itératif**, le jeu d'orbitales qui permet de minimiser l'énergie du système. Ceci revient à considérer indépendamment le mouvement de chaque électron, dans un champ moyen d'électrons. Cette approche est connue sous le nom de « **méthode du champ auto-cohérent** » (*self consistent field*, ou SCF).

Les équations d'Hartree-Fock sont le plus souvent résolues grâce à la méthode de Roothaan, qui traite chaque orbitale moléculaire comme étant une **combinaison linéaire d'orbitales atomiques** (approximation LCAO, pour Linear Combination of Atomic Orbitals). Ces dernières sont décrites par des fonctions de Slater ou, pour faciliter l'obtention de solutions analytiques, par une combinaison de fonctions gaussiennes appelée « set de base ».

Dans le cadre de ces travaux, le set de base employé sera de type 6-31g* ou 6-31g**. Ces bases sont constituées par la combinaison de fonction gaussiennes : 6 pour les orbitales de cœur et 4 (dont une plus diffuse) pour les orbitales de valence. Les indices « * » ou « ** » indiquent que des **fonctions de polarisation** ont été ajoutées, de manière à obtenir une meilleure description du système étudié. Ceci est réalisé en combinant chaque orbitale de valence avec une nouvelle orbitale de nombre quantique supérieur (ex : s avec p , ou p avec d). Dans le cas des bases « * », cette procédure ne concerne que les atomes « lourds » de la molécule (autres que H), tandis que dans celui des bases « ** », ces fonctions de polarisation sont appliquées à l'ensemble des atomes du système. Les calculs *ab initio* ont été réalisés à l'aide du logiciel *Gaussian 98*^[16].

3.3. Méthodes de mécanique moléculaire^[17]

Une grande part des systèmes auxquels la modélisation moléculaire s'intéresse ont une taille bien trop importante pour pouvoir être étudiés par des méthodes de mécanique quantique. Cette approche, qui s'intéresse aux électrons d'un système moléculaire, doit en effet traiter un nombre important de particules. Au final, le temps nécessaire au traitement d'un système par les méthodes *ab initio* est environ proportionnel à la 4^e puissance du nombre d'électrons qu'il contient. L'utilisation de ces techniques pour l'étude d'objets macromoléculaires tels qu'un complexe enzyme-ligand est donc à proscrire. Même les méthodes quantiques semi-empiriques, qui ne considèrent que les électrons de valence, se révèlent trop fastidieuses pour être appliquées à des systèmes tels que les protéines.

L'**approximation de Born-Oppenheimer** considère que les électrons d'une molécule peuvent s'adapter de manière presque instantanée à la position des noyaux. L'énergie d'un système est dès lors une fonction des coordonnées nucléaires. Cette approximation ouvre la voie à un **traitement plus simple**, dans lequel un système peut être décrit uniquement sur base des **coordonnées atomiques**. Le nombre de particules à traiter est dès lors considérablement réduit, ce qui permet l'étude d'objets de taille plus importante dans des temps de calcul accessibles. Cette approche est à la base de la **mécanique moléculaire**.

3.3.1. Les champs de forces

La **mécanique moléculaire** est basée sur un principe assez simple, dans lequel l'énergie d'un système est la somme d'une série de contributions rendant compte des interactions intramoléculaires et intermoléculaires. Dans chaque cas, des pénalités énergétiques sont appliquées lorsqu'une variable (par exemple, une longueur de liaison ou un angle de valence) s'écarte de sa valeur de référence. L'ensemble de ces termes et des paramètres destinés à décrire chaque type d'atome rencontré constitue un **champ de forces**, qui comporte dans la plupart des cas cinq contributions principales.

- **L'élongation des liaisons** (bond stretching) est un terme destiné à réguler la distance entre deux atomes liés de manière covalente. A l'origine, cette contribution a été exprimée sous forme d'un potentiel de Morse ou, de manière à rendre le calcul plus simple, par un potentiel harmonique (en x^2) issu de la loi de Hooke, qui détermine l'énergie associée à la déformation d'un ressort. De par cette analogie, les champs de forces sont souvent décrits comme des modèles de « boules et ressorts ». Suite aux approximations trop importantes du modèle harmonique, le terme en x^2 peut être corrigé par l'ajout de contributions en x^3 et x^4 , qui permettent de reproduire plus efficacement une courbe de Morse.
- **La déformation des angles de valence** (angle bending) est fréquemment représentée par une expression similaire à celle de l'élongation des liaisons, à savoir un terme en θ^2 corrigé par des contributions en θ^3 et θ^4 .

- **La modification des angles dièdres** (dihedral) impose l'utilisation d'un terme périodique. Une expression calculant l'énergie du système en fonction de $\sin\phi$ ou $\cos\phi$ est donc généralement employée.
- **Les interactions hors plan** (out of plane) constituent un terme correctif destiné à assurer la coplanarité de certains groupements, tels que des systèmes aromatiques.
- **Les interactions entre atomes non liés** (non bonding interactions) sont le plus souvent traitées par un terme représentant les forces de Van der Waals (par exemple un potentiel « 6-12 » de type Lennard-Jones) et un terme électrostatique.

Un grand nombre de champs de forces récents ajoutent à ces cinq fonctions principales des termes dits « croisés » (cross terms), qui rendent compte du couplage des différentes déformations et permettent d'améliorer la précision des résultats obtenus. D'autres champs ajoutent également un terme spécialement dédié à la description des ponts hydrogène.

Il est important de noter que les champs de forces constituent une **approche purement empirique**. Ils sont paramétrés de manière à ce que l'ensemble des différentes contributions permette de reproduire une série de résultats expérimentaux. Un champ doit donc toujours être considéré comme une entité indivisible et il est exclu de combiner les termes et/ou les paramètres de deux champs dans l'espoir d'obtenir un meilleur ensemble^[18]. En outre, le paramétrage vise souvent à ce que le champ de forces puisse traiter de manière réaliste une **catégorie particulière de composés**. On peut ainsi trouver des champs destinés plus spécialement à la modélisation de petites molécules organiques^[19], de macromolécules^[19], de nucléotides^[20] ou encore de complexes organométalliques^[19]. Il est donc dans un premier temps important de vérifier si le champ choisi est adapté au système à étudier.

Dans le cadre de ces travaux, nous utiliserons le champ de forces **cff91**^[19] (covalent forcefield 91) de la firme *Accelrys*. *Cff91* est un champ de classe 2, c'est à dire que ses paramètres proviennent non seulement de données empiriques mais également de résultats issus de la

mécanique quantique. Sa forme analytique, détaillée à la figure 6 et illustrée à la figure 7, comprend les cinq contributions classiques décrites plus haut, ainsi que sept termes croisés. Cff91 est plus particulièrement adapté à l'étude de **petites molécules organiques**, mais permet également de traiter des **macromolécules biologiques**.

$$\begin{aligned}
 E = & \sum {}^2K_b (b - b_0)^2 + {}^3K_b (b - b_0)^3 + {}^4K_b (b - b_0)^4 \quad (1) \\
 & + \sum {}^2K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + {}^3K_\theta (\theta - \theta_0)^3 + {}^4K_\theta (\theta - \theta_0)^4 \quad (2) \\
 & + \sum_\phi K_\phi (1 - \cos\phi) + {}^2K_\phi (1 - 2\cos\phi) + {}^3K_\phi (1 - \cos3\phi) \quad (3) \\
 & + \sum \chi K_\chi X^2 \quad (4) \\
 & + \sum_b \sum_{b'} K_{bb'} (b - b_0) (b' - b'_0) \quad (5) \\
 & + \sum_\theta \sum_{\theta'} K_{\theta\theta'} (\theta - \theta_0) (\theta' - \theta'_0) \quad (6) \\
 & + \sum_b \sum_\theta K_{b\theta} (b - b_0) (\theta - \theta_0) \quad (7) \\
 & + \sum_b \sum_\phi (b - b_0) [K_{\phi b} \cos\phi + {}^2K_{\phi b} \cos2\phi + {}^3K_{\phi b} \cos3\phi] \quad (8) \\
 & + \sum_{b'} \sum_\phi (b' - b'_0) [K_{\phi b'} \cos\phi + {}^2K_{\phi b'} \cos2\phi + {}^3K_{\phi b'} \cos3\phi] \quad (9) \\
 & + \sum_\theta \sum_{\theta'} (\theta - \theta_0) [K_{\phi\theta} \cos\phi + {}^2K_{\phi\theta} \cos2\phi + {}^3K_{\phi\theta} \cos3\phi] \quad (10) \\
 & + \sum_\theta \sum_{\theta'} \sum_\phi K_{\phi\theta\theta'} (\theta - \theta_0) (\theta' - \theta'_0) \cos\phi \quad (11) \\
 & + \sum_{i>j} (q_i \cdot q_j)/r_{ij} + \sum_{i>j} \epsilon_{ij} [2(r_{ij}^*/r_{ij}^9) - 3(r_{ij}^*/r_{ij}^6)] \quad (12)
 \end{aligned}$$

Figure 6 : Forme analytique du champ de forces *cff91*.

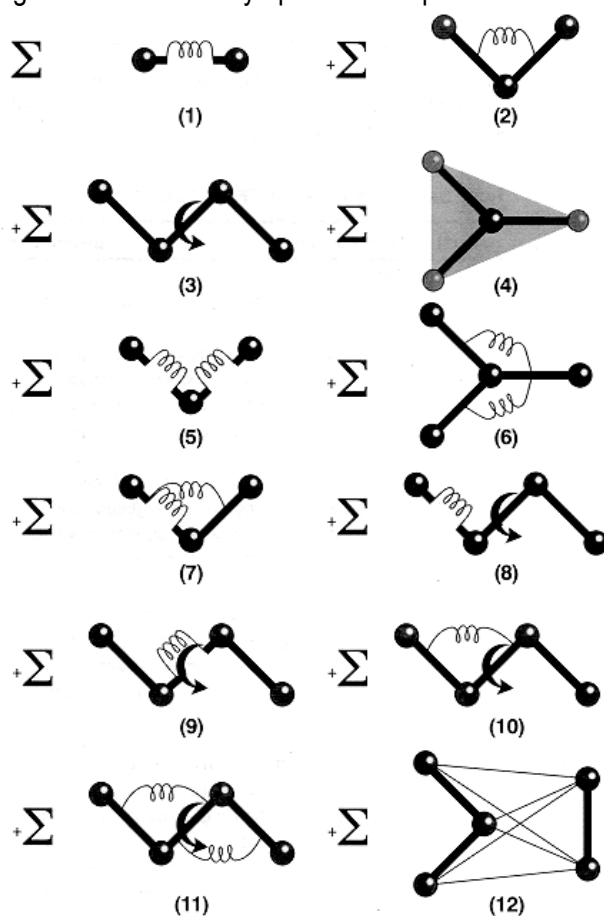


Figure 7 : Illustration graphique des termes du champ de forces *cff91*

3.3.2. Algorithmes de minimisation^[21]

L'énergie potentielle d'un système est donc une **fonction complexe** et multidimensionnelle des coordonnées des atomes qui le composent. La manière dont cette énergie varie en fonction de ces coordonnées est appelée **surface d'énergie potentielle**. Dans la majorité des cas, on s'intéresse plus particulièrement aux états les plus stables du système, c'est à dire à ceux qui possèdent une **énergie potentielle minimale**. Il est donc important de disposer d'algorithmes qui permettent d'**optimiser** rapidement la géométrie d'une molécule.

Les algorithmes utilisés dans le cadre de ce travail recherchent un minimum énergétique en se basant sur le **gradient** de la surface d'énergie potentielle, c'est à dire sur sa dérivée première par rapport aux coordonnées atomiques. Ce gradient indique la direction du minimum, tandis que sa valeur renseigne sur la « pente » locale de la fonction d'énergie.

Une méthode simple de minimisation de l'énergie consiste donc à emprunter la direction indiquée par le gradient le plus négatif, jusqu'au moment où la valeur de la fonction converge vers un premier minimum. A ce moment, le gradient de la fonction est recalculé et une nouvelle direction de recherche sera définie. Cette procédure constitue la méthode **steepest descents**^[22](figure 8), qui est extrêmement efficace et fiable dans le cas de systèmes très éloignés du minimum énergétique, mais peu adaptée aux systèmes qui en sont proches. En effet, les directions de recherches de cet algorithme sont systématiquement orthogonales entre elles, ce qui peut conduire à un comportement oscillant et retarder la découverte du minimum de la surface d'énergie potentielle. Dans de telles conditions, un second algorithme, **conjugate gradients**^[23] (figure 8), se révèle plus adapté. A chaque itération, cette méthode produit une direction de recherche qui tient en partie compte de celles déjà empruntées. Ceci permet une convergence plus rapide vers le minimum le plus proche.

Dans le cadre de ce travail, les deux algorithmes ont été combinés en vue de permettre l'optimisation rapide de la structure de petites molécules. Le processus débute par un traitement de type *steepest descents*, qui permet d'éliminer rapidement les interactions les plus défavorables et se poursuit par une procédure de *conjugate gradients*. Les seuils de

convergence requis pour ces deux algorithmes sont respectivement de $10 \text{ kcal mole}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ et $0.001 \text{ kcal mole}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$.

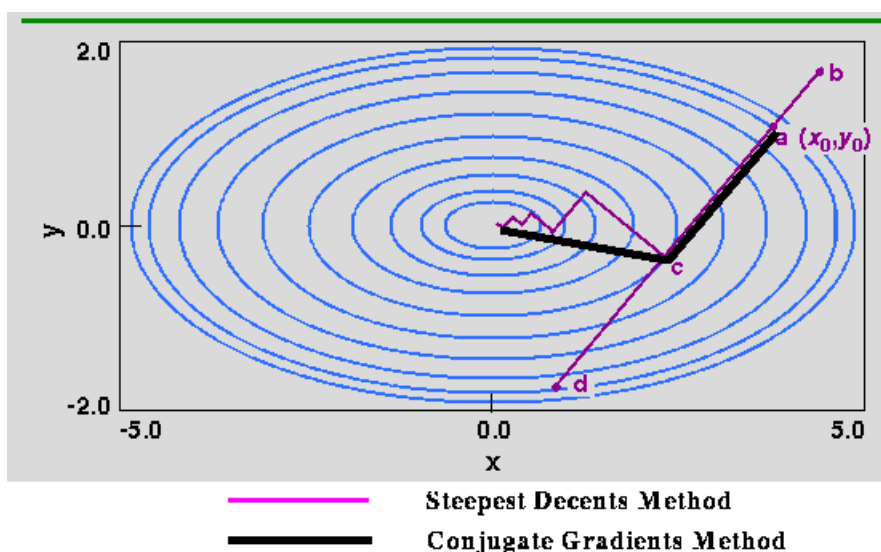


Figure 8 : Comparaison des deux algorithmes de minimisation utilisés. La méthode *steepest descents*, qui utilise une succession de trajectoires strictement orthogonales, mène à un comportement oscillant. L'algorithme *conjugate gradient*, qui tient compte des directions de recherche déjà empruntées, permet d'atteindre plus rapidement le minimum énergétique.

3.4. Analyse conformationnelle^[24]

Même si les algorithmes de minimisation basés sur le gradient de l'énergie potentielle permettent d'optimiser rapidement la géométrie d'un édifice moléculaire, ils ne résolvent qu'une partie du problème lié à la flexibilité de certaines molécules. En effet, ils ne permettent d'atteindre que le minimum énergétique le plus proche de la structure de départ. Il n'est donc pas certain que cette solution corresponde au **minimum global** de la surface d'énergie potentielle. En outre, il est généralement admis que même si la **conformation bioactive** d'une molécule (c.à.d. responsable de son activité biologique) est généralement proche d'une de ses conformations stables, elle ne correspond pas forcément au minimum énergétique global^[11]. On comprend donc tout l'intérêt d'une méthode capable d'explorer efficacement **l'espace conformationnel** d'un composé, c'est à dire la gamme de conformations qui lui sont accessibles.

Résoudre ce problème n'est pas une chose triviale dans le cas de composés très flexibles. Un rapide calcul montre que le nombre de minima énergétiques locaux accessibles à une molécule tend à augmenter de manière exponentielle avec le nombre de liaisons simples qu'elle contient. Ainsi, sans tenir compte de la rotation des groupes méthyle, il existe 3 minima énergétiques pour le butane (les trois conformations décalées) et déjà 9 pour le pentane (figure 9). Une molécule dotée de six liaisons rotatoires possède donc en théorie 3^6 soit 729 minima locaux, en considérant uniquement les possibilités liées à la modification des angles dièdres!

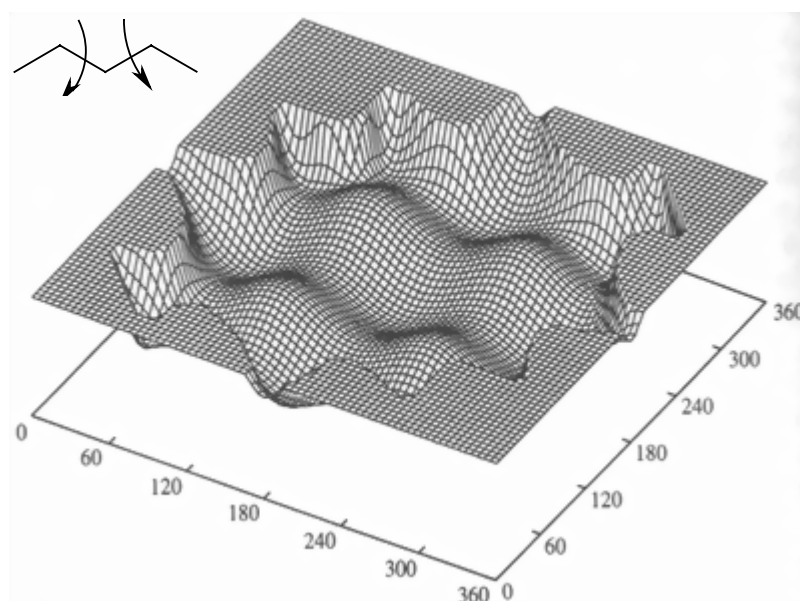


Figure 9 : Surface d'énergie potentielle obtenue par modification de deux angles dièdres de la molécule de n-pentane. On remarque la présence de 9 minima énergétiques locaux^[21]

3.4.1. La manière forte : recherche systématique

La manière la plus simple et la plus sûre d'explorer l'ensemble de l'espace conformationnel d'une molécule consiste à générer et à optimiser l'ensemble des possibilités imaginables. Cette approche est appelée **recherche systématique**. On peut ainsi définir une procédure automatisée dans laquelle chaque angle de torsion lié à une liaison rotatoire est modifié par intervalles réguliers. La géométrie de chacune de ces solutions est ensuite optimisée de manière à l'amener au minimum énergétique le plus proche. Pour peu qu'un intervalle suffisamment faible soit choisi (et donc qu'un nombre assez important de possibilités soient considérées), cette procédure permet de localiser avec certitude le minimum énergétique

global. On comprend cependant aisément qu'une étude par recherche systématique n'est envisageable que dans le cas de molécules relativement simples, qui ne comportent qu'un **faible nombre de liaisons rotatoires**. Pour des composés plus élaborés, les temps de calcul exigés par cette méthode se révèlent rapidement prohibitifs .

Dans le cadre de ce travail, les molécules étudiées par une procédure de recherche systématique ont vu chaque angle dièdre lié à une liaison rotatoire modifié par pas de 30°. Les structures générées ont ensuite été minimisées selon le processus décrit plus haut (cf point 3.1.3.3).

3.4.2. La méthode douce : dynamique moléculaire^[25]

La **dynamique moléculaire** est une des méthodes qui permettent d'explorer l'espace conformationnel d'une structure complexe. Elle est applicable à une large gamme de systèmes, qui vont des composés d'intérêt pharmaceutique aux macromolécules. Dans son expression la plus simple, cette technique se base sur les **lois du mouvement de Newton**.

$$-\frac{dV}{dx} = F = ma = m \frac{d^2x}{dt^2}$$

où **V** est le potentiel auquel est soumise une particule, **x** est la position de la particule, **F** est la force qui agit sur la particule, **m** est la masse de la particule, **a** est l'accélération à laquelle est soumise la particule et **t** est le temps

Cette équation est applicable à un système étudié par mécanique moléculaire, puisqu'un champ de forces exprime précisément l'énergie potentielle sous forme d'une fonction des coordonnées atomiques. Il est donc à tout moment possible de calculer la **force** qui agit sur chaque atome et l'**accélération** à laquelle il est soumis. Ceci permet d'évaluer sa **position** et sa **vitesse** après un intervalle de **temps** donné, grâce à l'algorithme d'intégration *Velocity Verlet*.

$$\text{position} : x(t+\Delta t)=x(t)+\Delta t v(t)+\frac{\Delta t^2 a(t)}{2}$$

$$\text{vitesse} : v(t+\Delta t)=v(t)+\frac{1}{2}\Delta t[a(t)+a(t+\Delta t)]$$

Le choix de l'**intervalle Δt** utilisé (souvent désigné *timestep*) possède une importance particulière (figure 10). Un temps trop court amène de nombreuses opérations inutiles et augmentent donc les temps de calcul nécessaires à l'étude du système. Un intervalle trop long laisse les atomes parcourir une très grande distance entre deux étapes, ce qui peut notamment amener des collisions violentes, suite à des conflits stériques entre les atomes. De manière générale, les intervalles de temps utilisés pour générer la trajectoire des atomes lors d'une simulation de dynamique moléculaire sont de l'ordre de 10^{-15} s.

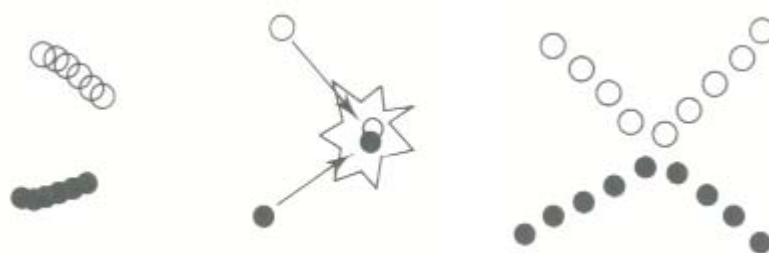


Figure 10 : L'utilisation en dynamique moléculaire d'un intervalle de temps trop court (gauche) ralentit inutilement le calcul des trajectoires atomiques. Un intervalle trop long (centre) mène à des collisions très violentes et à des situations instables. Un intervalle de temps approprié (droite) permet de calculer efficacement les trajectoires atomiques, tout en gardant des collisions acceptables.

En début de simulation, une **vitesse initiale** est assignée à chaque atome, grâce à une procédure aléatoire qui simule une distribution de **Maxwell-Boltzmann** correspondant à une température choisie par l'utilisateur :

$$p(v_{ix})=\left(\frac{m_i}{2\pi k_B T}\right)^{1/2} \exp\left[\frac{-1}{2} \frac{m_i v_{ix}^2}{k_B T}\right]$$

Cette équation exprime la probabilité qu'un atome i de masse m_i ait une vitesse v_{ix} à la température T . Elle introduit donc la **notion de température** au sein des méthodes de dynamique moléculaire. Plus la température est élevée, plus la vitesse communiquée aux atomes sera importante. On fournit donc au système une certaine quantité d'**énergie cinétique**,

qui lui permet de franchir les barrières d'**énergie potentielle**, comme l'indique la figure 11. Pour peu que la température soit suffisamment importante, une molécule est alors capable d'adopter toutes les conformations possibles.

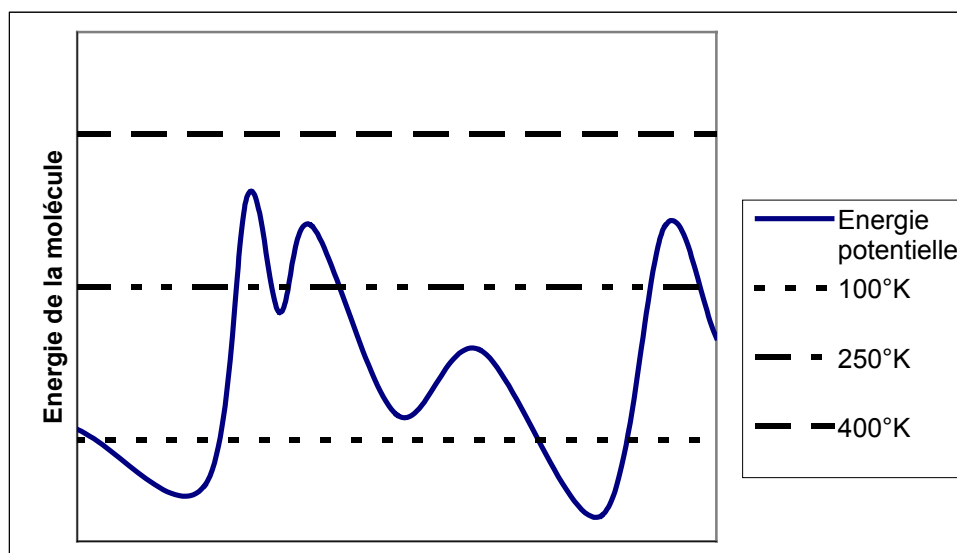


Figure 11 : Influence de la température simulée sur l'énergie d'une molécule au cours d'une dynamique moléculaire. A faible température, la molécule est incapable de franchir les barrières d'énergie potentielle liées aux changements de conformation. Plus la température simulée est élevée, plus l'énergie cinétique communiquée à la molécule augmente. A une température suffisante, la molécule est en mesure de franchir l'ensemble des barrières d'énergie potentielle.

Au cours de la simulation, la température et l'énergie cinétique des molécules peuvent être fixées ou modifiées par diverses méthodes. La plus évidente consiste à contrôler régulièrement la température effective du système (qui peut être calculée sur base de l'énergie cinétique des atomes) et d'ajuster, par une simple mise à l'échelle, la vitesse des particules de manière à refléter la température choisie. Cette technique est connue sous le nom de **direct velocity scaling**.

En général, une simulation de dynamique moléculaire débute ainsi par une phase de **mise à l'équilibre**, qui permet aux différentes variables thermodynamiques du système de se stabiliser. Une fois la mise à l'équilibre réalisée, la configuration du système peut être enregistrée à intervalles de temps réguliers, durant une phase de **collecte des données**. Ces structures peuvent ensuite être optimisées de manière à générer un échantillon de conformations stables, qu'on espère représentatif de l'espace conformationnel de la molécule. Cette approche peut

cependant fournir plusieurs structures caractérisées par une énergie potentielle importante. En effet, il est possible que lors de la minimisation certaines des solutions se retrouvent « piégées » dans une zone peu favorable (figure 12). Une méthode permettant au système d'éviter ces régions de la surface d'énergie potentielle pourrait donc permettre d'obtenir des solutions plus représentatives de l'espace conformationnel de la molécule.

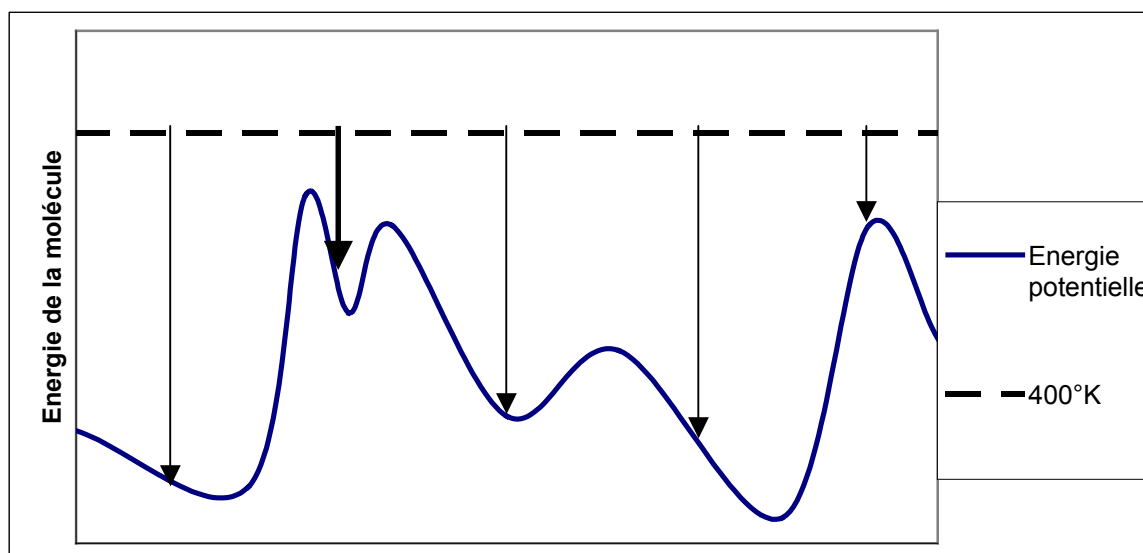


Figure 12 : Une minimisation directe des structures générées par dynamique moléculaire peut mener à des conformations possédant une énergie potentielle relativement élevée, car certaines solutions sont piégées dans des zones peu favorables de la surface d'énergie potentielle.

3.4.3. « Recuit » simulé, ou *simulated annealing*

A l'origine, la méthode dite d'*annealing*, ou de « **recuit** » consiste à refroidir très lentement et minutieusement un matériau fondu, afin de lui permettre d'organiser au mieux sa structure moléculaire. Ceci mène à la formation de larges cristaux, qui d'un point de vue chimique correspondent à l'état le plus stable du système, qui possède une **énergie libre minimale**. Cette procédure est largement employée dans l'industrie, par exemple pour obtenir les macrocristaux de silicium utilisés dans la fabrication des microprocesseurs.

Le *simulated annealing*^[26], ou « **recuit** » simulé, est une procédure informatique qui imite cette technique industrielle, de manière à identifier les réponses optimales à un problème qui possède un grand nombre de solutions possibles. Une **fonction de score** joue alors le rôle de

l'énergie libre, tandis qu'un **paramètre de contrôle** permet de simuler l'effet de la température. Dans le cas d'une recherche conformationnelle réalisée par dynamique moléculaire, l'énergie interne d'une molécule constitue une bonne fonction de score, tandis que la température du système peut être utilisée comme paramètre de contrôle. Une diminution progressive de la température du système permet ainsi de réduire son énergie cinétique et de le forcer à **occuper les états de plus basse énergie**. Les structures qui correspondent à ces états peuvent alors être collectées et optimisées (figure 13). L'avantage de cette technique par rapport à une simple minimisation est qu'elle laisse une certaine liberté d'évolution à la molécule étudiée, ce qui évite le confinement du système dans des minima locaux trop défavorables. Il est cependant important de noter que le *simulated annealing* reste une procédure **aléatoire**. Elle ne peut garantir que le minimum énergétique global a été identifié, mais elle s'en approchera probablement, pour peu qu'un ensemble suffisant de configurations soit collecté.

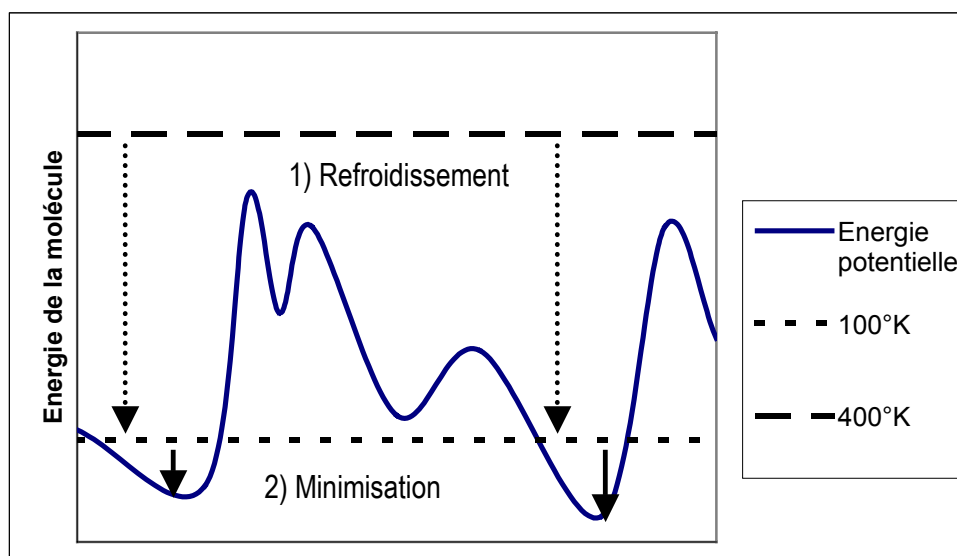


Figure 14 : Au cours d'une procédure de *simulated annealing*, les solutions générées (ici par dynamique moléculaire) sont dans un premier temps « refroidies » de manière à occuper les zones stables de la surface d'énergie potentielle. Ces structures peuvent ensuite être optimisées.

Le *simulated annealing* a été largement utilisé dans le cadre de ces travaux. La plupart des structures étudiées ont en effet été soumises à une procédure de dynamique moléculaire destinée à échantillonner leur espace conformationnel et à estimer l'énergie attribuée à la conformation la plus stable. Pour ce faire, une température de 1000°K est dans un premier temps simulée (*timestep*, 3fs). Après une période de mise à l'équilibre de 2ps (2000fs), un

premier échantillonnage est réalisé, en enregistrant la configuration du système à intervalles réguliers de 2000fs. En fonction de la flexibilité de la molécule, la taille de l'échantillon collecté varie de 20 à 100 structures. Chaque structure est ensuite refroidie à 100°K (timestep : 1fs), puis minimisée.

3.5. Docking

Le **docking** vise à prédire la **structure d'un complexe** formé par deux molécules, voir d'avantage. Cette procédure est particulièrement utile pour comprendre le **mode de liaison** d'un ligand, c'est à dire la manière dont il interagit avec la macromolécule cible. Comme dans le cas de l'analyse conformationnelle, ce problème comporte un grand nombre de solutions possibles. A l'ensemble des degrés de liberté liés à la **flexibilité** d'un ligand viennent en effet s'ajouter ceux associés à sa **position** et à son **orientation** au sein du complexe. Cette situation est donc comparable à celle d'un puzzle en trois dimensions dont la pièce maîtresse, le ligand, est dans une certaine mesure malléable et peut prendre une grande variété de formes. On comprend rapidement que la prise en compte de la flexibilité de la protéine complique encore davantage la recherche d'un mode d'interaction. C'est pourquoi la plupart des simulations de *docking* sont réalisées **en considérant la protéine comme une entité rigide**, bien qu'un ajustement de certains résidus soit parfois possible.

3.5.1. Monte Carlo^[27]

Dans sa forme la plus simple, le *docking* peut être réalisé manuellement, en utilisant un logiciel qui permet de manipuler les différents éléments du complexe. Cette approche peut se révéler efficace, pour peu qu'on dispose déjà d'informations réellement pertinentes sur le mode de liaison du ligand comme par exemple la structure d'un complexe impliquant une molécule très similaire à celle étudiée. Elle reste cependant risquée, car les expériences de diffraction de rayons X ont déjà prouvé que deux composés de structure très proche peuvent adopter des modes de liaison radicalement différents. La plupart du temps, une procédure informatique se révèle plus impartiale que le chercheur qui la met en oeuvre et permet de mieux répondre à la multidimensionalité du problème, en considérant un plus grand nombre de possibilités.

Un grand nombre de méthodes utilisées pour l'analyse conformationnelle d'un ligand isolé peuvent être appliquées au *docking*. Il suffit par exemple de considérer que l'**énergie d'interaction protéine-ligand** (ou l'énergie totale du complexe formé) joue le rôle de fonction de score, tandis que la position et l'orientation du ligand sont introduites dans les variables à optimiser. D'autres fonctions, telles que le nombre de ponts hydrogène formés ou une expression de la complémentarité entre les composants du complexe peuvent être employées. En ce qui concerne la génération et l'évaluation des hypothèses, la dynamique moléculaire n'est généralement pas utilisée. Deux méthodes lui sont préférées : la recherche Monte Carlo et les algorithmes génétiques.

Une simulation de type **Monte Carlo** repose sur la génération d'un nombre important de configurations selon un **processus itératif**, ainsi que sur l'utilisation de **critères** visant à accepter ou rejeter ces solutions. A chaque étape, une nouvelle hypothèse est générée en modifiant de manière **aléatoire** les degrés de liberté liés à la position, à l'orientation et à la conformation du ligand. La pertinence de cette configuration est évaluée grâce à une fonction de score, par exemple une énergie d'interaction. Si la nouvelle solution se révèle plus efficace que l'ancienne ($\Delta E < 0$), elle est automatiquement acceptée et devient la nouvelle hypothèse de référence. Dans le cas contraire, son acceptation dépend d'une probabilité calculée par analogie à une distribution de Maxwell-Boltzmann.

$$p(\Delta E) = \exp\left(\frac{-\Delta E}{RT}\right)$$

Un nombre aléatoire compris entre 0 et 1 est alors généré. Si il est compris dans la gamme de probabilité qui a été calculée, l'hypothèse est acceptée en tant que nouvelle référence. Dans le cas contraire, elle est définitivement rejetée. Cette règle de sélection est appelée « **critère Metropolis** ». Deux points importants peuvent être déduits de son expression. D'une part, plus la différence d'énergie entre deux configurations augmente, plus la probabilité d'acceptation diminue. D'autre part, plus la température du système diminue, plus le critère de sélection se

montre sévère. Ces propriétés permettent l'implémentation d'une procédure de *simulated annealing*, telle qu'elle a été décrite précédemment.

3.5.2. Algorithmes génétiques

Les **algorithmes génétiques**^[28, 29], également utilisés dans le cadre des simulations de *docking*, s'inspirent des principes naturels de l'évolution biologique, tels qu'ils ont été formulés par **Darwin** et qui considèrent que seules les créatures les plus adaptées à leur environnement survivent. La méthode des algorithmes génétiques imite ce phénomène naturel en favorisant, au cours de l'évolution de la procédure de recherche, les réponses les plus pertinentes au problème posé, de manière à constituer au fil des générations un ensemble de solutions adaptées.

Par analogie à l'évolution biologique, les éléments principaux de la méthode comprennent :

- Une **population** fixe de solutions appelées individus ou chromosomes.
- Une **compétition** entre ces individus, sur base d'une fonction de score qui évalue leur pertinence.
- Un processus de **reproduction** qui permet aux solutions les plus adaptées de leur génération de transmettre leurs caractéristiques aux générations suivantes.
- Des **variations** semi-aléatoires qui permettent d'introduire une certaine diversité dans la population.

En pratique, chaque **individu** correspond à une **configuration** particulière du système, codée de manière numérique. On retrouve ainsi dans le **chromosome** les informations liées à la position, l'orientation et la conformation du ligand.

En début de simulation, une première population aux caractéristiques aléatoires est générée. La performance des différentes solutions est alors évaluée par la fonction de score. Une série d'**opérateurs génétiques** se charge ensuite de constituer la population de la génération suivante.

- La **reproduction sélective** vise à favoriser la transmission des informations contenues dans les chromosomes les mieux adaptés. Les individus caractérisés par le plus haut score lors de leur évaluation ont plus de chance d'être reproduits dans la génération suivante. Le critère de sélection le plus courant est la « *roulette wheel* », qui accorde à chaque solution une probabilité de reproduction proportionnelle au score obtenu. Cet opérateur est nécessaire à l'optimisation des populations, mais ne permet pas d'explorer des possibilités qui n'étaient pas représentées dans la population initiale. Il doit donc être complété par des mécanismes permettant d'introduire de la diversité dans les solutions.
- L'opérateur de **recombinaison**, ou *crossover*, permet de scinder aléatoirement, mais de manière identique, deux chromosomes. Les fragments d'information sont alors échangés, ce qui mène à deux nouveaux chromosomes de même taille, mais différents au niveau de l'information véhiculée. Ce opérateur ne suffit cependant pas à amener une réelle diversité au sein d'une population. Il se contente de combiner des fragments d'information déjà présents au départ.
- L'opérateur de **mutation** désigne au hasard un gène d'un chromosome et le mute, c'est à dire qu'il remplace l'information qui y est contenue par une valeur aléatoire. Ces changements peuvent être effectués sur toute la population, mais cet opérateur est généralement associé à une faible probabilité d'exécution, de manière à ne pas perturber outre mesure les individus les plus prometteurs. Il permet cependant d'**introduire de la diversité** parmi les différents candidats.

Au final, un algorithme génétique permet d'optimiser graduellement une population d'hypothèses. Cette procédure étant basée sur un **mécanisme aléatoire**, elle ne peut cependant garantir que le minimum énergétique global ait été atteint.

3.5.3. Autodock 3.0

Autodock 3.0^[30] (Automated docking of flexible ligands to receptors) est un logiciel conçu pour étudier l'interaction d'un ligand avec sa cible macromoléculaire, en identifiant et en classant les modes de liaison envisageables. La recherche de solutions optimales peut être réalisée soit par une simulation de type Monte Carlo combinée à du *simulated annealing*, soit par un algorithme génétique. Ce dernier peut être associé à une recherche locale, qui permet d'affiner régulièrement une solution choisie au hasard, en vue d'obtenir un score optimal.

La fonction de score d'*Autodock* est basée sur une **grille tridimensionnelle**. En chaque point de la grille, un **potentiel d'affinité** atomique est précalculé pour chaque type d'atome rencontré dans le ligand. Ces paramètres sont complétés par un **potentiel électrostatique**. En interpolant les valeurs de potentiel qui entourent chaque atome d'un ligand positionné dans la grille, il est alors possible d'évaluer une énergie d'interaction protéine-ligand. Les résultats obtenus sont ensuite corrigés par un terme de solvation et un terme rendant compte de l'énergie interne du ligand.

Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes cantonnés à utiliser une procédure associant algorithme génétique et recherche locale. Les conditions précises de la simulation varient en fonction de la complexité du composé étudié (taille, nombre de liaisons rotatoires,...). Entre 20 et 200 hypothèses de complexes ont été générées pour chaque composé étudié. Chacune provient de l'optimisation d'une population de 50 à 100 individus, au cours d'un processus impliquant entre 100000 et 1000000 évaluations par la fonction de score du logiciel. Les solutions retenues ont ensuite été rassemblées en « clusters », au sein desquels l'écart moyen sur la position du ligand (RMS) est inférieur à 1Å.

3.5.4. Affinement des solutions

L'étude d'un ligand à l'aide d'une méthode telle que celle implémentée dans *Autodock* présente de nombreux avantages, mais n'en reste pas moins perfectible. Tout d'abord, l'utilisation d'une grille de potentiels précalculés implique une **rigidité totale de la protéine cible**. Il n'est donc

pas possible de prendre en compte l'adaptation de la protéine à son ligand et ceci peut évidemment entraîner des erreurs lors de l'évaluation de l'énergie d'interaction. Il convient ensuite de remarquer que comme nombre de procédures de *docking*, *Autodock* considère chaque cycle de la molécule comme une entité rigide. Ceci est également d'application pour les cycles saturés tels que les cyclohexyles, alors que la plupart d'entre eux sont capables d'adopter plusieurs conformations. Enfin, le champ de forces utilisé par *Autodock*, même si il est bien adapté à une simulation de *docking*, se révèle peu efficace dans la gestion des liaisons rotatoires du ligand, ce qui conduit parfois à des situations irréalistes. Il est donc nécessaire **d'affiner les solutions** retenues au terme d'une simulation de *docking* à l'aide d'une procédure plus rigoureuse.

Pour ce faire, nous avons choisi de **minimiser** l'énergie potentielle associée à la structure des complexes obtenus, grâce au module *Discover3*^[19], implémenté dans le logiciel *InsightII*. Cette opération est réalisée en utilisant le champ de forces *cff91*, ce qui permettra un traitement plus réaliste des ligands étudiés. Deux simplifications ont cependant été introduites. La première est l'utilisation d'une distance de **cutoff**, au delà de laquelle les interactions entre atomes non liés ne sont plus prises en compte^[19]. En effet, ces interactions diminuent rapidement avec la distance, à savoir en $1/r$ pour les forces électrostatiques (Coulomb) et en $1/r^6$ pour les forces de Van der Waals. Passé un certain seuil, leurs contributions peuvent donc être considérées comme négligeables. Dans le cadre de ce travail, la valeur du *cutoff* a été fixée à 12Å. Afin d'éviter les discontinuités dans l'énergie, les interactions non nulles à cette distance ont été progressivement supprimées grâce à l'utilisation d'une zone tampon, qui s'étend sur 3Å supplémentaires. La deuxième simplification porte sur la valeur de la **constante diélectrique** utilisée. Dans les faits, cette constante ϵ_r prend une valeur d'environ 4 au cœur d'une protéine et de 80 en milieu aqueux. Une constante diélectrique distance dépendante ($\epsilon_r = 1*r$), souvent utilisée pour la modélisation des protéines, a ici été utilisée.

Le processus d'affinement retenu permet de tenir compte, dans une certaine mesure, de la **flexibilité de l'enzyme**. Dans un premier temps, seule la structure du ligand est optimisée. La flexibilité du site de liaison (une zone de 10Å autour de l'inhibiteur) est alors progressivement restaurée. Ainsi, les chaînes latérales des résidus du site allostérique sont les premières à être

libérées. Les chaînes principales sont ensuite autorisées à se déplacer, monnayant l'application de **contraintes dégressives** de 20, 10 et 0 kCal mol⁻¹ Å⁻¹. A chaque étape, le seuil de convergence requis est de 0.01 kCal mol⁻¹ Å⁻². En fin de minimisation, l'énergie d'interaction TI-INNTI est estimée par les termes de Coulomb et Van der Walls présents dans *cff91*.

Un affinement plus poussé des solutions obtenues est encore possible. On peut notamment envisager de traiter de manière plus réaliste la flexibilité du site allostérique de la TI, grâce à un processus de dynamique moléculaire. Ces procédures sont cependant trop coûteuses en temps de calcul pour être appliquées aux séries d'inhibiteurs étudiées dans le cadre de ce travail. L'exception à cette règle réside dans les ligands possédant de larges cycles saturés (cycloheptyle, cyclooctyle ou cyclononyle), dont la flexibilité n'est pas prise en compte par la procédure de *docking*. Dans ce cas précis, une dynamique moléculaire impliquant uniquement l'inhibiteur du complexe TI-INNTI a été réalisée, afin de permettre une meilleure adaptation au site de liaison.

3.6. Calcul du logP

La lipophilie est un paramètre physico-chimique décrivant l'affinité d'une substance pour les graisses. Elle conditionne en partie le passage d'une molécule à travers une membrane biologique et influence donc certaines propriétés pharmacologiques importantes, comme la biodisponibilité^[31] d'un composé ou sa pénétration dans le système nerveux central^[32]. Son étude présente donc un intérêt particulier dans le cadre de la conception de nouveaux inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH-1.

La lipophilie d'une molécule est fréquemment caractérisée par une valeur de log P, qui est le logarithme du coefficient de partage (P) de la molécule entre deux phases non miscibles, qui sont généralement le n-octanol et l'eau. D'un point de vue expérimental, le log P peut être déterminé grâce à plusieurs méthodes, telles que la mesure des concentrations en composé dans chacune des deux phases, à l'équilibre, ou encore par utilisation de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

La mesure expérimentale du log P peut rapidement s'avérer coûteuse en temps et en matériel si une large gamme de composés doit être étudiée. De plus, il est parfois intéressant de pouvoir estimer rapidement une valeur de log P pour un composé qui n'a pas encore été obtenu, par exemple pour épargner la synthèse d'une molécule dotée de propriétés trop défavorables.

L'avènement de la chimie combinatoire a favorisé le développement de nombreuses méthodes de prédiction du log P. Les procédures les plus couramment utilisées sont dites « méthodes fragmentales » et définissent le log P comme étant la somme d'une série de contributions liées à chaque fragment (groupes méthyle, hydroxy, carbonyles,...) présent dans la molécule. Elles dérivent, à des degrés divers, de la méthode de Rekker, qui fut le premier à assigner des constantes fragmentales à une variété de groupements^[33, 34].

De manière générale, les méthodes fragmentales de prédiction du log P peuvent être classées en deux grandes catégories. Les procédures **réductionnistes**, comme celle de Rekker, dérivent leurs paramètres d'une analyse statistique (régressions linéaires multiples,...) réalisée sur un grand nombre de molécules. Les approches **constructionnistes**, comme celle de Hansch et Leo^[35, 36], se basent sur une série restreinte de groupements simples, à partir desquels sont construits les fragments les plus complexes.

Dans le cadre de nos travaux, nous utiliserons la méthode ***Molinspiration***, qui est issue d'une approche réductionniste.

3.7. Calcul de l'énergie de solvation d'un composé

Parmi les différents facteurs impliqués dans le repliement (folding) d'une protéine ou à la formation d'un complexe enzyme-inhibiteur, la solvation (ou à la désolvation) joue souvent un rôle non négligeable. Le calcul des énergies de solvation peut donc présenter un intérêt particulier dans le cadre de l'étude de molécules d'intérêt biologique. Il peut cependant s'avérer fastidieux pour un système très élaboré, tel qu'un complexe enzyme-inhibiteur.

La méthode proposée en 1987 par Ooi *et al*^[37] permet d'évaluer rapidement l'énergie de solvation d'un composé. Elle postule d'une part que l'interaction d'un groupe fonctionnel avec

le solvant qui l'entoure est directement proportionnelle à la surface qui lui est exposée. Elle considère d'autre part que l'énergie libre de solvation d'une molécule peut être calculée en sommant les contributions respectives de chaque groupement ou atome qui la composent :

$$\Delta G_h^0 = \sum_i g_i A_i$$

Cette relation contient une constante de proportionnalité g_i ($\text{kcal mole}^{-1} \text{\AA}^{-2}$), qui symbolise la contribution d'un groupement par unité de surface exposée au solvant et la variable A_i représentant cette surface, qui dépend de la conformation de la molécule.

La méthode de Ooi *et al* se base sur une approche constructionniste, comparable à celles qui sont parfois utilisées pour le calcul théorique du logP d'une molécule. Les paramètres utilisés sont ainsi déduits de l'étude d'une série assez limitée de molécules très simples, dont les énergies libres de solvation peuvent être déterminées expérimentalement et pour lesquelles les changements de conformation peuvent être considérés comme négligeables. Ceci permet une déduction aisée des valeurs de A_i et g_i liées à chaque fonction. Le calcul de l'énergie de solvation d'une molécule plus complexe est dès lors réalisé en décomposant cette dernière en fragments simples et en sommant chaque contribution. Bien que cette méthode ait dans un premier temps été utilisée pour l'étude de peptides, elle peut *a priori* être appliquée à l'étude de molécules telles que des inhibiteurs de la TI. Elle ne fournit cependant des paramètres que pour les atomes le plus courants (C, H, O, N et S, aucun halogène)

Dans le cadre de nos travaux, la méthode de Ooi *et al* a été utilisée pour évaluer la pénalité énergétique liée à la désolvatation des inhibiteurs étudiés. La valeur obtenue étant fonction de la conformation de l'inhibiteur, nous avons choisi d'utiliser pour chaque composé une valeur moyenne calculée sur un ensemble de structures représentatives, issues de l'analyse conformationnelle par dynamique moléculaire de la molécule. Cette procédure mène à des résultats plus reproductibles.

3.8. Tests biologiques

Bien qu'elle n'ait pas été réalisée par nos soins, l'**évaluation biologique** des composés étudiés tient de toute évidence une part importante dans ce travail. En effet, la conception de molécules possédant une activité inhibitrice de la réplication du VIH-1 constitue l'un de nos objectifs principaux. De plus, ces résultats expérimentaux permettent de **valider** les travaux de modélisation qui ont été réalisés. Nous avons donc jugé utile d'expliquer brièvement la manière dont ces tests biologiques ont été réalisés, ainsi que les résultats qui peuvent en être tirés.

3.8.1. Test *in vitro* d'inhibition enzymatique

Ce travail portant sur la conception de molécules inhibitrices de la transcriptase inverse du VIH-1, il est dans un premier temps utile de **vérifier l'action de ces composés sur l'enzyme cible**. Un test *in vitro* d'activité enzymatique, dans lequel la TI est mise en présence d'un inhibiteur, constitue l'une des meilleures validations possibles.

Le test réalisé mesure le taux d'incorporation d'un nucléotide marqué d'un isotope radioactif (tritium, ^3H) au sein d'un brin d'ADN en croissance. La **réduction du taux d'incorporation** observée est alors représentative de l'inhibition engendrée par un composé. La réaction enzymatique est réalisée dans un volume de 50 μl . Le mélange réactionnel contient 0.125 unité de TI, MgCl_2 (10mM), KCl (50mM), DTT (2mM), Tris pH8.3 (50mM), BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Triton X100 (0.01%), $[\text{H}]^3\text{dGTP}$ (1 μCi), un template d'ARN à rétrotranscrire (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de poly(rC)-oligo(dG)) et l'inhibiteur à tester, à une concentration de 10 μM . Une fois tous les composants en présence, on laisse la réaction se dérouler durant 10 minutes, à 37°C. L'ADN formé est alors précipité par ajout d'acide trichloroacétique, et la quantité de nucléotides intégrés est quantifiée grâce à un compteur à scintillations.

Une alternative à ce test consiste à mesurer l'activité enzymatique résiduelle à des concentrations variables en inhibiteur. Cette procédure permet de définir une **concentration inhibitrice 50 (CI_{50})**, qui représente la concentration en inhibiteur bloquant 50% de l'activité enzymatique.

3.8.2. Mesure du pouvoir antiviral ex vivo

Un test d'inhibition enzymatique *in vitro*, même s'il permet de valider le mode d'action d'un composé, n'offre souvent qu'une information assez subjective sur son efficacité réelle. En effet, les conditions expérimentales liées à un tel test sont souvent fort éloignées de celles rencontrées dans un organisme vivant ou dans un milieu cellulaire. Il est donc indispensable d'évaluer les composés étudiés dans des **conditions plus réalistes**, par exemple en mesurant leur effet sur la réplication du VIH-1 au sein d'un système cellulaire (test *ex vivo*).

Dans le cadre de ce travail, cette étude a été réalisée en utilisant une lignée cellulaire P4. Ces cellules, permissives au VIH-1, sont modifiées de manière à inclure un **gène rapporteur** *lacZ*, qui code pour une enzyme de type β -galactosidase. L'expression de ce gène est régulée par la séquence LTR du VIH-1 et l'accumulation de β -galactosidase dépend donc de la présence de la protéine virale Tat. **L'activité β -galactosidase est donc proportionnelle à la réplication virale.**

Dans la pratique, des cellules P4 sont tout d'abord mises en culture (incubation à 37°C, 5% CO₂) pendant 48h. Un INNTI est alors ajouté dans le milieu, à des concentrations variables. Après quatre heures d'attente, les cellules sont infectées par des quantités égales de virus. Après 48h d'incubation supplémentaire, l'activité β -galactosidase est quantifiée grâce à une coloration au CPRG. L'absorbance des solutions est mesurée grâce à un microcolorimètre, à une longueur d'onde de 570 nm. Ces mesures permettent d'attribuer à un composé une valeur de **concentration efficace 50 (EC₅₀)**, qui correspond à la concentration en inhibiteur inhibant 50% de la réplication virale.

3.8.3. Evaluation de la cytotoxicité des molécules

Une autre donnée biologique importante pour les composés d'intérêt pharmaceutique est leur **cytotoxicité**. Il est en effet indispensable qu'un inhibiteur ne soit pas toxique aux concentrations auxquelles il est efficace. La valeur de **concentration cytotoxique 50 (CC₅₀)** a été déterminée à l'aide d'un test de viabilité cellulaire adapté de la littérature. Les cellules P4

sont ainsi placées en présence de différentes concentrations du composé à évaluer. Après trois jours d'incubation (37°C, 5%CO₂), la viabilité des cellules traitées est mesurée grâce à une coloration au MTT (Roche Cell Prolifération Kit) et comparée à celle de cellules non traitées.

La valeur de CC₅₀ ainsi obtenue permet de calculer un **indice de sélectivité (IS)** en divisant la CC₅₀ par la CE₅₀. Plus cet indice est élevé, plus il existe une marge importante (et donc favorable) entre la toxicité d'un composé et son pouvoir antiviral.

Bibliographie.

1. X Ray. 1997, Encyclopædia Britannica, Inc.http://www.britannica.com/nobel/micro/646_57.html
2. "X-Ray tube". 2000, Georgia State University.<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/quantum/xtube.html>
3. Bremsstrahlung X-Rays. 2000, Georgia State University.<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/quantum/xrayc.html#c2>
4. Characteristic X-Rays. 2000, Georgia State University.<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/quantum/xrayc.html#c2>
5. Bragg Law. 1997, Encyclopædia Britannica, Inc.http://www.britannica.com/nobel/micro/83_20.html
6. Nonius, CAD-4 MACH3 : A Collect Software. 2000, Nonius B.V. and Delft Instruments: Delft, The Netherlands
7. Sheldrick, G.M., *SHELXL-97 : Program for the Refinement of Crystal Structures*. 1997, Institut für Anorganische Chemie der Universität Göttingen: Göttingen, Germany
8. Spek, A.L., *PLATON : A Multipurpose Crystallographic Tool*. 2001, Vakgroep Algemene Chemie, Utrecht Universiteit, Afdeling Kristal en Structuurchemie: Utrecht, The Netherlands
9. Johnson, C.K., *ORTEP-II. A Fortran Thermal-Ellipsoid Program*,. 1976: Report ORNL-5138, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA
10. Wouters, J.; F. Ooms, *Small molecule crystallography in drug design*. Current Pharmaceutical Design, 2001. **7**(7): p. 529-545.
11. Vieth, M.; J.D. Hirst; C.L.I. Brooks, *Do active site conformations of small ligands correspond to low free-energy solution structures?* Journal of Computer-Aided Molecular Design, 1998. **12**: p. 563-572.
12. Allen, F.H., *The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising*. Acta Crystallographica, Section B: Structural Science, 2002. **B58**(3, No. 1): p. 380-388.
13. Berman, H.M.; T. Battistuz; T.N. Bhat; W.F. Bluhm; P.E. Bourne; K. Burkhardt; Z. Feng; G.L. Gilliland; L. Iype; S. Jain; P. Fagan; J. Marvin; D. Padilla; V. Ravichandran; B. Schneider; N. Thanki; H. Weissig; J.D. Westbrook; C. Zardecki, *The Protein Data Bank*. Acta crystallographica Section D, 2002. **D58**: p. 899-907.
14. Leach, A.R., *Quantum Mechanical Models*, in *Molecular modeling : Principles and applications*. 1996, Addison Wesley Longman Ltd.: Harlow. p. 25-130.
15. Burkert, U.; N.L. Allinger; Editors, *ACS Monograph, No. 177: Molecular Mechanics*. 1982. 339 pp.
16. Frisch, M.J.; G.W. Trucks; H.B. Schlegel, *Gaussian 98; Revision A.11*. 2001, ed., Gaussian, Inc.: Pittsburgh PA

17. Leach, A.R., *Empirical force field models : molecular mechanics*, in *Molecular modeling : Principles and applications*. 1996, Addison Wesley Longman Ltd: Harlow. p. 131-210.
18. Lipkowitz, K.B., *Abuses of molecular mechanics : Pitfalls to avoid*. J. Chem. Ed., 1995. **72**: p. 1070-1075.
19. Biosym/MSI, *Discover, user guide*, ed. Biosym/MSI. 1995, San Diego.
20. Weiner, S.J.; P.A. Kollman; D.T. Nguyen; D.A. Case, *An all-atom force field for simulations of proteins and nucleic acids*. J. Comp. Chem., 1986. **7**: p. 230.
21. Leach, A.R., *Energy minimisation and related methods for exploring the energy surface*, in *Molecular modeling : Principles and applications*. 1996, Addison Wesley Longman Ltd: Harlow. p. 211-260.
22. Leach, A.R., *The steepest descents method*, in *Molecular modeling : Principles and applications*. 1996, Addison Wesley Longman Ltd: Harlow. p. 221.
23. Leach, A.R., *Conjugate gradients minimization*, in *Molecular Modeling : Principles and applications*. 1996, Addison Wesley Longman Ltd: Harlow. p. 223-226.
24. Leach, A.R., *Conformational analysis*, in *Molecular modeling : Principles and applications*. 1996, Addison Wesley Longman Ltd.: Harlow. p. 413-480.
25. Leach, A.R., *Molecular Dynamics Simulation Methods*, in *Molecular Mechanics : Principles and applications*. 1996, Addison Wesley Longman Ltd.: Harlow. p. 313-370.
26. Kirkpatrick, S.; C.D. Gelatt; M.P. Vecchi, *Optimization by simulated annealing*. Science, 1983. **220**: p. 671-680.
27. Leach, A.R., *Monte Carlo simulation methods*, in *Molecular modeling : Principles and applications*. 1996, Addison Wesley Longman Ltd.: Harlow. p. 371-411.
28. Leach, A.R., *Genetic algorithms*, in *Molecular modeling : principles and applications*. 1996, Addison Wesley Longman Ltd: Harlow. p. 424-426.
29. Goldberg, D.E., *Genetic algorithyms in search, optimization and machine learning*. 1989, Reading, Massachusetts: Addison-Wesley.
30. Morris, G.M.; D.S. Goodsell; R.S. Halliday; R. Huey; W.E. Hart; R.K. Belew; A.J. Olson, *Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function*. Journal of Computational Chemistry, 1998. **19**.
31. Lipinski, C.A.; F. Lombardo; B.W. Dominy; P.J. Feeney, *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **23**: p. 4-25.
32. Clark, D.E., *Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration*. J. Pharm. Sci., 1999. **88**: p. 815-821.
33. Nys, G.G.; R.F. Rekker, *Statistical analysis of a series of partition coefficients with special reference to the predictability of folding of drug molecules. Introduction of hydrophobic fragmental constants (f values)*. Chimica Therapeutica, 1973. **8**(5): p. 521-35.
34. Rekker, R.F.; H.M. De Kort, *The hydrophobic fragmental constant; an extension to a 1000 data point set*. European Journal of Medicinal Chemistry, 1979. **14**(6): p. 479-88.
35. Leo, A.; P.Y. Jow; C. Silipo; C. Hansch, *Calculation of hydrophobic constant (log P) from pi and f constants*. Journal of medicinal chemistry, 1975. **18**(9): p. 865-8.
36. Hansch, C.; A. Leo; D. Nikaitani, *Additive-constitutive character of partition coefficients*. Journal of Organic Chemistry, 1972. **37**(20): p. 3090-2.
37. Ooi, T.; M. Oobatake; G. Nemethy; H.A. Scheraga, *Accessible surface areas as a measure of the thermodynamic parameters of hydration of peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1987. **84**(10): p. 3086-90.

Chapitre 4 : Elaboration d'un modèle théorique de l'interaction TI-pyridinone

*« L'homme qui veut s'instruire doit lire d'abord, puis voyager
pour rectifier ce qu'il a appris »
Voltaire*

L'objectif principal de notre travail de thèse est de contribuer à l'identification, à l'étude et au développement de nouveaux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH-1 (INNTI), dérivés du cycle 2-pyridinone. Afin d'être réalisé de manière rationnelle, ce processus suppose dans un premier temps une bonne compréhension des interactions mises en jeu entre la transcriptase inverse et ces ligands. Dès la découverte des premiers INNTI, un intérêt majeur a été porté à la recherche des **critères stéréoélectroniques** essentiels à leur pouvoir inhibiteur et à la proposition d'un pharmacophore. Ces travaux ont débouché sur plusieurs modèles théoriques décrivant l'interaction TI-INNTI.

Depuis lors, l'utilisation de la **diffraction de rayons X** (DRX) a permis de déterminer la **structure tridimensionnelle** de nombreux **complexes TI – INNTI**^[1-13] et de révéler de manière univoque les interactions mises en jeu entre l'enzyme et les ligands co-cristallisés. Sur base de ces résultats, il est possible de créer de nouveaux analogues de ces molécules en s'inspirant de la topologie du site allostérique (**conception directe**). A ce jour, aucune structure de complexe TI – pyridinone n'a cependant été publiée dans la littérature. La conception directe de nouveaux INNTI de type pyridinone doit donc se baser sur la **comparaison** aux inhibiteurs qui ont été co-cristallisés avec la TI ou encore sur un **modèle théorique** qui décrit de la manière la plus **réaliste** possible la position adoptée par ces dérivés originaux au sein du site de liaison. Ce modèle peut être construit notamment grâce à des résultats issus de simulations de *docking*, qui visent à insérer une molécule dans la structure de l'enzyme. Il doit cependant être validé par des résultats expérimentaux, tels qu'une série de relations structure-activité.

Afin de mener à bien la conception rationnelle de nouveaux INNTI dérivés du cycle pyridinone, nous avons dans un premier temps choisi d'examiner les différents modèles d'interaction déjà proposés pour vérifier leur cohérence par rapport aux relations structure activité, puis d'étudier une série de 2-pyridinones décrites dans la littérature à l'aide des outils de modélisation moléculaire (analyse conformationnelle, *docking*,...) exposés au chapitre 3.

4.1. Modèles d'interaction TI-pyridinone proposés dans la littérature

A ce jour, quatre modèles théoriques susceptibles de décrire les interactions TI-pyridinone ont été proposés dans la littérature. Trois d'entre eux concernent uniquement les composés de la série *Merck*.

4.1.1. Le pharmacophore « *butterfly* »

En 1993, les travaux de Schäfer *et al* permettent l'élaboration d'un premier modèle de **pharmacophore**^[14], baptisé par la suite « *butterfly* » (figure 1) et construit grâce à la superposition des structures cristallographiques et des potentiels électrostatiques moléculaires de trois composés : la Névirapine, le TIBO et une thiazolidine. Il est principalement composé d'un cycle aromatique et d'un système π délocalisé, distants de 4.5 à 5 Å et formant entre eux un angle de 108 à 115°. Il comprend également un groupe de contrainte stérique, un carbonyle associé au système π délocalisé et d'un groupe méthyle placé sur le cycle aromatique. Même si plusieurs variantes ont été introduites, par exemple dans le cadre du 3D-QSAR^[15], ce modèle reste l'un des plus cités lors de la conception de nouveaux INNTI et a contribué à l'identification et au développement de plusieurs séries de composés.

Bien qu'ils ne soient pas spécifiquement dédiés à l'étude des pyridinones, les critères qui composent le pharmacophore « *butterfly* » doivent en théorie s'appliquer à ces composés. Avant d'utiliser ce modèle dans le cadre de nos travaux, nous avons dans un premier temps cherché à le **valider** au moyen de données issues de l'étude par DRX de complexes TI-INNTI . Pour ce faire, sept INNTI (dont les trois molécules à l'origine du pharmacophore) ont été superposés sur base de leur position au sein du site allostérique^[1, 3, 5, 7, 10, 13] afin d'identifier les

éléments communs à ces composés (figure 2). L'analyse de cette superposition permet de constater plusieurs points importants.

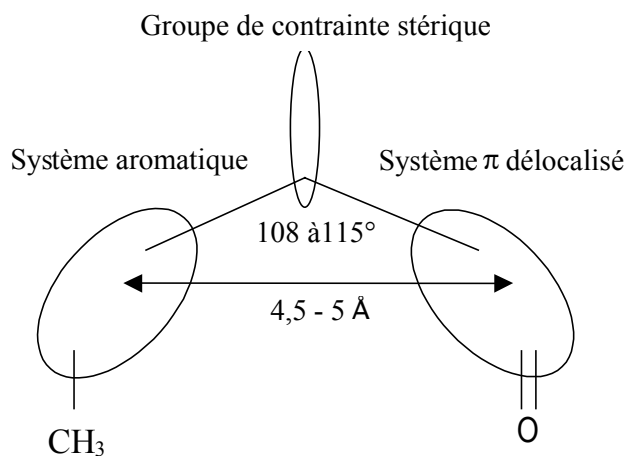


Figure1 : Le pharmacophore « *butterfly* » tel que proposé par Schäfer *et al*

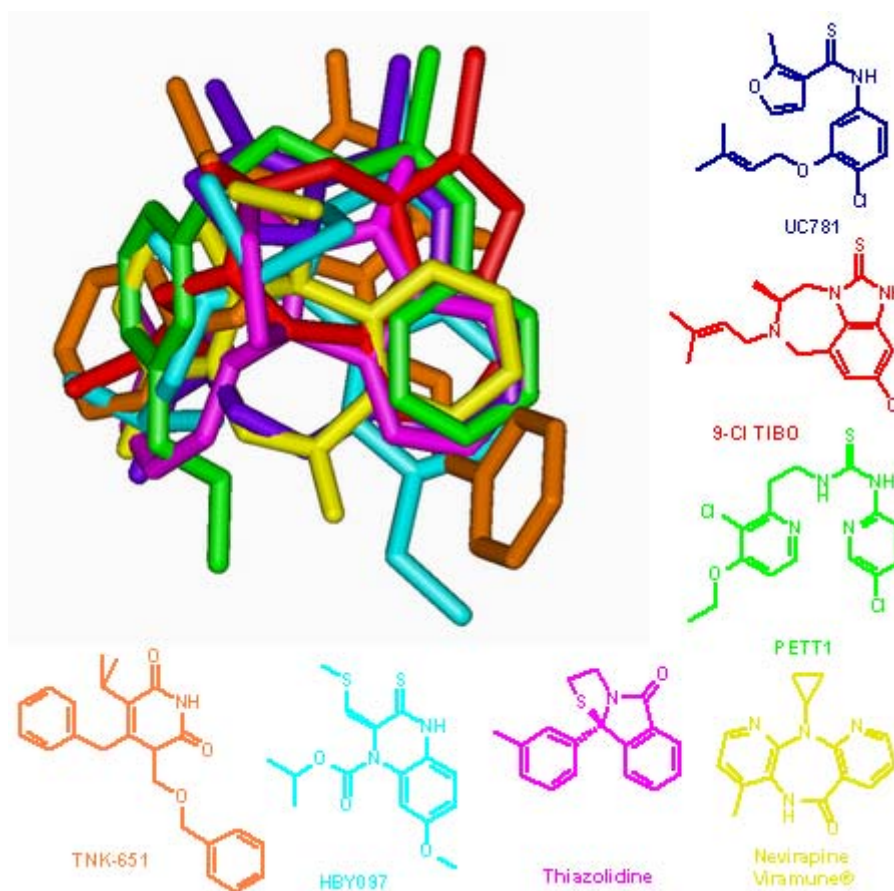


Figure 2 : Superposition de sept INNTI sur base de leurs positions dans le complexe TI-INNTI correspondant

Si l'on se fie à la simple comparaison des structures planes des molécules étudiées, la présence d'un groupe **carbonyle** dans le pharmacophore est justifiée. Chaque molécule possède en effet un tel groupement, ou son équivalent thiocarbonyle. Le pharmacophore « *butterfly* », qui est construit à partir de la comparaison de potentiels électrostatiques moléculaires (PEM), considère que ces fonctions jouent un **rôle équivalent** dans la formation du complexe TI-INNTI. La superposition des sept molécules sur base de leur position dans le site allostérique indique pourtant que cette hypothèse est inexacte. Ainsi, les groupes carbonyles des trois molécules à l'origine du pharmacophore sont localisés dans des **régions différentes** du site de liaison (figure 3). La comparaison des PEM ne constitue donc pas une base suffisante pour l'élaboration d'un modèle d'interaction TI-INNTI.

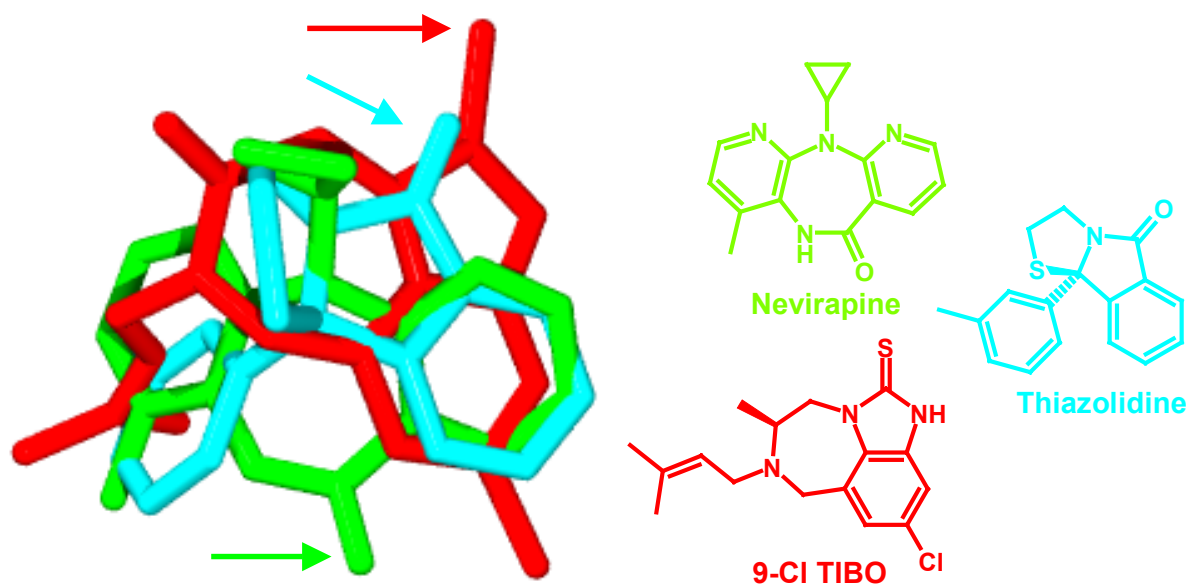


Figure 3 : Superposition des trois INNTI à l'origine du pharmacophore « *butterfly* » sur base de leur position dans le site allostérique de la TI. Les groupes (thio)carbonyles de chaque molécule sont indiqués par une flèche

La superposition illustrée à la figure 2 indique également que la région du site allostérique délimitée par Tyr181, Tyr188 et Trp229 ne doit pas obligatoirement être occupée par un système π délocalisé. Un simple **groupe hydrophobe**, tel que celui porté par HBY-097 peut également être utilisé. **L'un des deux systèmes π du pharmacophore semble donc injustifié.**

En dépit de leur diversité structurale, les sept INNTI superposés occupent des régions similaires du site de liaison. A partir des volumes de Van der Waals de chaque composé, il est ainsi possible de définir un **volume commun de 49.3 Å³**, illustré à la figure 4. Sa topologie est très similaire au pharmacophore « *butterfly* », dont on reconnaît aisément plusieurs composants :

- Un **système π délocalisé** placé à proximité des résidus Leu100, Lys101 et Val106.
- Un **groupe de contrainte stérique** qui exploite l'espace laissé vacant suite au changement de conformation de Tyr181
- Un **système « aromatique »**, qui peut dans certains cas être remplacé par un simple **groupe hydrophobe**, localisé au sein de la région du site allostérique délimitée par Tyr181, Tyr188 Phe227 et Trp229. Cette partie de la TI, qui n'offre aucune possibilité de formation d'un pont hydrogène, sera désignée « **zone hydrophobe** » dans la suite de nos travaux.

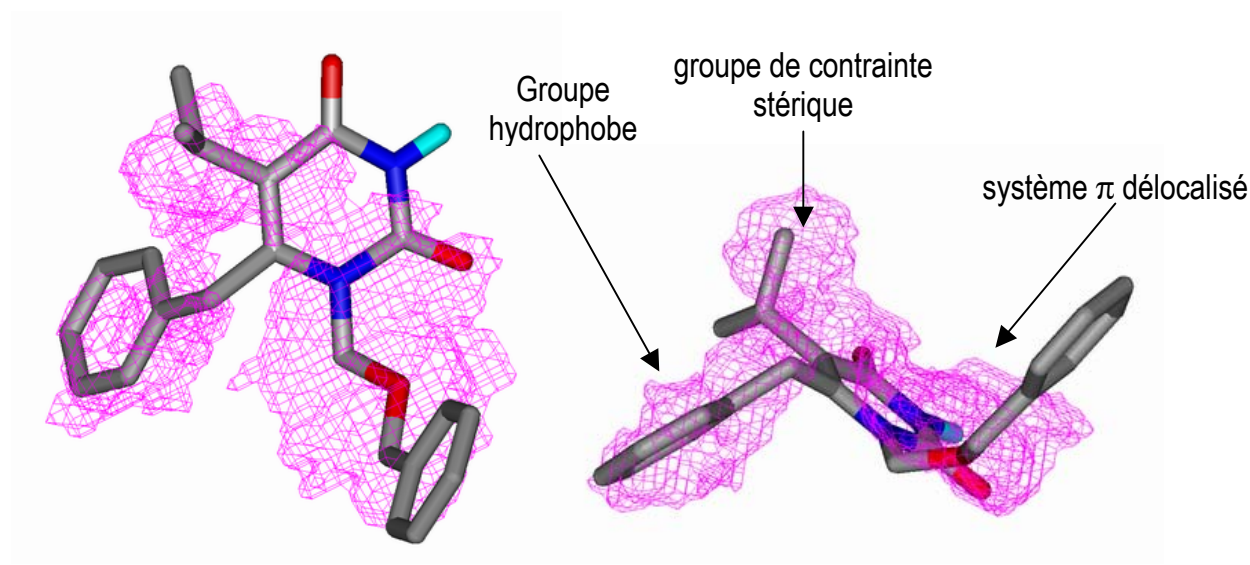


Figure 4 : Volume commun défini suite à la superposition de sept INNTI. Correspondance aux éléments structuraux du TNK-651 et du pharmacophore *butterfly*

On peut par contre constater que certains INNTI n'exploitent pas l'intégralité du site allostérique. Aucun volume commun ne peut être mis en évidence au niveau du groupe benzoxy terminal du TNK-651, situé à proximité du résidu **Pro236**. Cette partie du site allostérique est connue pour sa **flexibilité**. La position du résidu Pro236 est ainsi sujette à des écarts qui peuvent atteindre plus de 5Å et qui sont fonction du volume de l'INNTI présent dans le complexe TI-INNTI^[5]. Cette région du site de liaison sera donc désignée « **zone flexible** » dans la suite de nos travaux.

Enfin, il n'est pas évident, sur base de ces données de volume commun, de justifier la présence d'un groupe méthyle dans le pharmacophore.

Parmi les sept molécules superposées, six possèdent un groupe NH susceptible de jouer le rôle de **donneur d'hydrogène** dans un pont H. A l'exception de la Névirapine, toutes utilisent cette fonction pour former un **pont hydrogène** avec le carbonyle du résidu **Lys101**. L'examen de la structure cristallographique du complexe TI–Névirapine^[3] révèle cependant que cet inhibiteur forme également un pont hydrogène avec Lys101, *via* une molécule d'eau co-cristallisée. Ce résidu, localisé dans l'une des rares zones hydrophiles du site allostérique, représente une des seules possibilités de formation d'un pont H.

La présence d'un donneur d'hydrogène et son interaction avec Lys101 semblent donc être l'un des éléments importants pour l'activité antivirale d'un INNTI, bien qu'ils ne soient pas considérés dans le pharmacophore « *butterfly* ». La formation d'un pont hydrogène entre un cycle pyridinone, qui contient un tel groupement et Lys101 est donc probable.

En conclusion, la critique du pharmacophore « *butterfly* » permet de dégager plusieurs informations importantes pour l'étude des pyridinones. On constate ainsi que ce pharmacophore est **trop restrictif**. La présence en son sein d'un groupe carbonyle (ou thiocarbonyle), d'un méthyle et d'un des deux systèmes π ne peut en effet être justifiée sur base des données issues de la diffraction de rayons X. Les seuls **éléments communs** aux sept inhibiteurs superposés sont :

- Un **volume commun** de 49.3 Å dont la topologie est similaire à celle du pharmacophore.
- Un **système π délocalisé** à proximité des résidus Lys100 et Val106.
- Un **groupe de contrainte stérique** qui exploite l'espace laissé vacant par Tyr181
- Un **groupe hydrophobe** qui occupe la poche délimitée par les résidus Tyr181, Tyr188, Phe227 et Trp229.

A eux seuls, ces quatre critères sont probablement trop vagues pour construire un nouveau pharmacophore capable de distinguer efficacement une molécule active d'une inactive. Un **pharmacophore « butterfly » actualisé**, comme celui décrit à la figure 5 peut cependant s'avérer très utile pour juger rapidement de la pertinence d'une hypothèse d'interaction TI-pyridinone. Pour être considéré comme cohérent dans la suite de nos travaux, un modèle devra impérativement répondre à ces quatre critères. Une préférence supplémentaire sera de plus accordée aux propositions qui impliquent la formation d'un pont hydrogène avec Lys101, mise en évidence chez plusieurs INNTI.

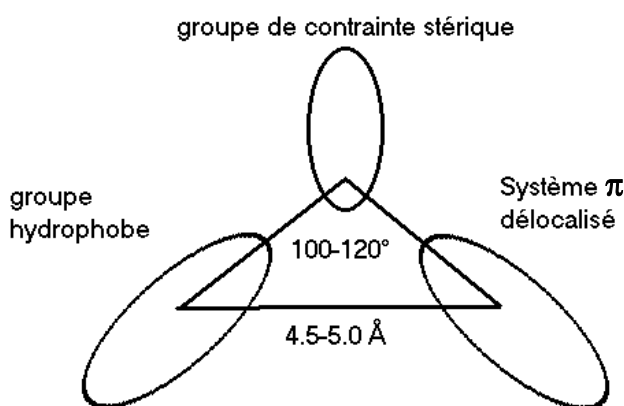


Figure 5 : Version actualisée du pharmacophore « butterfly »

4.1.2. Modèle de Jourdan et al

Le modèle de Jourdan *et al*, publié en 1997^[16], se base non pas sur la structure d'un complexe TI-INNTI, mais bien sur la **superposition**, de la pyridinone **L-696,229** (appartenant à la série *Merck*) et du **EBPU**, un inhibiteur très proche du TNK-651 (figure 6). Les interactions mises en jeu entre cette molécule et la TI ne sont donc pas détaillées explicitement, mais ces informations peuvent être aisément déduites à partir la structure du complexe TI–TNK-651. La superposition proposée est réalisée sur base d'une procédure **CoMFA**^[17] (*Comparative Molecular Field Analysis*), qui compare les **champs moléculaires** (zones hydrophiles et hydrophobes, champs électrostatiques,...) des deux molécules.

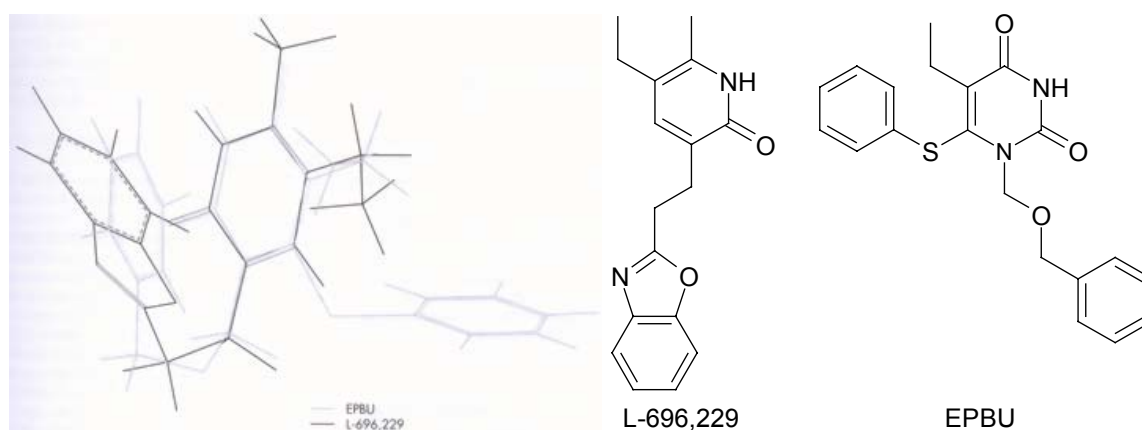


Figure 6 : Superposition du L-696,229 et du EBPU selon le modèle de Jourdan *et al*^[16]

Bien qu'issu d'une approche rationnelle, ce modèle reste rudimentaire. Son principal défaut est de ne tenir compte ni des contraintes liées à la topologie du site de liaison, ni des informations déjà disponibles à cette époque, parmi lesquelles la structure de complexes TI-INNTI impliquant des molécules apparentées au EBPU (HEPT, Emivirine, TNK-651^[5]). Ainsi, **une seule possibilité** de superposition est envisagée, alors que la **flexibilité** des molécules étudiées en autorise probablement d'autres. De plus, la **conformation** choisie pour le EBPU ne correspond pas à celle adoptée par les dérivés du HEPT au sein du site allostérique de la TI. Enfin, comme évoqué plus haut, la construction d'un modèle sur base de données telles que le potentiel électrostatique peut s'avérer problématique dans le cas des INNTI.

Au final, l'hypothèse de Jourdan *et al* ne peut soutenir la comparaison avec les données expérimentales. Tout d'abord, la conformation proposée pour la pyridinone n'est pas en accord avec le pharmacophore « *butterfly* ». Le **cycle double** du L-696,229 est en effet jugé équivalent au groupe benzoxyméthyle du EBPU et occuperait donc la **zone flexible** du site allostérique, qui n'est pas essentielle à l'activité inhibitrice (cf figure 4). La **zone hydrophobe** du site, occupée par l'ensemble des INNTI, resterait par contre **inexploitée**. Par ailleurs, la conformation proposée pour la pyridinone ne pourrait être adoptée au sein du site de liaison. La plupart des molécules synthétisées sur base de ce modèle sont donc logiquement dépourvues de toute activité antivirale.

4.1.3. Modèle de Tucker et al

Le modèle proposé par Tucker *et al* dans le cadre de l'étude de plusieurs familles d'INNTI^[18] est également basé sur la **superposition** d'une pyridinone, le **L-697,661** (figure 7), à un inhibiteur de référence, qui est ici la **Névirapine**. Cette superposition (figure 8) est réalisée grâce à la méthode **SEAL**^[19], qui utilise une fonction de score basée sur la complémentarité stérique et électronique des deux molécules. La procédure de Tucker *et al* tient dans une certaine mesure compte de données expérimentales, puisque la conformation de l'inhibiteur de référence est celle observée dans le complexe TI -Névirapine. La structure de l'enzyme n'est par contre pas considérée et rien n'indique que les molécules étudiées puissent être insérées dans la TI conformément à la superposition proposée.

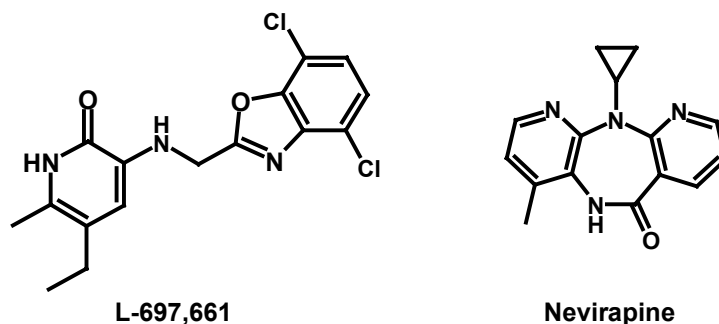


Figure 7 : Structure du L-697,661 et de la Nevirapine.

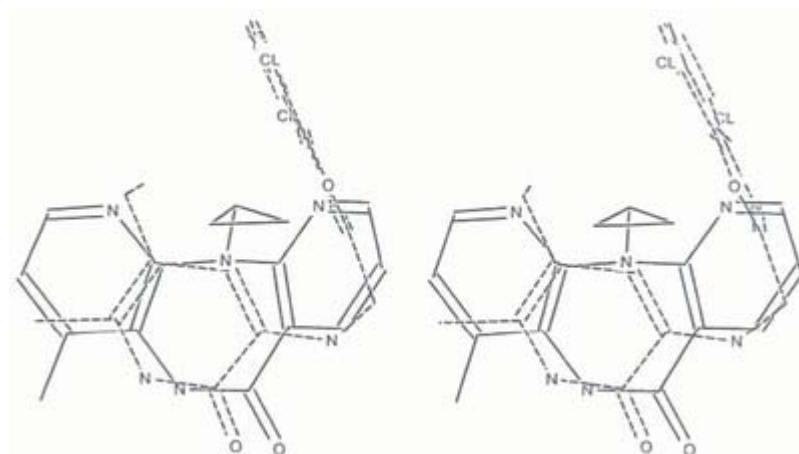


Figure 8 : Superposition de la Névirapine et de la pyridinone L-697,661 proposée par Tucker *et al*.

Comme dans les cas précédents, cette comparaison sur base de similarités stériques et électroniques se révèle **inadaptée** à l'étude des INNTI. Pour la plupart des inhibiteurs étudiés, la procédure SEAL tend à superposer un **carbonyle** et un **donneur d'hydrogène** à la fonction

lactame (-HN-C=O) de la Névirapine, tout en **maximisant le volume commun** aux deux molécules. La détermination, par diffraction de rayons X, de plusieurs complexes TI-INNTI impliquant des inhibiteurs étudiés par Tucker *et al.*^[3, 6] a par la suite révélé que la plupart des modes d'interaction proposés sont incorrects. En ce qui concerne la pyridinone L-697,661, il est impossible, d'un simple point de vue stérique, de l'insérer au sein du site TIBO de la manière préconisée par Tucker *et al.* Ce modèle n'a donc pas été retenu pour la suite de nos travaux.

4.1.4. Modèle de Mager

Un dernier modèle d'interaction TI-pyridinone est proposé par Mager en 1996^[20] (figure 9). Il présente l'avantage de traiter l'enzyme de manière **explicite**. Les molécules étudiées sont modélisées au sein d'un site de liaison construit sur base de la structure du **complexe TI-Névirapine**, publiée dans la littérature. Le processus de modélisation utilisé est cette fois plus évolué, et comprend plusieurs étapes de **minimisation** faisant appel à des champs de forces (MM+) et même à des méthodes quantiques semi empiriques (PM3). En utilisant cette méthode, Mager montre que la plupart des inhibiteurs non nucléosidiques de la TI sont capables d'adopter une conformation compatible avec le pharmacophore « *butterfly* » au sein du site allostérique de la TI.

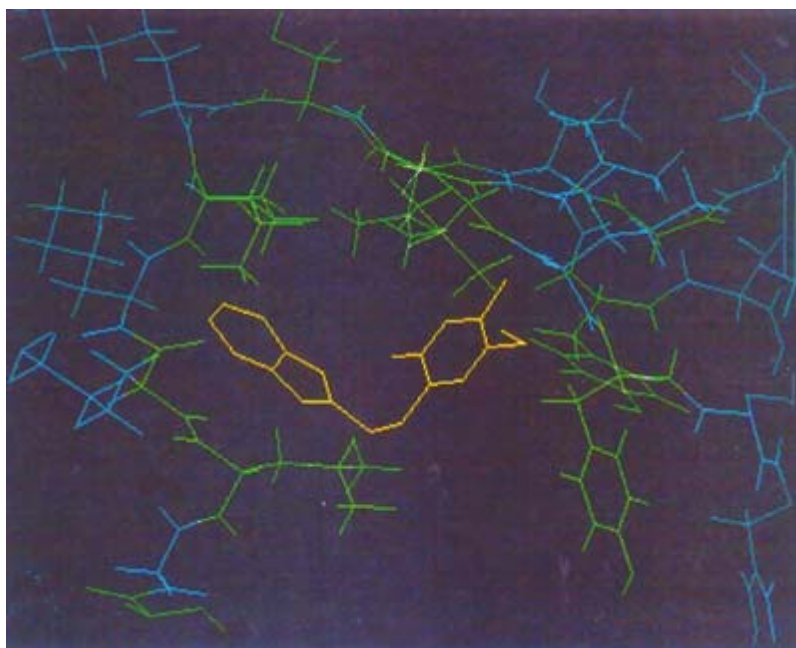


Figure 9 : Modèle d'interaction TI-pyridinone proposé par Mager

Le modèle proposé par Mager comporte cependant un défaut majeur : il ne prend en compte qu'une **partie des résidus** qui composent le site allostérique ^[21] et néglige ainsi plusieurs acides aminés dont l'importance a depuis été clairement mise en évidence, dont Phe227 et Trp229. En outre, bien que les modes d'interaction des ligands étudiés ne soient pas tous présentés en détail, il est probable que plusieurs d'entre eux, dont celui proposé pour les pyridinones, soient incorrects. En effet, les résultats obtenus par Mager indiquent qu'il n'existe **aucune interaction notable** entre le résidu **Lys101** et des inhibiteurs tels que le **HEPT** (qui est un analogue du TNK-651) ou le **TIBO**. L'étude des complexes TI-INNTI associés à ces composés a pourtant mis en évidence, dès 1995, la **formation d'un pont hydrogène** avec ce résidu^[3]. On constate également que l'hypothèse proposée dans le cas des pyridinones (figure 9) laisse **vacante** une grande part de la **zone hydrophobe** située à proximité de Tyr181 et Tyr188. Le modèle de Mager ne peut satisfaire aux critères d'interaction qui composent notre version actualisée du pharmacophore « *butterfly* ». Il doit donc également être rejeté.

4.1.5. Pyridinones Curie et Janssen

Bien que les composés des séries *Curie* et *Janssen* aient fait l'objet de plusieurs publications, aucune d'entre elles ne propose un modèle tridimensionnel décrivant l'interaction TI-pyridinone. Ces molécules ont cependant été conçues par analogie aux dérivés du HEPT^[22, 23] (figure 10) et aux pyridinones *Merck*. Il est donc *a priori* logique de postuler qu'elles adoptent au sein du site de liaison des INNTI une position similaire à celle de ces composés de référence.

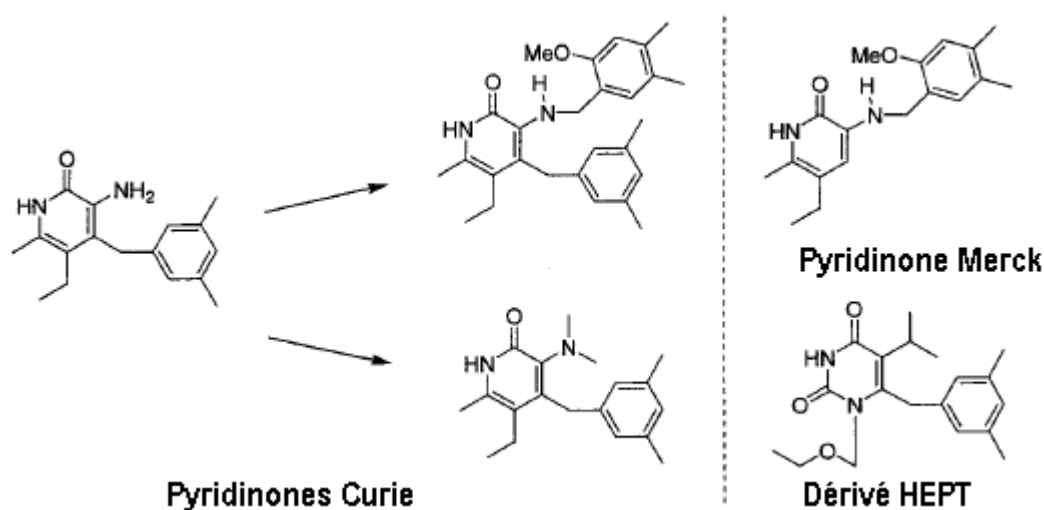


Figure 10 : Hypothèse de conception des pyridinones de la série *Curie*^[23]..

4.1.6. Conclusion

Suite à l'examen des publications consacrées aux pyridinones, il est évident que les hypothèses qui décrivent l'interaction des ces inhibiteurs avec la TI comportent de nombreuses lacunes. Ils ne peuvent donc **expliquer** de manière convaincante les **relations structure–activité** observées et sont donc insuffisants pour guider la conception directe de nouveaux INNTI. Afin de remédier à ces insuffisances et de permettre la réalisation des objectifs de ce travail, il est nécessaire de proposer un nouveau modèle décrivant de manière cohérente l'interaction des trois catégories de pyridinones avec la TI. Pour être convaincant, ce modèle doit remplir plusieurs conditions :

- Il doit tenir compte de la flexibilité de l'inhibiteur et considérer pour chaque molécule étudiée un nombre important de conformations.
- Il doit prendre en compte de manière explicite la structure de l'enzyme.
- Il doit satisfaire aux conditions posées par notre version actualisée du pharmacophore « *butterfly* »
- Il doit permettre d'expliquer clairement les relations structure–activité observées au sein des différentes familles de pyridinones.

4.2. Proposition d'un modèle d'interaction pour les Pyridinones Merck

Les composés de la série *Merck* constituent une des premières séries d'INNTI découvertes^[24], et sont les dérivés du cycle pyridinone les mieux connus. A ce titre, de nombreuses relations structures-activité relatives à ces inhibiteurs ont été publiées dans la littérature^[25-29] et représentent une base de travail idéale pour l'élaboration d'un modèle d'interaction TI-pyridinone.

4.2.1. Analyse conformationnelle des pyridinones de la série Merck

Une **analyse conformationnelle** de plusieurs pyridinones de la série *Merck* a été réalisée, afin de prendre en compte leur **flexibilité**. Cette première recherche vise à vérifier si ces composés

sont en mesure d'adopter une ou plusieurs conformations en accord avec le pharmacophore « *butterfly* ». Deux types principaux de molécules sont à distinguer : les 3-(alkylamino)pyridinones et les 3-alkylpyridinones.

La plupart des 3-(alkylamino)pyridinones de la série *Merck* sont des analogues d'une même molécule type, le L-696,040. Ce composé comporte quatre liaisons rotatoires (figure 11) importantes pour sa conformation. La première, T1, concerne le groupe 5-éthyle. Les trois autres conditionnent la position adoptée par le groupement benzoxazole par rapport au cycle pyridinone. Les 3-alkylpyridinones peuvent pour leur part être considérées comme des dérivés du composé L-696,229.

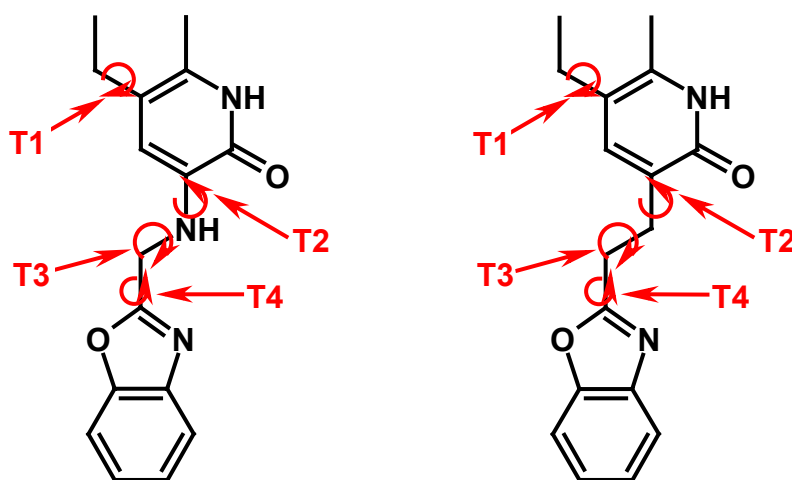


Figure 11 : Structure des molécules L-696,040 (gauche) et L-696,229 (droite) et définition des angles de torsion T1 à T4

4.2.1.1. Balayage conformationnel *ab initio*

Parmi les quatre liaisons rotatoires du L-696,040, T2 est la plus complexe à étudier. La barrière énergétique qui y est liée résulte non seulement d'**effets stériques**, mais aussi d'**effets électroniques**. Afin d'évaluer de manière acceptable la valeur de cette barrière, un **balayage conformationnel** (*conformational scan*) *ab initio* autour de T2 a été réalisé, en base RHF 6-31G**. Pour des raisons de temps de calcul, cette étude a été menée sur une molécule plus

simple que le L-696,040, mais possédant une liaison rotatoire équivalente (figure 12). Notons que T2 est ici défini par rapport à l'hydrogène du groupe 3-aminoalkyle.

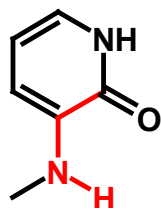


Figure 12 : Définition de la liaison rotatoire T2 pour les 3-(alkylamino)pyridinones

Treize conformations de cette molécule simplifiée ont été générées de manière à couvrir, par intervalles de 15°, des valeurs de T2 comprises entre 0 et 180°. Chaque conformation a ensuite été optimisée, avec pour seule contrainte de conserver l'angle dièdre initialement attribué. Le profil énergétique obtenu (figure 13) révèle un minimum global pour T2 = 15°, un minimum local pour T2 = 165° et un maximum pour T2 = 105°. Il peut être interprété comme étant la somme de trois contributions.

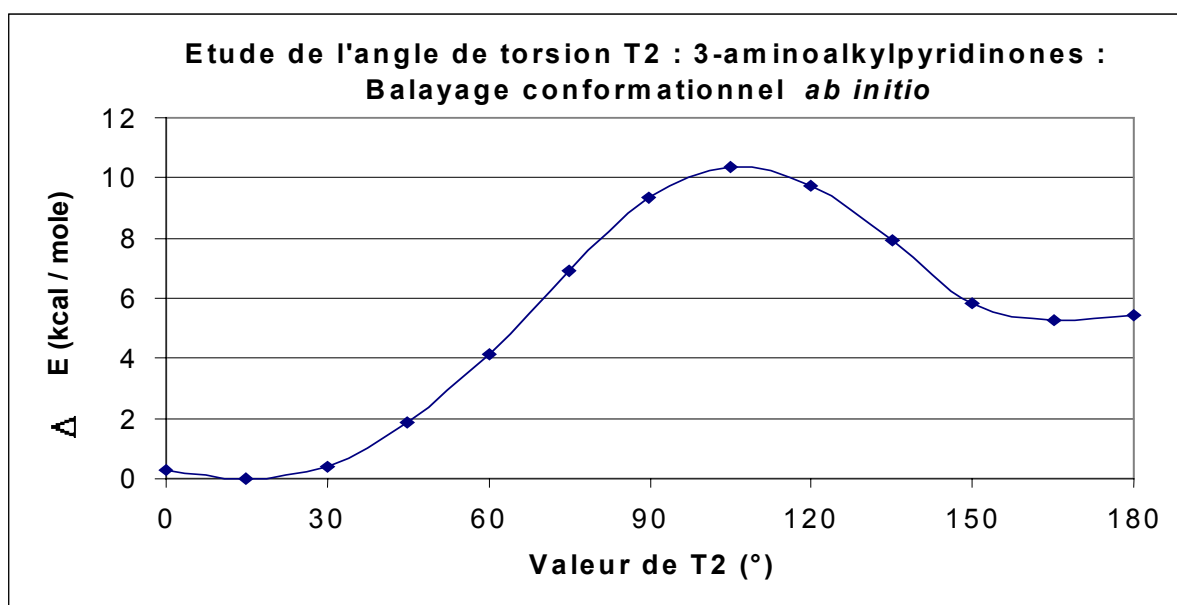


Figure 13 : Profil énergétique lié à la variation de l'angle dièdre T2 chez les 3-(alkylamino)pyridinones

- Une contribution liée à la formation d'un **pont hydrogène intramoléculaire** entre le carbonyle du cycle pyridinone et le groupe 3-aminoalkyle. Ce pont hydrogène est observé pour des valeurs de T2 proches de 0°. La distance minimale séparant les deux atomes

impliqués (H et O) est de 2.25Å. Cette contribution est commune à la plupart des 3-(alkylamino)pyridinones et influence considérablement leur conformation^[30].

- Une contribution provenant de la **délocalisation électronique** entre le cycle pyridinone et le groupe 3-aminoalkyle. La stabilisation qui y est liée est maximale pour des valeurs de T2 **proches de 0° et 180°**. Dans ces conditions, l'azote du groupement 3-alkylamino adopte une configuration plane (sp_2). La délocalisation est par contre perdue pour des valeurs proches de 90°, comme le montre le conformère pour lequel T2 = 105° (figure 14). Dans ce cas, l'azote du groupe 3-alkylamino adopte une géométrie pyramidale.
- Une contribution provenant d'effets stériques, qui pénalise les angles dièdres proches de 0° et 180°

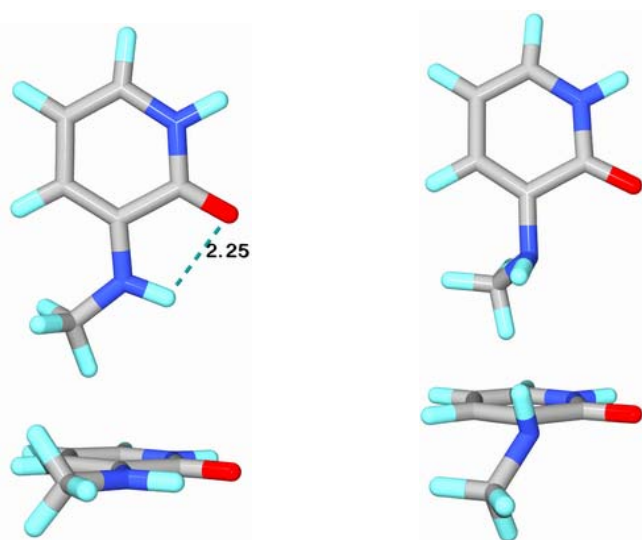


Figure 14 : Structure (représentée dans deux plans perpendiculaires) des 3-(alkylamino)pyridinones pour une valeur de l'angle T2 de 0° (gauche) et 105° (droite)

En conclusion, ces calculs *ab initio* révèlent que la conformation des 3-(alkylamino)pyridinones est largement influencée par la formation d'un pont hydrogène et par des effets de délocalisation électronique, qui tendent à favoriser des valeurs de T2 proches de 0° (minimum global) et 180° (minimum local).

La liaison T2 du L-696,229 a également été étudiée par un balayage conformationnel *ab initio*. La procédure appliquée est en tous points identique à celle utilisée pour le L-696,040, avec sélection d'une molécule plus simple pour limiter le temps de calcul (figure 15).



Figure 15 : Molécule utilisée pour l'étude de l'angle de torsion T2 chez les 3-alkylpyridinones

Le profil énergétique (figure 16) obtenu diffère nettement du cas précédent et possède un **minimum global** pour $T2 = 75^\circ$ et un **minimum local** pour $T2=180^\circ$. La seule **barrière énergétique** notable correspond à un angle dièdre T2 **proche de 0°** . Une telle disposition amène en effet une gêne stérique entre le carbonyle du cycle pyridinone et la chaîne 3-alkyle. Les autres valeurs de T2 sont localisées à moins de 2kcal/mole du minimum global.

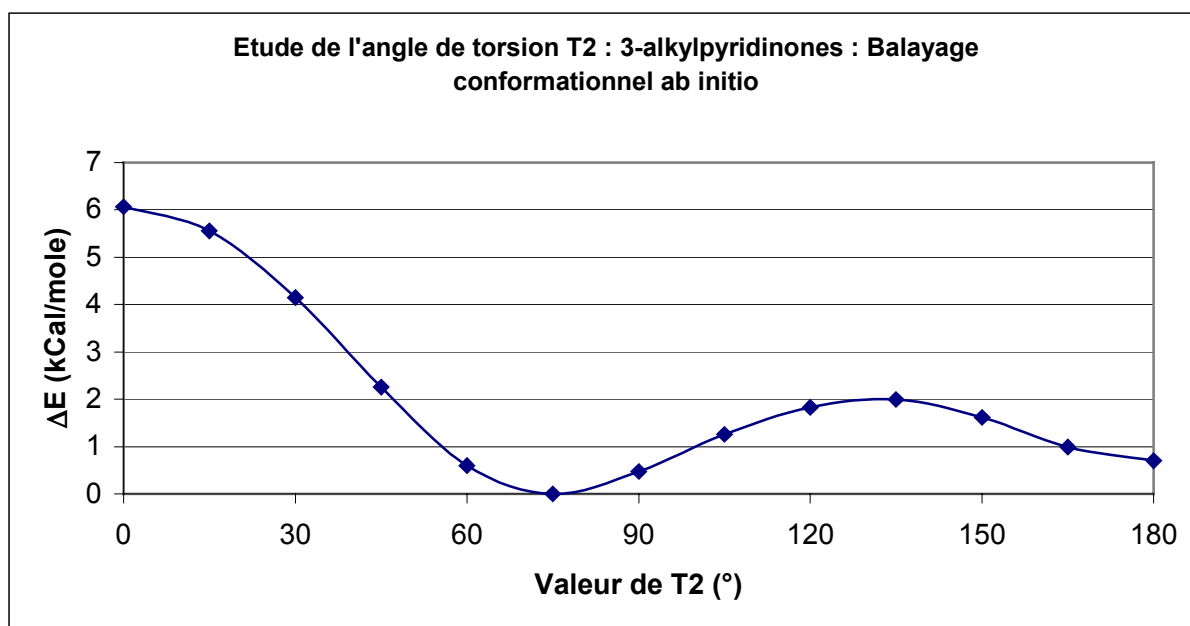


Figure 16 : Profil énergétique lié à la variation de l'angle dièdre T2 chez les 3-alkylpyridinones

Ce profil indique donc une plus grande **liberté conformationnelle** de la chaîne latérale pour les dérivés de type 3-alkylpyridinone.

4.2.1.2.Utilisation de la CSD

Les résultats issus de l'étude des 3-(alkylamino)pyridinones et des 3-alkylpyridinones par des méthodes *ab initio* ont été complétés et validés par l'utilisation de la banque de données CSD^[31], qui regroupe les structures cristallographiques de plus de 250000 composés. Les molécules présentant des angles de torsion similaires aux angles T2 rencontrés chez les 3-alkylpyridinones et 3-(alkylamino)pyridinones ont ainsi été recherchées. Les valeurs de T2 relevées ont alors été classées en histogrammes rendant compte de leur fréquence relative en %. Les informations obtenues (figures 17a et 17b) sont en bon accord avec les résultats théoriques. Ainsi, les valeurs de T2 chez les analogues des 3-(alkylamino)pyridinones sont principalement comprises entre -20° et 20° , ce qui correspond au minimum global du profil énergétique obtenu. Plusieurs exemples de valeurs comprises entre 160° et 180° , qui correspondent au minimum local de la courbe, peuvent également être relevés (figure 17a).

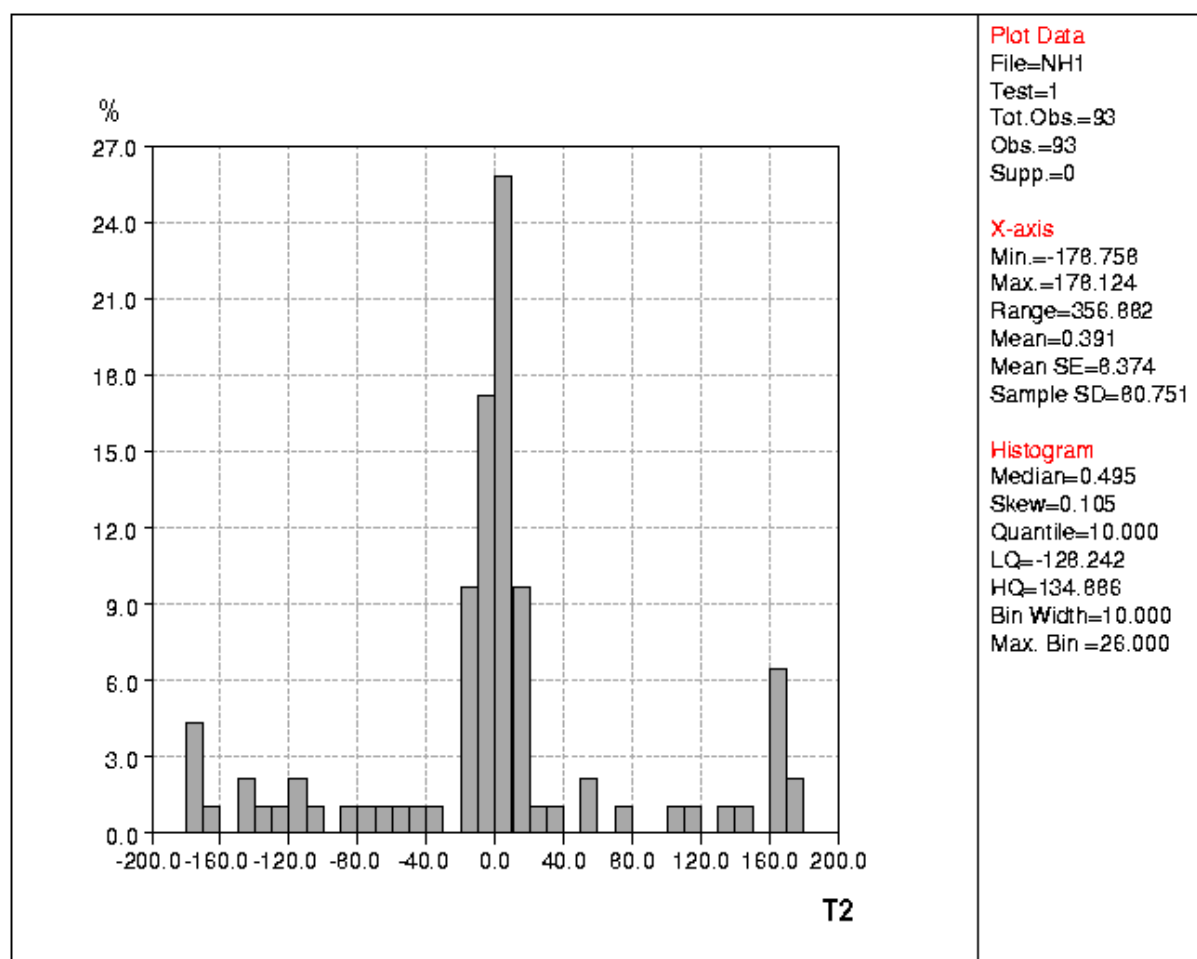


Figure 17a : répartition statistique des angles de torsion T2 chez les 3-(alkylamino)pyridinones

Dans le cas des analogues des 3-alkylpyridinones (figure 17b), aucun composé ne peut être trouvé dans les valeurs de T2 comprises entre -40° et 40° , qui correspondent à la zone la plus défavorable du profil énergétique, tandis que la plupart des structures sont caractérisées par une valeur de T2 allant de 60° à 80° (minimum global du profil énergétique) ou, dans une moindre mesure, proches de 180° (minimum local).

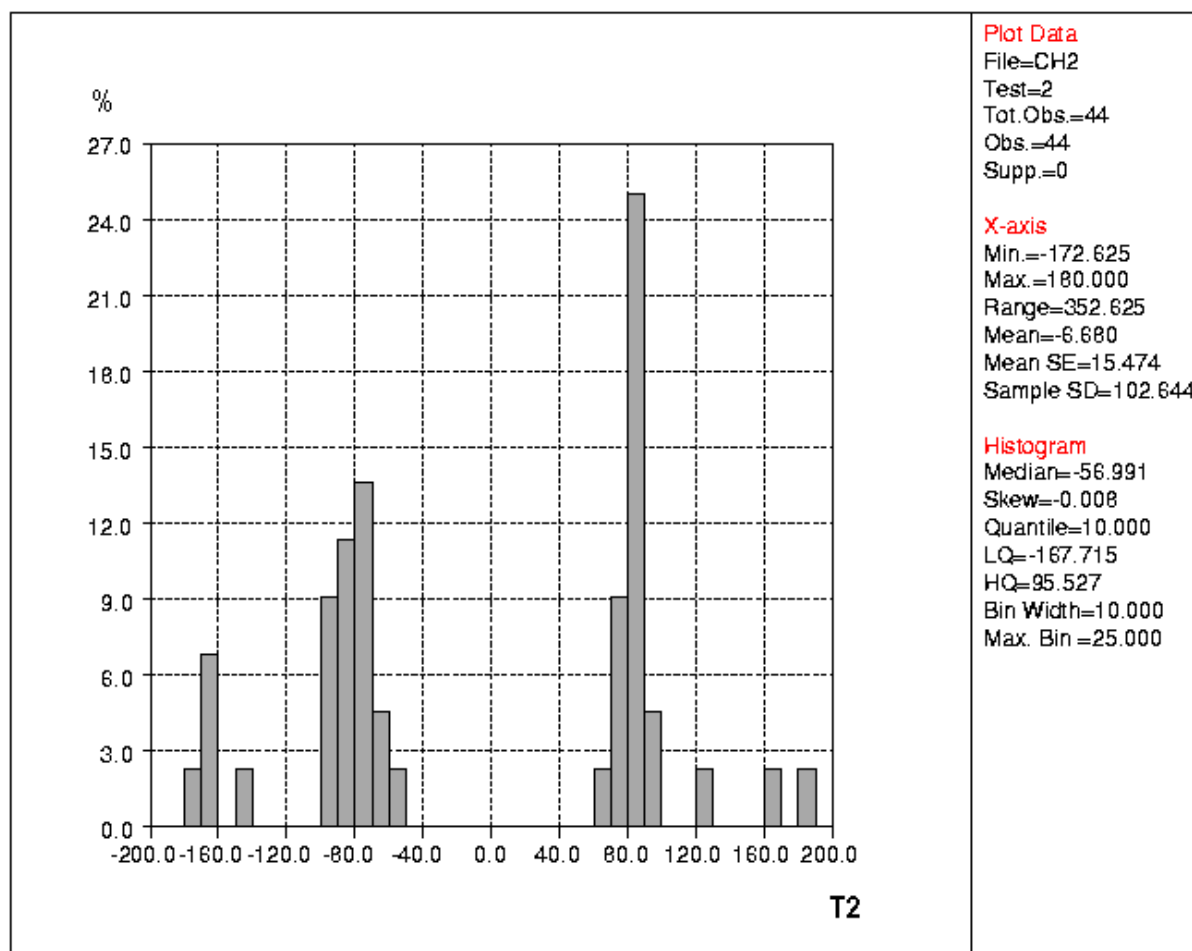


Figure 17b : répartition statistique des angles de torsion T2 chez les 3-alkylpyridinones

4.2.1.3. Etude par mécanique moléculaire

Les 3-(alkylamino)pyridinones et les 3-alkylpyridinones ont été étudiées par mécanique moléculaire, à l'aide du champ de forces *cff91*^[32]. Ces recherches sont non seulement destinées à identifier les **conformations bioactives** des inhibiteurs, mais aussi à vérifier si le champ de forces *cff91* est capable de rendre compte des résultats obtenus grâce aux calculs *ab initio* et à l'utilisation de la banque de données CSD.

En raison du faible nombre de liaisons rotatoires du L-696,040 et du L-696,229, ces composés ont été étudiés par une procédure de **recherche systématique**. Pour ce faire, l'angle dièdre T1 a été fixé à une valeur de 90°, qui correspond à une énergie de conformation minimale. Les angles T2, T3 et T4 ont pour leur part été modifiés par pas de 30°. Chacune des 1728 conformations ainsi générées a ensuite été optimisée. Pour faciliter l'analyse des résultats obtenus, seules celles situées à moins de 10 kCal/mole du minimum énergétique global ont été conservées.

Les conformations générées pour le L-696,040 ont pu être classées en **six familles** illustrées aux figures 18 et 18a. Ces possibilités sont comprises dans un intervalle de 1.3 kCal/mole (tableau 19) et sont donc presque équivalentes d'un point de vue énergétique. Les deux conformères les plus favorables (rouge et orange) sont symétriques par rapport au plan du cycle pyridinone. Toutes les solutions retenues sont caractérisées par une valeur d'angle dièdre T2 de 0° ou 180°. Ceci est en bon accord avec les informations obtenues lors du balayage conformationnel *ab initio* de l'angle T2, même si la différence d'énergie entre les conformations à 0° et 180° est sous-estimée (ΔE moyen de 0.5kcal/mole, alors que le profil obtenu *ab initio* indique une différence de l'ordre de 5 kcal/mole). L'une des deux conformations les plus favorables (n°2, orange) est compatible avec le modèle simplifié de pharmacophore, pour peu qu'une légère rotation soit imposée au cycle benzoxazole.

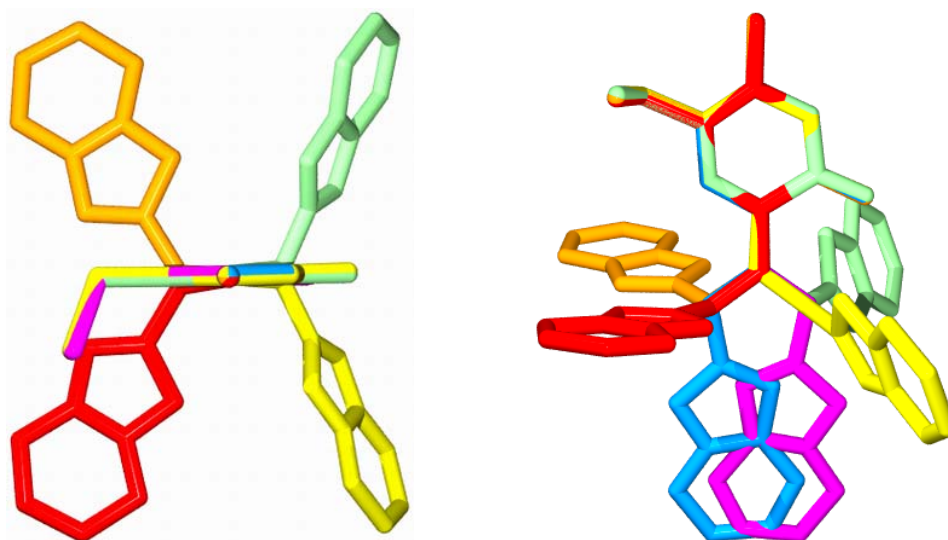


Figure 18 : Superposition des 6 conformations du L-696,040 générées suite à une procédure de recherche systématique (représentées dans deux plans perpendiculaires)

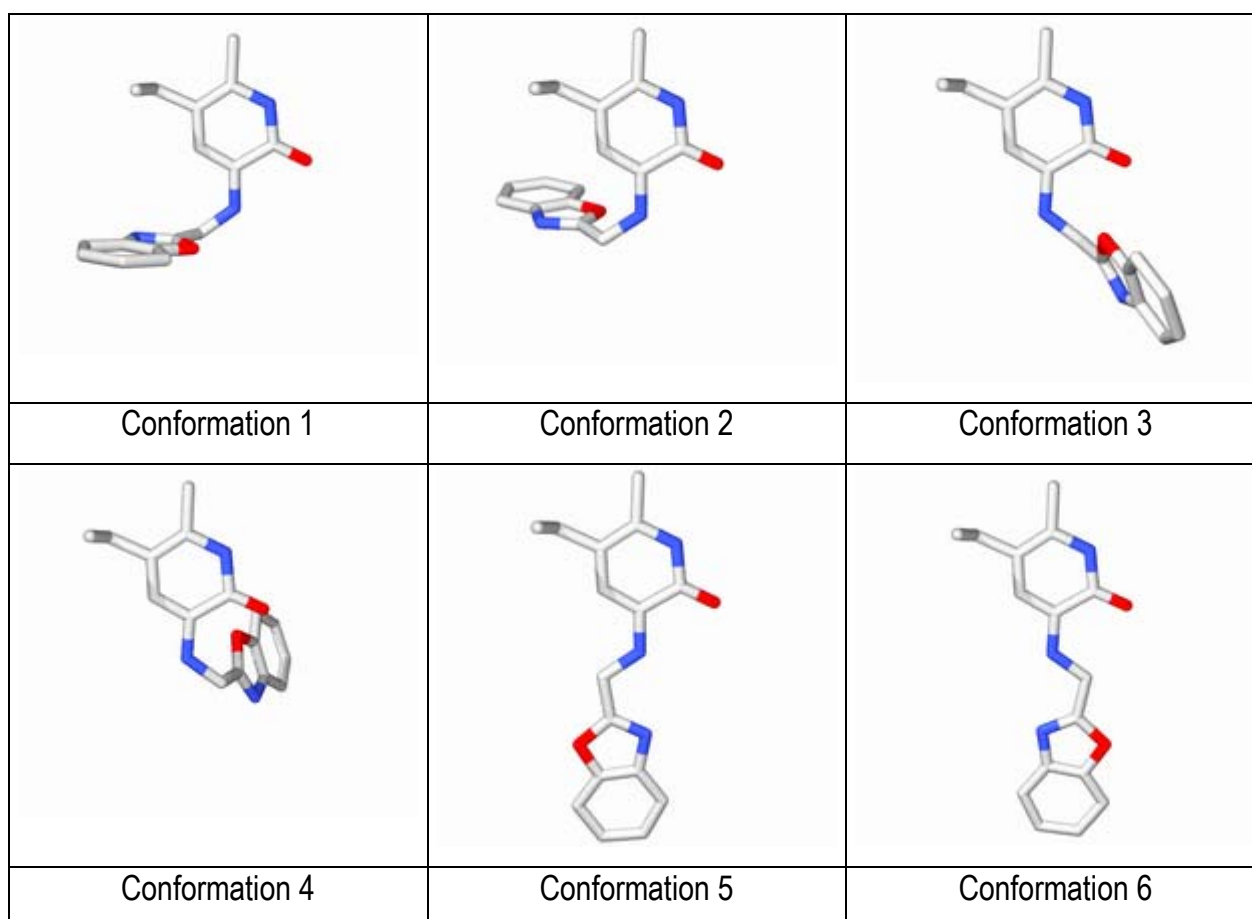


Figure 18a : Représentation des six conformères du L-696,040 générés par recherche systématique

Conformation	Couleur	Energie (kCal/mole)
1	Rouge	67.7
2	Orange	68.0
3	Jaune	68.4
4	Vert	68.5
5	Bleu	68.7
6	Magenta	69.0

Tableau 19 : Energies associées aux conformations du L-696,040

L'ensemble des conformations retenues pour le L-696,229 peut être classé en **10 familles** distinctes (figures 20 et 20a) comprises dans un intervalle de 3.3 kCal/mole (figure 21). Conformément aux résultats obtenus par calculs *ab initio*, **aucune n'est caractérisée par un angle dièdre T2 de 0°**. Plusieurs conformations se rapprochent de celles obtenues pour le L-696,040 et deux d'entre elles semblent compatibles avec les critères du pharmacophore « *butterfly* ». La première (2, bordeaux) est caractérisée par une valeur de T2 de 75°, ce qui

correspond au minimum énergétique mis en évidence par le balayage conformationnel *ab initio*. Elle est localisée à 0.5 kCal/mole de la structure de plus basse énergie. L'autre (8, magenta) présente un angle T2 proche de 180°, également observé pour le L-696,040 et est à 2.6 kCal/mole de la structure la plus stable. De manière générale, ces informations, qui indiquent une plus grande flexibilité de la chaîne latérale des 3-alkylpyridinones, sont conformes aux résultats obtenus par les calculs *ab initio* et par l'utilisation de la CSD.

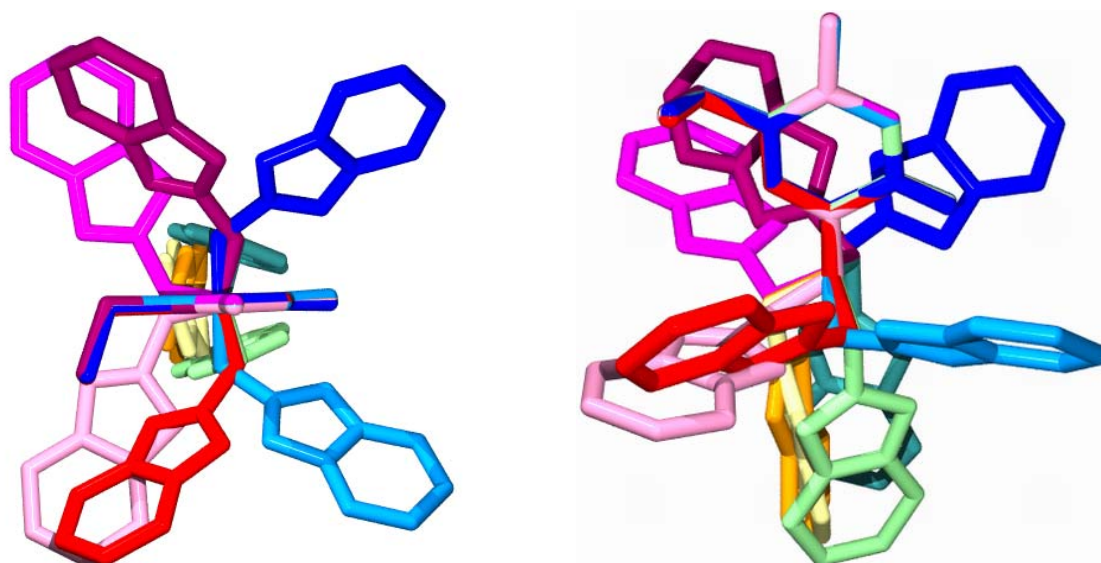
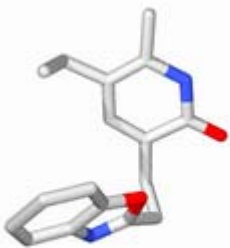
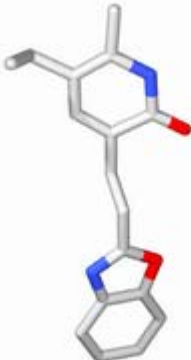
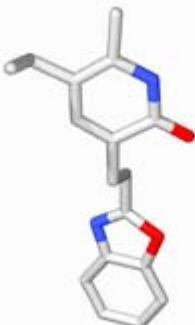
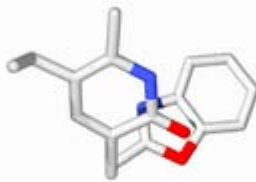
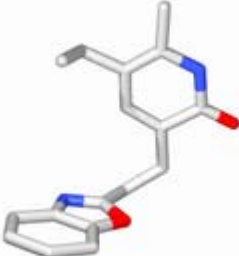
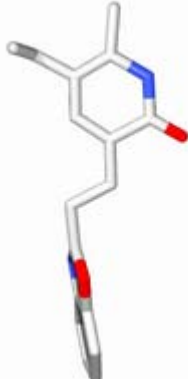
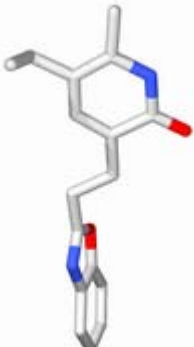


Figure 20 : Superposition des 10 conformations du L-696,229 générées suite à une procédure de recherche systématique. Représentation dans deux plans perpendiculaires.

Conformation	Couleur	Energie (kCal/mole)
1	Rouge	8.6
2	Bordeaux	9.1
3	vert clair	10.2
4	vert sombre	10.2
5	Cyan	10.5
6	Bleu	10.5
7	Rose	11.0
8	Magenta	11.2
9	Jaune	11.9
10	Orange	11.9

Figure 21 : Energies associées aux conformations de L-696,229

		
Conformation 1	Conformation 2	Conformation 3
		
Conformation 4	Conformation 5	Conformation 6
		
Conformation 7	Conformation 8	Conformation 9
	Figure 20a : représentation des dix conformations du L-696,229 générées suite à une procédure de recherche systématique	
Conformation 10		

Ces résultats permettent de **valider** le choix du champ de forces *cff91* et indiquent également qu'une des conformations de basse énergie est proche des critères du pharmacophore « *butterfly* ».

4.2.1.4. Conclusions de l'étude conformationnelle des pyridinones *Merck*

L'analyse conformationnelle des 3-(alkylamino)pyridinones et des 3-alkylpyridinones permet de mieux comprendre leurs propriétés d'inhibiteurs de la transcriptase inverse. Malgré leurs différences de structure, les deux types de molécules possèdent des **conformations communes**, qui répondent aux critères du pharmacophore « *butterfly* ».

La correspondance entre les éléments structuraux des pyridinones *Merck* et ceux du pharmacophore est illustrée à la figure 22, pour le L-696,040.

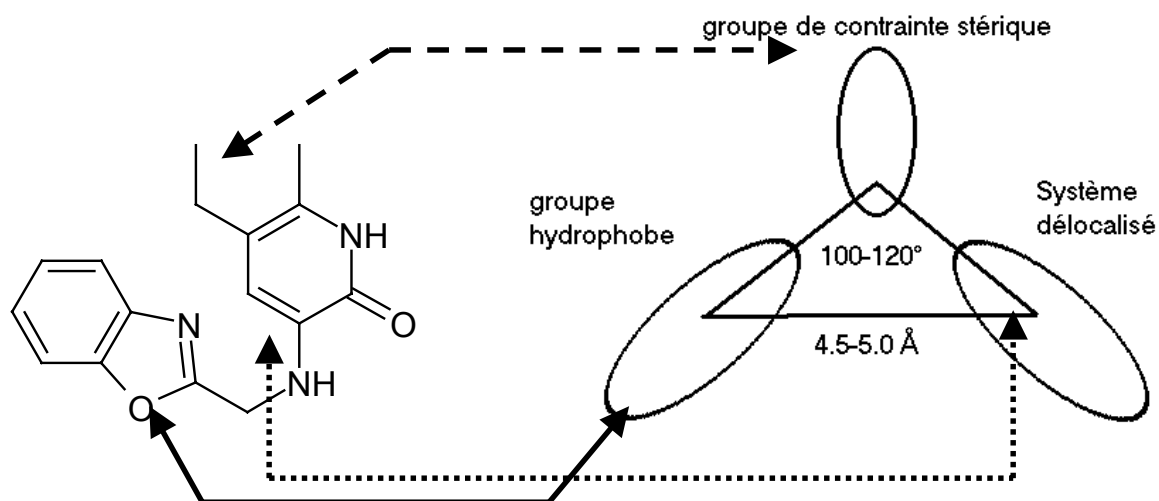


Figure 22 : Correspondance entre les éléments structuraux de la molécule L-696,040 et du modèle simplifié de pharmacophore « *butterfly* »

La capacité des deux types de pyridinones *Merck* à adopter des conformations communes en accord avec le pharmacophore *butterfly* peut *a priori* expliquer pourquoi les activités biologiques

de ces deux catégories de dérivés sont généralement assez proches. Il est maintenant nécessaire de rechercher la manière dont ces molécules interagissent avec le site allostérique de la transcriptase inverse du VIH-1, grâce à l'utilisation des algorithmes de *docking*.

4.2.2. Docking de pyridinones de la série Merck

La recherche d'un mode d'interaction TI-pyridinone capable de rendre compte des relations structure-activité publiées dans la littérature fait appel aux algorithmes génétiques de *docking* implémentés dans le programme *Autodock*. Les détails relatifs à ce type de simulation sont repris au chapitre 3.

4.2.2.1. Validation du programme *Autodock*

Avant d'utiliser *Autodock*^[33] pour l'étude des pyridinones, il est nécessaire de s'assurer que cette procédure est capable de rendre compte de l'interaction d'un INNTI avec son site de liaison. Pour ce faire, quatre **inhibiteurs de référence** (figure 23) pour lesquels la structure du complexe TI-INNTI a été déterminée expérimentalement ont été étudiés : la Névirapine^[3], l'Efavirenz^[11], la Capravirine^[12] et le TNK-651^[5]. Le *docking* de chaque composé a été réalisé en utilisant une structure de la TI extraite du complexe correspondant.

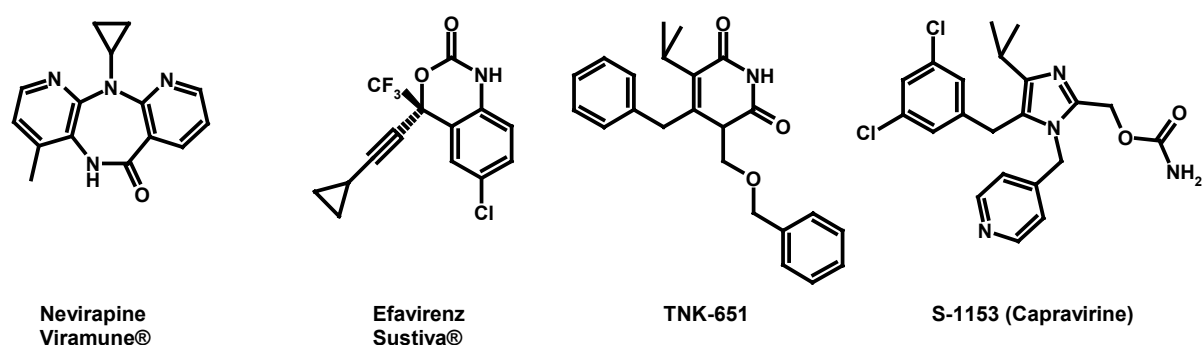


Figure 23 : Inhibiteurs de référence utilisés pour la validation du logiciel *Autodock*

Les résultats de ces travaux préliminaires permettent de **valider** le choix du logiciel *Autodock*. En effet, pour les quatre INNTI sélectionnés, la solution la plus favorable parmi celles proposées par *Autodock* est très proche de la position observée dans le complexe TI-INNTI

expérimental. Les déviations moyennes (RMS) par rapport à la structure de référence, calculées sur les atomes lourds (autres que H) de chaque INNTI sont indiquées à la figure 24.

Inhibiteur	RMS (Å)
Névirapine	0.85
Efavirenz	0.78
TNK-651	0.96
Capravirine	1.25

Figure 24 : Comparaison de la structure du complexe TI-INNTI proposé par *Autodock* et de celle déterminée par DRX : écart moyen sur la position des atomes de l'inhibiteur.

Il est par contre important de constater que même si *Autodock* prédit une valeur de K_i pour la molécule étudiée, il n'existe aucune corrélation appréciable entre ce K_i et les valeurs d'IC50/EC50 renseignées dans la littérature, tout au moins en ce qui concerne les quatre INNTI étudiés lors de cette validation.

Dans le cadre de ces travaux, *Autodock* semble donc indiqué pour déterminer la position d'un ligand au sein du site de liaison des INNTI, et non son affinité.

4.2.2.2. Recherches préliminaires

Les premières études de *docking* réalisées sur les pyridinones *Merck* ont été menées sur le composé **L-696,040** (figure 25), dont sont dérivés plusieurs inhibiteurs. Aucun substituant n'est présent sur le cycle benzoxazole de cette molécule, ce qui facilite, en théorie, son insertion dans le site allostérique, en minimisant les risques de conflits stériques et en limitant le nombre de variables à optimiser par les algorithmes de *docking*. La structure de la TI utilisée pour cette recherche a été extraite de celle du complexe TI-TNK-651^[5] (pdb1rt2), déterminée par DRX.

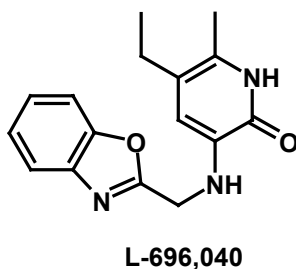


Figure 25 : Structure du L-696,040

Les **200 hypothèses d'interaction** générées ont été classées en **30 familles**, en fonction de leur position dans le site de liaison (RMS = 1Å). Les énergies d'interaction qui leur sont attribuées par *Autodock* sont très semblables et vont de -10.78 kcal/mole à -9.50 kcal/mole. Après examen de ces propositions sur base des critères imposés par le pharmacophore « *butterfly* », **seules deux d'entre elles peuvent être considérées comme cohérentes**. Toutes deux diffèrent des modèles proposés par Jourdan *et al*, Tucker *et al* et Mager. Ces solutions ont été affinées à l'aide du programme *Discover* (protocole décrit au chapitre 3).

La première hypothèse, désignée **mode A** (figure 26) place le **cycle principal** de la molécule (pyridinone) à proximité des résidus **Leu100, Val106 et Lys101**. La pyridinone (a) forme alors un **pont hydrogène** avec le carbonyle de Lys101, comme cela est observé pour de nombreux autres INNTI. Le **benzoxazole** (b) occupe la **zone hydrophobe** du site de liaison, tandis que la zone flexible localisée à proximité de Pro236 est laissée inexploitée. Les deux cycles du L-696,040 se superposent ainsi à leurs équivalents chez le TNK-651. Le fragment 5-éthyle du L-696,040 (c) occupe l'espace réservé à un groupement isopropyle dans le complexe de référence et peut être orienté dans la même direction que le benzoxazole, ou à son opposé. Ces deux possibilités sont équivalentes du point de vue de l'énergie d'interaction avec la TI (-21.7 et -21.5 kCal/mole), mais la deuxième permet cependant à l'inhibiteur de mieux occuper l'espace réservé au **groupe de contrainte stérique** du pharmacophore, ce qui la rend plus crédible.

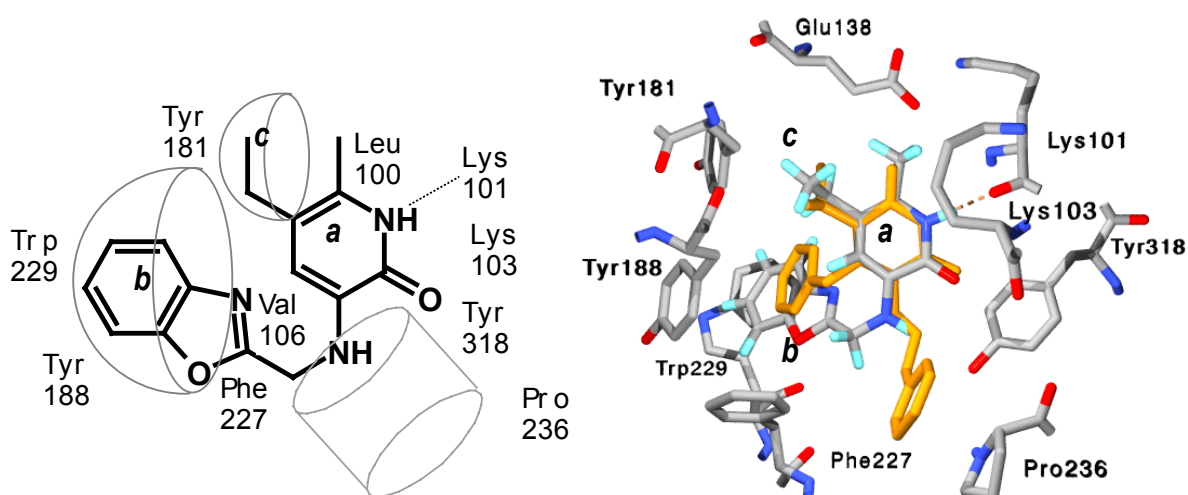


Figure 26 : Proposition d'un modèle d'interaction TI-L-696,040 : mode A . Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

La conformation de l'inhibiteur au sein du site de liaison est très proche d'une des structures de basse énergie qui avaient été identifiées lors de son analyse conformationnelle. La différence d'énergie entre ce conformère et la structure la plus stable produite lors de cette analyse est estimée par *Discover* à 1.3 kCal / mole.

Le deuxième mode de liaison considéré, désigné **mode B** (figure 27), est légèrement plus favorable du point de vue de l'énergie d'interaction avec la TI (-23.5 kcal/mole). Il est également caractérisé par la présence d'un **pont hydrogène** entre le NH de la pyridinone et le carbonyle de **Lys101**. Comme dans le cas précédent, le **cycle principal** de la molécule est superposé au **cycle thymine du TNK-651**, tandis que le **benzoxazole** occupe la **zone hydrophobe** du site allostérique de la TI. La différence entre les modes A et B réside en fait dans les orientations relatives de l'inhibiteur. Dans le cas du mode B, le groupe 5-éthyle du L-696,040 est placé à proximité du résidu Pro236, tandis que la fonction 3-aminoalkyle se superpose à l'isopropyle du TNK-651. La présence de ce fragment polaire dans une région hydrophobe du site de liaison semble *a priori* peu favorable. De plus, ce groupement de faible volume, situé dans le plan du cycle pyridinone, ne permet pas d'occuper entièrement l'espace alloué au groupe de contrainte stérique dans le pharmacophore. Ces deux derniers points sont cependant insuffisants pour mener au rejet de ce second modèle d'interaction.

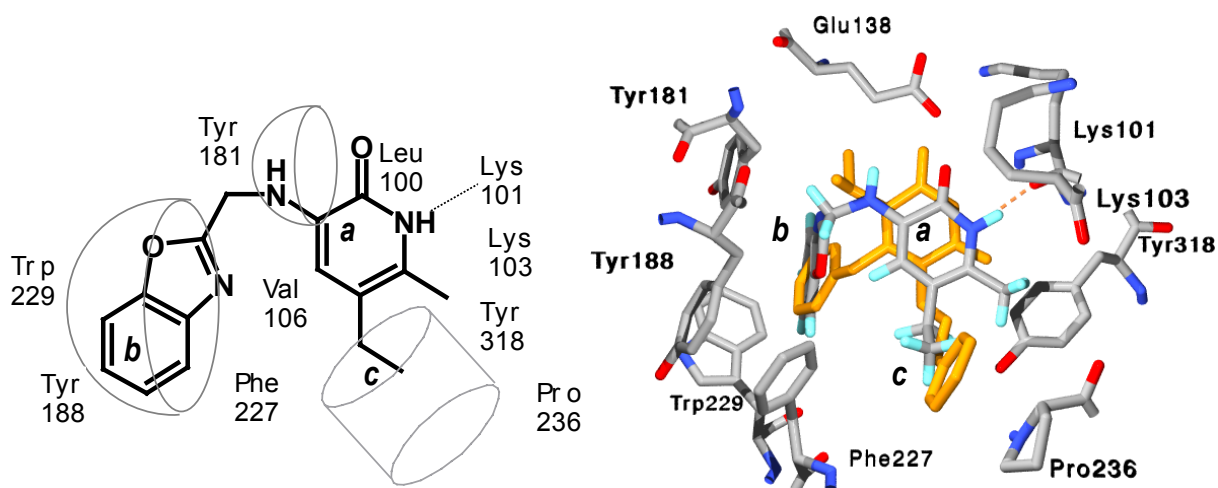


Figure 27 : Proposition d'un modèle d'interaction TI-L-696,040 : mode B. Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

Même si le mode de liaison B ne semble pas répondre parfaitement aux conditions posées par le pharmacophore, la **faible différence d'énergie d'interaction** entre les deux modèles et leur relative **cohérence** ne permettent pas de désigner avec certitude l'hypothèse la plus réaliste. Pour ce faire, il est nécessaire de poursuivre notre étude sur d'autres pyridinones de la série *Merck* et d'examiner les résultats obtenus à la lumière des **relations structure-activité** établies non seulement pour ces pyridinones, mais aussi pour d'autres familles d'INNTI. Trois types de variations moléculaires ont été considérées : au niveau de la pyridinone, du cycle secondaire et enfin du *spacer* qui relie ces deux cycles.

4.2.2.3. Variations sur le cycle pyridinone

Onze pyridinones de la série *Merck*, représentatives des variations moléculaires réalisées sur le cycle principal de ces molécules, ont été étudiées afin d'évaluer la capacité des deux modèles à expliquer les relations structure–activité décrites dans la littérature. Celles-ci sont illustrées à la figure 28 .

La plupart des modifications apportées aux molécules de base concernent les **positions 4 et 5** de la pyridinone. Il est cependant important de constater que la présence d'un **donneur d'hydrogène en position 1** est indispensable à l'activité du composé (a), ce qui est en bon accord avec les deux modèles proposées, qui impliquent la formation d'un pont H avec le résidu Lys101. L'introduction de substituants sur la position 4 est généralement défavorable (b), tout particulièrement si ceux-ci sont volumineux. De son côté, **le groupement présent en position 5 influence de manière déterminante les propriétés de la molécule**. Les activités les plus favorables sont obtenues pour des substituants éthyle, isopropyle (c) et cyclopropyle. Des groupements plus petits (méthyle, d) semblent insuffisants, tandis que le pouvoir inhibiteur décroît rapidement dans le cas de groupes plus volumineux (e, f). De même, l'introduction d'un groupement polaire en position 5 (g, h) a un impact défavorable sur les propriétés inhibitrices des molécules.

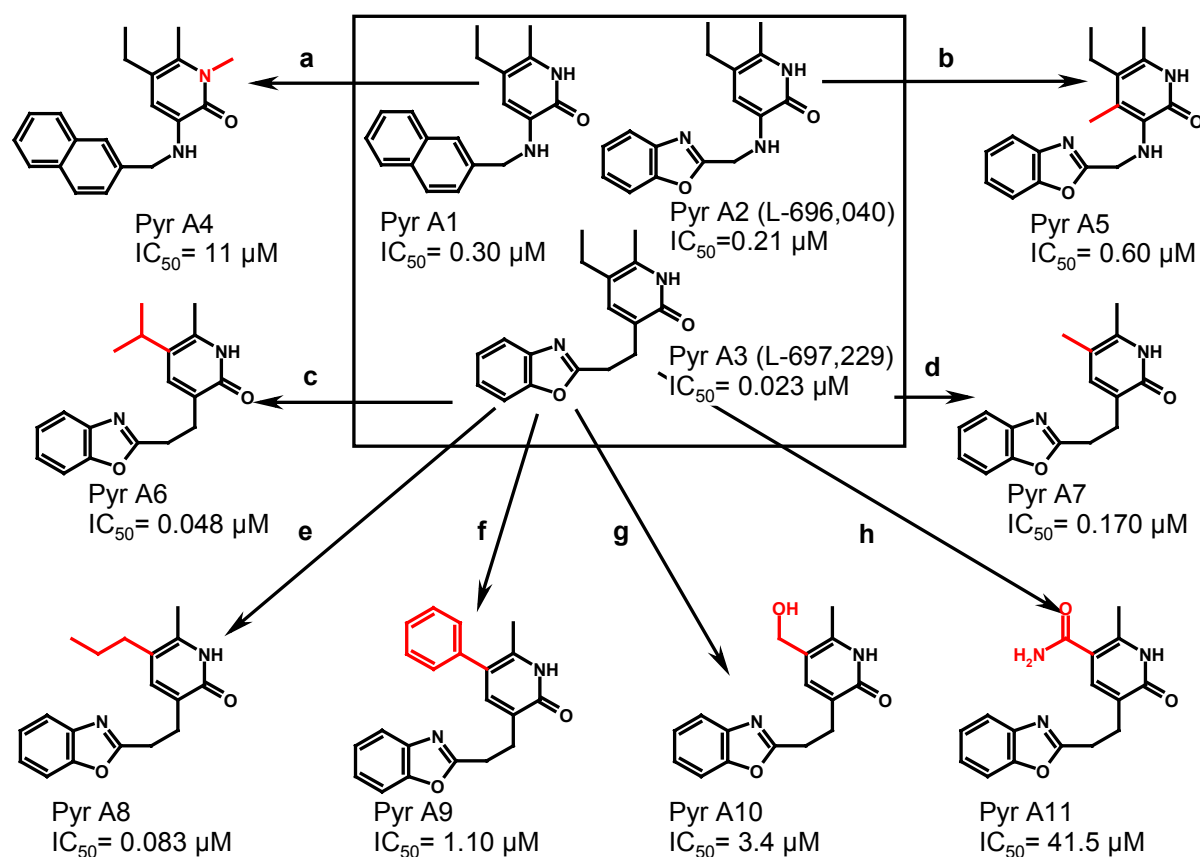
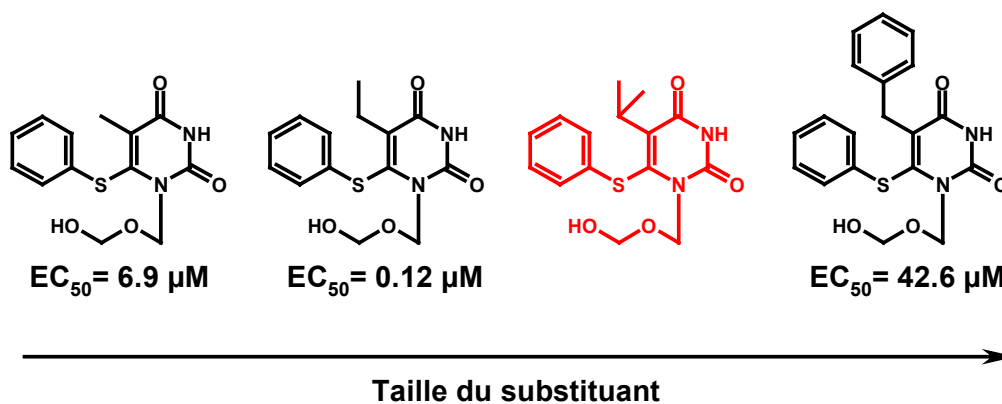


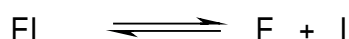
Figure 28 : Série Merck : Variations moléculaires sur le cycle 2-pyridinone

Certaines des relations structure-activité relatives à la position 5 des pyridinones sont très semblables à celles établies pour les **analogues du TNK-651**^[34]. On retrouve en effet dans cette famille les **mêmes groupements favorisés** (éthyle ou isopropyle) et les **mêmes limitations de taille** (figure 29). Ces données plaident donc *a priori* en faveur du mode A, dans lequel les substituants en position 5 de la pyridinone et du TNK-651 sont superposés.



Comme dans le cas du L-696,040, les onze composés sélectionnés, désignés PyrA1 à Pyr A11, ont été étudiés grâce aux algorithmes de *docking* implémentés dans *Autodock*. Pour chaque inhibiteur, les solutions liées aux modes A et B ont ensuite été affinées à l'aide de *Discove*^[32], en utilisant le champ de forces *cff91*. Les **énergies d'interaction** TI-ligand ont ensuite été **comparées aux relations structure-activité** correspondantes, afin de vérifier si elles sont en mesure de rendre compte de ces données expérimentales et de prédire de manière efficace l'activité biologique d'une molécule.

Idéalement, il doit exister une **relation linéaire** entre les énergies d'interaction obtenues et le pIC₅₀ des molécules étudiées. En effet, si on considère la dissociation d'un complexe enzyme-inhibiteur :



où : EI = complexe enzyme-inhibiteur, E = enzyme libre et I = Inhibiteur libre

On peut définir une **constante d'équilibre** K_i décrivant cette dissociation. K_i est liée à l'énergie nécessaire à la dissociation du complexe selon une relation simple.

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = e^{\frac{-\Delta G_0}{RT}}$$

Il est possible de transformer cette formule en une **relation linéaire** :

$$\ln(K_i) = \frac{-\Delta G_0}{RT} \quad \log(K_i) = \frac{-\Delta G_0}{2,303 RT}$$

On peut alors définir $pK_i = -\log(K_i)$. Ainsi, plus le pK_i d'un inhibiteur est élevé, plus stable sera le complexe qu'il forme avec l'enzyme

$$pK_i = -\log(K_i) = \frac{\Delta G_0}{2,303 RT}$$

Cette formule doit encore être quelque peu adaptée pour pouvoir être utilisée avec une valeur de **pIC₅₀ ou de pEC₅₀**. Si on définit l'IC₅₀ comme étant la concentration en inhibiteur bloquant 50% de l'activité enzymatique, on peut aisément démontrer que cette valeur est équivalente à celle du K_i, si on postule que l'inhibition observée résulte uniquement de la formation du complexe enzyme–inhibiteur. Le même postulat devra également être posé dans le cas des valeurs d'EC₅₀. D'autre part, on peut ici définir l'**affinité (A)** d'un inhibiteur pour l'enzyme comme étant la valeur opposée à l'énergie d'interaction enzyme-inhibiteur fournie par *Discover*. **On obtient ainsi une relation linéaire dans laquelle l'activité biologique d'une molécule (pIC₅₀ ou pEC₅₀) croît lorsque son affinité pour l'enzyme augmente.**

$$pIC_{50} = -\log(IC_{50}) = \frac{A}{2,303 RT}$$

Les affinités obtenues après modélisation de chaque inhibiteur sont reprises dans les tableaux 30 (mode A) et 32 (mode B), où elles sont comparées aux valeurs d'IC₅₀. Les pIC₅₀ des inhibiteurs PyrA3 et PyrA6 à PyrA11, qui sont tous dérivés du L-696,229 ne variant qu'au niveau de la position 5, sont également portés dans un graphique, en fonction de ces affinités (figures 31 et 33).

Molécule	E docking	Affinité	IC50 (μM)
PyrA1	-22,05	22,05	0,3
PyrA2	-21,54	21,54	0,21
PyrA3	-20,58	20,58	0,023
PyrA5	-22,37	22,37	0,6
PyrA6	-20,72	20,72	0,048
PyrA7	-19,60	19,60	0,17
PyrA8	-21,75	21,75	0,083
PyrA10	-23,12	23,12	3,4
PyrA11	-23,03	23,03	41,5

Tableau 30 : Mode A : Affinité des inhibiteurs étudiés et comparaison à l'IC₅₀ publié : Influence de la substitution du cycle pyridinone

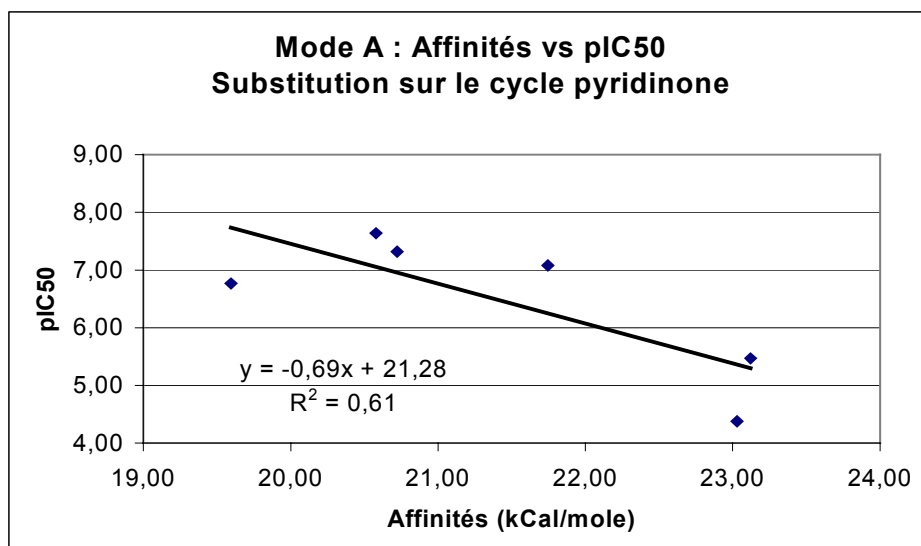


Figure 31 : Mode A : Relation entre l'affinité théorique des inhibiteurs étudiés et leur pIC₅₀ publié

Molécule	E docking	Affinité	IC50 (μM)
PyrA1	-23.40	23.40	0.3
PyrA2	-23.45	23.45	0.21
PyrA3	-23.53	23.53	0.023
PyrA4	-23.40	23.40	11
PyrA6	-23.73	23.73	0.048
PyrA7	-22.54	22.54	0.17
PyrA8	-24.16	24.16	0.083
PyrA9	-24.78	24.78	1.1
PyrA10	-25.08	25.08	3.4
PyrA11	-24.95	24.95	41.5

Tableau 32 : Mode B : Affinité des inhibiteurs étudiés et comparaison à l'IC₅₀ publié : Influence de la substitution du cycle pyridinone

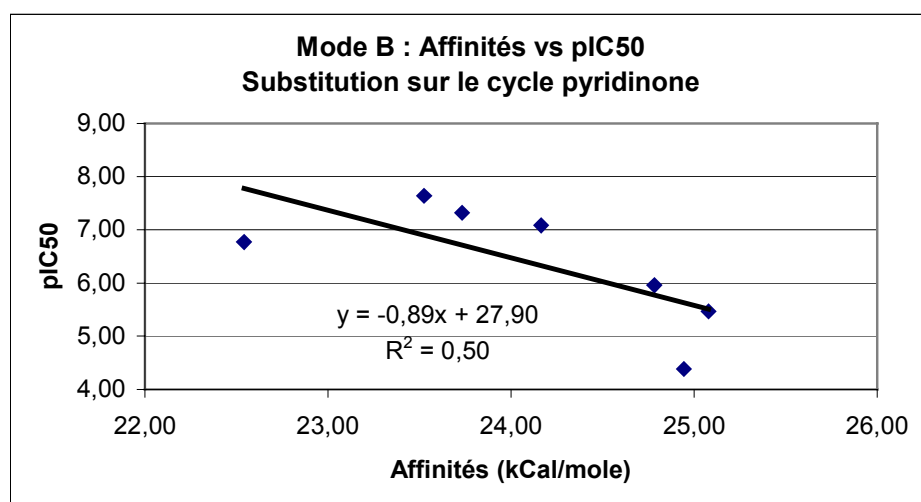


Figure 33 : Mode B : Relation entre l'affinité théorique des inhibiteurs étudiés et leur pIC₅₀ publié

Le résultat obtenu est assez décevant. D'une part, il semble n'exister qu'une **faible relation** entre l'affinité théorique d'une molécule pour la TI et son activité biologique réelle. Les coefficients de corrélation obtenus sont en effet de 0.61 pour le mode A et de 0.50 pour le mode B. D'autre part, les relations obtenues sont **illogiques**, car l'activité biologique tend en effet à diminuer lorsque l'affinité pour la TI augmente. Les énergies d'interaction fournies par *Discover* ne peuvent donc constituer à elles seules un outil de prédiction fiable.

Cette observation n'est pas particulièrement surprenante. La valeur d'**énergie d'interaction** fournie par *Discover* provient en effet de la somme d'un terme de **Coulomb** et d'un terme de **Van der Waals**, sur chaque atome de la protéine et du ligand. Elle ne traduit donc au mieux que la **stabilisation** de ce ligand au sein du site de liaison. Même si cette donnée est évidemment importante dans la formation d'un complexe enzyme-inhibiteur, elle est loin d'être la seule à intervenir dans ce processus. La procédure *Discover* appliquée jusqu'ici ne tient par exemple aucun compte de l'état de **solvatation** de l'enzyme et du ligand (figure 34), ni des **changements de conformation** nécessaires à la formation du complexe, ni des **variations d'entropie** liées à ce processus.

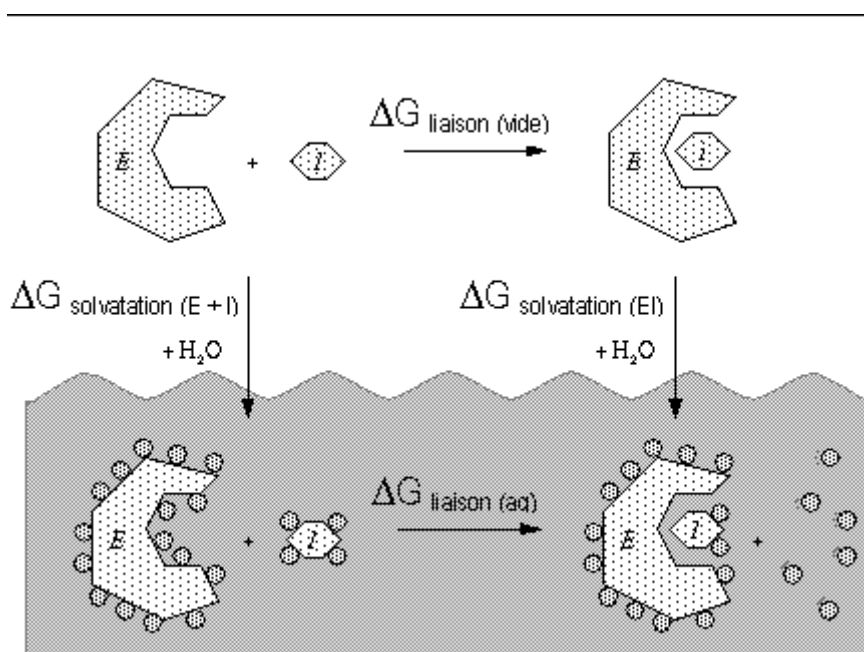
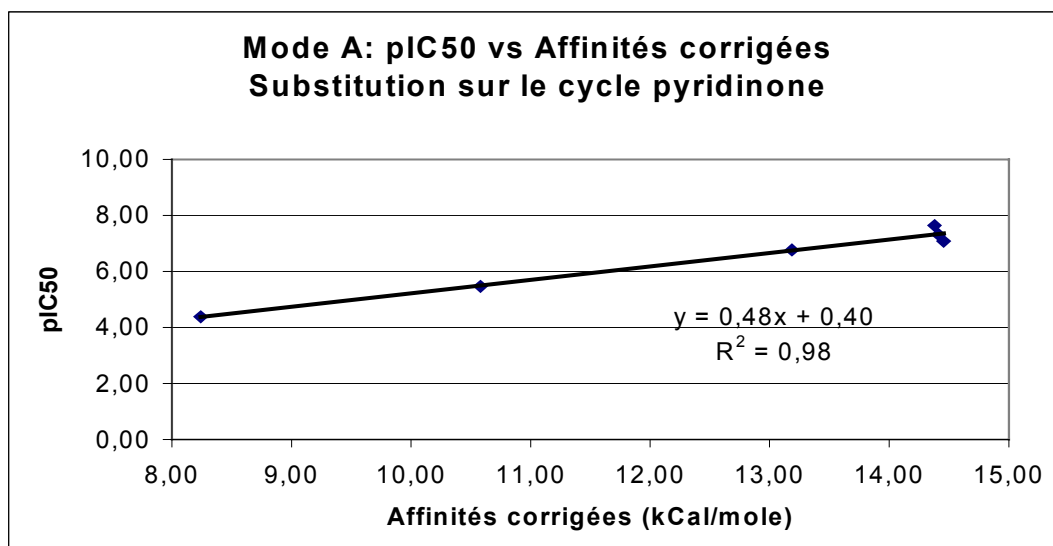


Figure 34 : Influence de l'état de solvation de l'enzyme et du ligand. Une procédure telle que *Discover* estime l'énergie de liaison d'un ligand dans le vide, ou dans un milieu possédant une constante diélectrique définie. Dans la réalité, enzyme et ligands doivent être désolvatés pour permettre la formation du complexe.

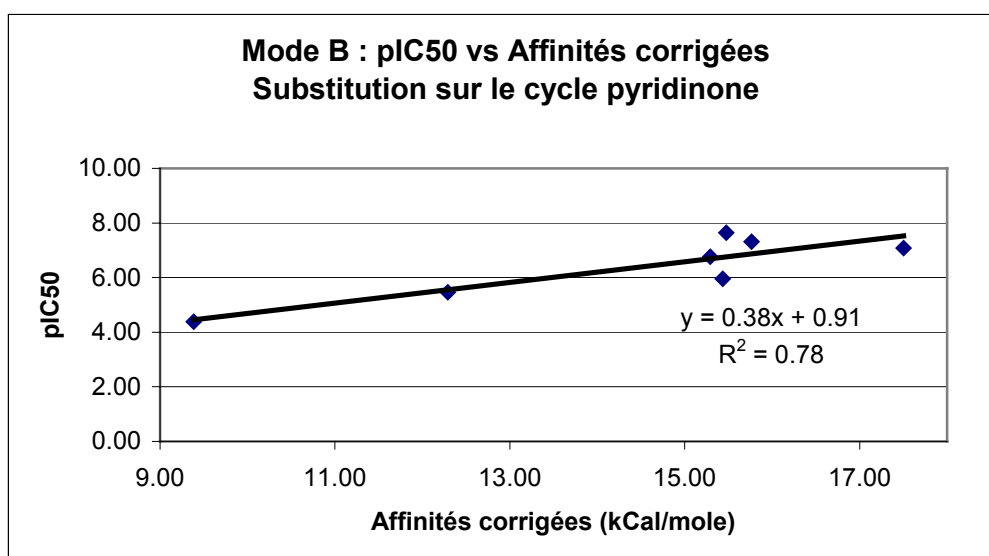
Les fonctions thermodynamiques telles que l'enthalpie (H) ou l'énergie libre de Gibbs (G) étant des **fonctions d'état**, il est cependant possible, par un cycle de Hess, de calculer une valeur d'affinité plus rigoureuse, en apportant des **corrections** à l'énergie d'interaction estimée par *Discover*. Les termes liés à la solvation de l'enzyme et à ses éventuels changements de conformation sont difficiles à calculer de manière rigoureuse et leur estimation exige une étude de l'enzyme par dynamique moléculaire, sur une période de temps assez longue et dans un milieu contenant un nombre important de molécules d'eau (« boîte d'eau » périodique). Les corrections liées au ligand sont par contre relativement aisées à introduire. Nous avons ainsi choisi de calculer la pénalité énergétique liée à la **désolvatation du ligand** grâce à la méthode de Ooi *et al*^[35], implémentée dans le module *Solvation*^[36] du programme *Insight II*. En outre, la pénalité énergétique liée aux **changements de conformation du ligand** a également été estimée, en comparant pour chaque composé le conformère présent au sein du complexe TI-INNTI à la structure la plus stable identifiée lors de son analyse conformationnelle par dynamique moléculaire. Une fonction similaire a été utilisée par Smith *et al*^[37] pour prédire les affinités de plusieurs analogues du TIBO pour la TI. L'introduction de ces deux corrections (tableaux 35 et 37) permet d'obtenir des relations plus **cohérentes**, tant pour le mode A que pour le mode B. Dans les deux cas, **l'affinité corrigée du ligand est proportionnelle à son activité biologique** (figures 36 et 38), exprimée sous forme de pIC₅₀.

Molécule	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée	IC50 (μM)
PyrA1	-22,05	22,05	3,98	1,31	16,76	0,3
PyrA2	-21,54	21,54	4,89	1,28	15,37	0,21
PyrA3	-20,58	20,58	4,62	1,58	14,38	0,023
PyrA5	-22,37	22,37	5,94	3,49	12,94	0,6
PyrA6	-20,72	20,72	4,33	1,98	14,41	0,048
PyrA7	-19,60	19,60	4,81	1,6	13,19	0,17
PyrA8	-21,75	21,75	4,45	2,84	14,46	0,083
PyrA10	-23,12	23,12	10,69	1,85	10,58	3,4
PyrA11	-23,03	23,03	12,91	1,88	8,24	41,5

Tableau 35 : Mode A : Affinité corrigée (en kcal/mole) des inhibiteurs étudiés et comparaison à l'IC₅₀ publié : Influence de la substitution du cycle pyridinone

Figure 36 : Mode A : Relation entre l'affinité corrigée des inhibiteurs étudiés et leur pIC₅₀ publié

Molécule	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée	IC ₅₀ (μM)
PyrA1	-23,40	23,40	3,98	1,37	18,05	0,3
PyrA2	-23,45	23,45	4,89	1,87	16,69	0,21
PyrA3	-23,53	23,53	4,62	3,43	15,48	0,023
PyrA4	-23,40	23,40	1,24	1,38	20,78	11
PyrA6	-23,73	23,73	4,33	3,64	15,76	0,048
PyrA7	-22,54	22,54	4,81	2,44	15,29	0,17
PyrA8	-24,16	24,16	4,45	2,21	17,50	0,083
PyrA9	-24,78	24,78	6,62	2,73	15,43	1,1
PyrA10	-25,08	25,08	10,69	2,1	12,29	3,4
PyrA11	-24,95	24,95	12,91	2,65	9,39	41,5

Tableau 37 : Mode B : Affinité corrigée (en kcal/mole) des inhibiteurs étudiés et comparaison à l'IC₅₀ publié : Influence de la substitution du cycle pyridinoneFigure 38 : Mode B : Relation entre l'affinité corrigée des inhibiteurs étudiés et leur pIC₅₀ publié

L'examen de ces nouvelles données montre à présent qu'il existe une nette **corrélation** entre les affinités calculées au terme de la procédure de modélisation et les activités biologiques des molécules étudiées. Parmi les corrections apportées, **la désolvatation joue le rôle le plus important**. Les énergies nécessaires à la désolvatation vont en effet de 1.24 à 12.91 kCal/mole, ce qui peut représenter jusqu'à 50% de la valeur d'affinité initialement attribuée par *Discover*. Les dérivés les plus polaires comme PyrA10 et PyrA11, sont en toute logique les plus affectés par cette correction. On constate ainsi que le faible gain d'affinité attribué par *Discover* à ces structures ne suffit pas à compenser le coût énergétique lié à leur désolvatation, ce qui explique la perte d'activité biologique. **La pénalité liée au changement de conformation du ligand est plus faible**. Dans la plupart des cas, elle n'excède pas 10 à 15% de la valeur d'affinité non corrigée.

Il convient maintenant de déterminer laquelle des deux hypothèses d'interaction est la plus cohérente par rapport aux relations structure-activité liées aux composés modélisés. Le **mode A** est caractérisé par un **meilleur coefficient de corrélation** ($r^2=0.98$). Les trois molécules les plus affines de la série étudiée (PyrA3, PyrA6 et PyrA8) sont bien celles qui possèdent la meilleure activité inhibitrice. La relation obtenue pour le mode A traduit également le fait que **l'espace disponible** au niveau de la position 5 du cycle pyridinone est **limité**. On constate ainsi que les **contraintes conformationnelles** sont un peu plus élevées dans le cas du composé PyrA8, qui porte un groupement n-propyle et qu'aucune solution n'est proposée pour la molécule PyrA9, qui possède un groupe 5-phényle nettement trop volumineux. L'absence de solution pour le composé PyrA4 illustre pour sa part l'importance d'un donneur d'hydrogène en position 1. Enfin, on remarque que les contraintes de conformation les plus importantes sont celles liées au composé PyrA5. Ceci est du à **l'encombrement stérique** généré par un substituant en position 4, qui pénalise les conformations en accord avec le pharmacophore « *butterfly* ». En résumé, ce mode A semble reproduire de manière convaincante les relations structure-activité liées aux positions 4 et 5 du cycle pyridinone.

Le **mode B** est caractérisé par un **coefficient de corrélation plus faible** que celui attribué au mode A (0.78 au lieu de 0.98). Il est également entaché de **plusieurs incohérences**. D'une part, il ne semble pas capable de reproduire de manière convaincante les relations structure-

activité liées à la position 5 de la pyridinone. Ainsi, la structure PyrA8, dotée d'un groupement n-propyle, possède la meilleure valeur d'affinité, qui est environ 2 kCal/mole plus élevée que celle de PyrA3 et PyrA6, alors que ces trois molécules sont caractérisées par des activités inhibitrices très semblables. Le mode B accorde également aux composés PyrA5 et PyrA9, qui sont des inhibiteurs relativement faibles, une affinité très semblable à celle de PyrA3 et PyrA6, qui sont les plus actifs d'un point de vue biologique. Ceci est sans doute lié au fait que le substituant en position 5 de la pyridinone est placé dans la zone flexible de la TI, qui peut aisément accueillir des groupements de taille très variable. Il n'est donc pas étonnant que le mode de liaison B ne puisse rendre compte des **limitations de taille** normalement imposées à ces substituants. Enfin, ce modèle ne permet pas non plus d'expliquer l'importance d'un donneur d'hydrogène en position 1, puisque la structure PyrA4, qui en est dépourvue, est prédite plus affine que la structure de référence PyrA1.

En conclusion, l'étude de cette première série de pyridinones *Merck* indique que parmi les deux hypothèses d'interaction envisagés, le mode A se révèle être le plus cohérent par rapport aux relations structure-activité.

4.2.2.4. Variations sur le spacer

Une seconde série de dix molécules illustrant les modifications qui peuvent être apportées au *spacer* reliant la pyridinone au cycle double ont été étudiées (figure 39). Le remplacement de la chaîne 3-aminoalkyle par son équivalent 3-alkyle (a) ou 3-aminodialkyle (b) a généralement peu d'influence sur les propriétés inhibitrices de la molécule, même s'il existe des exceptions (c). Ceci est logique au vu de l'analyse conformationnelle des pyridinones *Merck*, puisque la perte du pont hydrogène intramoléculaire lié au groupement 3-aminoalkyle n'empêche pas la molécule de prendre une conformation en accord avec le pharmacophore *butterfly*. D'autres variations ont un effet plus prononcé sur l'activité de la molécule. Ainsi, la **longueur du spacer** a un impact déterminant : une **chaîne de deux atomes** mène à des **propriétés optimales**, tandis que les analogues dotés d'un **spacer plus court** (d) ou **plus long** (e) sont nettement **pénalisés**. De même, toute rigidification de ce *spacer*, comme le remplacement de la chaîne alkyle par un alcène Z (f) ou E (g) nuit au pouvoir inhibiteur de la molécule.

Comme précédemment, les composés sélectionnés ont fait l'objet d'une étude de *docking*, afin de vérifier si l'un ou l'autre des modes de liaison proposés est en mesure de reproduire les données expérimentales. Les résultats obtenus pour le mode A sont repris dans le tableau 40 et la figure 41, tandis que ceux relatifs au mode B sont renseignés dans le tableau 42 et la figure 43. Seules les affinités des composés PyrA2, PyrA3, PyrB5, PyrB6 et PyrB7, qui ne diffèrent entre eux que par la nature du *spacer*, ont été portées en graphique. Dans le cas du mode A, la corrélation entre les affinités corrigées et les pIC_{50} expérimentaux est moins nette ($r^2=0.60$) que celle qui avait été établie dans le cas des modifications réalisées sur le cycle pyridinone. Aucune corrélation ne peut par contre être mise en évidence pour le mode B.

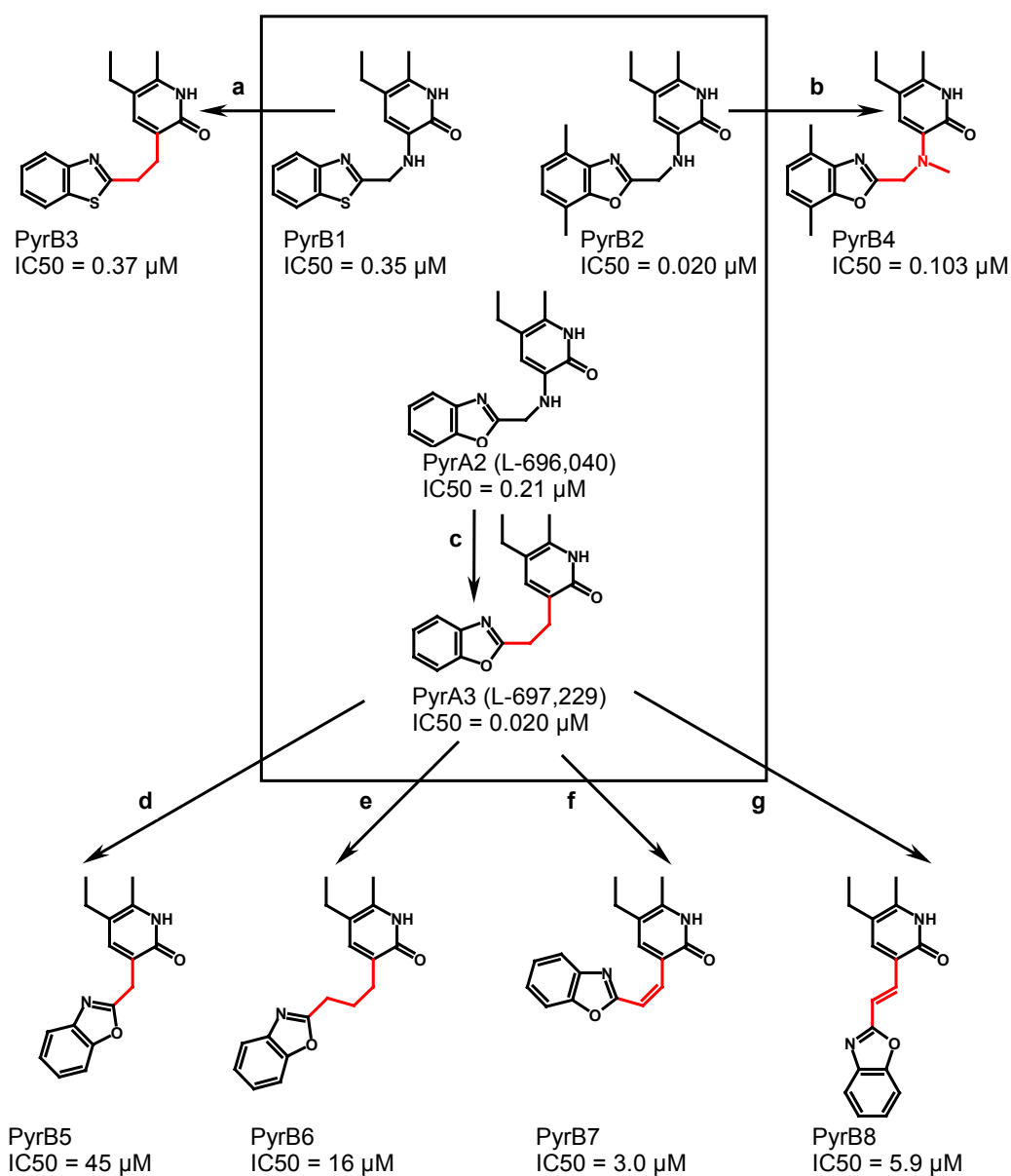


Figure 39 : Série Merck : Variations moléculaires sur le spacer

Molécule	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée	IC50 (μM)
PyrA2	-21.54	21.54	4.9	1.28	15.36	0.21
PyrA3	-20.58	20.58	4.62	1.58	14.38	0.023
PyrB1	-21.19	21.19	4.64	3.68	12.87	0.35
PyrB2	-21.95	21.95	3.2	1.46	17.29	0.02
PyrB3	-20.96	20.96	3.54	3.99	13.43	0.37
PyrB4	-24.76	24.76	0.27	5.45	19.04	0.103
PyrB5	-19.74	19.74	4.126	4.42	11.19	45
PyrB6	-21.07	21.07	3.8	9.44	7.83	16
PyrB7	-21.378	21.378	3.37	8.43	9.578	3

Tableau 40 : Mode A : Affinité corrigée (en kcal/mole) des inhibiteurs étudiés et comparaison à l'IC₅₀ publié : Influence du *spacer*

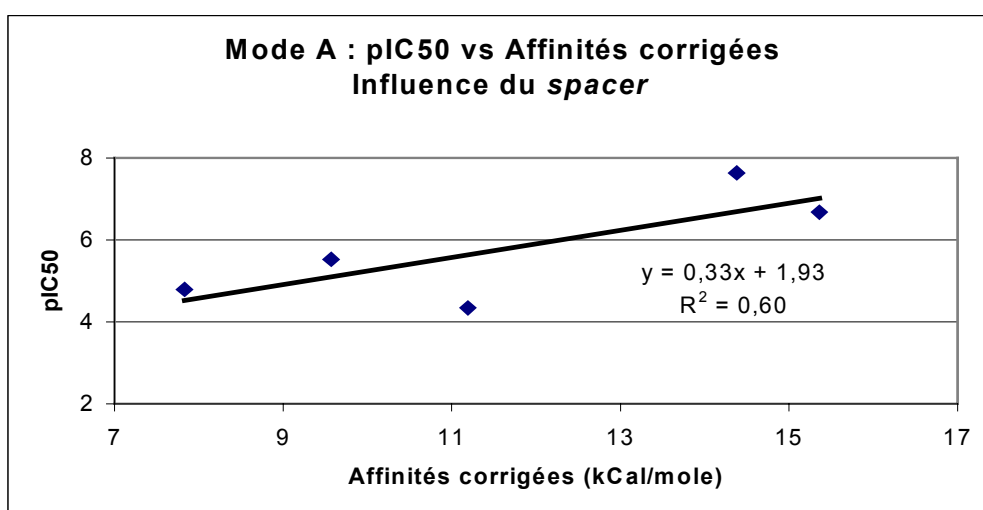


Figure 41 : Mode A : Relation entre l'affinité corrigée des inhibiteurs étudiés et leur pIC₅₀ publié

Molécule	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée	IC50 (μM)
PyrA2	-23,45	23,45	5,14	1,87	16,44	0,21
PyrA3	-23,53	23,53	4,62	3,43	15,48	0,023
PyrB1	-22,89	22,89	4,64	1,81	16,44	0,35
PyrB2	-24,44	24,44	3,2	2,13	19,11	0,02
PyrB3	-21,90	21,90	3,54	1,97	16,39	0,37
PyrB4	-25,15	25,15	0,27	6,02	18,86	0,103
PyrB5	-23,04	23,04	4,13	3,59	15,32	45
PyrB6	-23,29	23,29	3,8	2,97	16,52	16
PyrB7	-22,47	22,47	1,78	3,87	16,82	3

Tableau 42 : Mode B : Affinité corrigée (en kcal/mole) des inhibiteurs étudiés et comparaison à l'IC₅₀ publié : Influence du *spacer*

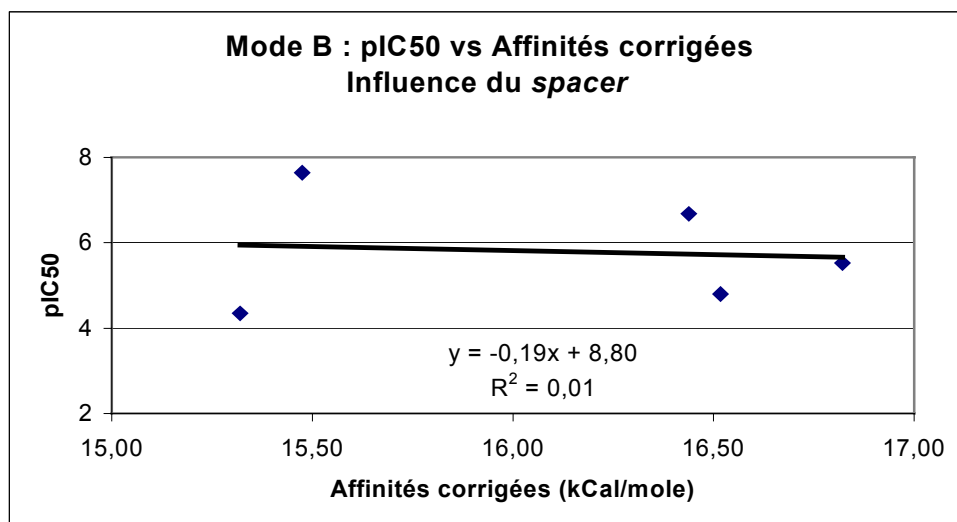


Figure 43 : Mode B : Relation entre l'affinité corrigée des inhibiteurs étudiés et leur pIC₅₀ publié

Même si il établit un lien logique entre les affinités des inhibiteurs et leur activité biologique, **le mode de liaison A présente ici plusieurs faiblesses**. Ainsi, les effets liés à la présence et à l'absence d'un donneur d'hydrogène dans le *spacer* ne peuvent être reproduits (PyrA2-PyrA3, PyrB1-PyrB3, PyrB2-PyrB4). Ceci est sans doute lié au fait que cette partie de la molécule est placée à proximité de la zone flexible de la TI. Dans des conditions réelles, cette partie de l'enzyme est capable de s'adapter, dans une certaine mesure, à la structure du ligand présent dans le site allostérique. Ce processus ne peut être reproduit par le protocole de modélisation employé ici, ce qui explique sans doute en partie le manque de corrélation entre pIC₅₀ et affinité corrigée. Il est par contre intéressant de constater que le mode de liaison A rend assez bien compte des **pertes d'activité liées aux variations de longueur du spacer ou à sa rigidification**. Les composés PyrB5, PyrB6 et PyrB7 présentent en effet une affinité nettement inférieure à celle des inhibiteurs de référence PyrA2 et PyrA3, tandis qu'aucune hypothèse d'interaction n'a pu être proposée pour l'alcène *E* PyrA8.

A l'inverse, **aucune information exploitable ne peut être tirée du mode de liaison B**. Le coefficient de corrélation obtenu est proche de 0 et l'ensemble des cinq molécules est localisé dans une fenêtre de valeurs d'affinité qui n'excède pas 1.4 kCal/mole. Il n'est donc pas possible de mettre en évidence une différence significative entre les composés les plus actifs et les moins actifs de la série. Plusieurs incohérences discréditent encore d'avantage cette hypothèse d'interaction. Selon celle-ci, les variations de longueur du *spacer* n'empêchent en rien la

molécule de se lier au site allostérique de la TI, avec une affinité presque équivalente à celle des molécules les plus actives de la série. On peut ainsi vérifier que les valeurs d'affinité accordées à PyrB5 ou PyrB6 (respectivement 15.32 et 16.52 kcal/mole), qui sont les inhibiteurs les plus faibles de la série sont équivalentes ou même supérieures à celles attribuées au composé le plus efficace (PyrA3, 15,48kcal/mole). De même, l'ajout au *spacer* d'un groupement méthyle permettrait à un inhibiteur (PyrB4) de mieux se conformer au pharmacophore « *butterfly* », ce qui devrait se traduire par un gain d'activité. Ceci n'est cependant pas le cas. Contrairement à ce qui a été expliqué dans le cas du mode A, les fragments de molécule qui ont été modifiés ne sont pas situés à proximité de la zone flexible du site de liaison et il n'est donc pas possible d'expliquer les faiblesses de ce modèle par une éventuelle adaptation de l'enzyme.

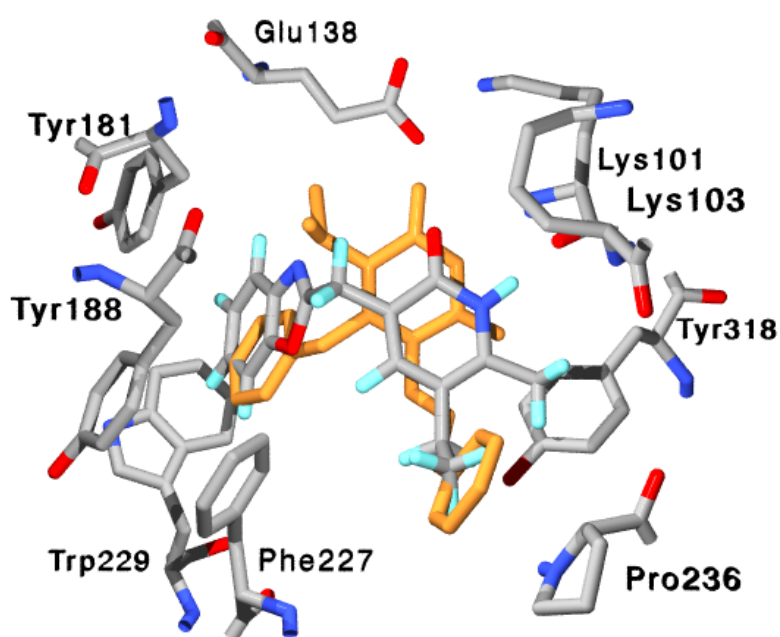


Figure 44 : Mode de liaison B proposé pour PyrB5. Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

L'étude des variations réalisées sur le *spacer* des pyridinones de la série *Merck* ajoute donc un nouvel argument en faveur du mode de liaison A, même si cette hypothèse ne reproduit pas de manière optimale les relations structure-activité

4.2.2.5. Variations sur le cycle secondaire

Une dernière étude de *docking* a été menée sur sept autres composés (figure 45) représentatifs des variations moléculaires réalisées sur le **cycle secondaire** de l'inhibiteur, qui est le plus souvent un benzoxazole. Ces exemples indiquent qu'un inhibiteur portant un **cycle simple** est caractérisé par une **faible activité** (a), à moins que celui-ci ne soit substitué de manière à mimer un cycle double (b). Ce cycle double ne doit pas nécessairement être aromatique (c). L'introduction de **substituants polaires** sur cette partie de la molécule se solde systématiquement par une **perte de pouvoir inhibiteur** (d, e). Enfin, les **groupes hydrophobes** de faible volume (Me, Cl, CF₃) **augmentent l'activité inhibitrice**, pour peu qu'ils soient placés sur les positions 4 ou 7 du cycle secondaire (f), tandis que leur présence en position 5 ou 6 s'avère néfaste (g).

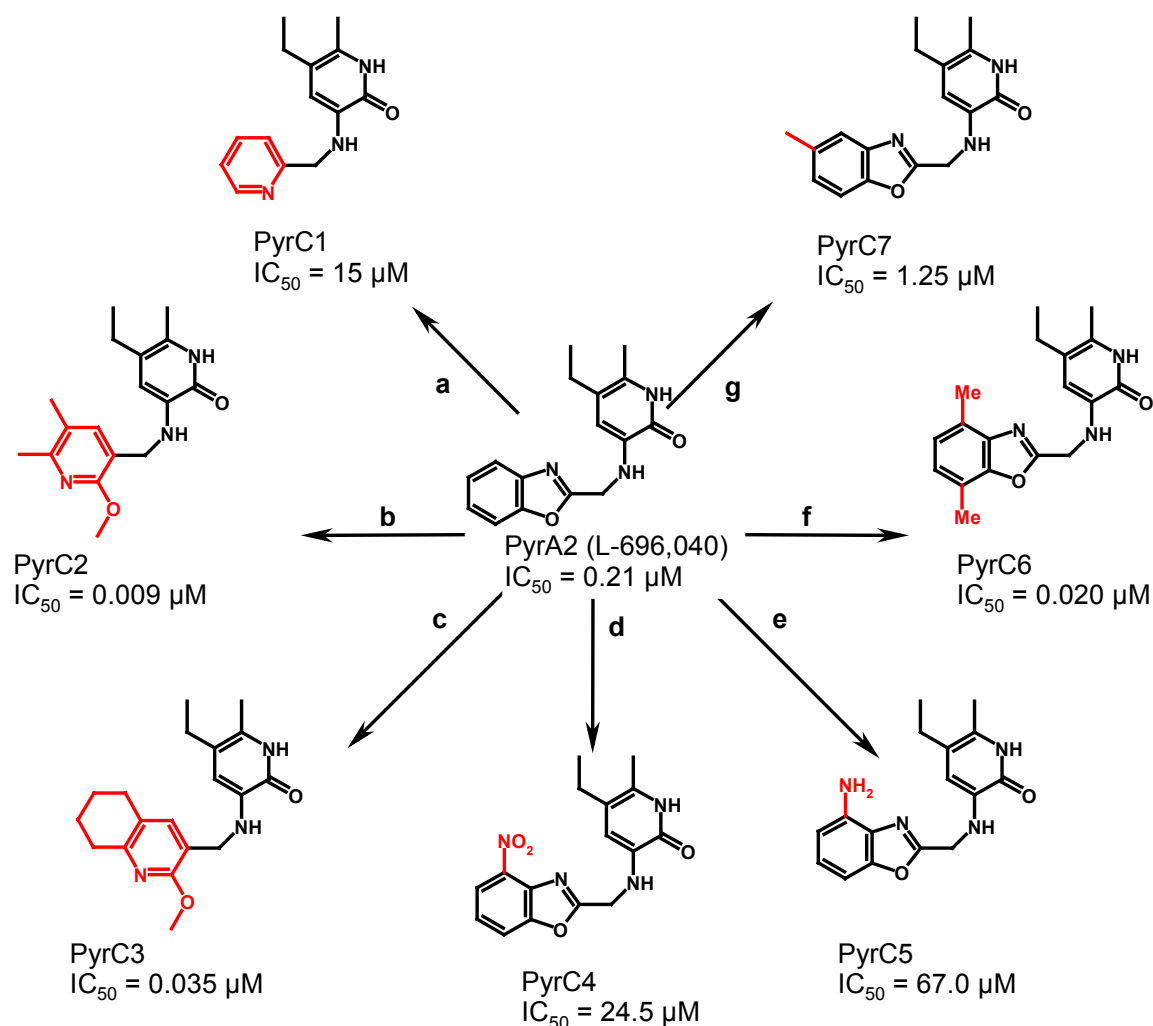


Figure 45 : Série Merck : Variations moléculaires sur le cycle secondaire

Molécule	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée	IC50 (μM)
PyrA2	-21.54	21.54	4.89	1.38	15.27	0.21
PyrC1	-20.59	20.59	4.72	4.21	11.66	15
PyrC2	-23.98	23.98	-0.39	4.76	19.61	0.009
PyrC3	-23.00	23.00	0.71	3.63	18.66	0.035
PyrC4	-24.43	24.43	7.46	5.37	11.60	24.5
PyrC5	-22.07	22.07	11.95	4.00	6.12	67
PyrC6	-21.95	21.95	3.2	1.46	17.29	0.02
PyrC7	-21.95	21.95	3.86	4.31	13.78	1.25

Tableau 46 : Mode A : Affinité corrigée (en kcal/mole) des inhibiteurs étudiés et comparaison à l'IC₅₀ publié : Influence de la substitution du benzoxazole

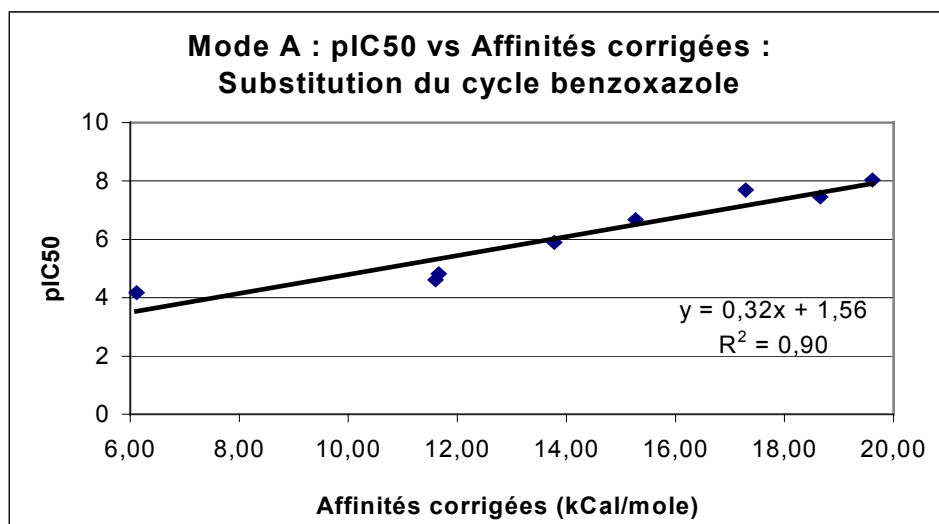


Figure 47 : Mode A : Relation entre l'affinité corrigée des inhibiteurs étudiés et leur pIC₅₀ publié

Molécule	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée	IC50 (μM)
PyrA2	-23,45	23,45	4,89	1,87	16,69	0,21
PyrC2	-25,15	25,15	-0,39	3,63	21,91	0,009
PyrC3	-24,35	24,35	0,71	4,91	18,73	0,035
PyrC4	-25,15	25,15	7,46	2,04	15,65	24,5
PyrC5	-23,06	23,06	11,95	2,36	8,75	67
PyrC6	-23,84	23,84	3,2	7,64	13,00	0,02
PyrC7	-24,22	24,22	3,86	2,22	18,14	1,25

Tableau 48 : Mode B : Affinité corrigée (en kcal/mole) des inhibiteurs étudiés et comparaison à l'IC₅₀ publié : Influence de la substitution du benzoxazole

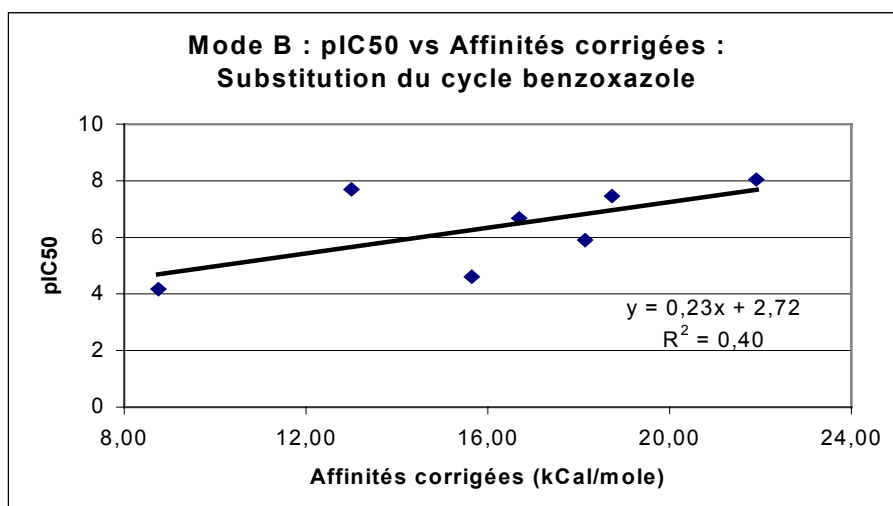


Figure 49 : Mode B : Relation entre l'affinité corrigée des inhibiteurs étudiés et leur pIC₅₀ publié

Les résultats issus du *docking* de ces composés (tableaux 46 et 48) montrent à nouveau une **nette différence de cohérence** entre les deux hypothèses envisagées, le coefficient de corrélation attribué au mode de liaison A (figure 47, $r^2 = 0.90$) étant nettement supérieur à celui accordé au mode B (figure 49, $r^2 = 0.40$). L'analyse des succès et des erreurs obtenus par les deux modèles au cours de cette nouvelle série de simulations est également révélatrice du **rôle joué par les corrections** apportées aux valeurs d'affinité fournies par *Discover*. Ainsi, le terme relatif à l'**énergie de conformation** de l'inhibiteur permet dans le cas du mode A de différencier les inhibiteurs PyrC6 et PyrC7, en accordant une affinité plus élevée au premier, conformément aux données expérimentales. Ce même terme pénalise nettement PyrC6 dans le cas du mode B. On constate également que la correction liée à la désolvatation des ligands explique en grande partie la faible activité de PyrC4 et PyrC5.

Enfin, la **superposition des pyridinones aux analogues du TNK-651** sur base des modes d'interaction proposés permet de comparer les relations structure-activité établies pour les deux familles de composés. Ainsi, les modifications réalisées sur les positions 3 ou 5 (méta) du cycle secondaire du HEPT, qui sont connues pour leur effet favorable sur les propriétés antivirales de ces composés^[34], correspondent selon le mode A à des opérations équivalentes sur les positions 4 ou 7 du benzoxazole. Selon ce même modèle, une greffe en position 4 (para) chez le HEPT, qui entraîne une perte d'activité, équivaut pour sa part à une greffe en position 5 ou 6 du benzoxazole des pyridinones, qui mène également à une perte d'activité. Cette hypothèse

est donc parfaitement en accord avec les relations structure-activité, comme l'illustre la figure 50 . Le mode B suggère par contre que la greffe de groupements méthyle peut également être réalisée sur les positions 5 ou 6, ce qui va à l'encontre des résultats expérimentaux.

A nouveau, l'hypothèse d'interaction A se révèle être la plus convaincante pour expliquer les relations structure-activité liées aux pyridinones de la série *Merck*.

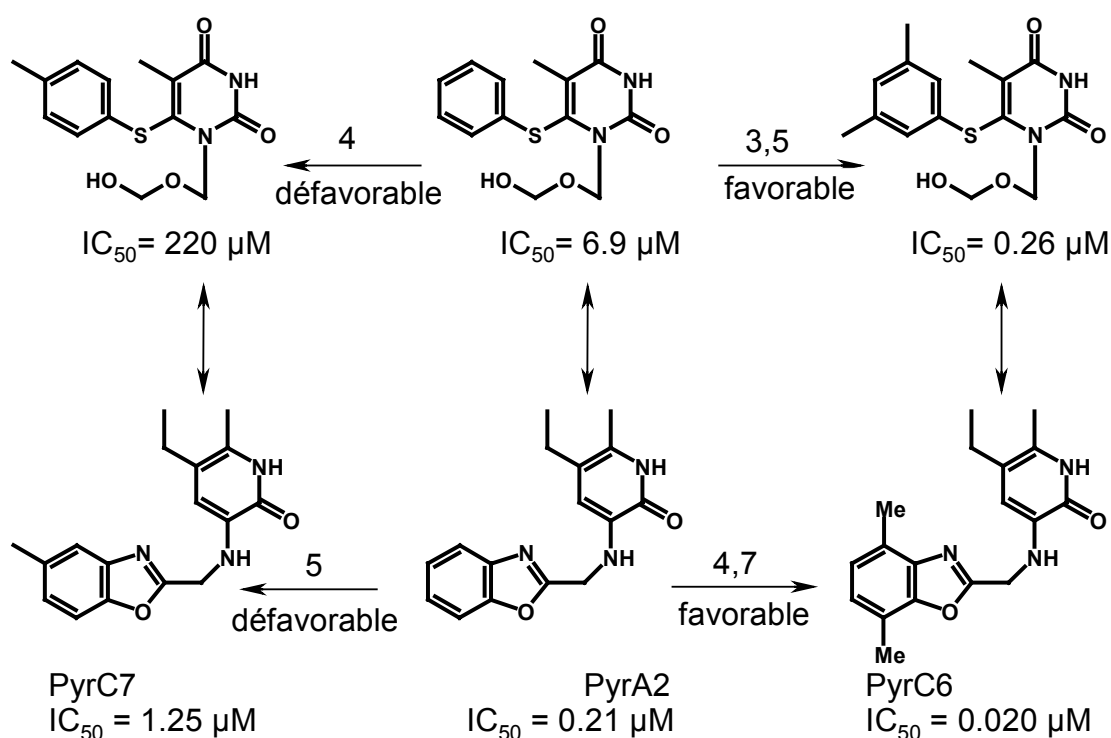


Figure 50 : Comparaison entre les relations structure-activité chez les dérivés de la série HEPT et chez les pyridinones *Merck*

4.2.3. Conclusion sur les pyridinones de la série *Merck*

Les pyridinones de la série *Merck* constituent une large famille d'inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH-1. La plupart d'entre elles peuvent être classées en 3-(alkylamino)pyridinones ou en 3-alkylpyridinones. Ces deux types de composés possèdent des conformations communes, qui sont compatibles avec les impératifs posés par notre version simplifiée du pharmacophore « *butterfly* ». Le *docking* de molécules simples, telles que le L-696,040 a dans un premier temps permis d'identifier deux modes d'interaction (A et B) susceptibles de rendre compte de la fixation de l'inhibiteur au site allostérique. Les deux

modèles diffèrent des hypothèses d'interaction précédemment proposées pour ces composés. Après étude d'une plus large série de molécules, le modèle A (figure 51) se révèle nettement plus cohérent vis à vis des relations structure-activité présentées dans la littérature. Il sera pour la suite de nos travaux considéré comme l'unique possibilité de liaison pour les pyridinones de la série *Merck* et sera désigné « **Mode Merck** ».

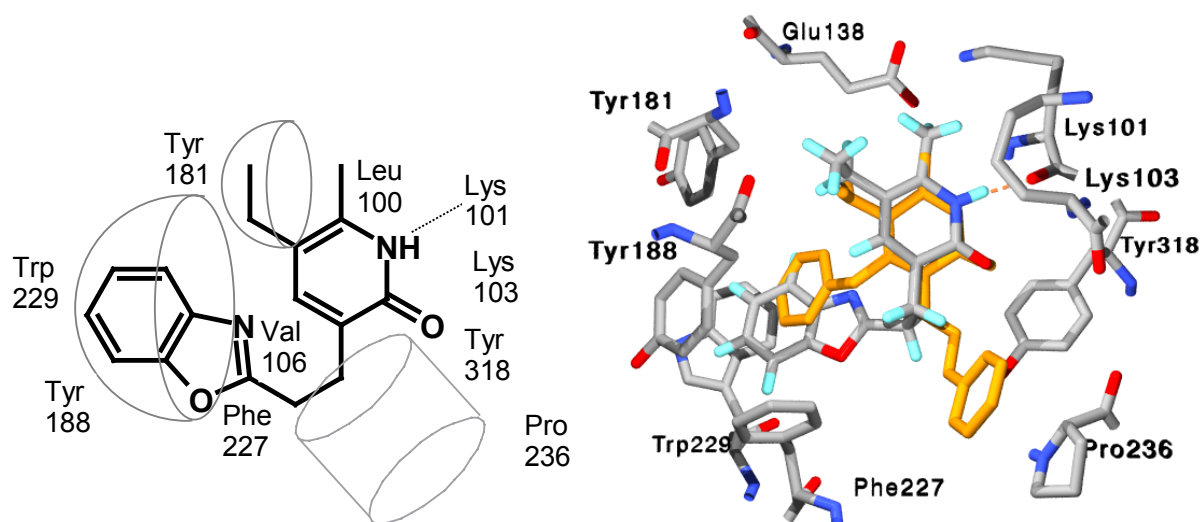


Figure 51 : Mode d'interaction TI-pyridinone retenu pour les composés de la série *Merck*. Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

En outre, cette étude théorique des pyridinones *Merck* nous a amenés à proposer une fonction d'affinité qui semble capable de reproduire, avec un bon coefficient de corrélation, les relations structure-activité au sein de cette série. Un tel outil est particulièrement utile dans le cadre de la conception rationnelle de nouveaux dérivés.

4.3. Proposition d'un modèle d'interaction pour les pyridinones Curie

4.3.1. Correspondance au pharmacophore

Une rapide analyse de la structure des pyridinones *Curie* permet de constater que ces inhibiteurs possèdent l'ensemble des éléments requis pour répondre aux critères du pharmacophore « *butterfly* » (figure 52). En effet, ils sont principalement composés de **deux systèmes π délocalisés** (cycle pyridinone et cycle benzénique), reliés par un seul **atome d'hybridation sp_3** , ce qui assure l'angle de 100 à 120° entre les deux fragments. Enfin, un

substituant en position 3 ou 5 de la pyridinone joue le rôle du groupe de contrainte stérique. L'analyse conformationnelle de ces composés par **dynamique moléculaire** (figure 53) confirme cette analyse. Les structures de basse énergie générées ont pu être classées en huit familles principales, comprises dans un intervalle d'énergie de 0.8 kcal/mole. Plusieurs de ces conformations sont en accord avec les exigences du pharmacophore.

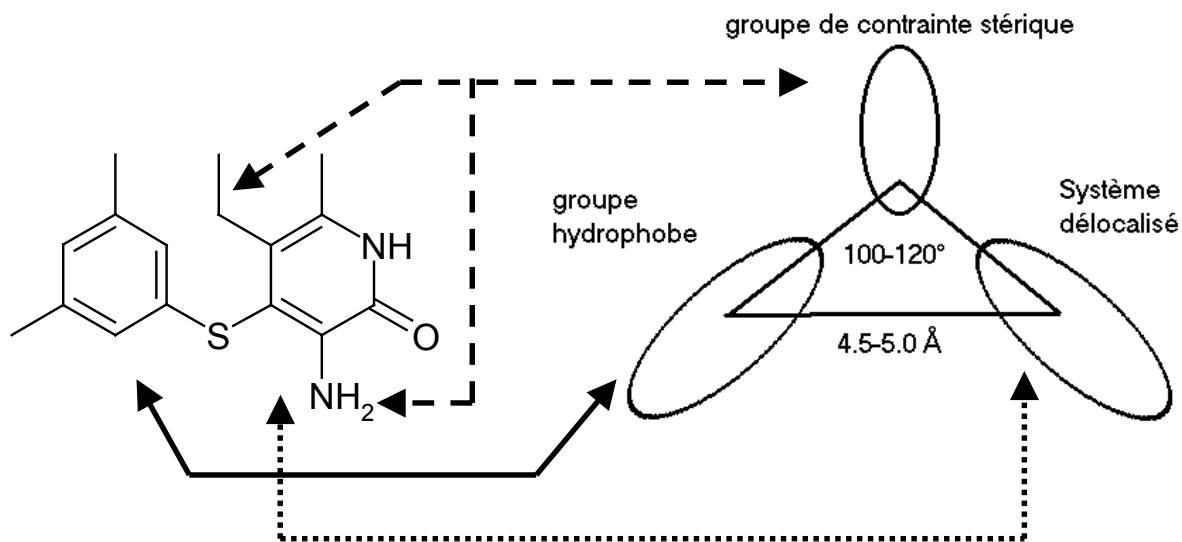


Figure 52 : la structure des pyridinones de la série *Curie* contient les éléments structuraux renseignés dans le pharmacophore *butterfly*.

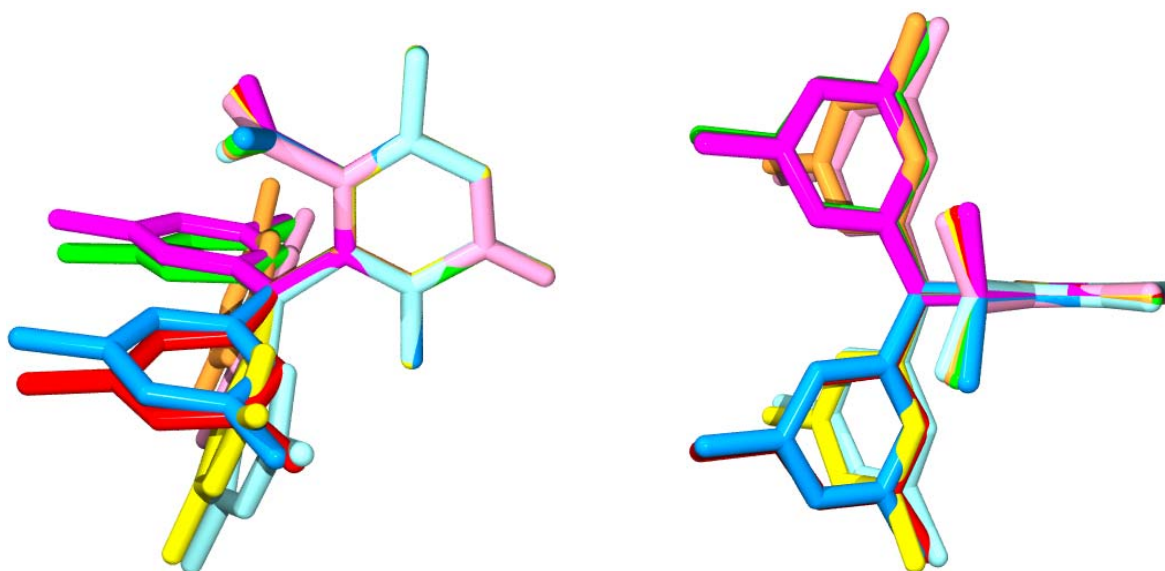


Figure 53 : superposition des huit familles de conformères générée suite à l'étude par dynamique moléculaire d'une pyridinone *Curie* (représentation dans deux plans perpendiculaires).

4.3.2. Docking des pyridinones Curie

Comme dans le cas de la série *Merck*, plusieurs pyridinones de la série *Curie* ont été soumises à une procédure de *docking* au sein du site des liaisons des INNTI, afin de déterminer leur mode d'interaction avec la TI. La première série de molécules étudiées est constituée d'inhibiteurs portant en **position 3** un **substituant de volume assez faible**. Les relations structure-activité au sein de cette famille (figure 54) sont similaires à celles observées chez les pyridinones *Merck* ou les analogues du TNK-651. Ainsi, la présence d'un **donneur d'hydrogène** en position 3 n'est pas indispensable aux propriétés antivirales (a, b). Des groupements légèrement plus volumineux que NH_2 ou NMe_2 peuvent être bien tolérés par la TI (c). Enfin, les substituants en position 5 et 6 du cycle pyridinone jouent un rôle important pour l'activité biologique de la molécule (d), tout comme les méthyles placés en position 3 et 5 (méta) du cycle secondaire.

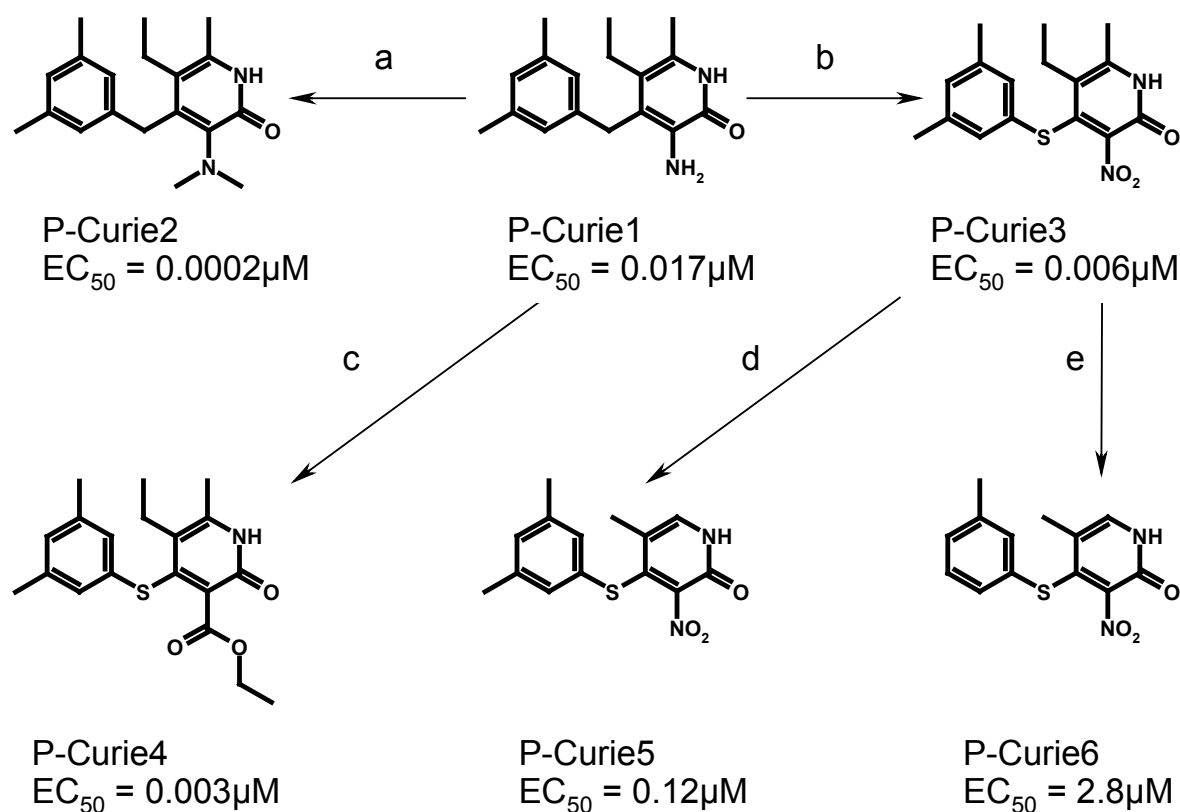


Figure 54 : Relations structure-activité chez les pyridinones de la série *Curie*

Comme on peut s'y attendre, l'étude de ces molécules à l'aide des algorithmes de *docking* mène à des **hypothèses analogues** à celles qui avaient été formulées dans le cas de la série

Merck. On retrouve ainsi les **modes de liaison A** (figure 55) et **B** (figure 56), qui positionnent tous deux le cycle secondaire de l'inhibiteur dans la zone hydrophobe du site TIBO, tandis que la 2-pyridinone se glisse entre les résidus Leu100 et Val106 pour former un **pont hydrogène** avec le carbonyle du résidu **Lys101**. A nouveau, la différence entre ces deux solutions réside dans l'**orientation relative des composés**, qui détermine le substituant (en position 3 ou 5) jouant le rôle du groupe de contrainte stérique.

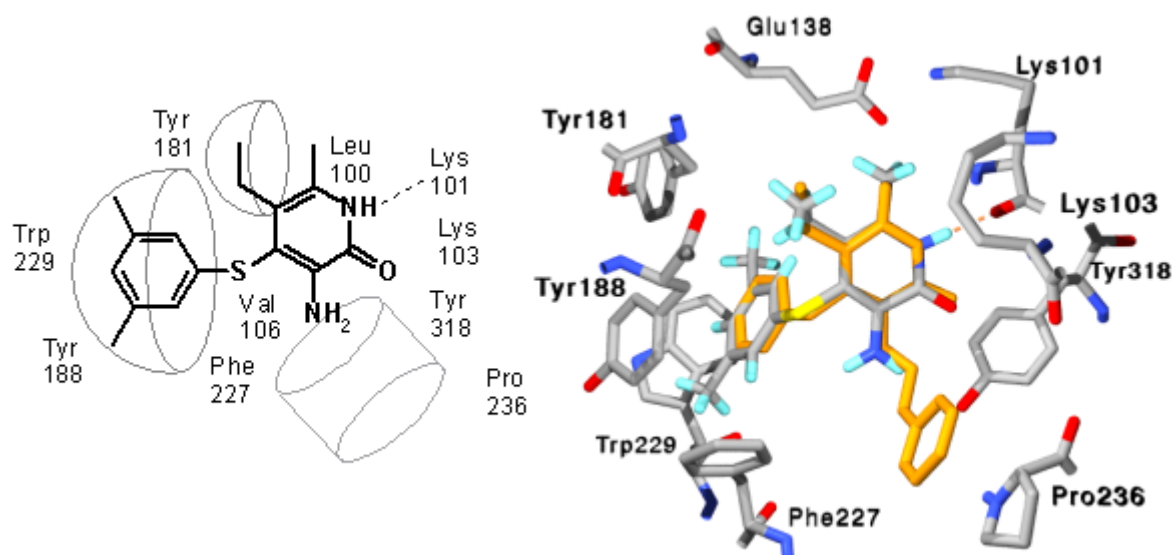


Figure 55 : Mode d'interaction A proposé pour les pyridinones de la série *Curie*, suite aux procédures de *Docking*. Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

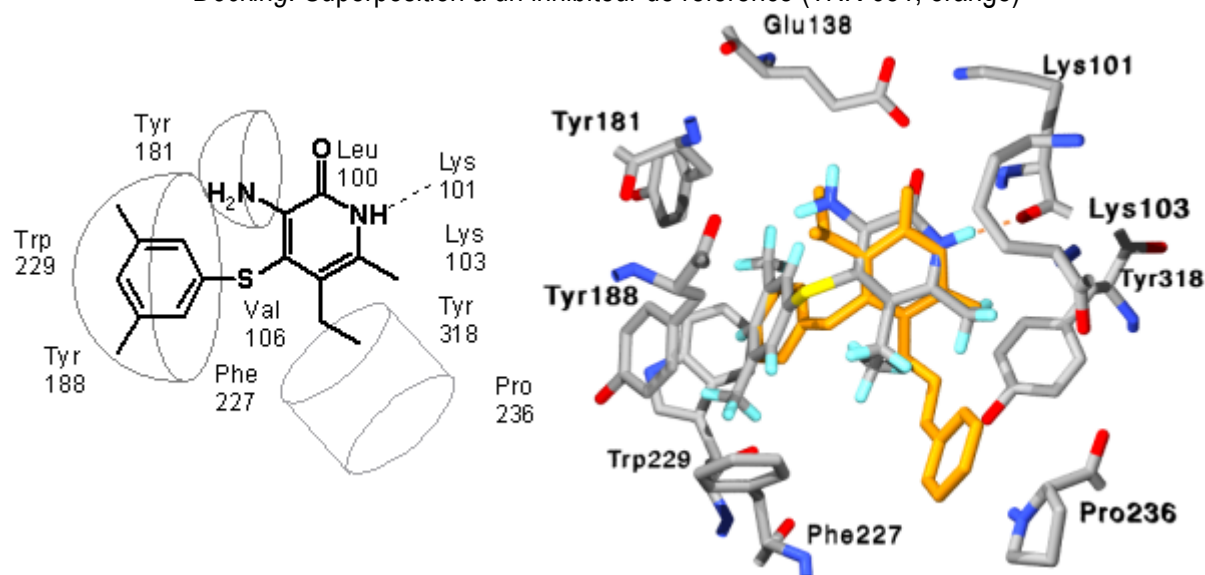


Figure 56 : Mode d'interaction B proposé pour les pyridinones de la série *Curie*, suite aux procédures de *Docking*. Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

Contrairement à ce qui a été observé pour les pyridinones *Merck*, **il n'est pas évident de départager ces hypothèses** sur base des valeurs d'affinité attribuées aux composés de

cette série (tableaux 57 et 59) , même après avoir apporté les corrections d'usage. Les deux modèles sont en effet caractérisés par un **bon coefficient de corrélation** (0.94 pour A, figure 58 et 0.87 pour B, figure 60), prédisent l'activité des inhibiteurs dans l'ordre correct et semblent donc satisfaisants. Un critère permet cependant d'accorder une légère préférence au mode A. En effet, un composé possédant un substituant de très faible volume en position 3 (comme le groupe NH₂ de P-Curie1) et se liant selon le mode B ne peut occuper totalement le volume commun défini par superposition des sept complexes TI-INNTI (cf. point 4.1.1.). Une partie de l'espace dévolu au groupe de contrainte stérique reste alors vacant. Rien ne permet par contre de discriminer les deux hypothèses dans le cas d'un **groupe peu polaire** et de **volume analogue** à celui d'un fragment éthyle ou isopropyle (tel que NMe₂).

Molécule	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée	EC ₅₀ (μM)
P-Curie1	-20.95	20.95	3.64	1.51	15.80	0.017
P-Curie2	-23.22	23.22	-1.55	3.84	20.93	0.0002
P-Curie3	-23.38	23.38	2.4	3.82	17.16	0.006
P-Curie4	-24.60	24.60	0.16	6.83	17.61	0.003
P-Curie5	-21.43	21.43	3.98	2.28	15.17	0.12
P-Curie6	-20.81	20.81	5.11	2.45	13.25	2.8

Tableau 57 : Mode A : Affinité corrigée des inhibiteurs de la série *Curie* et comparaison à l'EC₅₀ publié.

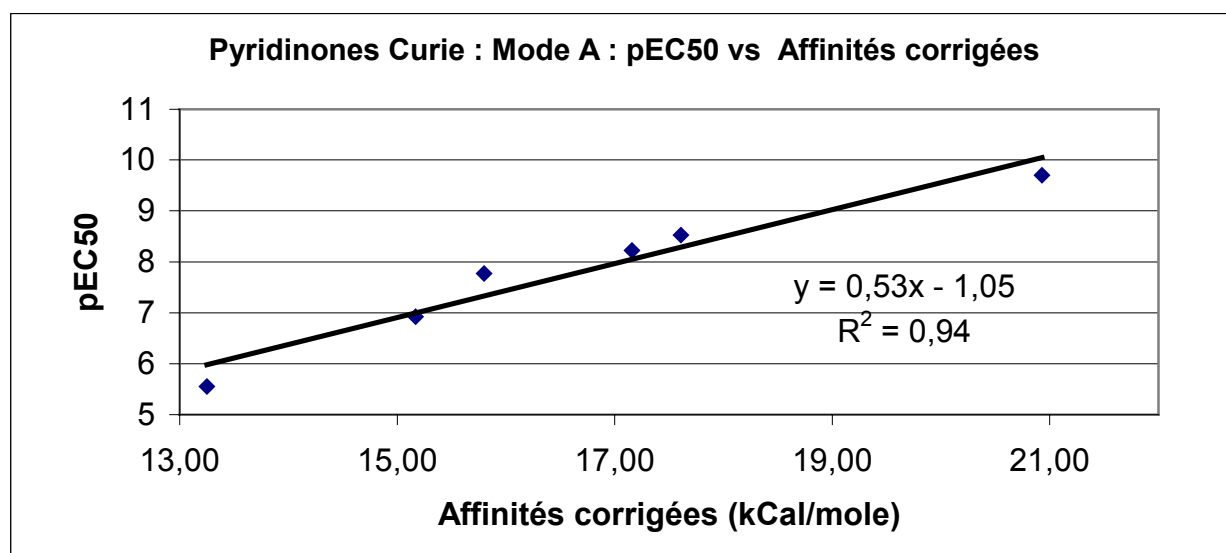
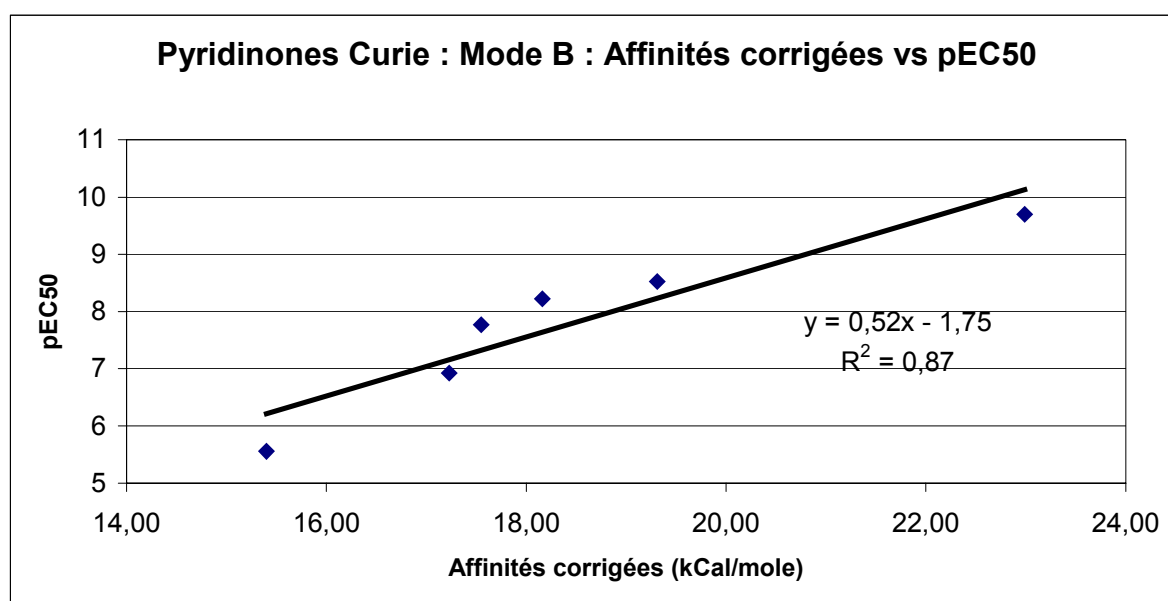


Figure 58 : Mode A : Relation entre l'affinité corrigée des inhibiteurs étudiés et leur pEC₅₀ publié

Molécule	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée	Ki (μM)
P-Curie1	-23.16	23.16	3.64	1.97	17.55	0.017
P-Curie2	-25.29	25.29	-1.55	3.85	22.99	0.0002
P-Curie3	-24.46	24.46	2.4	3.9	18.16	0.006
P-Curie4	-26.66	26.66	0.16	7.19	19.31	0.003
P-Curie5	-23.46	23.46	3.98	2.25	17.23	0.12
P-Curie6	-22.87	22.87	5.11	2.36	15.40	2.8

Tableau 59 : Mode A : Affinité corrigée des inhibiteurs de la série *Curie* et comparaison à l' EC_{50} publié.Figure 60 : Mode A : Relation entre l'affinité corrigée des inhibiteurs étudiés et leur pEC₅₀ publié

Cette **ambiguïté** n'est pas réellement surprenante. En effet, ces composés ont précisément été conçus pour combiner les éléments structuraux des pyridinones de la série *Merck* et ceux des analogues du HEPT, sur base d'une **hypothèse** (figure 61) qui fait correspondre le substituant 5-éthyle (ou 5-isopropyle) porté par les dérivés du HEPT et le groupe 3-aminoalkyle des pyridinones *Merck*^[22, 23]. Si l'on s'en tient à ce modèle, c'est donc le groupement présent en **position 3** des pyridinones de la série *Curie* qui joue le rôle de **groupe de contrainte stérique**, tout comme dans le **mode de liaison B** proposé suite aux simulations de *docking*.

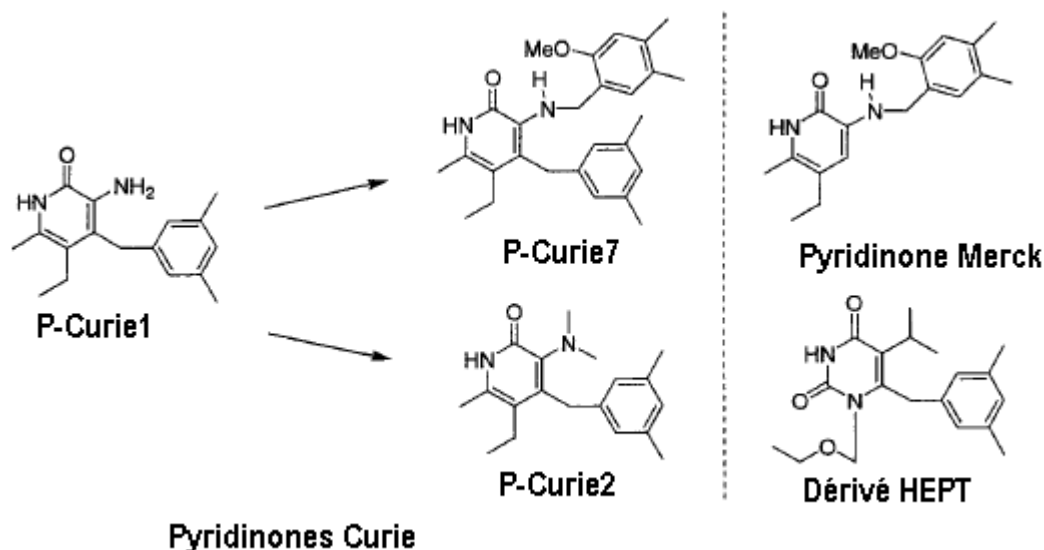


Figure 61 : Hypothèse de conception des pyridinones de la série *Curie*. Schéma adapté de l'article de Dollé *et al*^[23].

Si les deux modèles envisagés permettent *a priori* de rationaliser l'activité de cette première série d'inhibiteurs, il n'en va pas de même lors de l'étude de ligands possédant des **groupements plus encombrants en position 3**. Il n'est dans ce cas pas possible de mettre en évidence une corrélation nette entre les valeurs d'affinité attribuées à chaque composé et les activités antivirales, ni pour le mode A, ni pour le mode B. Les données obtenues grâce à l'utilisation des algorithmes de docking sont cependant suffisantes pour **rejeter** ce dernier mode. Ainsi, **les composés les plus volumineux**, tels que la molécule P-*Curie7* issue de la combinaison des éléments structuraux d'un dérivé HEPT et d'une pyridinone, semblent **incapables de se lier au site allostérique de la TI selon le mode B**, alors que leur activité antivirale a pu être démontrée. Ceci est sans aucun doute lié au fait que l'espace disponible pour accueillir le groupe de contrainte stérique est **limité**. On se souvient ainsi que dans le cas des pyridinones *Merck*, un groupement plus volumineux qu'un n-propyle ou qu'un isopropyle était responsable d'une perte d'activité inhibitrice. Par conséquent, ces données issues des simulations de *docking* indiquent clairement que l'hypothèse de Dollé *et al*, sur laquelle se base la conception de ces molécules, est inexacte.

Pour de telles molécules, la solution offerte par le **mode de liaison A** reste par contre **compatible avec les données structurales** disponibles dans la littérature. L'inhibiteur se

positionne alors de manière à placer le groupe greffé en position 3 de la pyridinone dans la **zone flexible** du site de liaison, à proximité du résidu Pro236. Ce comportement est similaire à celui adopté par des inhibiteurs très volumineux, tels que la **Delavirdine** ou le **TNK-651**. De plus, cette configuration permet à des composés tels que *P-Curie8* (figure 62) de conserver les fragments les plus **polaires** de leur structure à la surface de l'enzyme, c'est à dire à l'écart des régions les plus hydrophobes du site de liaison et en contact avec le solvant. Ceci peut même mener à la **formation de nouveaux ponts hydrogène** avec la TI (figure 62).

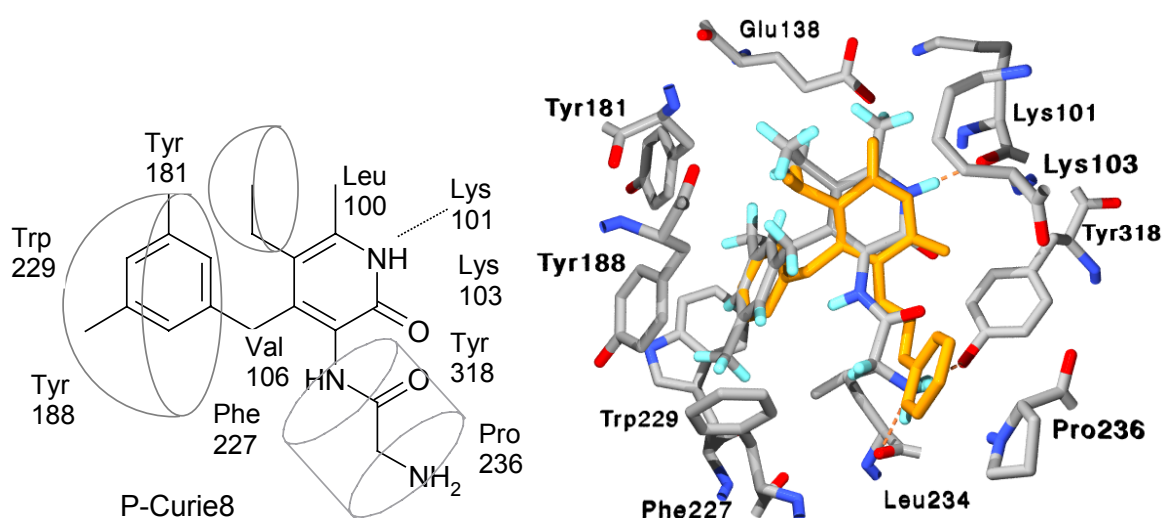


Figure 62 : Le mode d'interaction A est le seul proposé pour *P-Curie8*. IL permet à l'inhibiteur d'interagir favorablement avec la zone flexible de la TI. Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

Il est légitime de s'interroger sur l'**absence de corrélation** entre les affinités prédites et les activités antivirales mesurées. Les raisons en sont probablement multiples. D'une part, le fait que certains **groupes polaires** des inhibiteurs restent en **contact avec le solvant** rend nettement moins pertinente la **correction de désolvatation** appliquée à l'affinité. D'autre part la **perte d'entropie** liée à la formation du complexe TI – INNTI et au gel des degrés de liberté associés à ces liaisons varie en fonction de la taille et de la flexibilité des groupements greffés en position 3 de la pyridinone. Ceux-ci se logent de plus dans la **zone flexible** de la TI, qui s'adapte au ligand présent. L'énergie nécessaire à ce léger **changement de conformation** de l'enzyme pourrait être non négligeable, mais n'est pas prise en compte dans le calcul de l'affinité. Elle constituerait donc une source d'erreur supplémentaire.

4.3.3. Conclusion sur la modélisation des pyridinones Curie

Les pyridinones de la série *Curie* constituent une famille de molécules qui remplissent les critères imposés par le pharmacophore « *butterfly* ». Une grande partie d'entre elles ont été conçues en **combinant** les éléments structuraux des **dérivés du HEPT** et ceux des **pyridinones de la série Merck**. Cette règle de conception confère au groupement présent en position 3 du cycle pyridinone le rôle de groupe de contrainte stérique, tout comme dans le mode d'interaction B proposé dans le cadre de ces travaux (cf. figure 56).

Dans le cas de composés portant en position 3 des substituants de faible volume, il est difficile de départager les deux hypothèses d'interaction (A et B) envisagées. **Il est également possible que le mode de liaison favorisé ne soit pas le même pour tous les inhibiteurs de cette série.** Par contre, seul le mode A semble en mesure de rendre compte de l'activité antivirale des dérivés qui possèdent un groupement plus volumineux et polaire sur cette même position. Il sera donc pour la suite de nos travaux considéré comme l'hypothèse d'interaction privilégiée pour les pyridinones de la série *Curie* et sera désigné « **Mode Curie** » (figure 63).

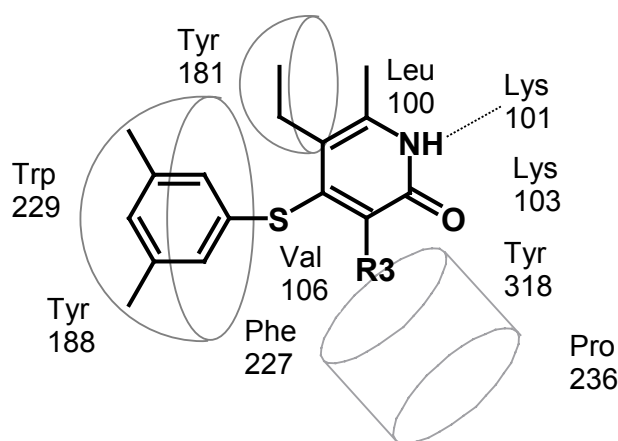


Figure 63 : Mode de liaison retenu pour les Pyridinones *Curie* (mode A)

Cette étude des pyridinones *Curie* a également permis de mettre en évidence une des limitations de la fonction d'affinité destinée à rationaliser les relations structure-activité. Cette fonction perd en effet de sa cohérence si des substituants volumineux sont placés dans la zone flexible de la TI, à proximité du résidu Pro236.

4.4. Proposition d'un modèle d'interaction pour les pyridinones *Janssen*

4.4.1. Correspondance au pharmacophore

Les pyridinones *Janssen*, comme celles de la série *Curie*, ont été **conçues par analogie aux dérivés du HEPT**. Elles sont constituées d'un **cycle pyridinone** relié à un **cycle benzénique** par un seul **atome d'hybridation sp_3** , qui confère au système sa configuration en « ailes de papillon » (figure 64). Le rôle du groupe de contrainte stérique peut alors être tenu soit par le groupe iodo en position 3, soit par le groupement greffé en position 5.

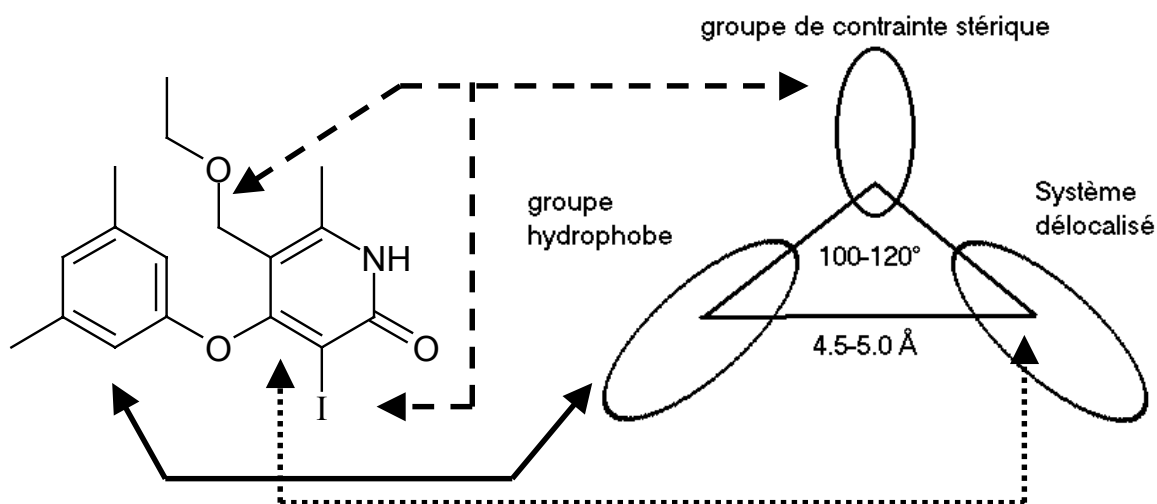


Figure 64 : la structure des pyridinones de la série *Janssen* contient les éléments structuraux renseignés dans le pharmacophore *butterfly*.

Un fragment **iodo** peut en effet être utilisé en tant que **groupe de contrainte stérique**. Il occupe un **volume de $35.1 \text{ \AA}^3$** , ce qui est **intermédiaire entre celui d'un éthyle et celui d'un isopropyle** (tableau 65). La superposition d'un éthylbenzène et d'un iodobenzène (figure 66), montre que des groupes éthyle et iodo placés sur une position équivalente possèdent un volume commun de $20.5 \text{ \AA}^3$, soit 67% du volume de l'éthyle. Par ailleurs, les relations structure-activité au sein de la famille du HEPT indiquent qu'un groupement iodo se révèle plus efficace dans le rôle de groupe de contrainte stérique qu'un simple méthyle^[34]. Les pyridinones *Janssen* possèdent donc tous les éléments nécessaires pour répondre aux critères du pharmacophore « *butterfly* ». De plus, l'existence de conformères de basse énergie répondant aux critères du pharmacophore *butterfly* a été confirmée lors de l'étude de ces molécules par dynamique moléculaire.

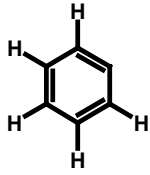
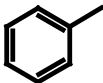
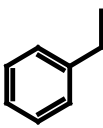
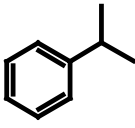
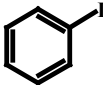
Molécule	Groupe	Volume de la molécule (Å ³)	Contribution du groupe (Å ³)
	Néant	68.5	0
	Hydrogène	70.4	1.9
	Méthyle	48.5	16.0
	Ethyle	98.9	30.4
	Isopropyle	113.5	45.0
	Iodo	103.6	35.1

Tableau 65 : Volume de divers substituants placés sur un cycle benzénique

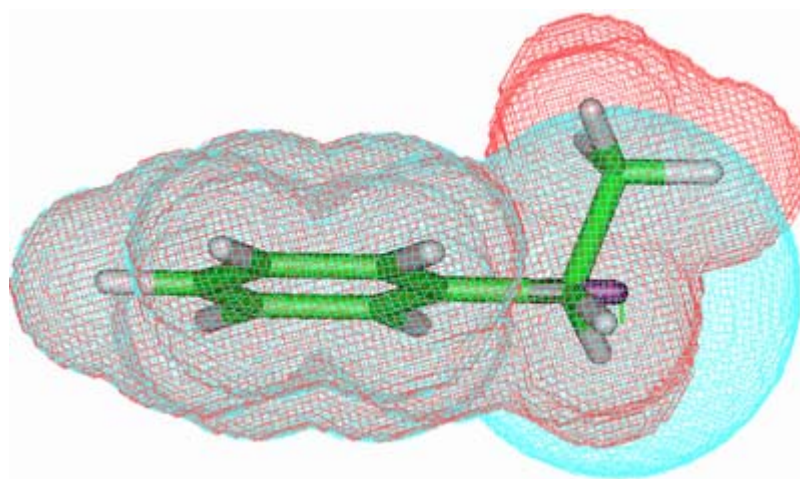


Figure 66 : Superposition des volumes de Van der Waals d'un éthylbenzène (rouge) et d'un iodobenzène (bleu).

4.4.2. Docking de pyridinones Janssen

Onze pyridinones de la série *Janssen* (figure 67) ont été sélectionnées sur base de leur activité antivirale et soumises à une étude de *docking*. L'examen des relations structure-activité liées à ces composés indique qu'une **grande variété de groupements** peuvent être **greffés en position 5** du cycle pyridinone, y compris des fragments **volumineux** ou **polaires**, ce qui contraste nettement avec les inhibiteurs précédemment étudiés. On peut donc supposer que le **mode d'interaction** qui caractérise les pyridinones *Janssen* diffère de celui adopté par les composés des séries *Merck* et *Curie*.

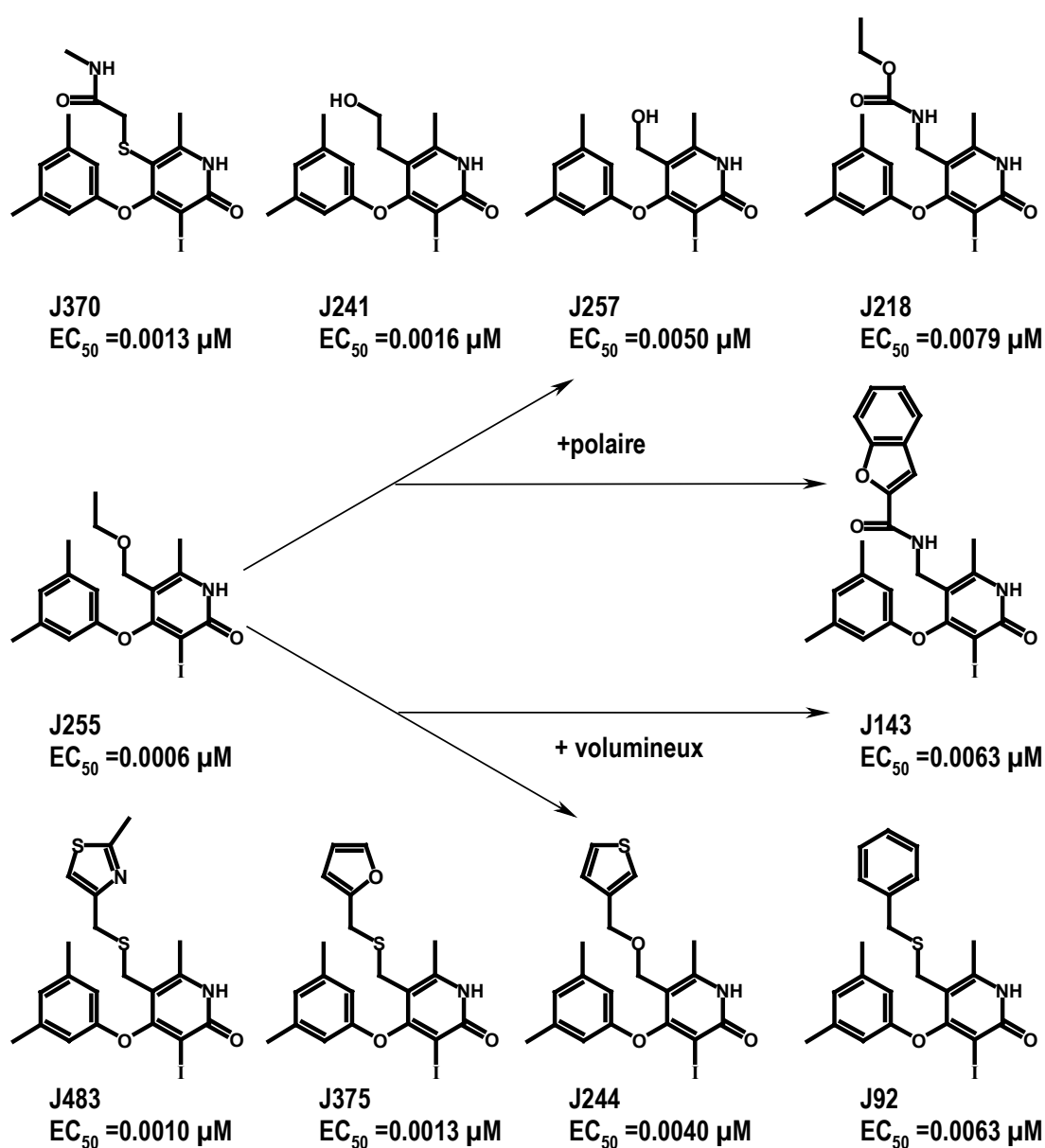


Figure 67 : Relations structure-activité chez les pyridinones de la série *Janssen*.

Il ne nous est pas possible d'établir une **corrélation** entre les affinités attribuées aux composés étudiés et leur activité antivirale. D'une part, les données fournies par le brevet WO02/24650 ne couvrent qu'un **espace très restreint d'activités** (de 0.0006 μ M à 0.01 μ M, soit à peine 1.2 unités de pEC₅₀). D'autre part, il n'est pas possible de calculer la correction d'affinité liée à la désolvatation des composés à l'aide du module *solvation* à notre disposition. La procédure de Ooi *et al*^[35] que nous avons précédemment utilisée n'y est en effet paramétrée que pour les atomes les plus fréquemment rencontrés dans des systèmes biologiques, c'est à dire C,H,O,N et S. Les résultats obtenus suite aux simulations de *docking* ne laissent cependant que **peu de doute** quant au comportement des pyridinones de la série *Janssen* au sein du site allostérique. Le mode d'interaction de ces composés est en effet largement conditionné par le substituant présent en position 5 du cycle pyridinone.

Le **mode de liaison A**, analogue à celui mis en évidence pour les composés des séries *Merck* et *Curie*, n'est proposé que pour les molécules possédant un **groupement de faible volume en position 5**, tel que le J257 (figure 68). Cette configuration place cependant un groupe polaire dans une région hydrophobe du site de liaison, ce qui est *a priori* peu favorable. Un mode d'interaction B est également possible pour ce type de molécules. Par contre, **seul le mode B est proposé dans le cas de composés dotés de fragments plus volumineux en position 5** (figure 69). Le groupe 3-iodo joue alors le rôle du groupe de contrainte stérique. Cette disposition est cette fois plus logique vis à vis des relations structure-activité établies dans la littérature. Comme dans le cas de pyridinones de la série *Curie* ou des dérivés du HEPT, les substituants volumineux et/ou polaires sont alors placés dans la zone flexible de la TI, qui est plus propice à la formation de ponts hydrogène et peut facilement s'adapter à leur présence.

Il apparaît donc que les pyridinones *Janssen* adoptent un **mode de liaison différent** de celui rencontré pour les séries *Merck* et *Curie*. Cette information est importante dans le cadre de la conception de nouveaux inhibiteurs de type pyridinone. Il conviendra en effet de placer sur ces composés des substituants compatibles avec le mode de liaison considéré.

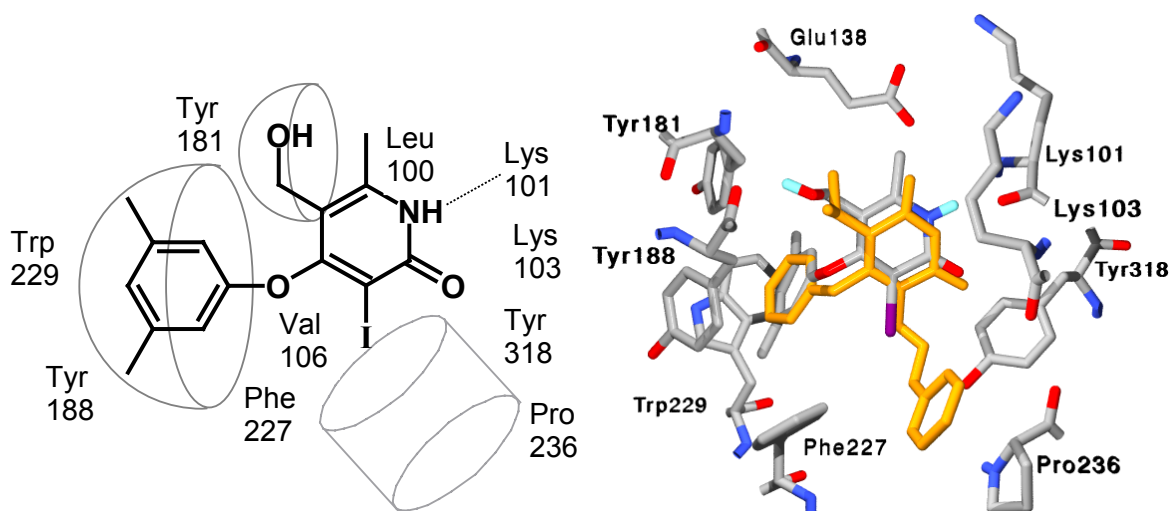


Figure 68 : Exemple de mode de liaison A proposé pour une pyridinone *Janssen* : Cas du composé J257. Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

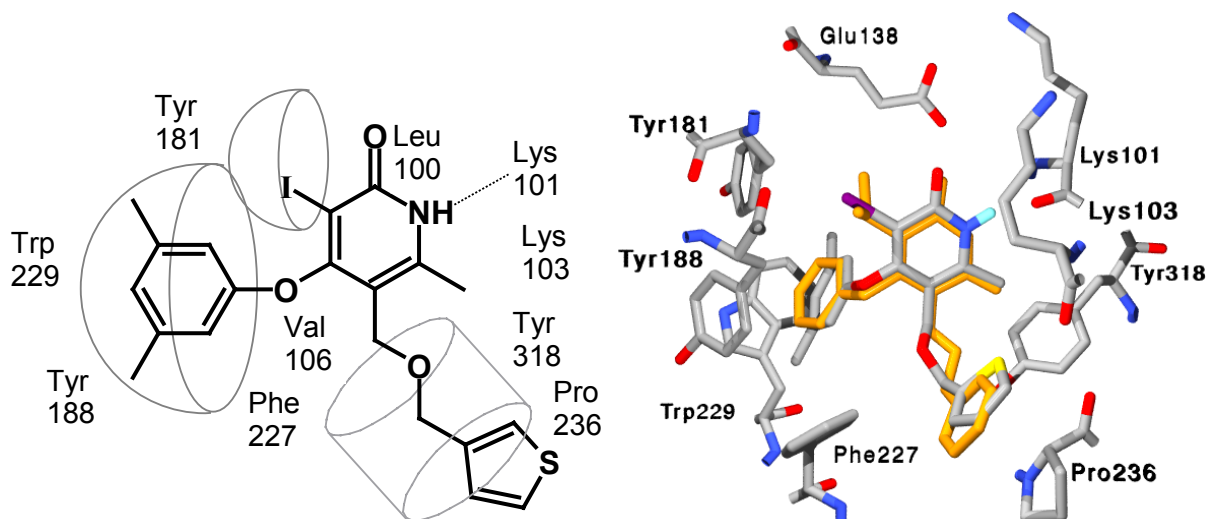


Figure 69 : Exemple de mode de liaison B proposé pour une pyridinone *Janssen* : Cas du composé J244. Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange).

4.4.3. Conclusion sur les pyridinones *Janssen*

Les composés de la série *Janssen*, tout comme ceux de la série *Curie*, combinent les éléments structuraux des pyridinones *Merck* et ceux des dérivés du HEPT. Suite aux variations moléculaires réalisées sur les positions 3 et 5 du cycle pyridinone, le **mode d'interaction** de ces molécules avec le site allostérique de la TI (**mode B**) **diffère de celui rencontré pour les autres familles de pyridinones**. Ce mode d'interaction sera pour la suite de nos travaux désigné « mode *Janssen* ».

4.5. Conclusion sur l'étude théorique d'inhibiteurs de type pyridinone.

Malgré l'intérêt porté aux INNTI de type pyridinone par la recherche pharmaceutique, **aucune structure cristallographique** d'un complexe TI-pyridinone n'a à ce jour été publiée. De plus, les rares hypothèses d'interaction antérieures à ces travaux ne prennent en compte qu'un nombre restreint de données expérimentales. Pour mener à bien la conception rationnelle de nouveaux INNTI dérivés du noyau pyridinone, il était donc indispensable de développer un modèle **décrivant de manière cohérente la liaison de ces composés au site allostérique de la TI**. Pour ce faire différentes séries d'inhibiteurs décrites dans la littérature ont été étudiées à l'aide des outils de modélisation moléculaire.

Dans un premier temps la **superposition des structures cristallographiques** de sept complexes TI-INNTI a permis de construire une **version actualisée du pharmacophore « butterfly »**, en conservant les éléments stériques et électroniques communs à l'ensemble de ces molécules et en éliminant ceux qui s'avèrent incorrects au vu des données expérimentales. Sur base de cette superposition, la **formation d'un pont hydrogène** entre le cycle 2-pyridinone et le résidu Lys101 du site de liaison des INNTI a également été postulée. L'utilisation de ces critères simples permet de **porter rapidement un premier jugement sur la pertinence d'une hypothèse d'interaction** TI-pyridinone et indique que l'ensemble des modèles tridimensionnels de la littérature relatifs aux INNTI de type pyridinone doivent être rejetés.

L'étude proprement dite des séries d'inhibiteurs décrites dans la littérature (*Merck*, *Curie* et *Janssen*) a mis en évidence **deux hypothèses d'interaction acceptables**, sur base de l'analyse conformationnelle de ces composés, des solutions proposées grâce aux simulations de *docking* et de la prise en compte du modèle simplifié de pharmacophore. La cohérence de ces modèles vis à vis des données expérimentales a été vérifiée au moyen d'une **fonction d'affinité** qui prend en compte la **stabilisation** du ligand dans le site de liaison, sa **désolvatation** et son **énergie de conformation**. Ces résultats ont permis de rationaliser une grande part des relations structure-activité liées aux pyridinones.

Malgré leurs larges **analogies structurales**, les pyridinones des séries *Merck*, *Janssen* et *Curie* ne partagent pas le même mode d'interaction avec la TI. L'orientation adoptée par l'inhibiteur au sein du site allostérique de l'enzyme semble en effet **déterminée par les substituants** présents sur les positions 3, 4 et 5 du cycle pyridinone, comme le montre l'organigramme repris à la figure 70, qui résume les résultats obtenus et permet de déduire rapidement le mode de liaison d'un INNTI de type pyridinone.

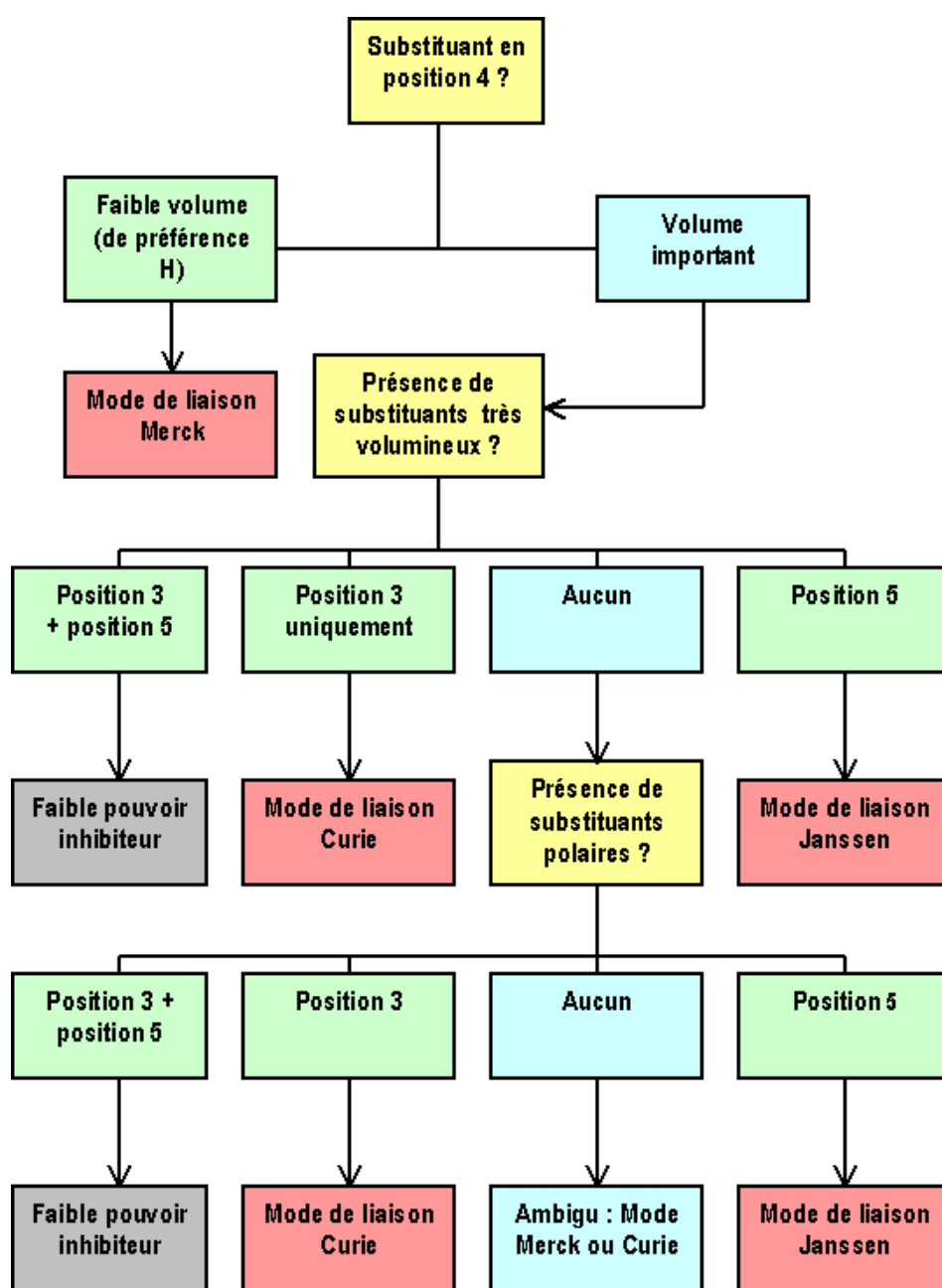


Figure 70 : Organigramme permettant de déterminer rapidement le mode de liaison d'un INNTI de type pyridinone

Ainsi, les fragments de faible volume à caractère hydrophobe sont préférentiellement localisés à proximité du résidu Tyr181 et jouent le rôle du groupe de contrainte stérique présent dans le pharmacophore « *butterfly* ». A l'inverse, les groupements volumineux ou polaires tendent à occuper la zone flexible du site de liaison, qui s'adapte plus aisément à leur présence et peut permettre le contact avec le solvant extérieur.

Les informations recueillies au cours de cette étude des pyridinones décrites dans la littérature vont maintenant être utilisées pour guider la conception rationnelle de nouveaux INNTI dérivés du cycle pyridinone.

Bibliographie.

1. Ren, J.; C. Nichols; L. Bird; P. Chamberlain; K. Weaver; S. Short; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Structural Mechanisms of Drug Resistance for Mutations at Codons 181 and 188 in HIV-1 Reverse Transcriptase and the Improved Resilience of Second Generation Non-nucleoside Inhibitors*. Journal of Molecular Biology, 2001. **312**(4): p. 795-805.
2. Esnouf, R.; J. Ren; C. Ross; Y. Jones; D. Stammers; D. Stuart, *Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors*. NATURE STRUCTURAL BIOLOGY, 1995. **2**(4): p. 303-8.
3. Ren, J.; R. Esnouf; E. Garman; D. Somers; C. Ross; I. Kirby; J. Keeling; G. Darby; Y. Jones; D. Stuart, *High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes*. Nature Structural Biology, 1995. **2**(4): p. 293-302.
4. Ren, J.; R. Esnouf; A. Hopkins; C. Ross; Y. Jones; D. Stammers; D. Stuart, *The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with 9-chloro-TIBO: lessons for inhibitor design*. STRUCTURE, 1995. **3**(9): p. 915-26.
5. Hopkins, A.L.; J. Ren; R.M. Esnouf; B.E. Willcox; E.Y. Jones; C. Ross; T. Miyasaka; R.T. Walker; H. Tanaka; D.K. Stammers; D.I. Stuart, *Complexes of HIV-1 reverse transcriptase with inhibitors of the HEPT series reveal conformational changes relevant to the design of potent non-nucleoside inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 1996. **39**(8): p. 1589-600.
6. Esnouf, R.M.; J. Ren; A.L. Hopkins; C.K. Ross; E.Y. Jones; D.K. Stammers; D.I. Stuart, *Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1997. **94**(8): p. 3984-9.
7. Ren, J.; R.M. Esnouf; A.L. Hopkins; J. Warren; J. Balzarini; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase in complex with carboxanilide derivatives*. Biochemistry, 1998. **37**(41): p. 14394-403.
8. Larder, B.A.; S. Bloor; S.D. Kemp; K. Hertogs; R.L. Desmet; V. Miller; M. Sturmer; S. Staszewski; J. Ren; D.K. Stammers; D.I. Stuart; R. Pauwels, *A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999. **43**(8): p. 1961-1967.

9. Hopkins, A.L.; J. Ren; H. Tanaka; M. Baba; M. Okamoto; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Design of MKC-442 (emivirine) analogues with improved activity against drug-resistant HIV mutants*. Journal of Medicinal Chemistry, 1999. **42**(22): p. 4500-5.
10. Ren, J.; R.M. Esnouf; A.L. Hopkins; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Crystallographic analysis of the binding modes of thiazoloisindolinone non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase and comparison with modeling studies*. J. Med. Chem., 1999. **42**(19): p. 3845-51.
11. Ren, J.; J. Milton; K.L. Weaver; S.A. Short; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Structural Basis for the Resilience of Efavirenz (DMP-266) to Drug Resistance Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase*. Structure (London), 2000. **8**(10): p. 1089-1094.
12. Ren, J.; C. Nichols; L.E. Bird; T. Fujiwara; H. Sugimoto; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Binding of the second generation non-nucleoside inhibitor S-1153 to HIV-1 reverse transcriptase involves extensive main chain hydrogen bonding*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(19): p. 14316-20.
13. Ren, J.; J. Diprose; J. Warren; R.M. Esnouf; L.E. Bird; S. Ikemizu; M. Slater; J. Milton; J. Balzarini; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Phenylethylthiazolylthiourea (PETT) non-nucleoside inhibitors of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases. Structural and biochemical analyses*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(8): p. 5633-9.
14. Schäfer, W.; W.-G. Friebe; H. Leinert; A. Mertens; T. Poll; W. von der Saal; H. Zilch; B. Nuber; M.L. Ziegler, *Non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase : Molecular modeling and X-Ray structure investigations*. Journal of Medicinal Chemistry, 1993. **36**(726-732).
15. Gussio, R.; N. Pattabiraman; D.W. Zaharevitz; G.E. Kellogg; I.A. Topol; W.G. Rice; C.A. Schaeffer; J.W. Erickson; S.K. Burt, *All-Atom Models for the Non-Nucleoside Binding Site of HIV-1 Reverse Transcriptase Complexed with Inhibitors: A 3D QSAR Approach*. Journal of Medicinal Chemistry, 1996. **39**(8): p. 1645-50.
16. Jourdan, F.; J. Renault; C. Fossey; R. Bureau; D. Laduree; M. Robba; A.M. Aubertin; A. Kim, *Design, synthesis and antiviral activity of new pyridinone derivatives*. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 1997. **8**(2): p. 161-172.
17. Cramer, R.D.I.; D.E. Patterson; J.D. Brunce, *Comparative molecular field analysis. 1. Effect of shape on binding of sterols to proteins*. Journal of the American Chemical Society, 1988. **110**: p. 5959.
18. Tucker, T.J.; W.C. Lumma; J.C. Culberson, *Development of nonnucleoside HIV reverse transcriptase inhibitors*. Methods Enzymol., 1996. **275**: p. 440-472.
19. Kearsley, S.K.; G.M. Smith, *An alternative method for the alignment of molecular structures: maximizing electrostatic and steric overlap*. Tetrahedron Computer Methodology, 1990. **3**(6c): p. 615-33.
20. Mager, P.P., *Evidence of a butterfly-like configuration of structurally diverse allosteric inhibitors of the HIV-1 reverse transcriptase*. Drug Design and Discovery, 1996. **14**: p. 241-257.
21. Mager, P.P.; H. Walther, *A hydrophilic Ω -loop (Tyr181 to Tyr188) in the nonsubstrate binding area of HIV-1 reverse transcriptase*. Drug Design and Discovery, 1996. **14**: p. 225-239.
22. Dolle, V.; E. Fan; C.H. Nguyen; A.-M. Aubertin; A. Kim; M.L. Andreola; G. Jamieson; L. Tarrago-Litvak; E. Bisagni, *A New Series of Pyridinone Derivatives as Potent Non-Nucleoside Human Immunodeficiency Virus Type 1 Specific Reverse Transcriptase Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 1995. **38**(23): p. 4679-86.
23. Dolle, V.; C.H. Nguyen; M. Legraverend; A.-M. Aubertin; A. Kim; M.L. Andreola; M. Ventura; L. Tarrago-Litvak; E. Bisagni, *Synthesis and antiviral activity of 4-benzyl pyridinone derivatives as potent and selective non-nucleoside human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 2000. **43**(21): p. 3949-3962.
24. Goldman, M.E.; J.H. Nunberg; J.A. O'Brien; J.C. Quintero; W.A. Schleif; K.F. Freund; S.L. Gaul; W.S. Saari; J.S. Wai; et al., *Pyridinone derivatives: specific human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitors with antiviral activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(15): p. 6863-7.

25. Saari, W.S.; J.M. Hoffman; J.S. Wai; T.E. Fisher; C.S. Rooney; A.M. Smith; C.M. Thomas; M.E. Goldman; J.A. O'Brien; et al., *2-Pyridinone derivatives: a new class of nonnucleoside, HIV-1-specific reverse transcriptase inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 1991. **34**(9): p. 2922-5.
26. Hoffman, J.M.; J.S. Wai; C.M. Thomas; R.B. Levin; J.A. O'Brien; M.E. Goldman, *Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as HIV-1 specific reverse transcriptase inhibitors. 1. Phthalimidoalkyl and -alkylamino analogs*. Journal of Medicinal Chemistry, 1992. **35**(21): p. 3784-91.
27. Saari, W.S.; J.S. Wai; T.E. Fisher; C.M. Thomas; J.M. Hoffman; C.S. Rooney; A.M. Smith; J.H. Jones; D.L. Bamberger; et al., *Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as HIV-1-specific reverse transcriptase inhibitors. 2. Analogs of 3-aminopyridin-2(1H)-one*. Journal of Medicinal Chemistry, 1992. **35**(21): p. 3792-802.
28. Hoffman, J.M.; A.M. Smith; C.S. Rooney; T.E. Fisher; J.S. Wai; C.M. Thomas; D.L. Bamberger; J.L. Barnes; T.M. Williams; et al., *Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as HIV-1-specific reverse transcriptase inhibitors. 4. 3-[2-(Benzoxazol-2-yl)ethyl]-5-ethyl-6-methylpyridin-2(1H)-one and analogs*. Journal of Medicinal Chemistry, 1993. **36**(8): p. 953-66.
29. Wai, J.S.; T.M. Williams; D.L. Bamberger; T.E. Fisher; J.M. Hoffman; R.J. Hudcosky; S.C. MacTough; C.S. Rooney; W.S. Saari; et al., *Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as specific HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. 3. Pyridyl and phenyl analogs of 3-aminopyridin-2(1H)-one*. Journal of Medicinal Chemistry, 1993. **36**(2): p. 249-55.
30. Parreira, R.L.T.; O. Abrahao; S.E. Galembeck, *Conformational preferences of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors*. Tetrahedron, 2001. **57**: p. 3243-3253.
31. Allen, F.H., *The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising*. Acta Crystallographica, Section B: Structural Science, 2002. **B58**(3, No. 1): p. 380-388.
32. Biosym/MSI, *Discover, user guide*, ed. Biosym/MSI. 1995, San Diego.
33. Morris, G.M.; D.S. Goodsell; R.S. Halliday; R. Huey; W.E. Hart; R.K. Belew; A.J. Olson, *Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function*. Journal of Computational Chemistry, 1998. **19**.
34. Tanaka, H.; H. Takashima; M. Ubasawa; K. Sekiya; I. Nitta; M. Baba; S. Shigeta; R.T. Walker; E. De Clercq; T. Miyasaka, *Structure-activity relationships of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine analogues : Effect of substitutions at the C-6 phenyl ring and at the C-5 position on anti-HIV-1 activity*. Journal of Medicinal Chemistry, 1992. **35**: p. 337-345.
35. Ooi, T.; M. Oobatake; G. Nemethy; H.A. Scheraga, *Accessible surface areas as a measure of the thermodynamic parameters of hydration of peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1987. **84**(10): p. 3086-90.
36. Biosym/MSI, *Delphi and Solvation, User Guide*, ed. Biosym/MSI. 1993, San Diego.
37. Smith, R.H.; W.L. Jorgensen; J. Tirado-Rives; M.L. Lamb; P.A.J. Janssen; C.J. Michejda; M.B. Kroeger Smith, *Prediction of binding affinities for TIBO inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase using Monte Carlo simulations in a linear response method*. Journal of Medicinal Chemistry, 1998. **41**: p. 5272-5286.

Chapitre 5 : Conception rationnelle de nouveaux INNTI de type pyridinone.

Il n'y a pas de succès facile, ni d'échec définitif

(M. Proust)

Au cours de la première partie de ces travaux, l'étude des différentes familles d'INNTI de type **pyridinone** à l'aide des outils de modélisation moléculaire a permis une meilleure compréhension du **mécanisme d'action** de ces composés. En décrivant clairement leur **interaction** avec le **site allostérique** de la transcriptase inverse et en définissant les **critères stériques et électroniques** essentiels à leur activité, ces résultats ouvrent la voie à la **conception directe** de nouveaux inhibiteurs.

Cette partie de notre travail de thèse couvre une partie des recherches réalisées dans le cadre d'un projet mené conjointement avec le laboratoire de chimie des matériaux organiques (FUNDP) et le laboratoire de virologie moléculaire (ULB). La majeure partie de cette étude est consacrée à l'optimisation de l'activité antivirale d'une nouvelle série d'INNTI dérivés des 2-pyridinones. D'autres points importants dans le cadre de la conception de nouveaux médicaments anti-VIH, tels que l'activité des composés face aux souches mutantes du virus et la prédiction leur biodisponibilité et de leurs propriétés de distribution sont également abordées.

5.1. Etude d'une série d'analogues des pyridinones Merck

Le point de départ de cette démarche de conception rationnelle de nouveaux INNTI concerne un groupe de cinq **dérivés du cycle 2-pyridinone** (figure 1). La molécule **E1**, chef de file de cette série, avait été identifiée en tant que **faible inhibiteur de la réplication du VIH-1** au cours de tests biologiques *ex vivo**, tandis que les composés E2 à E5 ont été synthétisés par analogie au E1, pour tenter de dégager des relations structure-activité.

Un premier relevé des **éléments structuraux** qui composent le E1 et ses dérivés permettent de les désigner comme étant des **analogues des pyridinones Merck**. On retrouve ainsi les groupements **5-éthyle** et **6-méthyle** présents chez bon nombre de ces composés de référence, ainsi qu'un groupe de faible volume en position 4 et une longue **chaîne latérale en position 3**, terminée par un **cycle aromatique**. En vertu de ces similitudes, l'activité antivirale du E1 a été rapidement attribuée à l'inhibition de la transcriptase inverse.

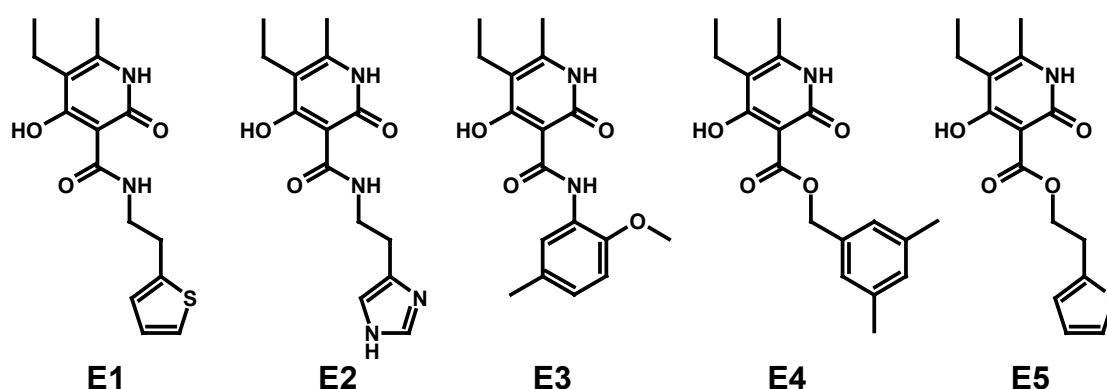


Figure 1 : Structure des cinq composés synthétisés antérieurement à ce projet de recherches

En dépit de ces points communs et au vu des hypothèses d'interaction décrites au chapitre 4, plusieurs **éléments caractéristiques** aux composés de la série E pourraient **nuire à leur efficacité**. D'une part, plusieurs **fragments polaires**, tels qu'un groupement **4-hydroxy** ou une fonction **ester** ou **amide**, risquent de pénaliser leur interaction avec le site de liaison des INNTI, qui est en majorité hydrophobe. D'autre part, le **cycle secondaire** de ces molécules est un **cycle simple**, contrairement aux pyridinones *Merck*, qui possèdent un cycle double. Enfin, le **lien entre les deux cycles** dépasse dans la plupart des cas la **longueur optimale de deux atomes** mise en évidence chez les pyridinones *Merck* (cf point 4.2.2.4.). Ces éléments imposent un examen attentif du E1 et de ses dérivés, afin de vérifier si ceux-ci sont en mesure de répondre aux critères posés par notre pharmacophore et de se lier au site allostérique de la TI selon le mode d'interaction proposé pour les pyridinones de la série *Merck*.

* Tests réalisés en 1998, à l'aide d'un test commercial détectant la protéine CA-p24.

5.1.1. Etude cristallographique

La **structure tridimensionnelle du E1** a pu être déterminée par **diffraction de rayons X**. Plusieurs monocristaux exploitables ont été obtenus par évaporation lente et à température ambiante d'une solution du composé dans un mélange d'acétonitrile et d'acétone, dans les proportions 3/1. Dans ces conditions, le E1 cristallise dans le système monoclinique $P2_1/n$. Les paramètres de maille et l'indice de désaccord lié à cette structure sont résumés à la figure 2, tandis qu'une liste détaillée des données cristallographiques est fournie en annexe.

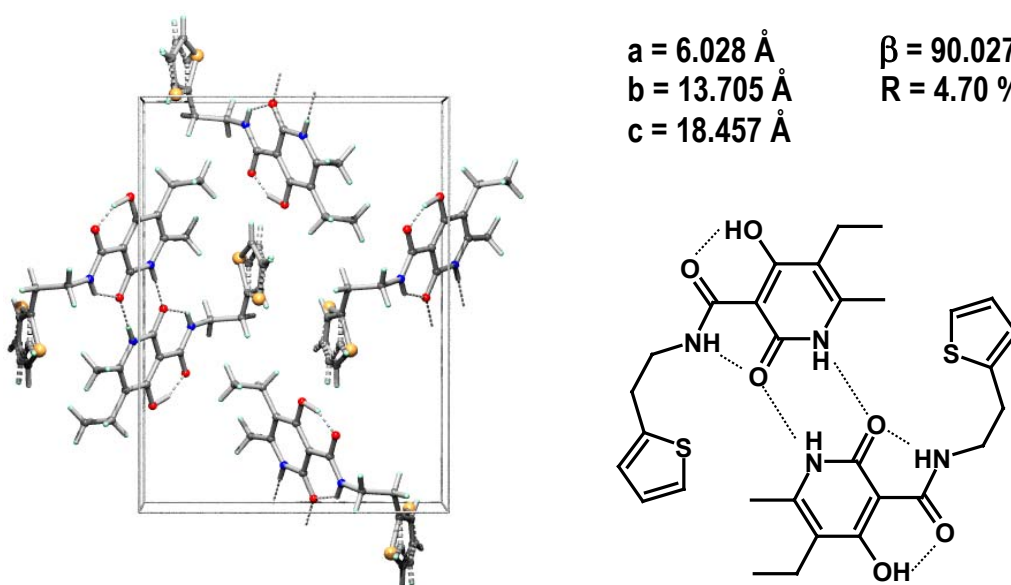


Figure 2 : Structure cristallographique du composé E1

L'analyse de ce système cristallin révèle que le E1 cristallise sous forme de **dimère**, suite à la formation de **deux ponts hydrogène intermoléculaires** qui mettent en jeu la fonction lactame de la pyridinone. Cette interaction est à l'origine d'un **léger réarrangement électronique** et tend à modifier la nature des liaisons au sein de ce cycle. Ce phénomène a déjà été étudié de manière théorique par H.J. Gold^[1], en vue d'expliquer l'effet catalytique du cycle 2-pyridinone sur la mutarotation du glucose. Conformément à cette étude, les indices de liaison (calculés par la méthode de Wiberg^[2]) au sein du dimère diffèrent de ceux obtenus par calcul *ab initio* (RHF 6-31G*) sur une molécule isolée (tableau 3). Il en va de même pour les longueurs de liaison (tableau 4). Ces variations tendent à rapprocher la structure du **cycle 2-pyridinone** de celle d'un de ses **tautomères**, la **2-hydroxypyridine** (figure 5). On peut ainsi vérifier que dans le cas

de la structure cristalline, les liaisons « doubles » se sont affaiblies, tandis que les liaisons « simples » se sont renforcées. Selon l'étude réalisée par H.J. Gold, la formation simultanée des deux ponts hydrogène et la réorganisation des électrons du cycle pyridinone **augmente de manière substantielle les interactions entre les deux molécules** (stabilisation estimée à 3.38 kcal/mole). Ceci pourrait contribuer, dans le cas du E1, à la formation du dimère.

Liaison	Indice de liaison : optimisation <i>a.i.</i>	Indice de liaison : DRX
N1 – C2	1.0606	1.0741
C2 – C3	1.1291	1.1651
C3 – C4	1.4226	1.3631
C4 – C5	1.1398	1.1726
C5 – C6	1.6191	1.5973
C6 – N1	1.1249	1.1297
C2 – O7	1.5378	1.4939

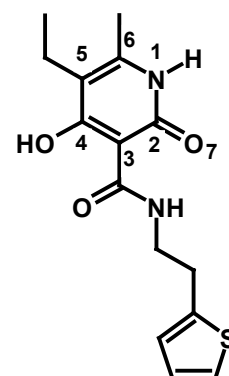


Tableau 3 : Comparaison des indices de liaison de Wiberg dans le cycle pyridinone

Valeurs mesurées		
Liaison	Distance DRX (Å)	Distance RHF 6-31G* (Å)
N1 - C2	1.36	1.37
C2 - C3	1.42	1.44
C3 - C4	1.40	1.38
C4 - C5	1.41	1.44
C5 - C6	1.36	1.34
C6 - N1	1.36	1.36
C2 - O7	1.26	1.21

Valeurs Standard	
Liaison	Distance (Å)
C – C	1.54
C = C	1.34
C=C-C=C (a)	1.45
C=C-C=C (b)	1.47
C-N	1.47
C=N	1.27
C=O	1.23
(a) : non conjugué	(b) : conjugué

Tableau 4 : Comparaison des longueurs de liaison au sein du cycle pyridinone

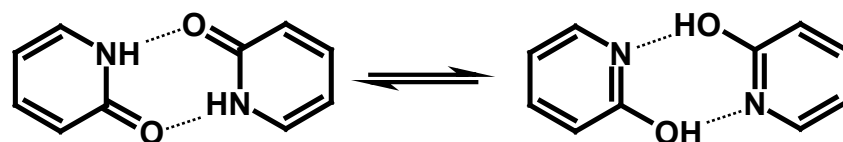


Figure 5 : La formation d'un dimère tend à rapprocher la structure du cycle 2-pyridinone de celle de son tautomère 2-hydroxypyridine.

La structure cristallographique du E1 indique également la formation de **deux ponts hydrogène intramoléculaires**. Tous deux impliquent la fonction amide du composé, qui interagit alors avec les groupes 4-hydroxy et 2-carbonyl du cycle pyridinone. Ceci a pour effet de maintenir l'amide **coplanaire** vis à vis de ce cycle. L'angle de torsion observé est en effet de 2.2°. Ces interactions tendent donc à **rigidifier** considérablement la molécule, ce qui pourrait l'empêcher de prendre une conformation compatible avec le pharmacophore « butterfly ».

5.1.2. Analyse conformationnelle des pyridinones de la série E

La structure du E1 obtenue au cours de son étude cristallographique est une des **conformations stables** de ce composé. Il est cependant possible que d'autres conformations de basse énergie soient accessibles à cette molécule et que l'une d'entre elles permette la liaison de la pyridinone au site allostérique de la TI. Comme dans le cas de la série *Merck*, **l'espace conformationnel** des pyridinones dérivées du E1 a donc été exploré grâce à des méthodes théoriques.

5.1.2.1. Etude par calculs *ab initio*

Deux types de liaisons rotatoires ont été étudiées grâce aux méthodes *ab initio*. Elles définissent l'**angle dièdre T2** (figure 6) entre le cycle pyridinone et la fonction **amide** ou **ester** présente en position 3 et conditionnent donc l'orientation générale de la chaîne latérale des composés de la série E. Afin de réduire les temps de calcul, seule une partie du composé a été considérée.

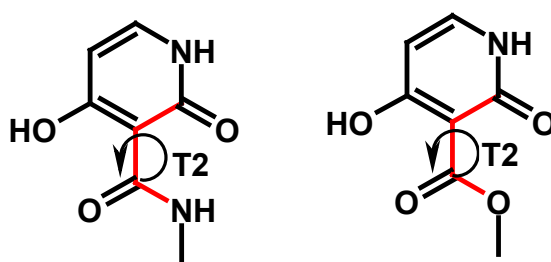


Figure 6 : Définition de l'angle dièdre T2 entre le cycle pyridinone et la fonction amide ou ester des dérivés de la série E

Dans le cas d'un composé de type **amide**, l'étude systématique de cette liaison rotatoire au moyen d'un balayage conformationnel *ab initio* se révèle délicate à mettre en œuvre. La modification de cet angle de torsion implique non seulement la **rupture de deux ponts hydrogènes** intramoléculaires entre le groupement amide et les fonctions 4-hydroxy et carbonyle, mais également la **formation d'un nouveau pont H** entre le carbonyle de la fonction amide et le groupe 4-hydroxy, suite à la rotation du groupe 4-hydroxy (figure 7). L'obtention d'un profil énergétique réaliste demanderait un balayage conformationnel combinant les variations, de 0° à 360°, de deux angles de torsion, ce qui exigerait l'optimisation *ab initio* d'un grand nombre de structures (576, si les angles dièdres sont modifiés par pas de 15° comme précédemment). Cette option a donc été abandonnée. Seuls les deux **conformères** illustrés à la figure 7, qui constituent probablement des minima énergétiques locaux de la surface d'énergie potentielle de cette molécule, ont été optimisés. La **différence d'énergie** entre ces deux structures est estimée à 28.5 kcal/mole, en faveur de la structure comprenant deux ponts hydrogènes intramoléculaires ($T_2=0^\circ$). Cette différence très élevée est sans doute liée non seulement à la **perte d'un des ponts H** dans le conformère pour lequel $T_2=180^\circ$, mais également à une **répulsion** très importante entre les deux groupements carbonyles, placés à une distance de 2.69 Å. En résumé, ces résultats indiquent la présence probable d'une **barrière énergétique de rotation** très importante.

L'étude d'un dérivé de type **ester** est nettement plus simple que celle d'une amide, car la formation de ponts hydrogène dans les conformères correspondants à des valeurs de T_2 de 0° ou 180° n'implique pas une rotation importante du groupement 4-hydroxy. Comme dans le cas des pyridinones de la série *Merck*, treize conformations de la molécule simplifiée ont été générées de manière à couvrir des valeurs d'angle de torsion de 0° à 180°, par intervalles de 15°. Chaque structure a ensuite été optimisée en base RHF 6-31G*, avec pour seule contrainte de conserver l'angle de torsion initialement attribué.

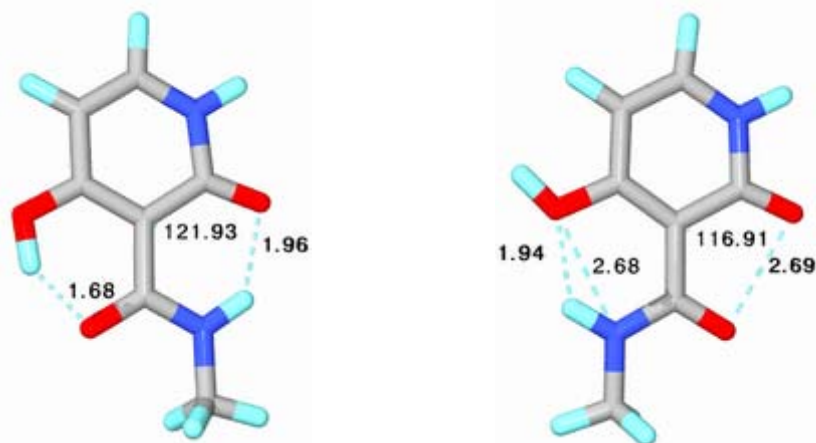


Figure 7 : Pour les dérivés de type amide, une valeur de T2 de 0° (gauche) ou de 180° (droite) implique la formation de ponts hydrogène (deux pour T2 = 0° et un si T1 : 180°)

Le profil énergétique obtenu (figure 8) est relativement simple. **Deux conformations stables** de la molécule sont liées à des valeurs d'angle de torsion de 0° et 180°, pour lesquelles un **pont hydrogène** est formé entre le groupe 4-hydroxy porté par le cycle pyridinone et un des oxygènes du groupement ester. Ceci place l'autre oxygène de cet ester en vis à vis du groupe carbonyle de la pyridinone, ce qui est source de **répulsions**. Comme on pouvait s'y attendre, la conformation à 180°, dans laquelle les deux fonctions carbonyle se repoussent, est la moins favorisée. La différence d'énergie entre les conformations à 0° et 180° est de 6.5 kCal/mole, ce qui est nettement plus favorable que dans le cas de l'amide. Ceci peut en partie s'expliquer par la distance plus importante entre les atomes d'oxygène des deux carbonyles dans le conformère à 180° (2.76Å), ce qui tend à diminuer la répulsion entre ces groupements (figure 9).

La **barrière de rotation** associée à T2 est logiquement moins importante que dans le cas de l'amide, où deux ponts hydrogènes devaient être brisés. Sa **valeur maximale** ($\Delta E = 12.8$ kCal/mole) est associée à un angle de torsion proche de 90°. Dans ces conditions, aucun pont hydrogène n'est possible, et toute conjugaison entre le groupe ester et le cycle pyridinone est perdue.

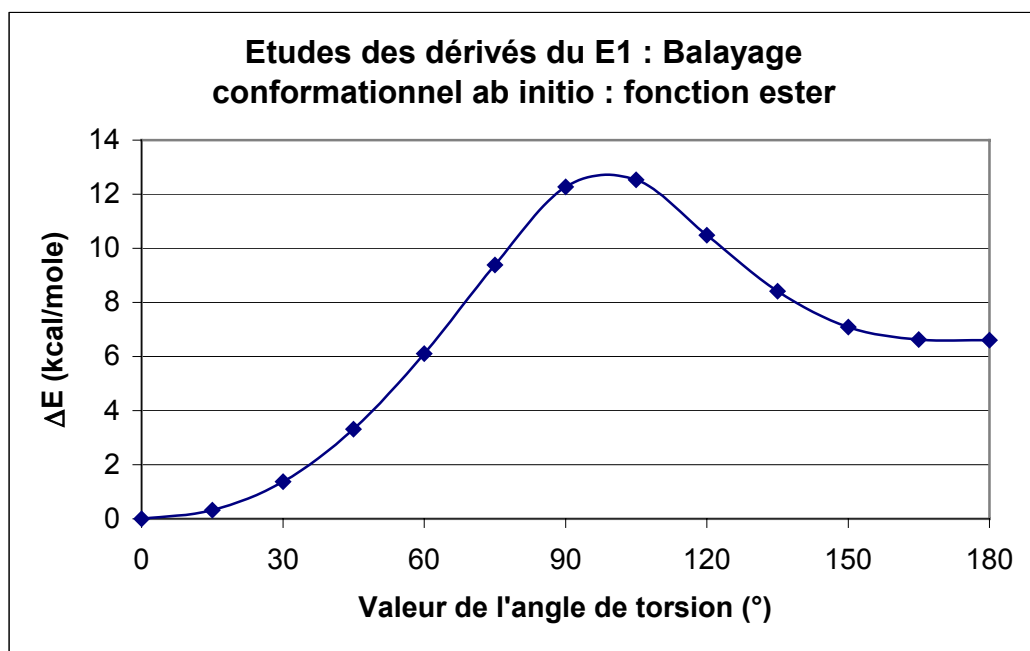


Figure 8 : Profil énergétique obtenu lors de l'étude des dérivés ester par calcul ab initio

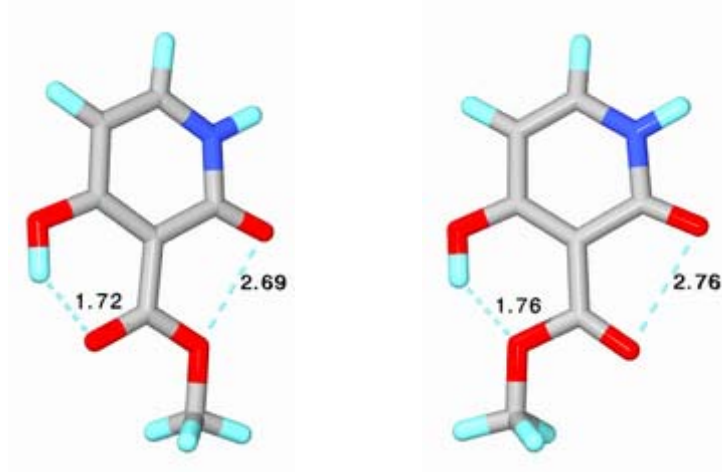


Figure 9 : Conformères des dérivés ester pour lesquels T2 = 0° (gauche) et T2 = 180° (droite)

Ces données sont particulièrement importantes dans le cadre de la conception d'inhibiteurs non nucléosidiques de la TI dérivés du E1. Elles indiquent que les chaînes latérales **des deux types de pyridinones** qui composent la série E (amides et esters) sont soumises à des contraintes qui tendent à les **orienter à l'opposé du site hydrophobe** qu'elles sont destinées à occuper. Ces contraintes sont très importantes dans le cas de l'amide, pour laquelle une valeur d'angle de torsion de 180° est interdite. Elle est plus faible pour les dérivés de type ester, qui pourraient malgré tout s'adapter à la topologie du site de liaison.

5.1.2.2. Utilisation de la CSD

La recherche dans la **banque de données CSD** (Cambridge Structural Database) de molécules présentant des **angles de torsion similaires à T2** permet de compléter les informations obtenues par les méthodes *ab initio*. En ce qui concerne les dérivés **amide**, elle indique l'existence d'une **forte barrière de rotation**. L'ensemble des **26 composés** de la CSD présentant les mêmes éléments structuraux que la molécule étudiée par calculs *ab initio* sont en effet caractérisés par une valeur de T2 comprise **entre -7° et 7°** (figure 10).

En ce qui concerne les dérivés ester, le **faible nombre de composés** de ce type présents dans la CSD (4) ne permet pas de tirer de réelles conclusions. Ces quatre molécules sont cependant caractérisées par des valeurs de T1 comprises entre -10° et 10° , ce qui est en bon accord avec les résultats des calculs *ab initio*.

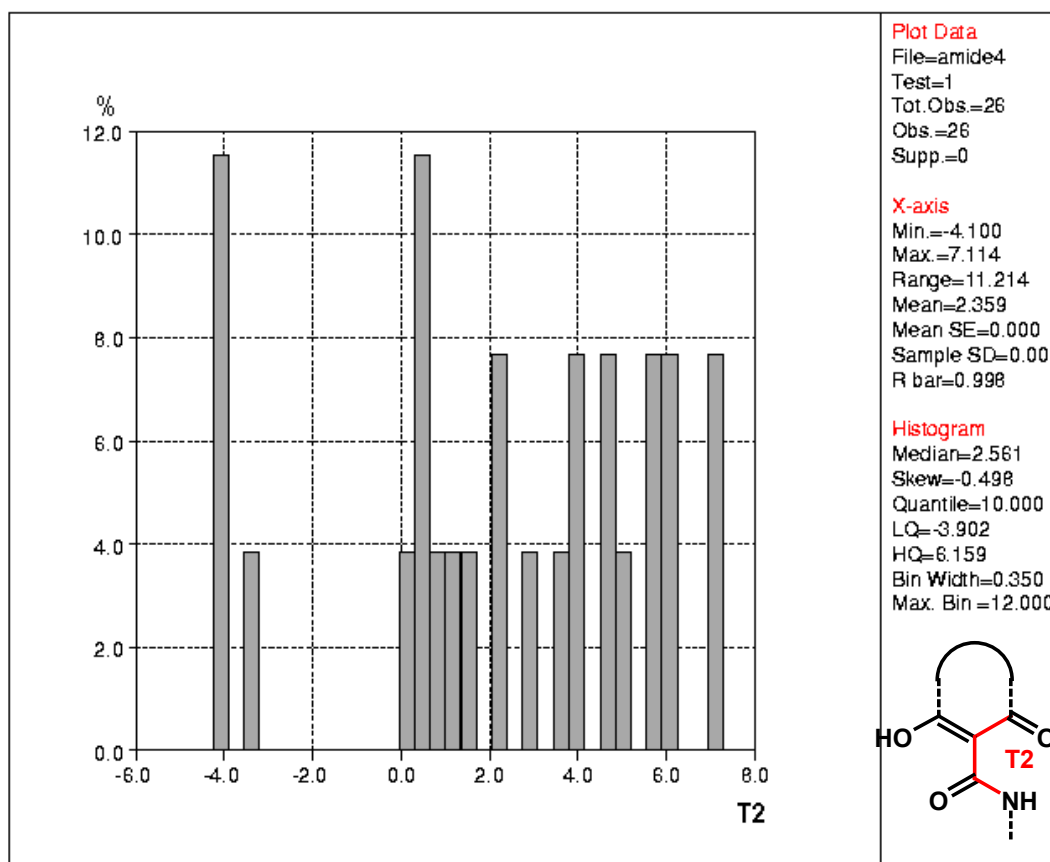


Figure 10 : Répartition (en %) des valeurs d'angle de torsion T2 au sein des composés de la CSD. T2 est ici défini comme l'angle dièdre entre une fonction carbonylée α - β insaturée incluse dans un cycle et portant un groupe hydroxy en position 4 et une fonction amide greffée en α du carbonyle.

Enfin, nous avons tenté d'expliquer la différence d'énergie (28.5 kcal/mole) importante entre les conformations à 0° et 180° du dérivé amide. Pour ce faire, nous avons recherché l'ensemble des structures de la CSD dans lesquelles un groupement carbonyle est greffé sur un cycle, en position adjacente d'un autre carbonyle inclus dans ce cycle (figure 11). Ce critère reprend non seulement des amides ou des esters, mais également des cétones et des aldéhydes, ainsi que des composés polycycliques ou même macrocycliques. Les distances entre les atomes d'oxygène de ces deux groupes (D) ont ensuite été portées dans un histogramme (figure 11). L'analyse des résultats obtenus indique que dans **95% des 453 structures cristallographiques** répondant au critère de recherche (figure 11), D est **supérieur à 2.72 Å**. Une grande part des 5% restants représente des systèmes fortement contraints. Dans le cas de l'amide, D = 2.69Å lorsque T2=180°, ce qui correspond à une valeur très peu représentée dans l'histogramme (0.4% des structures pour lesquelles 2.65Å < D < 2.72Å). La distance relevée dans le cas de l'ester (2.76 Å) est par contre bien représentée (pour 5% des structures, 2.72 Å < D < 2.79Å) On peut dès lors postuler que la répulsion entre les deux groupements carbonyles contribue nettement à la différence d'énergie entre les conformations à 0° et 180° de l'amide.

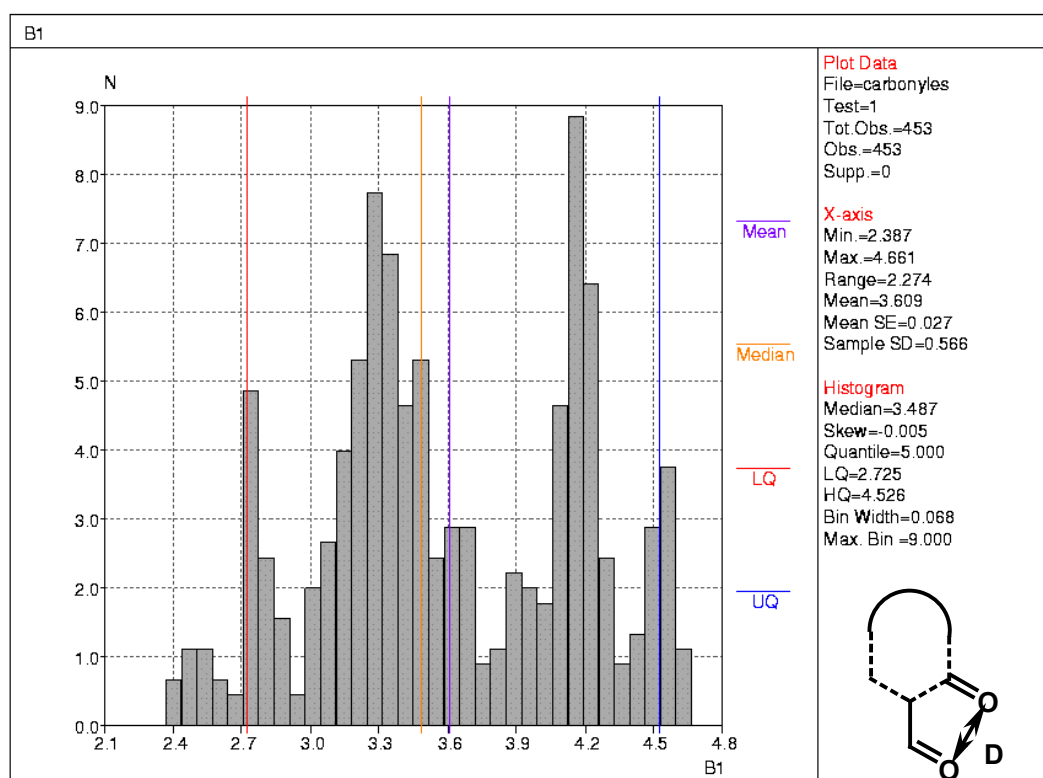


Figure 11 : Répartition (en %) des distances D au sein des composés de la CSD. D est ici défini comme la distance entre les oxygènes de deux groupements carbonyles, l'un étant inclus dans un cycle et l'autre étant greffé sur la position voisine du même cycle.

5.1.2.3. Etude par dynamique moléculaire

Le nombre important de liaisons rotatoires au sein des composés de la série E rend difficile leur analyse conformationnelle par une procédure de **recherche systématique**. Cette méthode exigerait en effet, uniquement pour le E1, la génération et l'optimisation de **plus de 50000 conformères**. L'espace conformationnel des molécules de la série E a donc été échantillonné à l'aide de la **dynamique moléculaire**. Les détails relatifs à ce type de simulation sont repris dans le chapitre 3.

Les résultats obtenus lors de cet échantillonnage sont la suite logique des données récoltées grâce à la diffraction de rayons X, aux calculs *ab initio* et à l'utilisation de la CSD. Ainsi, l'**angle de torsion** entre le cycle pyridinone et la fonction amide qui caractérise les composés E1, E2 et E3 est systématiquement **compris entre -30° et 30°** . Ceci restreint fortement l'espace accessible à la chaîne latérale, comme l'illustre bien la figure 12, dans laquelle les conformations du E1 sont comparées à la conformation adoptée par le TNK-651 dans la structure cristallographique du complexe TI-TNK-651. En conséquence, aucune des structures de basse énergie ne permet de superposer le cycle secondaire du TNK-651 au cycle aromatique du E1, du E2 ou du E3. Ces trois molécules semblent donc tout à fait **incapables de répondre aux exigences du pharmacophore *butterfly*** ou de se lier au site allostérique de la TI.

La situation est différente dans le cas des dérivés E4 et E5, qui possèdent un lien de type ester. Cette fonction, qui accorde un **plus grande flexibilité** à la molécule, permet à la chaîne latérale d'occuper un espace plus important, comme le montre la figure 13. Plusieurs structures de basse énergie sont en mesure de loger leur cycle secondaire à proximité de celui du TNK-651. L'angle de torsion entre la pyridinone et la fonction ester est alors compris entre 120° et 180° . La **différence d'énergie** qui sépare ces solutions de la conformation la plus stable est comprise **entre 4.0 et 6.5 kcal/mole** (ce qui est légèrement plus faible que la valeur de 6.5 kcal/mole obtenue par calcul *ab initio* au point 4.1.2.1). Il n'en reste pas moins que parmi les dérivés de la série E, le E4 et le E5 semblent être les seuls en mesure de se lier à la transcriptase inverse.

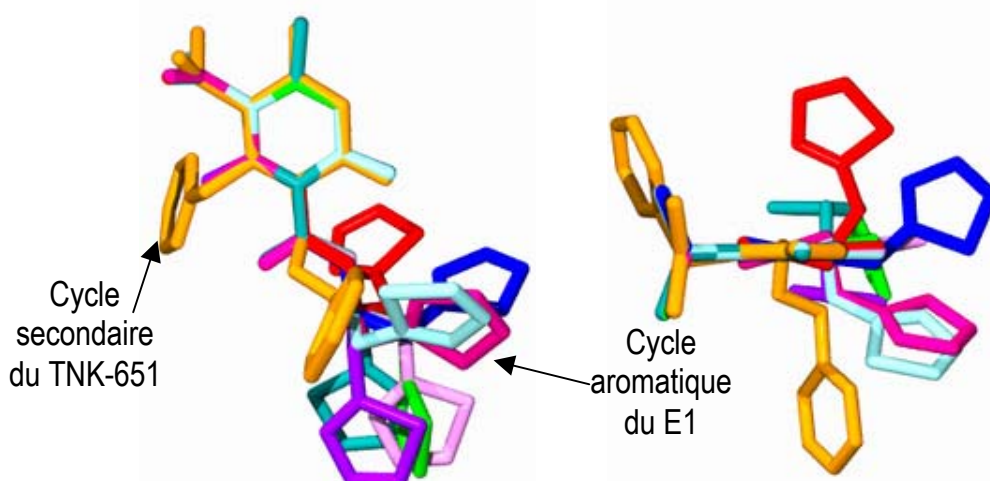


Figure 12 : L'espace conformationnel accessible au E1 (représenté dans deux plans perpendiculaires) est limité, et la molécule ne peut superposer le cycle aromatique de sa chaîne latérale au cycle secondaire du TNK-651 (orange).

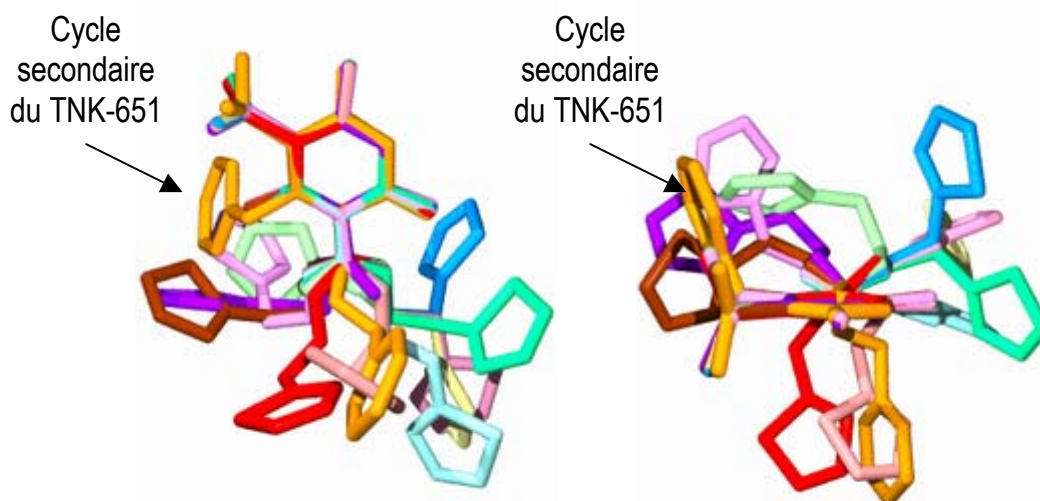


Figure 13 : L'espace conformationnel accessible au E5 (représenté dans deux plans perpendiculaires) est plus étendu que dans le cas du E1. Certains conformères superposent le cycle aromatique de sa chaîne latérale au cycle secondaire du TNK-651 (orange).

5.1.3. Docking des composés de la série E

Les cinq composés de la série E ont été soumis à une procédure de *docking* similaire à celle utilisée pour les pyridinones *Merck*. Sans surprise, les trois composés caractérisés par un lien de type **amide** (E1, E2 et E3) **ne semblent pas en mesure de se lier au site allostérique de la TI** selon le mode de liaison des pyridinones *Merck*. Ceci est la conséquence logique des fortes contraintes qui régissent la conformation de ces molécules. Un exemple de mode de

liaison alternatif suggéré pour le E1 est illustré à la figure 14. Cette solution place le cycle **thiophène** à proximité du résidu **Pro236**, mais laisse vacante la majeure partie de la **zone hydrophobe** du site de liaison, qui n'interagit alors qu'avec un **groupe 4-hydroxy polaire**. L'occupation de cette région étant essentielle à l'activité d'un INNTI, cette solution ne peut conduire à une bonne inhibition de la TI. Il convient également de noter que les valeurs de désolvatation attribuées à ces composés peuvent être relativement élevées : 6.46 kcal/mole pour le E1, 11.33 kcal/mole pour le E2 et 4.06 kcal/mole pour le E3.

Les deux derniers composés, qui possèdent un lien de type **ester**, pourraient être en mesure de se lier au site allostérique de la TI. Des solutions comparables au **mode de liaison Merck** sont en effet obtenues pour les structures E4 et E5 (figure 14). Elles contraignent cependant les deux molécules à adopter des **conformations défavorisées**. L'angle de torsion entre la pyridinone et la fonction ester est en effet de 102° dans le cas du E4 et de 91° dans celui du E5. Ces valeurs se situent dans la zone la plus défavorable du profil énergétique obtenu *ab initio* (cf. figure 8, au point 4.1.2.1). Il est donc probable que les **corrections d'affinité** destinées à tenir compte de l'énergie de conformation aient été **sous-estimées** par le champ de forces *cff91*. En outre, le groupe **4-hydroxy** du cycle pyridinone reste positionné en bordure de la **zone hydrophobe** du site de liaison. Malgré l'occupation de cette région, les valeurs d'affinité associées au E4 et au E5 demeurent nettement inférieures à celles attribuées aux meilleures pyridinones de la série *Merck* (tableau 15).

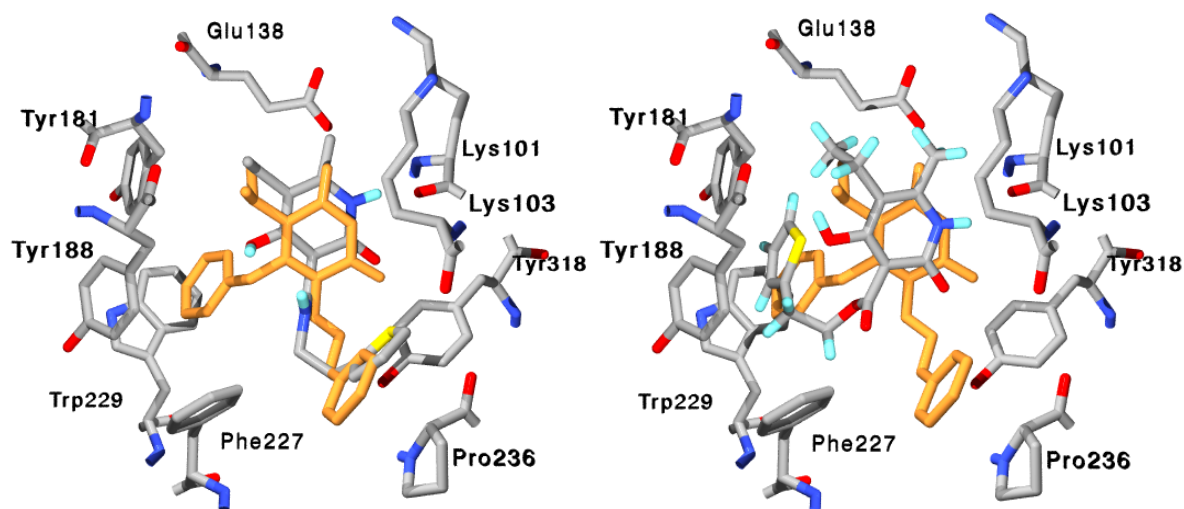


Figure 14 : Modes de liaison proposés pour les composés E1 (gauche) et E5 (droite). Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

Molécule	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée
E4	-23,12	23,12	4,32	6,44	12,36
E5	-22,52	22,52	6,28	4,22	12,02
PyrC6	-21,95	21,95	3,2	1,46	17,29

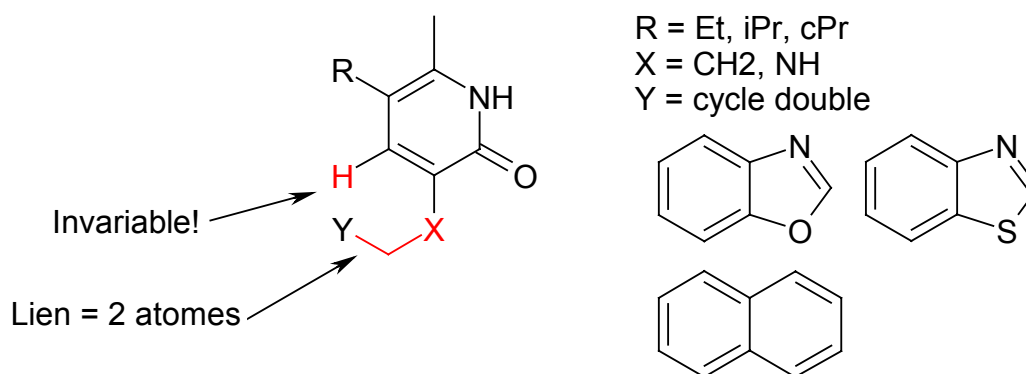
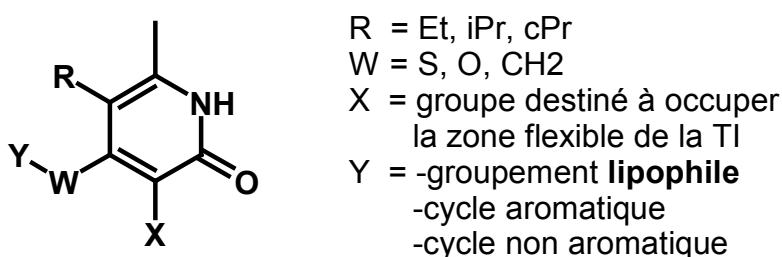
Tableau 15 : Valeurs d'affinité corrigée (en kcal/mole) obtenues pour les composés E4 et E5

5.1.4. Conclusion sur la modélisation des pyridinones de la série E

L'étude de l'espace conformationnel des pyridinones de la série E, ainsi que l'utilisation des procédures de docking ont mis en évidence plusieurs **éléments qui semblent peu compatibles avec l'inhibition de la TI**. Après le début de ces travaux, l'efficacité des cinq molécules a été vérifiée au moyen de tests *in vitro*. Ceux-ci indiquent que les molécules de la série E sont **inactives vis à vis de la TI** (pas d'inhibition observable à 200µM). L'activité antivirale *ex vivo* initialement attribuée au E1 est donc le fruit soit d'un faux positif, soit de l'action du E1 sur une cible moléculaire autre que la TI.

Sur base de ces premiers résultats, deux types de variations ont été envisagées en vue de concevoir des molécules inhibant effectivement la TI. La première possibilité (figure 16) consiste à rechercher de **nouveaux analogues de la série Merck**. Elle implique la **suppression du groupe 4-hydroxy**, ainsi que le **remplacement des liens de type amide et ester**, qui rigidifient exagérément la molécule et pénalisent ainsi sa liaison au site allostérique de la TI. De plus, elle exige probablement l'emploi de **cycles doubles**. Cette approche, qui limite considérablement la variété des molécules pouvant être obtenues, a été abandonnée après concertation avec le groupe de synthèse.

La deuxième solution (figure 17) consiste à modifier les molécules de la série E de manière à obtenir des **analogues des pyridinones de la série Curie**, pour lesquelles plusieurs possibilités de synthèse restent inexplorées. Pour ce faire, il est nécessaire de greffer un **groupement hydrophobe** adéquat sur la fonction 4-hydroxy qui caractérise les pyridinones de la série E. C'est cette seconde approche qui a été retenue.

Figure 16 : Règles pour la recherche de nouveaux analogues de la série *Merck*Figure 17 : Règles pour la recherche de nouveaux analogues de la série *Curie*

5.2. Contribution à la synthèse de pyridinones substituées en position 4

La greffe d'un **groupement hydrophobe** sur la fonction 4-hydroxy commune aux composés de la série E est réalisée sur le composé **B0**, dont la synthèse a été décrite par Dollé *et al*^[3]. L'existence de différentes **formes tautomères** du B0 complique cependant sa mise en œuvre. Ainsi, la structure **4-hydroxy-2-pyridinone** du B0 est en **équilibre dynamique** avec une **2,4-hydroxy-pyridine** et une **2-hydroxy-4-pyridinone** (figure 18). Il existe donc une incertitude sur le **site de greffe** du groupement hydrophobe et il convient de déterminer en quelle position cette opération est majoritairement réalisée. Cette distinction n'est pourtant pas triviale. Les produits de réaction peuvent en effet posséder des masses moléculaires identiques, ainsi que des caractéristiques spectroscopiques (RMN ¹H) très proches. La structure de composés obtenus *via* les différentes voies de synthèse a donc été déterminée de manière non ambiguë, grâce à la diffraction de rayons X.

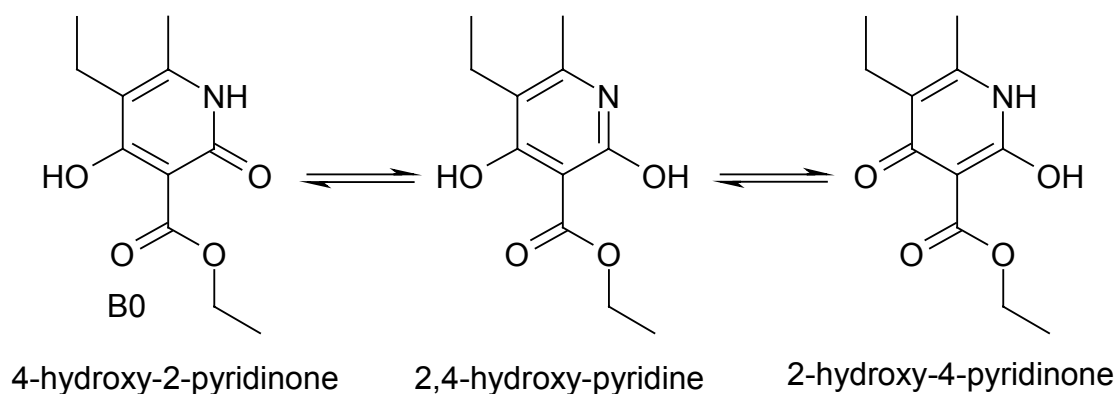


Figure 18 : formes tautomères de la 4-hydroxy-2-pyridinone B0

5.2.1. Réaction avec POCl_3

La réaction d'un **alcool** avec l'**oxyde de trichlorure de phosphore (POCl_3)** permet d'obtenir le **dérivé chloré** correspondant. Un intermédiaire de ce type obtenu à partir du B0 pourrait ensuite permettre la synthèse de pyridinones substituées en position 4, par exemple par réaction avec un groupement thiol. Des cristaux exploitables de l'intermédiaire et d'un produit final (M13) ont pu être obtenus par évaporation lente d'une solution dans l'isopropanol. Leur analyse par diffraction de rayons X montre cependant que la réaction de POCl_3 sur le B0 fournit un **composé dichloré**, tandis que la structure de M13 est celle d'une **2-chloropyridine** (figure 19). Les paramètres cristallographiques de ces structures sont fournis en annexe.

Bien que ne possédant pas la structure recherchée, le dérivé M13, présente un certain intérêt dans le cadre de nos travaux. Il possède en effet tous les éléments exigés par le pharmacophore « *butterfly* ». On retrouve ainsi **deux cycles aromatiques**, reliés entre eux par un atome d'hybridation sp_3 et un groupe lipophile de volume assez faible en position 5, qui est susceptible de jouer le rôle de **groupe de contrainte stérique**. Le M13 ne possède par contre **aucun donneur d'hydrogène** et ne peut donc former un pont H au sien de la TI, contrairement aux pyridinones de la série *Curie*, dont il est l'analogue.

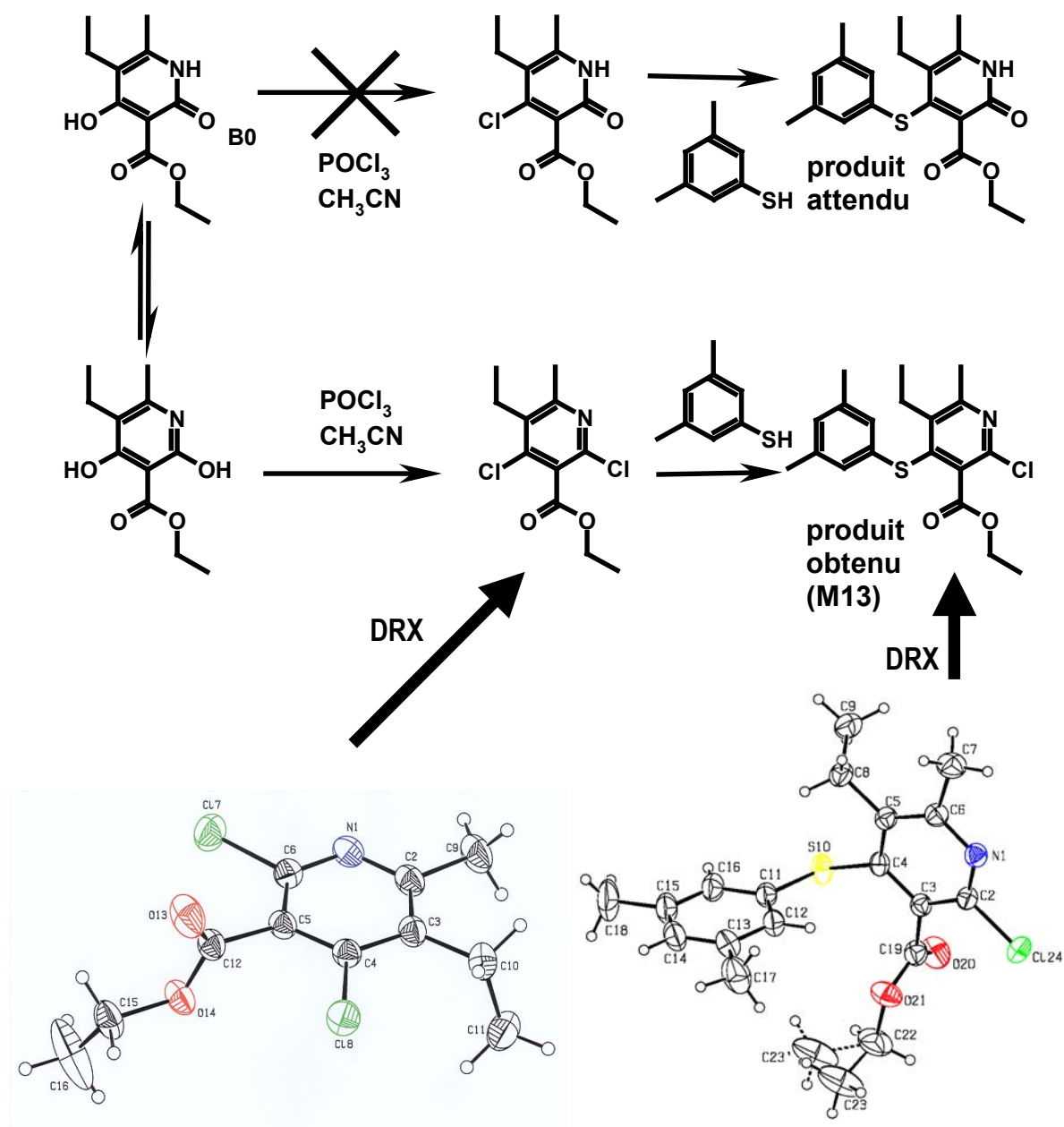


Figure 19 : La réaction du B0 avec POCl_3 fournit un intermédiaire dichloré, dont la réaction avec un groupe thiol mène à la formation de 2-chloropyridines.

L'étude du M13 à l'aide des algorithmes de *docking* indique que ce composé est capable de s'insérer dans le site de liaison des INNTI, de manière analogue à celle des **pyridinones Curie** (figure 20). La présence d'un chlore sur le cycle pyridine empêche cependant de calculer l'énergie de désolvatation de cette molécule par le modèle de Ooi *et al*^[4], dont les paramètres sont limités. L'affinité du M13 pour la TI n'a donc pas pu être estimée. L'examen de la structure du complexe TI-M13 indique cependant qu'il existe probablement une **répulsion** entre les paires libres de l'**azote pyridinique** du M13 et du **carbonyle du résidu Lys101**. Dans le cas

des pyridinones *Curie*, ce résidu était engagé dans un pont hydrogène avec le groupement NH de l'inhibiteur. Il est donc probable que la **perte de ce pont hydrogène**, combinée à l'apparition d'une répulsion électronique soit à l'origine d'une diminution d'activité inhibitrice, comme cela a pu être observé pour les différentes familles de pyridinones décrites dans la littérature.

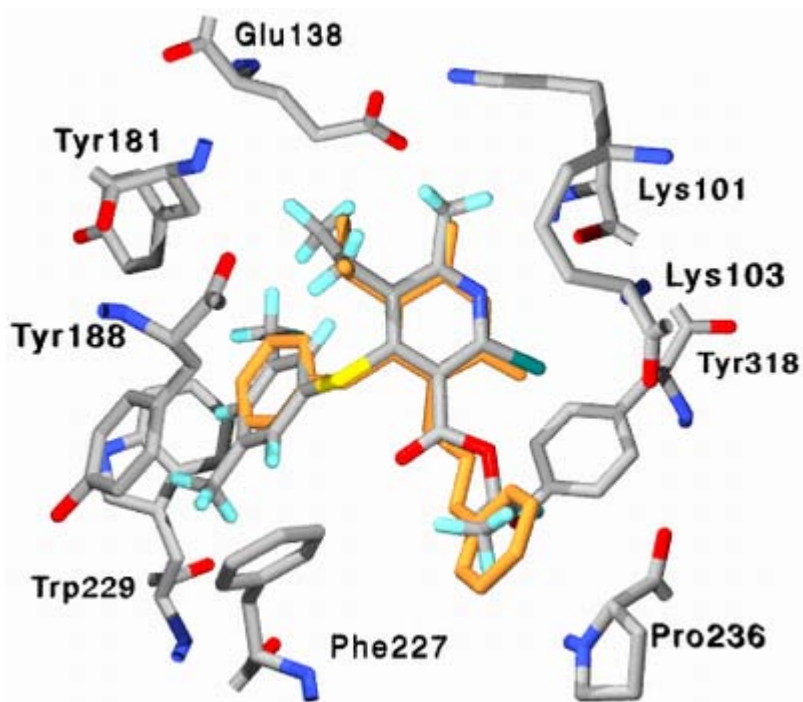


Figure 20 : Mode de liaison du composé M13 au sein du site allostérique de la TI Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

L'évaluation biologique du M13 est en bon accord avec ces informations structurales. Ce composé possède un certain **pouvoir inhibiteur de la TI**, puisqu'une concentration de 10 μ M en M13 provoque une réduction de 23% de l'activité polymérase de la TI. Cette inhibition reste cependant faible en comparaison de celle engendrée par les pyridinones *Curie* ou les INNTI faisant l'objet d'applications cliniques. En effet, dans les mêmes conditions, la Névirapine réduit de 89% l'activité polymérase. D'autre part, le M13 se révèle **incapable d'enrayer la réplication virale lors de tests ex vivo**. Les 2-chloropyridines ne constituent donc pas une alternative valable aux 2-pyridinones.

5.2.2. Réaction d'acylation

La réaction de **chlorures d'acides** avec le B0 permet d'obtenir des 2-pyridinones substituées en position 4 par une **deuxième fonction ester**. Le composé M18 est un exemple de molécule synthétisée selon ce procédé (figure 21). Sa structure tridimensionnelle a été déterminée par diffraction de rayons X, grâce à un cristal obtenu après évaporation lente d'une solution dans l'acétone. Elle permet notamment de constater que les deux groupements ester s'orientent perpendiculairement au plan du cycle pyridinone et que la fonction carbonylée α - β insaturée est plane, ce qui permet une **délocalisation électronique** optimale entre le carbonyle et la double liaison. Les paramètres cristallographiques détaillés de cette structure sont fournis en annexe.

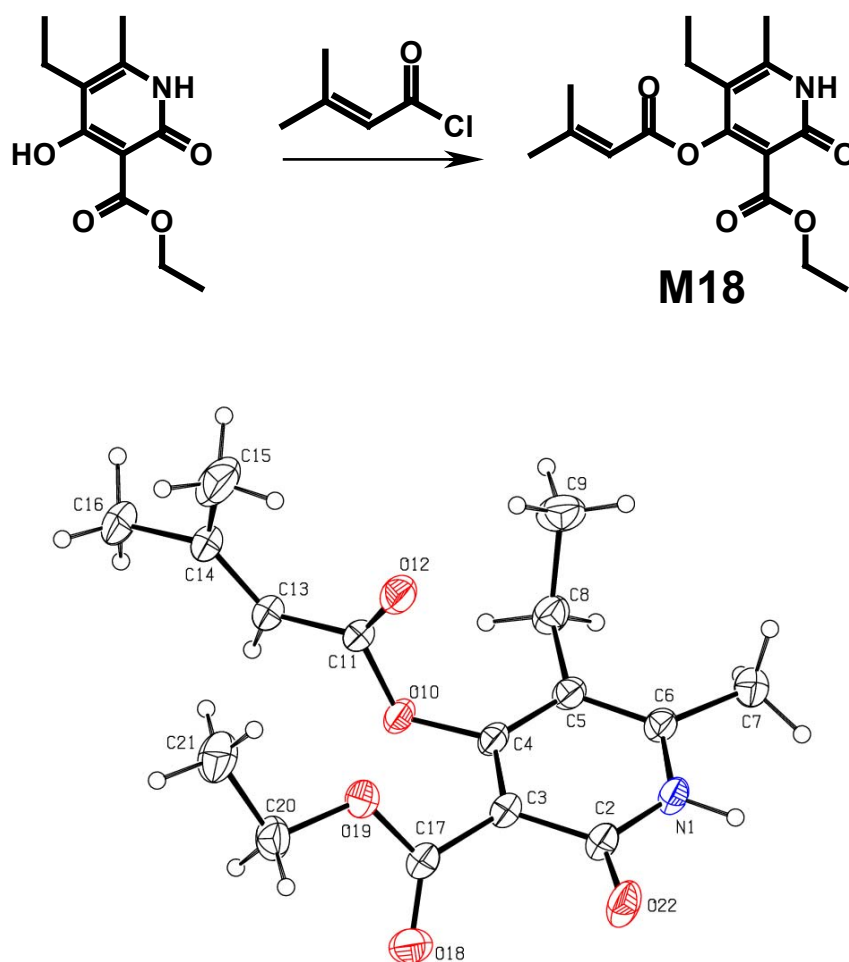


Figure 21 : Réaction menant à la formation du composé M18 et structure cristallographique du produit obtenu

Le groupement carbonyle α - β insaturé constitue un **système π délocalisé**, qui permet au M18 de répondre aux exigences du pharmacophore « *butterfly* ». Ce fragment étant coplanaire, il imite, en partie, le cycle aromatique des pyridinones *Curie* (figure 22).

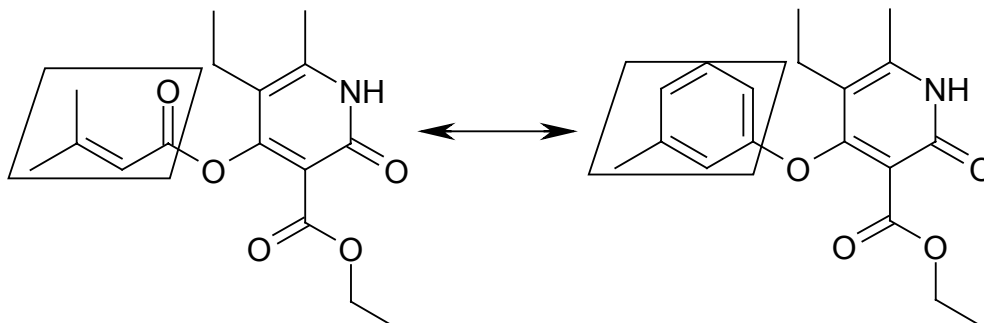


Figure 22 : Le groupement carbonyle α - β insaturé du M18 imite le cycle aromatique des pyridinones *Curie*

La modélisation du complexe TI-M18 indique que ce composé peut se positionner au sein du site allostérique de la TI selon le mode de liaison proposé pour les **pyridinones *Curie*** (figure 23). Le NH de la pyridinone M18 forme alors un **pont hydrogène** avec Lys101, tandis que la fonction α - β insaturée occupe la **zone hydrophobe** du site de liaison. Le volume de ce groupe est cependant assez faible et une partie de l'espace disponible reste inoccupée. On constate ainsi que **peu de contacts hydrophobes sont réalisés avec Tyr181**, alors qu'en temps normal ce résidu contribue largement à stabiliser l'inhibiteur. Outre les considérations stériques, la **polarité** du groupe greffé en position 4 risque également de nuire à l'activité de la molécule, bien que plusieurs pyridinones *Curie* possèdent également un lien incluant un carbonyle. Le groupe 5-éthyle est placé en vis à vis de Tyr181, tandis que l'ester éthylique occupe la zone flexible de la TI. L'**affinité corrigée** associée au M18 est de **18.50 kcal/mole**, ce qui est supérieur aux valeurs obtenues avec les composés de la série E. On peut donc s'attendre à une **amélioration des propriétés inhibitrices** de la molécule.

Ce résultat théorique est confirmé par les données issues de l'évaluation biologique du M18. Une concentration de 10 μ M en M18 provoque en effet une **réduction de 28% de l'activité enzymatique de la TI**, ce qui représente un léger progrès par rapport à la molécule M13. Le M18 possède également la capacité d'inhiber la réplication du VIH-1 au cours de tests *ex vivo*, avec une **EC₅₀ de 5.82 μ M**.

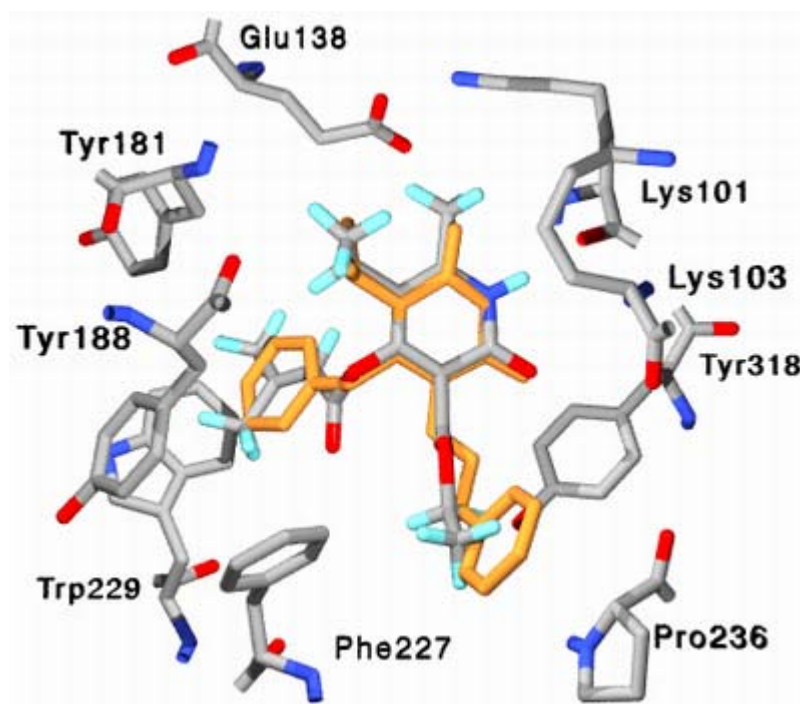


Figure 23 : Mode de liaison du composé M18 au sein du site allostérique de la TI. Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

5.2.3. Formation d'un intermédiaire sulfonate

La réaction du B0 avec l'**anhydride triflique** conduit en principe à un intermédiaire portant une fonction **sulfonate en position 4** du cycle pyridinone (figure 24). Une réaction de substitution nucléophile aboutirait dès lors à la greffe d'un nouveau groupement sur cette position. Des cristaux exploitables d'un des produits obtenus *in fine* (M13b) ont pu être obtenus par évaporation lente d'une solution dans l'acétate d'éthyle. La détermination, grâce à la DRX, de la structure du M13b montre cependant que la réaction a fourni une **4-pyridinone**, substituée en position 2. L'anhydride triflique a donc réagi prioritairement avec la forme 2-hydroxy-4-pyridinone du B0. Les paramètres cristallographiques de cette structure sont repris en annexe.

L'étude de cette nouvelle molécule ne laisse que peu d'espoir quant à ses caractéristiques d'inhibiteur de la transcriptase inverse. En effet, la recherche d'une possibilité d'interaction TI-M13b à l'aide des algorithmes de *docking* n'a fourni **aucune solution**. Ce composé semble donc incapable de se lier au site allostérique de la TI. Conformément à cette observation, le

M13b ne présente qu'une **activité inhibitrice négligeable**, même à une concentration de 200 μM .

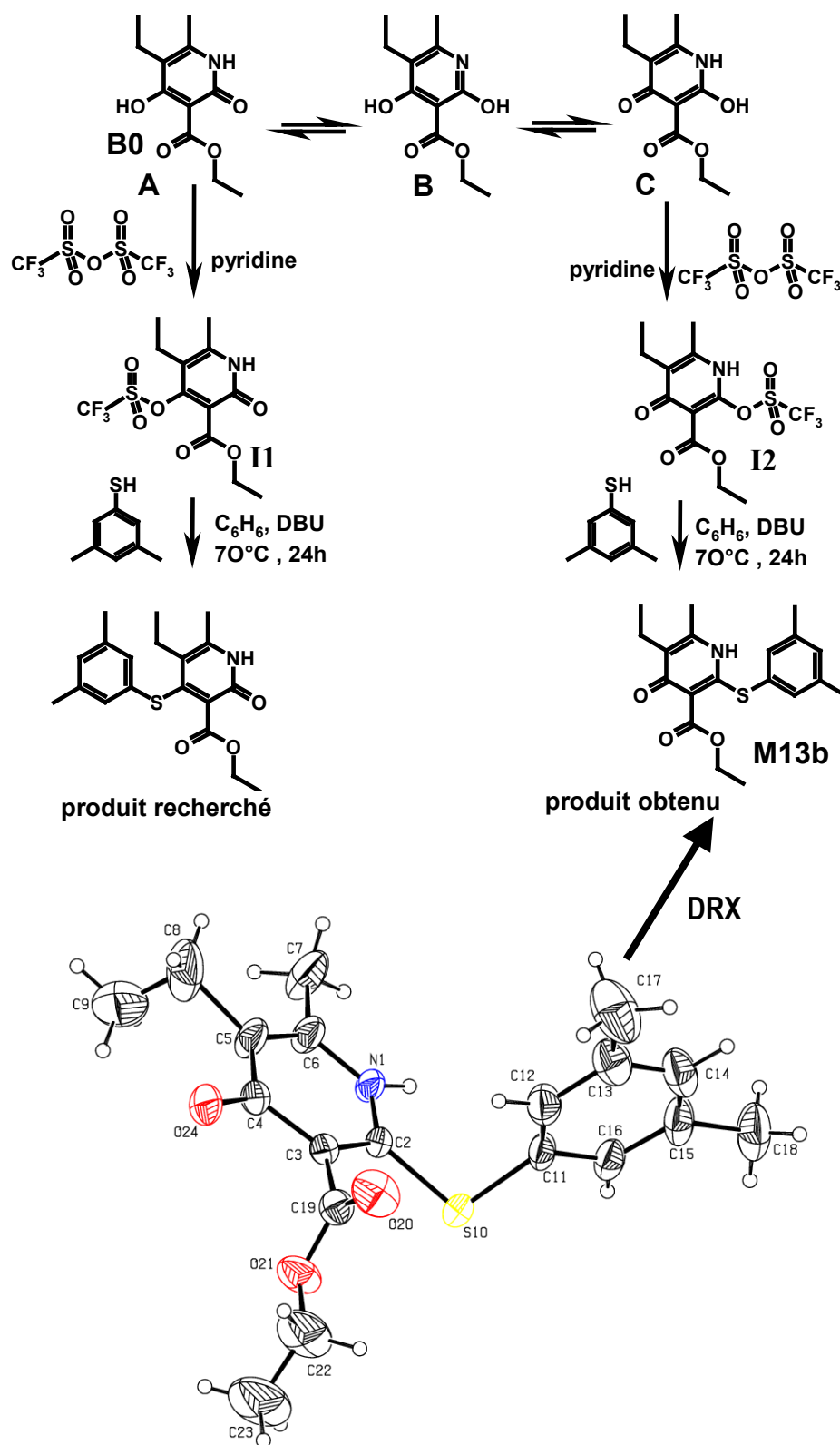


Figure 24 : Réaction proposée pour la synthèse d'analogues des pyridinones *Curie* via un intermédiaire sulfonate et structure du produit obtenu *in fine*

5.2.4. Réactions d'alkylation

Une réaction de **O-alkylation** du composé B0 en présence d'une base faible (Et_3N , Ag_2CO_3) mène à la production de **2-alkoxy-4-hydroxypyridines**, comme le montre la structure du composé M7 (figure 25), déterminée grâce à l'étude par DRX d'un cristal obtenu par évaporation lente d'une solution dans l'éthanol (paramètres cristallographiques en annexe). L'équilibre entre les formes tautomères du B0 a donc à nouveau orienté la synthèse vers un dérivé substitué en position 2. Il est cependant intéressant de constater que le produit obtenu est ici une 4-hydroxypyridine et non une 4-pyridinone, comme dans le cas du composé M13b. Ceci confirme que l'équilibre entre les différents tautomères est subtil et peut être déplacé en fonction du substituant greffé et des conditions expérimentales^[5].

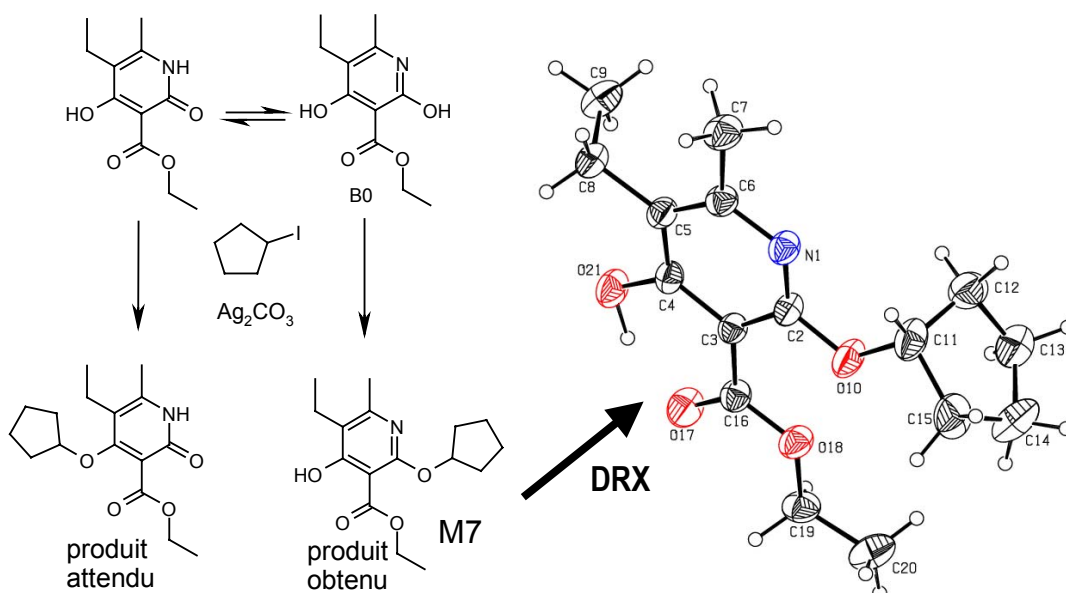


Figure 25 : Réaction proposée pour la synthèse d'analogues des pyridinones *Curie* par alkylation du B0 et structure du produit obtenu *in fine*

La **position 2 du cycle pyridinone** étant apparemment la **plus réactive** lors des réactions d'alkylation, le schéma de synthèse utilisé a été modifié par les chimistes organiciens du laboratoire CMO, afin d'obtenir plus aisément des 2-pyridinones substituées en position 4. Cette nouvelle stratégie (figure 26) consiste à réaliser une **première réaction d'alkylation**, qui aboutira à la formation d'un produit substitué en position 2 par un **groupement protecteur**. Par la suite, une seconde réaction d'O-alkylation permet une greffe sur la position 4. L'élimination du groupe protecteur permet enfin l'obtention de la 4-alkoxy-2-pyridinone correspondante. La

validité de cette approche a été vérifiée grâce la détermination par diffraction de rayons X de la structure du composé Z3, synthétisé selon cette procédure (paramètres cristallographiques en annexe). Les cristaux de composés Z3 utilisés pour cette expérience ont été obtenus par évaporation lente d'une solution dans l'acétonitrile.

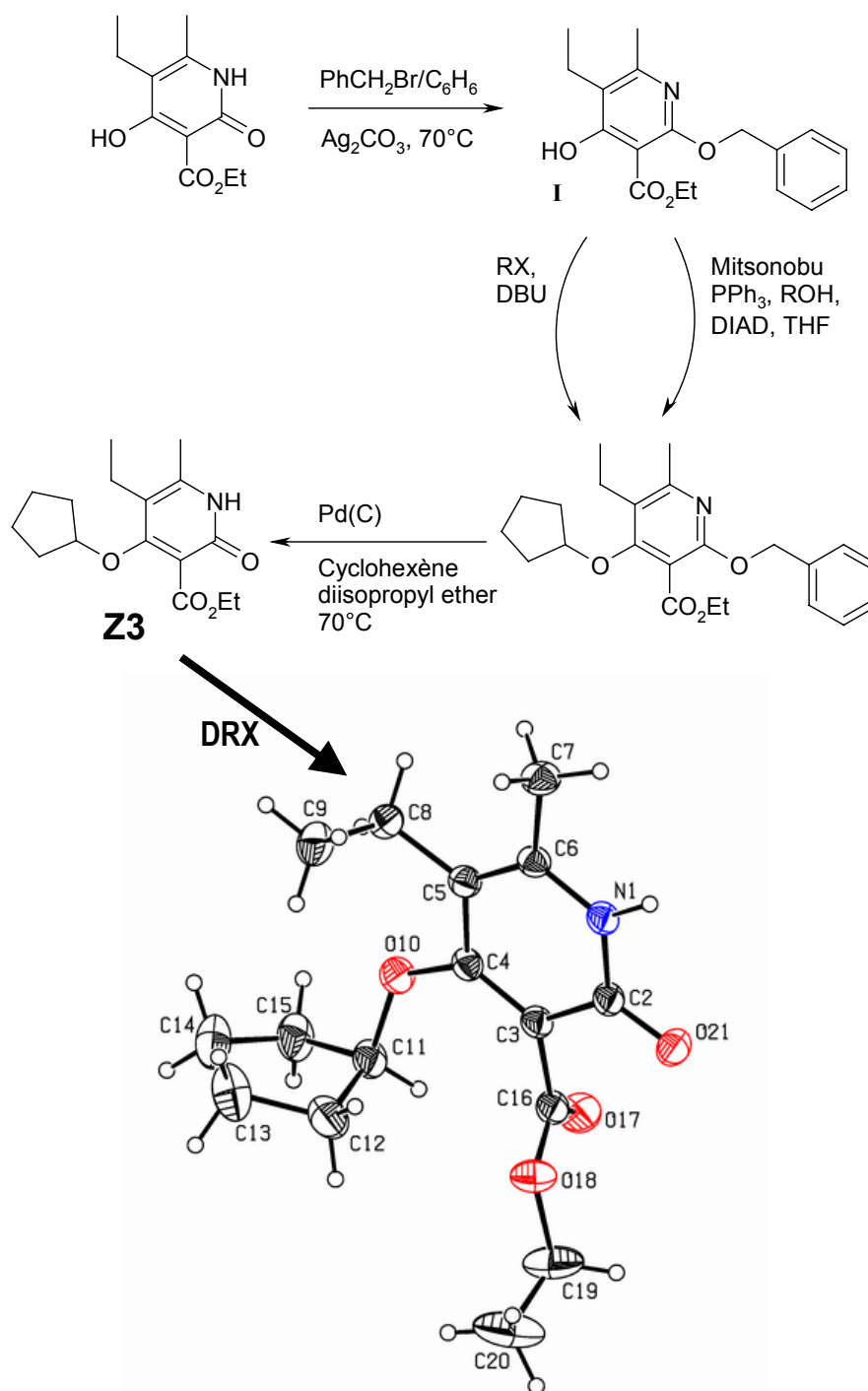


Figure 26 : La greffe d'un groupement protecteur sur le composé B0 permet l'obtention de la pyridinone Z3, grâce à une réaction d'alkylation

Le Z3 répond bien aux suggestions formulées suite à l'étude des composés de la série E. Le **groupe 5-éthyle**, qui fait partie intégrante du pharmacophore butterfly, a été conservé, tout comme la **fonction NH**. La fonction 4-hydroxy polaire a été remplacée par un **cycle saturé**, hydrophobe. La molécule possède un groupement ester mais ceci ne l'empêche en rien de prendre une conformation compatible avec le pharmacophore butterfly, contrairement à ce qui avait été observé dans le cas de la série E. Il n'est dès lors pas étonnant que les simulations de *docking* qui ont été réalisées indiquent que le Z3 est en mesure de s'insérer dans le site allostérique de la TI selon le mode de liaison adopté par les **pyridinones Curie** et d'y réaliser des interactions favorables (figure 27). La conformation adoptée par le Z3 est alors très proche de celle observée lors de l'étude de ce composé par diffraction de rayons X. Tout comme le M18, le Z3 forme un **pont hydrogène** avec le carbonyle du résidu Lys101. Le **groupe cyclopentyloxy** de la molécule occupe une part importante de la zone hydrophobe du site de liaison. La valeur d'**affinité corrigée** attribuée au Z3 à l'issue de ces simulations est de **23.08 kCal/mole**, ce qui est nettement supérieur aux valeurs obtenues pour le M18 ou pour les composés de la série E.

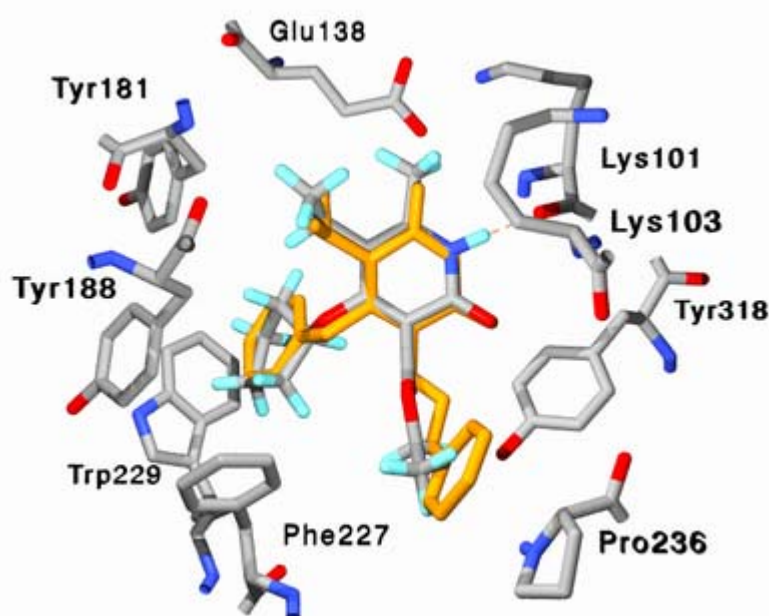


Figure 27 : Le Z3 adopte au sein de la TI un mode de liaison analogue à celui des pyridinones *Curie*
Superposition à un inhibiteur de référence (TNK-651, orange)

Les bons résultats obtenus par le composé Z3 au cours des simulations de *docking* sont confirmés par les tests biologiques. Une concentration de 10 μ M en inhibiteur provoque une **baisse de 42% de l'activité ADN polymérase de la TI**. L'**EC₅₀ du Z3** au cours de tests *ex vivo* est estimée à **1.9 μ M**. Bien que ces activités restent modestes, elles constituent un premier résultat encourageant dans le cadre de la recherche de nouveaux INNTI de type pyridinone. Cette molécule a donc été sélectionnée en tant que **chef de file** (*lead*) pour une optimisation ultérieure.

5.2.5. Conclusion

L'analyse par **diffraction de rayons X** de plusieurs dérivés de la molécule B0 a permis d'aider les chimistes organiciens du laboratoire CMO dans la recherche des méthodes les plus appropriées pour la production de 2-pyridinones substituées en position 4. Les produits de réaction issus des différentes voies de synthèse ont été étudiés à l'aide des outils de modélisation moléculaire. A l'issue de ces recherches, deux types de composés, les **4-oxycarbonyl-pyridinones** et les **4-(cyclo)alkoxypyridinones**, possèdent une activité antivirale exploitable, conformément aux simulations réalisées. L'une de ces molécules, Z3, a été sélectionnée pour une optimisation ultérieure.

5.3. Optimisation des dérivés 4-cycloalkoxy-pyridinone

La synthèse d'analogues des pyridinones *Curie* a permis d'obtenir un premier chef de file, le Z3, doté d'une activité antivirale. La structure de ce composé a été optimisée grâce à une série de variations moléculaires sur les positions 3 et 4 du cycle pyridinone (figure 28).

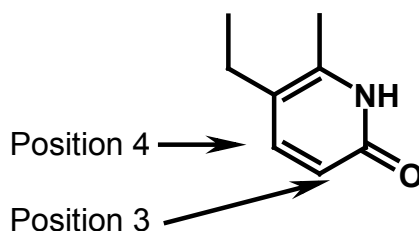


Figure 28 : Positions choisies pour les variations moléculaires sur les composés de la série Z

5.3.1. Optimisation du groupe en position 4

La greffe d'un groupe hydrophobe sur la position 4 du composé B0 s'étant avérée prometteuse, il paraît logique de réaliser une série de **variations moléculaires** sur cette position, en vue d'améliorer les interactions TI-inhibiteur et d'augmenter l'activité antivirale des nouveaux candidats. Plusieurs voies d'optimisation ont été envisagées, dont celles portant sur la **taille du cycle** et sa **substitution**. La greffe de cycles aromatiques ayant déjà été étudiée par les chercheurs de l'institut *Curie*, nous avons volontairement écarté cette possibilité.

5.3.1.1. Taille du cycle

Le groupe **cyclopentyloxy** du dérivé Z3 possède un **volume plus faible** que celui des cycles rencontrés chez d'autres INNTI tels que les pyridinones *Curie* ou les dérivés du HEPT. La plupart de ces inhibiteurs sont en effet caractérisés par des **cycles à six carbones**, souvent substitués. Il est dès lors logique de postuler que le **Z3 n'exploite pas la totalité de l'espace disponible** dans le site de liaison des INNTI, comme cela peut être constaté à la figure 29. Afin d'évaluer l'effet de la taille du cycle sur l'activité antivirale, des dérivés du Z3 portant des cycles saturés comprenant de quatre à neuf carbones ont été modélisés au sein de la TI (figure 30).

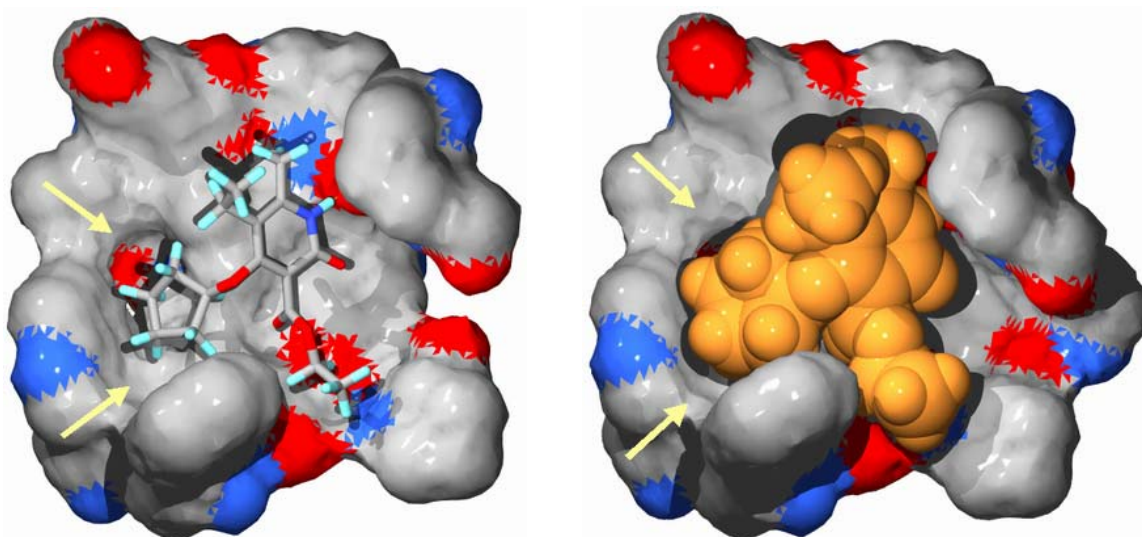


Figure 29 : Le Z3 laisse des espaces vacants au sien du site allostérique de la TI (flèches jaunes)

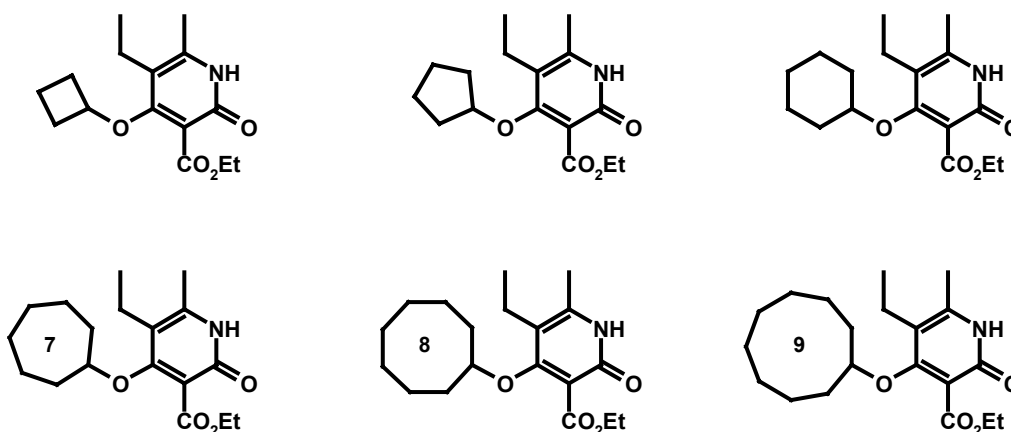


Figure 30 : Composés modélisés pour estimer l'effet de la taille du cycle saturé sur l'activité antivirale

Conformément à nos attentes, les résultats issus de ces simulations (tableau 31) indiquent que le groupe cyclopentyle du composé Z3 gagnerait à être **remplacé par un cycle légèrement plus volumineux**, dont la taille idéale est comprise **entre 6 et 8 carbones**. L'analyse des différents termes qui composent la valeur d'affinité corrigée (figure 32) permet de mieux comprendre cette tendance. On peut d'une part constater que l'**affinité attribuée par Discover** augmente de manière assez régulière avec la **taille du cycle**. Ceci traduit une meilleure occupation du site de liaison par un composé plus volumineux. D'autre part, la pénalité énergétique liée à la **désolvatation du ligand** diminue de manière quasi linéaire lorsque le nombre de carbones du cycle augmente. Cette évolution est logique puisque les cycles greffés augmentent le **caractère hydrophobe** de la molécule. On remarque au passage que la plupart de ces valeurs de désolvatation sont négatives, ce qui indique que ces molécules sont fort lipophiles.

Si l'on s'en tient à ces deux premières contributions, l'affinité des ligands étudiés augmente de manière proportionnelle à la taille du cycle saturé greffé en position 4. Il serait donc favorable de greffer le substituant le plus volumineux possible. Cette évolution est cependant contrée par la pénalité liée à l'**énergie de conformation** des composés étudiés. Celle-ci est relativement **basse pour des cycles de faible volume** et est minimale dans le cas d'un cyclohexyle. Elle **augmente par contre rapidement** dans le cas de groupements plus volumineux, si bien qu'un cycle à neuf carbones ne peut être inséré dans le site de liaison qu'au prix de contraintes prohibitives. Au final, les composés dotés de cycles comprenant entre six et huit carbones

semblent donc constituer une alternative valable au Z3 et représentent le meilleur **compromis** entre l'**occupation** nécessaire du site de liaison et les **contraintes conformationnelles** qui pèsent sur les inhibiteurs.

nbre de C	E docking	Affinité	Désolvat.	E conf	Aff. Corrigée
4	-23.84	23.84	0.16	2.19	21.49
5	-24.82	24.82	-0.12	1.86	23.08
6	-24.98	24.98	-0.42	1.6	23.80
7	-25.59	25.59	-0.54	1.84	24.29
8	-25.76	25.76	-0.74	2.72	23.78
9	-26.34	26.34	-0.87	6.93	20.28

Tableau 31 : Valeurs d'affinité corrigée (en kcal/mole) pour les dérivés du Z3

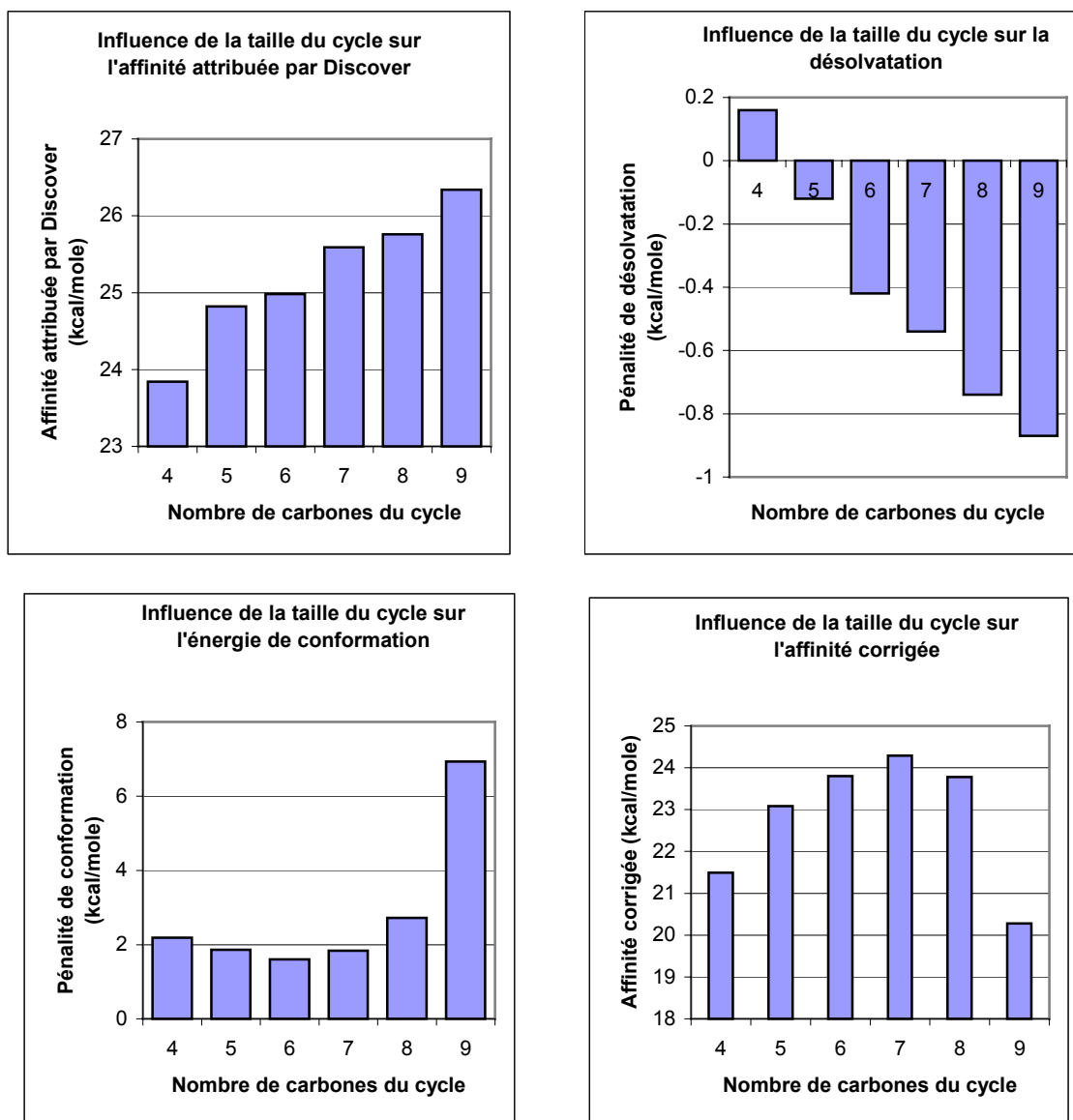


Figure 32 : Evolution des différents termes composant la valeur d'affinité corrigée en fonction de la taille du cycle saturé.

Les données issues de l'évaluation biologique des inhibiteurs sont en bon accord avec ces prédictions (tableau 33 et figure 34). Les molécules Z5, Z25 et Z54, caractérisées respectivement par un cycle à 6, 7 et 8 carbones, possèdent toutes trois une **activité inhibitrice supérieure à celle du Z3**, que ce soit au cours de tests *in vitro* ou *ex vivo*. Les activités des quatre composés synthétisés sont prédites dans l'ordre correct par notre fonction d'affinité, même si la distinction entre Z5 et Z54 est assez faible. Ceci n'est cependant pas étonnant au vu des faibles différences d'activité entre les inhibiteurs testés. On constate également que **les valeurs obtenues *in vitro* et *ex vivo* évoluent de manière similaire** en fonction du composé étudié, ce qui permet de lier de manière univoque le pouvoir antiviral de ces molécules à leur action sur la TI.

nbre de C	Nom	Aff. Corrigée	% act. rés.*	EC ₅₀ (μM)
5	Z3	23.08	58.6	1.9
6	Z5	23.80	44.7	0.77
7	Z25	24.29	34.6	0.48
8	Z54	23.78	ND**	1.35
/	Névirapine	ND	10.8	0.028

* : % d'activité enzymatique résiduelle en présence d'une concentration de 10μM du composé testé
 ** : ND = non déterminé

Tableau 33 : Dérivés du Z3 : Comparaisons des valeurs d'affinité corrigée (en kcal/mole) aux activités biologiques

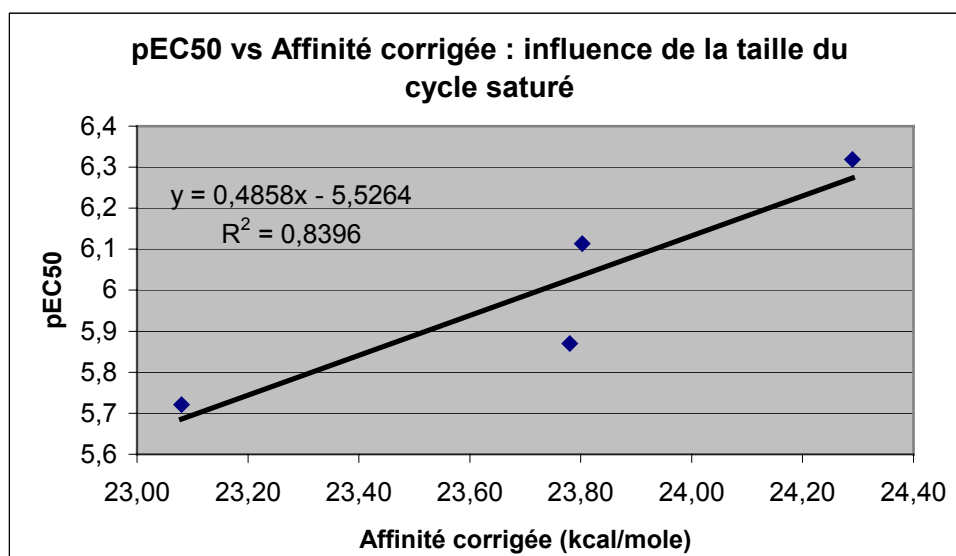


Figure 34 : Dérivés du Z3 : Comparaisons des valeurs d'affinité corrigée aux activités biologiques

5.3.1.2. Substitution du cycle

Même si elle se révèle efficace, l'**augmentation de la taille du groupe cycloalkoxy** n'est que la plus simple des variations moléculaires qui peuvent être réalisées sur le composé Z3. Elle ne mène également qu'à un **nombre très limité de dérivés**. L'introduction de divers substituants sur le cycle en position 4, ouvre par contre plus de possibilités.

Bien qu'attrayante, cette option risque de **compliquer** considérablement la synthèse des inhibiteurs, puisqu'elle entraîne dans de nombreux cas l'apparition de **carbones asymétriques**. Il est alors nécessaire de **séparer les isomères** obtenus et de d'identifier celui qui est le plus susceptible de contribuer à l'inhibition de la TI. Cette dernière opération n'est pas nécessairement triviale. Les relations structure-activité détaillées dans la littérature ne concernent le plus souvent que des composés qui placent un cycle aromatique dans la zone hydrophobe du site de liaison^[6]. Les substituants ajoutés à ce cycle sont donc coplanaires. A l'inverse, les groupements introduits sur des cycles saturés peuvent se trouver soit en position équatoriale, soit en position axiale. L'effet de ce dernier type de variation n'a à ce jour pas été étudié dans le cas des pyridinones.

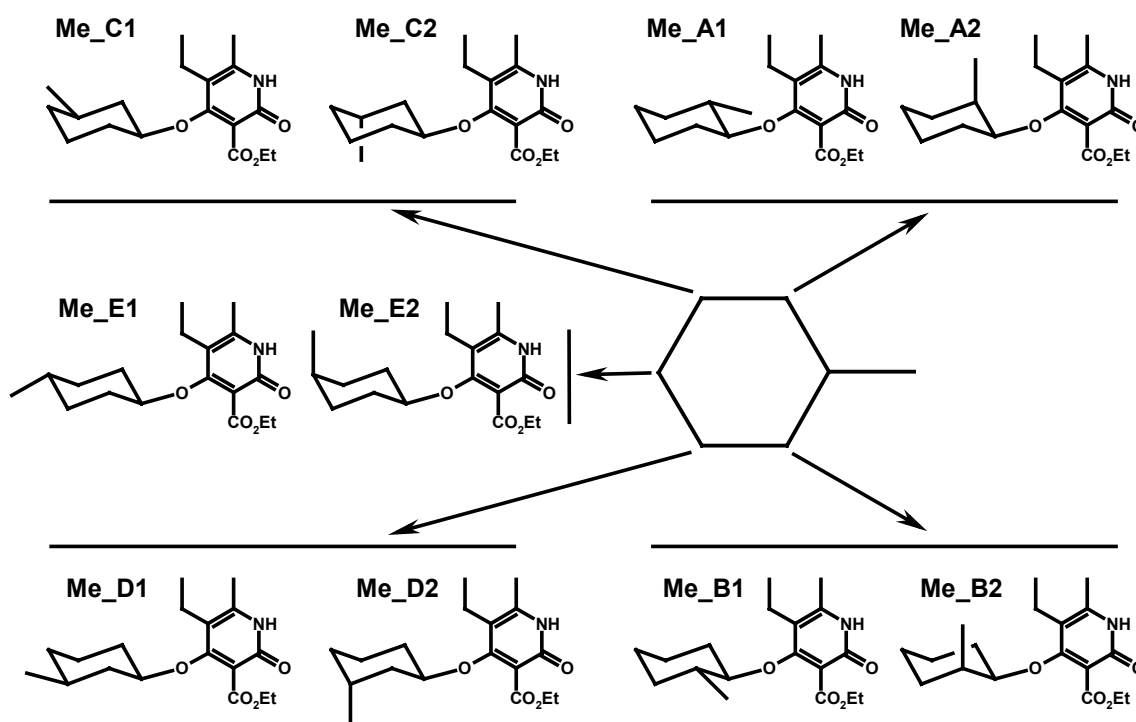


Figure 35 : Dix dérivés du Z5 peuvent être obtenus par introduction d'un groupe méthyle sur le cyclohexyle

Une bonne illustration des problèmes liés à la détermination de la meilleure substitution du groupe cycloalkyle est présentée à la figure 35. On constate que l'**introduction d'un méthyle** en position ortho ou meta du cyclohexyle implique l'existence de quatre diastéréoisomères, tandis que deux isomères seulement sont générés dans le cas d'un groupe méthyle en position para. Au total, ce sont donc pas moins de **dix structures** qui doivent être étudiés individuellement.

La modélisation de ces structures au sein du site allostérique de la TI permet d'estimer la position de greffe la plus favorable (tableau 36 et figure 37). D'une part, un groupement méthyle en **position axiale** tend à **pénaliser l'insertion d'un composé** au sein de la TI. La gêne stérique engendrée au sein du site de liaison contraint en effet l'inhibiteur à adopter une **conformation défavorable**. Ceci est bien illustré par le terme correctif lié à l'énergie de conformation de la molécule, qui est systématiquement plus élevé dans le cas de substituants axiaux. D'autre part, la présence d'un groupe méthyle en position méta permet d'établir de **nouvelles interactions** avec la chaîne latérale de **Trp229**, sans pour autant modifier la position de l'inhibiteur au sein du site de liaison. Au final, les résultats les plus favorables sont ainsi obtenus pour les molécules Me_C1 (24.24 kcal/mole) et Me_D1 (24.30 kcal/mole), qui sont énantiomères. Une préférence est donc donnée à la greffe de groupements méthyle en **position méta et équatoriale**. Une des quatre molécules porteuses d'un substituant en ortho est également caractérisée par une affinité intéressante (23.74 kcal/mole). Il convient cependant de remarquer que toutes ces valeurs ne représentent qu'une faible amélioration par rapport à celle obtenue par la molécule initiale (dérivé non substitué Z5, 23.80 kcal/mole).

Composé	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée
Z5	-24.98	24.98	-0.42	1.60	23.8
Me_A1	-24.15	24.15	-0.63	4.43	20.35
Me_A2	-25.08	25.08	-0.56	5.28	20.36
Me_B1	-25.04	25.04	-0.63	1.94	23.73
Me_B2	-25.04	25.04	-0.56	2.71	22.89
Me_C1	-25.88	25.88	-0.61	2.24	24.25
Me_C2	-25.02	25.02	-0.63	3.94	21.70
Me_D1	-25.66	25.66	-0.61	1.97	24.30
Me_D2	-25.13	25.13	-0.63	4.16	21.61
Me_E1	-24.46	24.46	-0.54	1.95	23.06
Me_E2	-25.29	25.29	-0.39	3.59	22.09

Tableau 36 : Valeurs d'affinité corrigée (en kcal/mole) attribuée aux dérivés du Z5

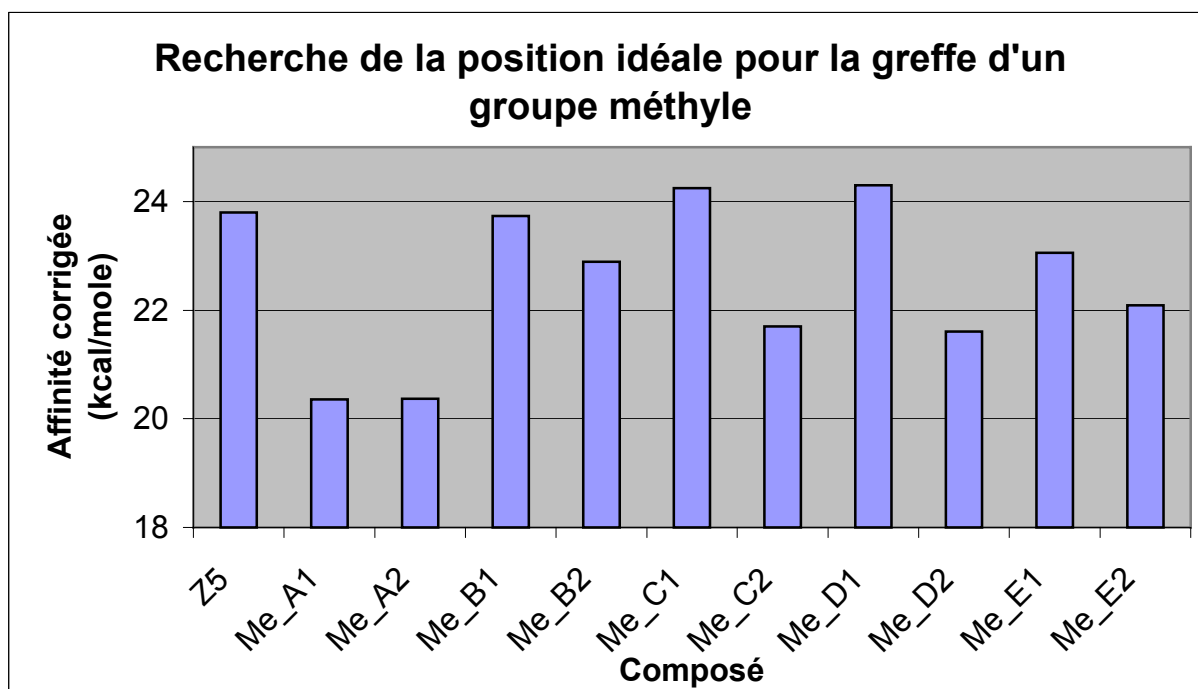


Figure 37 : Valeurs d'affinité corrigée attribuée aux dérivés du Z5

Les indications fournies par ces simulations sont cohérentes vis à vis des données issues de l'évaluation biologique des composés synthétisés. Ainsi, le composé **Z12**, **substitué en ortho** par un chlore, possède une **activité antivirale inférieure** à celle de la molécule de référence Z5. Le **Z30**, doté d'un **groupe méthyle en position méta**, se révèle pour sa part **supérieur au Z5**. Une molécule **Z55**, porteuse d'un **groupe éthyle en position para**, a également été obtenue par les chimistes organiciens du laboratoire CMO. La modélisation de ce nouveau dérivé au sein du site allostérique de la TI révèle cependant qu'aucun de ses deux isomères (axial ou équatorial) ne peut être introduit dans le site de liaison lors des simulations de docking. Il n'est donc pas surprenant que le Z55 ne soit qu'un **faible inhibiteur de la TI**. Il faut enfin noter que ces trois molécules ont été synthétisées sous forme d'un **mélange d'isomères en proportions inconnues**, destiné à une première évaluation de leur pouvoir antiviral. Les activités biologiques observées sont donc le résultat des contributions respectives de chaque isomère présent dans le mélange. Ces données sont cependant suffisantes pour orienter la synthèse de nouveaux inhibiteurs vers des dérivés substitués en méta.

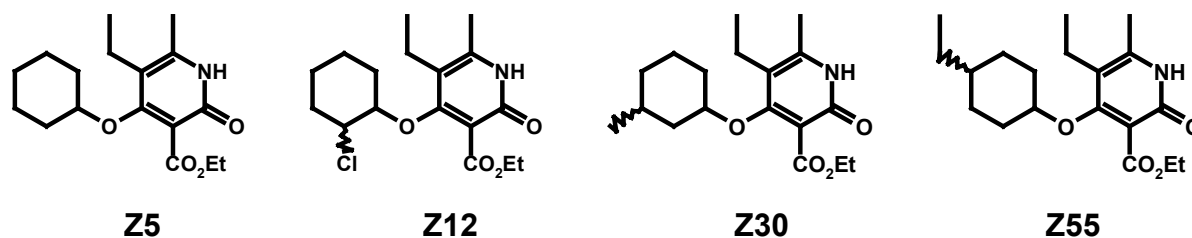


Figure 38 : Quelques dérivés du Z5 synthétisés au laboratoire CMO

Nom	% act. rés.*	EC ₅₀ (μM)
Z5	44.7	0.77
Z12	63.7	3.1
Z30	22.0	0.23
Z55	ND**	6.1
Névirapine	10.8	0.028

* : % d'activité enzymatique résiduelle en présence d'une concentration de 10μM du composé testé
 ** : ND = non déterminé

Figure 39 : Activités biologiques de quelques dérivés du Z5 synthétisés au laboratoire CMO

Parmi les dérivés synthétisés, le Z37 présente un intérêt tout particulier. Ce produit, **substitué par un groupe méthyle sur chaque position méta** du cyclohexyle, a été initialement obtenu sous forme d'un mélange de plusieurs isomères, caractérisé par une **EC₅₀ de 0.043 μM**. A une concentration de 10μM, ce mélange **inhibe *in vitro* 91.8% de l'activité enzymatique** de la TI. Ce composé possédant deux carbones asymétriques, **quatre stéréoisomères** doivent être étudiés. Leurs structures et les relations qui les lient sont représentées à la figure 40. On constate que les formes I et IV sont achirales, suite à la présence d'un plan de symétrie dans leur structure, tandis que les formes II et III sont énantiomères.

Suite à l'activité antivirale très intéressante du mélange Z37, les différents isomères qui le constituent ont été isolés, afin que leur activité respective puisse être quantifiée. Cette séparation est une bonne opportunité de vérifier les prédictions relatives à l'introduction de groupes méthyle sur les positions axiales et équatoriales du cyclohexyle. Les fractions obtenues ont donc été caractérisées par diffraction de rayons X et testées séparément. Parallèlement, les quatre isomères du Z37 ont été modélisés au sein du site de liaison, en vue de rationaliser les résultats biologiques obtenus.

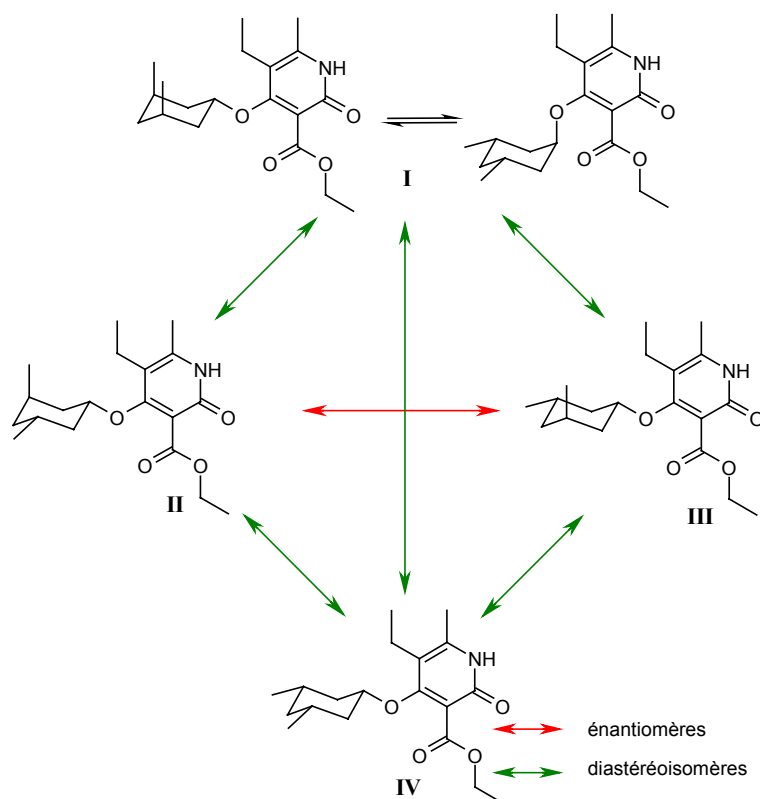


Figure 40 : Isomères du Z37

La **première fraction isolée (Z37A)**, constitue la **majeure partie du mélange Z37** (environ 68%). Des cristaux de Z37A ont été obtenus par évaporation lente d'une solution dans le cyclohexane. Leur étude par diffraction de rayons X a mis en évidence que la structure du Z37A correspond à celle de l'**isomère I** (figure 41a), où la **pyridinone est placée sur la position axiale** du cyclohexyle. Elle ne correspond donc pas à celle habituellement utilisée lors des travaux de modélisation. Une étude de *docking* montre cependant que cette structure n'est pas en mesure d'interagir avec la TI selon le mode de liaison associé aux pyridinones de la série Z (mode *Curie*). Par contre, le conformère plaçant le **cycle pyridinone en position équatoriale**, fournit pour sa part une solution acceptable, illustrée à la figure 41b. On constate que les deux groupes méthyle axiaux sont placés à l'opposé des résidus Tyr181 et Tyr188, de manière à minimiser les conflits stériques. La superposition du cyclohexyle substitué au cycle aromatique du TNK-651 reste cependant approximative. Exception faite de ces points, le mode de liaison du Z37A possède toutes les caractéristiques rencontrées chez les autres composés de la série Z.

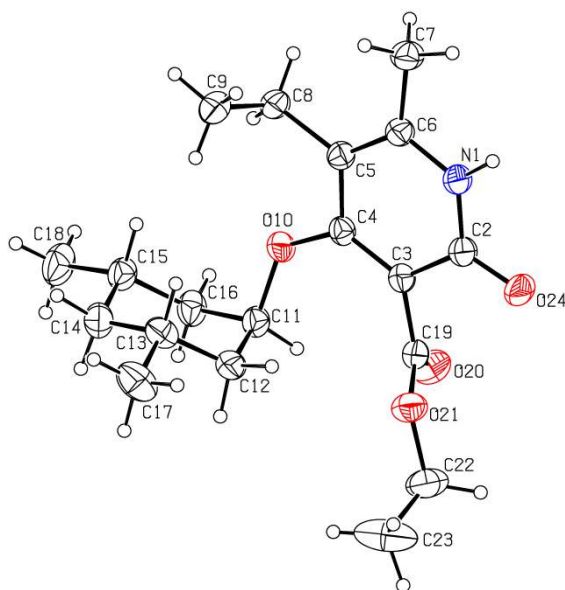


Figure 41a : Structure cristallographique de la pyridinone Z37A (isomère I), dans laquelle le cycle pyridinone est placé en position axiale du cyclohexyle.

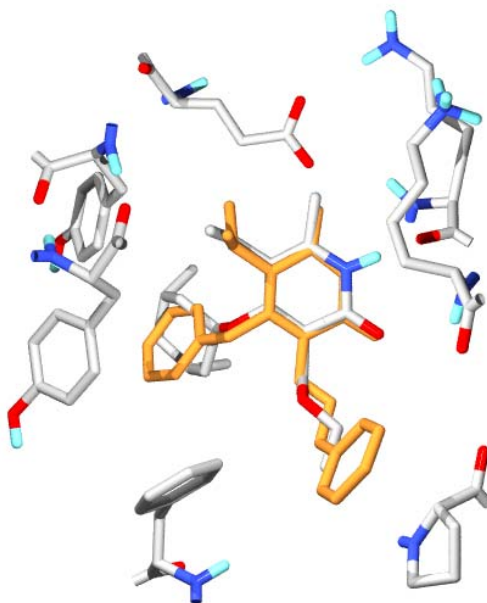


Figure 41b : Mode de liaison proposé pour la pyridinone Z37A. La pyridinone est considérée comme étant en position équatoriale du cyclohexyle

La **deuxième fraction isolée (Z37inv)** est le constituant **minoritaire** du mélange (environ 5%). L'étude par diffraction de rayons X de cristaux obtenus par évaporation lente d'une solution dans l'isooctane indique que la structure de Z37inv (figure 42) correspond à celle de l'**isomère IV**. Les trois substituants du cyclohexyle (groupes méthyle et pyridinone) sont cette fois placés en **position équatoriale**. Conformément à nos attentes, la modélisation du Z37inv au sein du

site de liaison indique que ce composé peut se lier à la TI selon le mode d'interaction habituellement attribué aux pyridinones de la série Z (figure 42). La figure 43 montre également que le groupement 3,5-diméthylcyclohexyloxy permet d'occuper de manière optimale la zone hydrophobe du site de liaison.

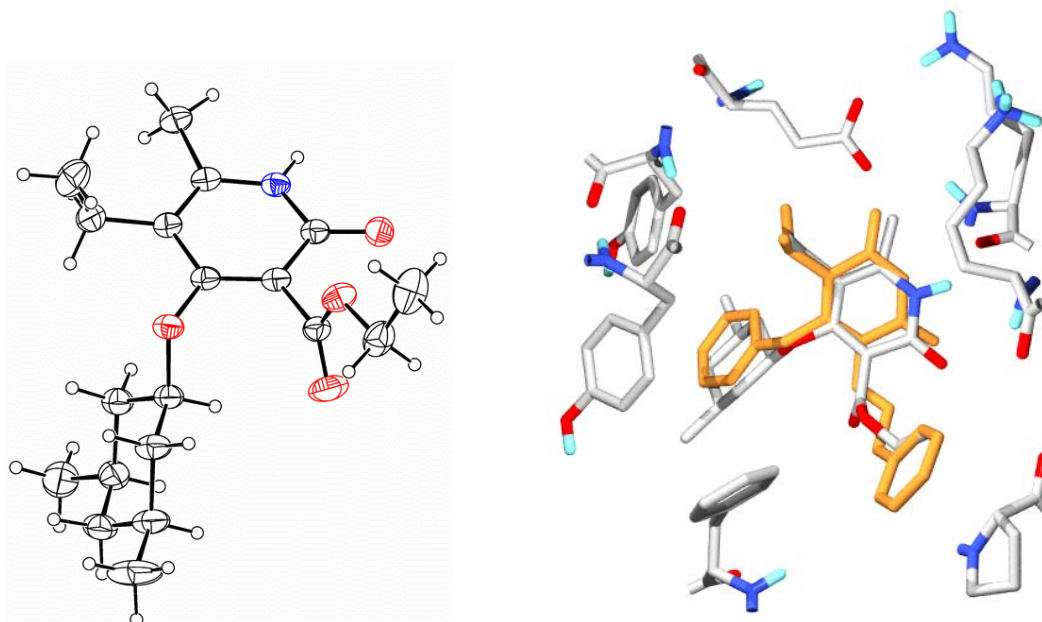


Figure 42 : Structure cristallographique de la pyridinone Z37inv (isomère IV) et mode de liaison de ce composé au sein du site allostérique de la TI

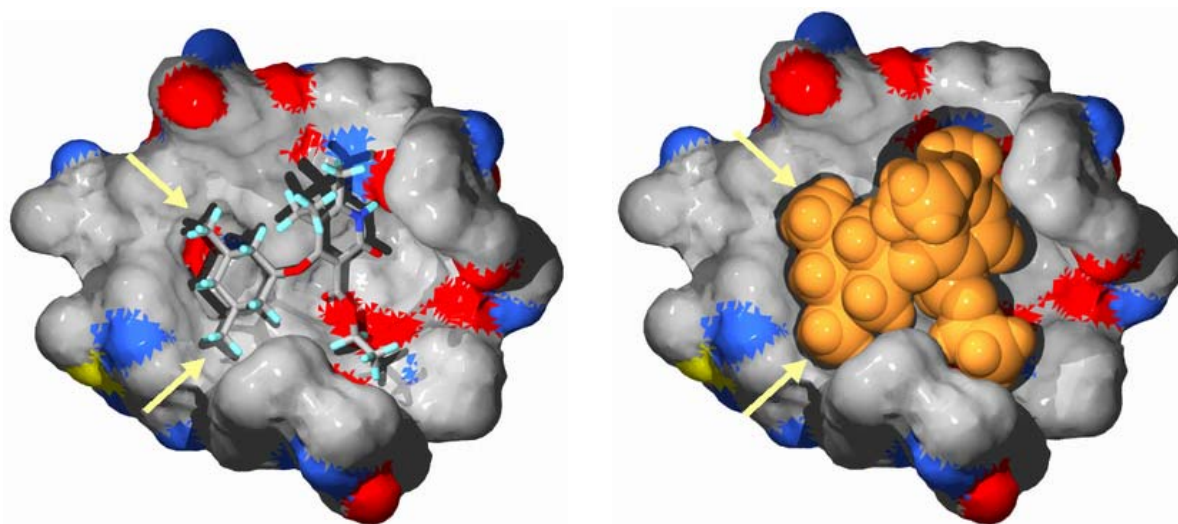


Figure 43 : Le Z37 inv occupe de manière optimale le site allostérique de la TI

Une **troisième fraction du mélange (Z37B)** a été isolée. Elle n'a pu être caractérisée par diffraction de rayons X, mais contient probablement les deux derniers isomères (II et III) du

composé Z37, en **proportions inconnues**. La séparation des constituants de cette fraction n'a pu être réalisée, malgré l'utilisation d'une colonne de chromatographie chirale.

L'examen des valeurs d'affinité attribuées aux quatre isomères du Z37 (tableau 44) permet de formuler une **prédiction** quant à leur activité antivirale respective. Ainsi, le composé **Z37A** apparaît comme étant l'inhibiteur **le moins efficace** de cette série, tandis que le **Z37inv** possède le profil **le plus favorable**. A nouveau, on constate que les corrections apportées aux valeurs d'affinité jouent un rôle déterminant dans le classement établi. Les isomères possédant des groupes méthyle axiaux sont ainsi largement pénalisés par un terme d'énergie de conformation défavorable.

Composé	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée
Z37A (I)	-25.40	25.40	-0.66	5.63	20.43
Z37B (II)	-25.80	25.80	-0.61	2.72	23.69
Z37B (III)	-25.21	25.21	-0.61	3.15	22.67
Z37inv (IV)	-25.10	25.10	-0.63	1.79	23.94

Tableau 44 : Valeurs d'affinité (kcal/mole) attribuées aux quatre isomères du Z37

Les valeurs d'activité biologique attribuées aux isomères suite à leur évaluation *in vitro* et *ex vivo* sont en **assez bon accord avec les prédictions théoriques** (tableau 45), tout au moins en ce qui concerne l'efficacité relative des inhibiteurs. Les deux types de mesures suivent la même tendance et indiquent que le composé **Z37inv est le plus efficace des quatre isomères et possède une activité antivirale équivalente à celle de la Névirapine**, tandis que le Z37A est le plus faible. La fraction Z37B possède pour sa part des propriétés intermédiaires.

Composé	Affinité corrigée (kCal/mole)	% Act. TI résid. (à 10 μ M)	% Act. TI résid. (à 1 μ M)	EC50 (μ M)
Z37 (mélange)	ND	8.2	29.8	0.043
Z37A (I)	20.43	11.7	ND	0.24
Z37B (II)	23.69	8.0	56.4	0.085
Z37B (III)	22.67			
Z37inv (IV)	23.94	7.8	22.1	0.022
Névirapine	ND	10.8	ND	0.028

Tableau 45 : Isomères du Z37 : Comparaison des valeurs d'affinité (kcal/mole) aux activités biologiques

Quelques **nuances** doivent cependant être apportées à ces résultats. D'une part, le composé Z37A possède une valeur d'affinité excessivement basse au regard des différences d'activité assez faibles qui existent entre les isomères. Il convient ensuite de remarquer que les propriétés antivirales accordées au Z37B sont la conséquence de la présence des deux isomères (II et III), en proportions inconnues. Il est cependant possible que l'un des deux constituants de cette fraction soit plus efficace que l'autre, comme semblent l'indiquer les résultats théoriques. Enfin, la valeur d'affinité qui caractérise Z37inv, le composé le plus puissant, n'est que légèrement supérieure à celle qui avait été attribuée au Z5 et est même inférieure à celle du Z30. Le processus de modélisation employé semble donc **sous-estimer l'effet de l'introduction de groupes méthyle** sur l'activité antivirale des dérivés pyridinone.

En dépit de ces remarques, nos résultats sont particulièrement intéressants dans le cadre de la conception de nouveaux INNTI. D'une part, le procédé de modélisation employé a permis d'identifier plusieurs molécules dotées d'une **activité antivirale exploitable** et de **rationaliser** les données biologiques obtenues. D'autre part, le composé le plus prometteur à l'issue de cette première série de variations moléculaires (Z37inv) est **achiral**, ce qui permet d'éviter les complications liées à la séparation et à l'évaluation de molécules énantiomères. Par conséquent, le fragment **3,5-diméthylcyclohexyloxy** qui caractérise le Z37inv peut être considéré comme le **groupement de référence** en position 4 du cycle pyridinone.

5.3.2. Optimisation du groupe en position 3

Parallèlement aux travaux de modélisation moléculaire visant à l'optimisation du groupe présent en position 4 du cycle pyridinone, nous avons cherché à prédire l'effet d'une **modification de la chaîne latérale** placée en position 3 sur l'activité antivirale d'un inhibiteur. La plupart des dérivés de la série Z initialement synthétisés possèdent en effet un **groupe ester**, hérité du composé à la base de leur synthèse, le B0. Il est cependant probable, que ce groupement ne constitue pas la meilleure solution en vue d'une activité antivirale optimale.

Selon le modèle d'interaction retenu pour les composés de la série Z (mode *Curie*), la **chaîne latérale** greffée en position 3 du cycle pyridinone se loge dans la **zone flexible** du site de

liaison, à proximité du résidu **Pro236**. Comme expliqué lors de l'étude théorique des inhibiteurs issus des séries *Merck* et *Curie*, il est assez difficile de simuler de manière réaliste les effets liés à l'occupation de cette zone par un inhibiteur, suite à la topologie très variable du site de liaison et à sa proximité avec le milieu extérieur (solvant). Même si la précision des prédictions qui peuvent être faites risque d'être limitée par ces contraintes, plusieurs points importants peuvent être rapidement mis en évidence. Ainsi, l'espace situé à proximité du cycle pyridinone conserve un **caractère hydrophobe**. Il est donc **exclu d'y loger un groupement chargé**, qu'il soit cationique ou anionique. La pénalité énergétique liée à la désolvatation de tels composés ne pourrait en effet être compensée par les interactions réalisées au sein du site de liaison. Ce point a été confirmé par l'**absence d'activité antivirale** chez les composés Z19 et Z78 (figure 46), qui sont tous deux ionisés à pH physiologique.

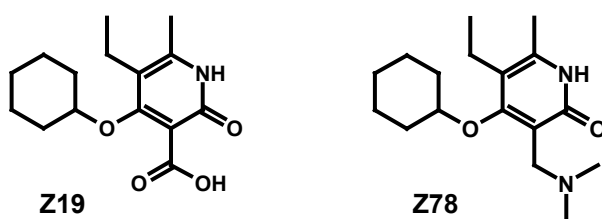


Figure 46 : Structure des composés Z19 et Z78

Le manque d'activité du Z19 a des conséquences importantes sur le développement des composés de la série Z, car il impose l'**abandon du groupe ester en position 3**. En effet, ceux-ci sont connus pour leur **instabilité en milieu physiologique**^[7]. Une fois absorbés par l'organisme, ils peuvent être rapidement dégradés par les estérases, pour restituer l'acide carboxylique correspondant. Il existe donc un risque important que des inhibiteurs tels que Z5 ou Z37 perdent rapidement leur activité antivirale une fois en milieu physiologique. La synthèse de nouvelles molécules doit donc être orientée vers des **dérivés plus stables**, ou tout au moins capables de conserver des propriétés pharmacologiques favorables dans de telles conditions. La réalisation, au laboratoire CMO, d'une réaction de réduction permettant de transformer l'ester en un groupe **hydroxyméthyle** permet de pallier ces difficultés. Un dérivé tel que Z7 peut en effet servir d'intermédiaire dans la synthèse d'**éthers** porteurs d'une large variété de groupements fonctionnels (Z35, Z46, Z69, Z70, Z72,...), de **thioéthers**, ou d'**esters** (Z17, Z26, Z29, Z39...) restituant le Z7 après hydrolyse.

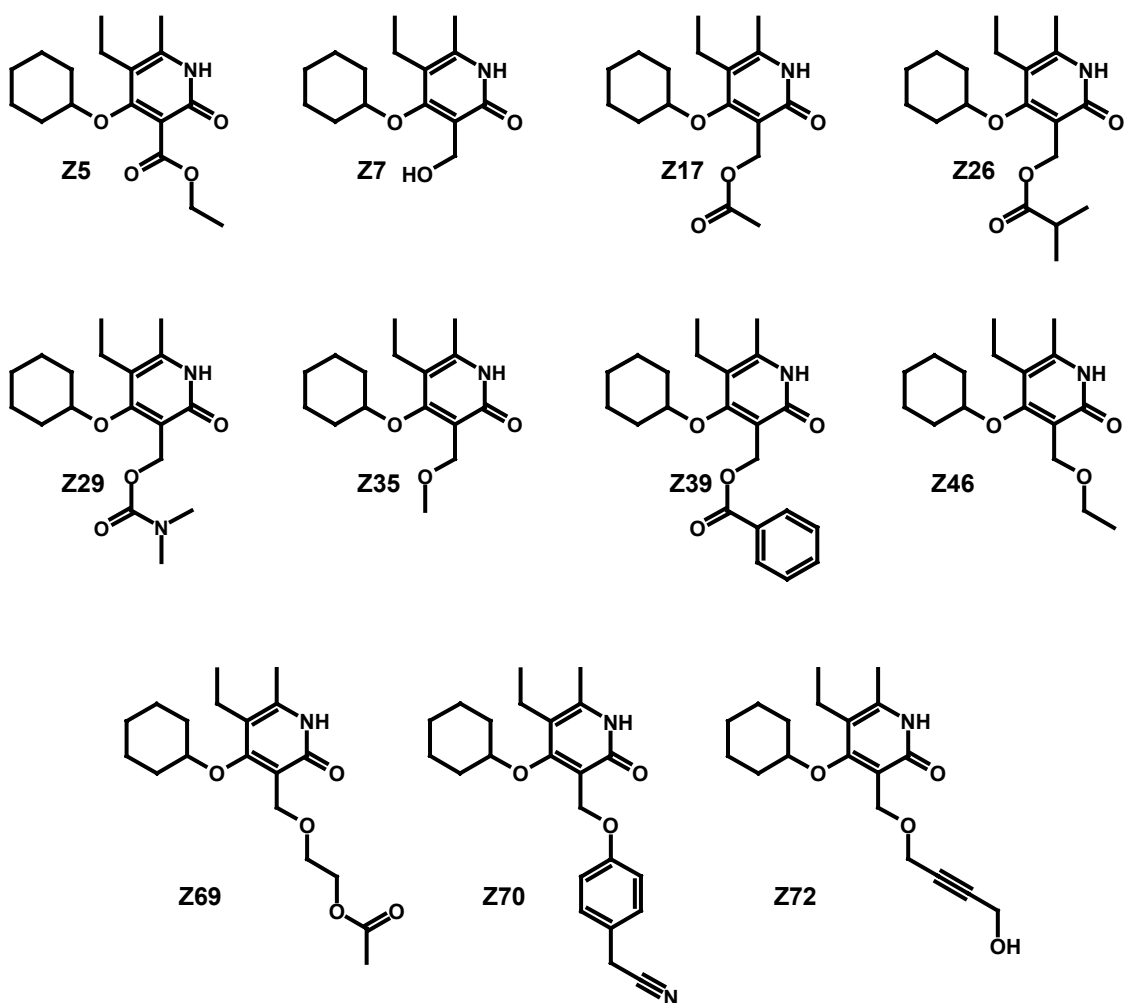


Figure 47 : Composés de la série Z représentatifs des variations moléculaires réalisées en position 3

Les onze dérivés illustrés à la figure 47 ont été modélisés au sein du site allostérique de la TI. L'examen des valeurs d'affinité théoriques obtenues suite à cette procédure (tableau 48 et figure 49) montre que seuls **quatre composés** (Z17, Z29, Z39 et Z46) semblent en mesure d'offrir une **alternative valable** au groupement ester du Z5 (valeur d'affinité corrigée équivalente ou supérieure à celle de Z5). On constate également que le remplacement de cette fonction par une **longue chaîne latérale** n'apporte pas une amélioration systématique de la valeur d'affinité attribuée au composé. De telles molécules sont en effet souvent **affectées par le terme correctif lié à l'énergie de conformation du ligand** (Z69, Z70, Z72). De même, l'introduction de groupements polaires sur la chaîne latérale se solde systématiquement par une hausse de la pénalité de désolvatation, qui explique la faible affinité accordée aux composés tels que Z7, Z70 et Z72.

Composé	E docking	Affinité	désolvat.	E conf	Aff. Corrigée
Z5	-24.98	24.98	-0.42	1.6	23.80
Z7	-21.66	21.66	5.36	1.43	14.87
Z17	-25.23	25.23	-0.71	2.07	23.87
Z26	-26.78	26.78	-0.78	5.27	22.29
Z29	-26.82	26.82	-1.99	3.63	25.18
Z35	-23.70	23.70	-1.16	2.35	22.51
Z39	-30.04	30.04	0.52	3.72	25.80
Z46	-25.00	25.00	-1.56	2.87	23.69
Z69	-29.96	29.96	-1.05	9.67	21.34
Z70	-28.11	28.11	4.28	8.52	15.31
Z72	-29.35	29.35	3.42	7.1	18.83

Tableau 48 : Valeurs d'affinité corrigée (en kcal/mole) attribuées aux dérivés du Z5

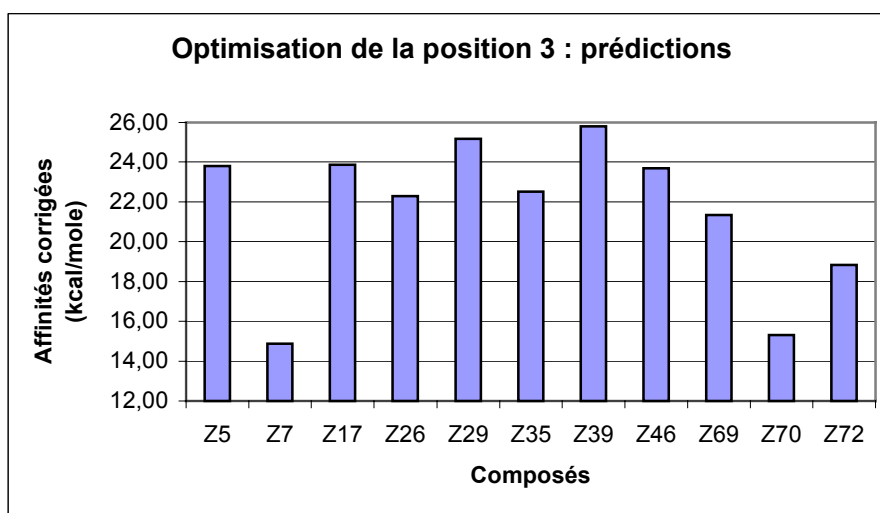


Figure 49 : Valeurs d'affinité corrigée attribuées aux dérivés du Z5

La comparaison de ces prédictions aux données expérimentales (tableau 50) met en évidence plusieurs points intéressants. Tout d'abord, il convient de remarquer la **très bonne activité du Z7**, qui a été **largement sous-évaluée** par le protocole de modélisation employé. Ce dérivé se révèle en effet être le plus puissant de la série étudiée, alors que sa valeur d'affinité théorique est la plus faible. Cette observation est d'autant plus étonnante que l'introduction du groupe hydroxyméthyle sur des analogues du Z5 dotés de cycles saturés à 5 carbones (Z6) ou 7 carbones (Z32) se solde par une baisse du pouvoir antiviral, conformément aux prédictions (figure 51). Il existe donc au niveau de la position 3 du cycle pyridinone un **effet particulièrement subtil**, qui concerne exclusivement les composés porteurs d'un groupement cyclohexyloxy en position 4 et qui n'a pu être reproduit au cours de ces travaux. Il est possible

que cette variation du pouvoir antiviral de la molécule dépende de la présence d'un **groupement donneur d'hydrogène**. En effet, l'activité inhibitrice de dérivés dont la fonction hydroxyméthyle a été alkylée (Z35, Z46) est inférieure à celle du Z7.

Composé	Aff. corrigée (kcal/mole)	% act. Res. (10µM)	EC ₅₀ (µM)
Z5	23.80	44.7	0.77
Z7	14.87	30.0	0.12
Z17	23.87	27.9	0.48
Z26	22.29	28.8	0.63
Z29	25.18	59.6	0.6
Z35	22.51	ND	0.47
Z39	25.80	ND	0.57
Z46	23.69	35.7	0.83
Z68	13.27	ND	ND
Z69	21.34	ND	2.76
Z70	15.31	ND	6.6
Z72	18.83	70.1	1.17

Tableau 50 : Isomères du Z5 : Comparaison des valeurs d'affinité corrigées aux activités biologiques

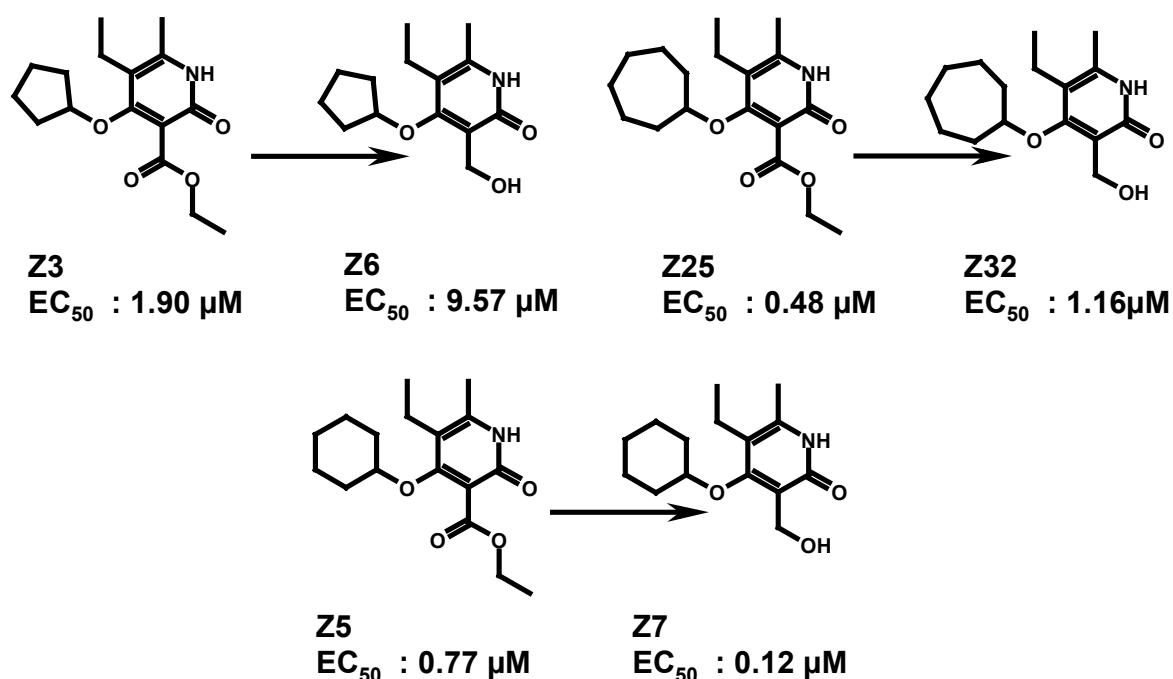


Figure 51 : Si on excepte le Z7, les composés dotés d'un groupement 3-hydroxyméthyle sont généralement moins actifs que les dérivés ester correspondants.

Si on excepte le problème posé par le composé Z7, les prédictions réalisées suite aux travaux de modélisation sont en assez bon accord avec les résultats expérimentaux. La relation entre

les affinités corrigées et les pEC_{50} (figure 52) possède un coefficient de corrélation (0.69) inférieur à celui obtenu avec d'autres séries de composés, mais cependant suffisant pour différencier les composés les plus attractifs de ceux qui ne possèdent qu'une faible activité antivirale. Il est par ailleurs intéressant de constater que la **dépendance du pEC_{50} vis à vis de la valeur d'affinité corrigée** (symbolisée par le coefficient angulaire de la droite de régression) est **beaucoup plus faible que dans le cas des autres séries de pyridinones** étudiées, qu'il s'agisse de composés référencés dans la littérature ou des dérivés de la série Z. Ceci indique que **l'occupation de la zone flexible du site de liaison n'est pas essentielle à l'activité biologique** d'une molécule.

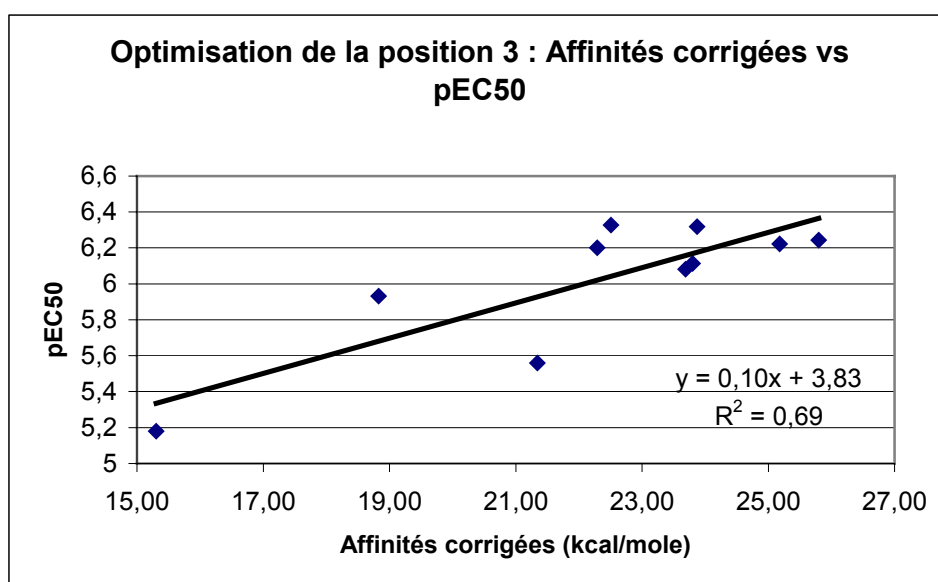


Figure 52 : Dérivés du Z5 : relation entre les valeurs d'affinité corrigée et l'activité biologique

Plusieurs sources d'erreurs pourraient expliquer le relatif manque de précision des résultats obtenus. L'une d'entre elle pourrait être la **diversité des groupements testés**, qui sont beaucoup plus variés que dans le cas de l'optimisation du groupe placé en position 4 du cycle pyridinone.. D'une part, les paramètres du champ de forces *cff91* sont peut-être moins valides pour certains types de groupements que pour d'autres, ce qui pourrait amener quelques erreurs dans le cas des fragments les moins courants (alcynes, nitriles,...).

D'autre part, il est possible que les variations réalisées modifient non seulement **l'activité inhibitrice** des molécules étudiées, mais également **d'autres paramètres biologiques**. Ainsi,

dans le cas le cas d'un test *ex vivo* sur cellules, un nombre important d'**interférences** (passage de la membrane cellulaire, liaison non spécifique à d'autres protéines,...) peuvent compliquer l'analyse des résultats expérimentaux. Pour exemple, les composés **Z26 et Z29, de structure similaire, possèdent une activité antivirale (EC_{50}) équivalente alors que leur activité inhibitrice *in vitro* est largement différente.**

Outre ces considérations sur les outils, théoriques ou expérimentaux, utilisés pour l'étude des inhibiteurs de la série Z, il convient de pointer les limites des outils de modélisation employés. La **proximité du milieu extérieur** (solvant) soulève plusieurs questions quant à la pertinence de la correction de désolvatation qui est appliquée aux valeurs d'affinité. De plus, la modélisation des différents composés au sein de la TI a été réalisée en utilisant une **structure de référence (TI) rigide**, extraite d'un complexe TI-inhibiteur qui contient un ligand très volumineux (TNK-651). L'insertion dans le site de liaison d'un composé de volume plus faible tel que Z35 laisse donc un **large espace vacant** situé au niveau de la **zone flexible** de la TI, alors que dans des conditions réelles la structure de l'enzyme en est mesure de s'adapter à celle de l'inhibiteur. En plus d'entraîner des imprécisions dans le complexe TI-INNTI obtenu, ce facteur tend donc à **favoriser de manière irréaliste les dérivés dotés des chaînes latérales les plus volumineuses**, en leur accordant une valeur d'affinité trop importante.

Enfin, la **flexibilité** de certaines des molécules étudiées est également une source d'erreurs. La liaison de molécules telles que Z69 au site allostérique implique en effet la **perte d'un nombre important de degrés de liberté**. D'un point de vue thermodynamique, ce processus se traduit par une **perte d'entropie**, ce qui pénalise la formation du complexe enzyme-inhibiteur. Aucun terme correctif lié aux variations d'entropie n'a cependant été utilisé dans nos simulations.

Malgré ces limitations, le protocole de modélisation employé se révèle utile dans le cadre de la conception de nouveaux inhibiteurs de type pyridinone. D'une part, il permet de **rationaliser les résultats biologiques relatifs aux composés synthétisés**. D'autre part, il peut être utilisé comme un filtre destiné à fournir une **première évaluation des propositions de synthèse** et à focaliser les efforts de recherche vers les structures les plus prometteuses. Une prise en compte plus rigoureuse de facteurs tels que l'entropie ou la flexibilité du site de liaison devrait à

l'avenir contribuer à améliorer encore le modèle utilisé et donc à affiner les informations qui peuvent en être tirées.

Une optimisation ultérieure des propriétés antivirales des dérivés de la série Z a enfin été réalisée en **combinant les modifications les plus favorables** pour les positions 3 et 4 du cycle pyridinone. Les résultats issus de ces travaux peuvent sans difficulté être mis en parallèle avec ceux obtenus lors de l'étude indépendante de chaque variation. Ainsi, les dérivés dotés du groupement 3,5-diméthylcyclohexyloxy sont systématiquement plus actifs que leurs analogues dotés du simple fragment cyclohexyloxy. De même, les changements d'activité liés aux modifications de la chaîne latérale en position 3 sont similaires pour les dérivés du Z5 et pour ceux du Z37. En d'autres termes, les effets liés aux variations moléculaires réalisées sur les positions 3 et 4 du cycle pyridinone semblent tout à fait **additifs**. Plusieurs molécules obtenues au terme de ce troisième cycle d'optimisation, telles que Z45inv, Z63, Z113 ou Z114* se sont révélées particulièrement attractives (figure 53).

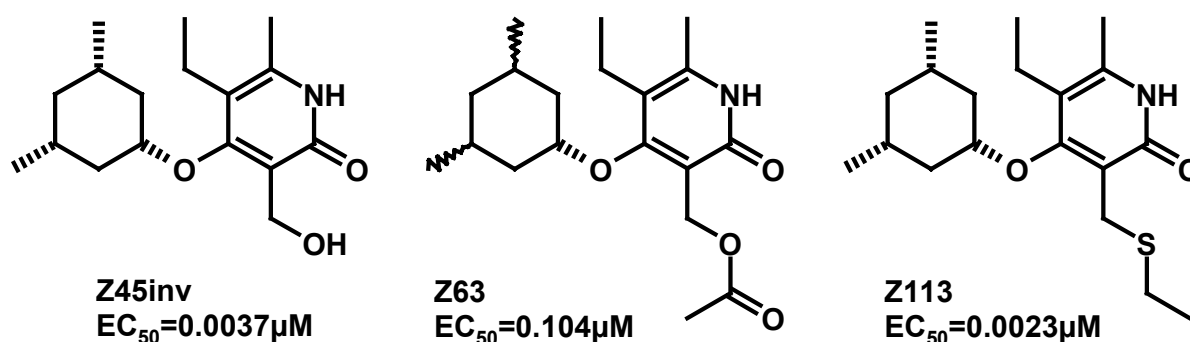


Figure 53 : Molécules issues de la combinaison de variations en position 3 et en position 4.

5.3.3. Conclusion sur l'optimisation des dérivés 4-(cycloalkoxy)pyridinone

L'optimisation de l'activité antivirale des composés de la série Z a été réalisée à partir de la molécule **Z3**, qui constitue notre premier chef de file. Plusieurs **variations**, portant sur les **positions 3 et 4 du cycle pyridinone** ont ainsi été examinées grâce aux outils de modélisation moléculaire.

* Structure non divulguée dans ce manuscrit pour raisons de confidentialité

L'utilisation de la **fonction d'affinité** développée dans le cadre de l'étude des pyridinones déjà décrites dans la littérature (chapitre 4) se révèle à nouveau d'une grande utilité dans ce processus. En effet, elle prédit avec succès la **taille idéale du cycle saturé** à greffer en position 4 de la pyridinone, ainsi que sa **substitution**. Elle permet également d'identifier le composé le plus affin parmi un mélange de plusieurs stéréoisomères. Ces travaux ont notamment débouché sur la molécule **Z37inv**, caractérisée par une **EC₅₀ de 0.022 µM**. Dans le cas des variations moléculaires réalisées sur la chaîne latérale des inhibiteurs (position 3), cette fonction, même si elle présente quelques limitations, s'avère capable de **différencier les composés** les plus puissants de ceux qui ne possèdent qu'une faible activité antivirale.

Au terme de ce processus d'optimisation, la combinaison des deux types de variations moléculaires a permis d'obtenir plusieurs composés tels que le Z45inv ou le Z113, dotés d'une **excellente activité antivirale**, de l'ordre du nanomolaire.

5.4. Activité des composés de la série Z sur les souches mutantes du virus

A l'heure actuelle, la **résistance du VIH aux traitements antirétroviraux** constitue un des principaux soucis des scientifiques chargés de développer de nouveaux médicaments et reste une **source importante d'échecs thérapeutiques** pour les patients contaminés par le virus. Le développement de ce phénomène de résistance est lié à l'émergence rapide de souches mutantes du VIH, moins sensibles aux molécules actuellement prescrites. Un processus de conception rationnelle de nouveaux INNTI se doit donc de prêter attention à l'effet de ces formes mutantes sur le pouvoir antiviral des molécules élaborées.

C'est pour cette raison que le laboratoire de virologie moléculaire de l'ULB a entrepris de déterminer l'activité antivirale des composés de la série Z sur plusieurs souches mutantes du VIH-1, obtenues grâce aux techniques de mutagenèse dirigée. Ces travaux ont pour l'instant permis l'obtention de virus portant dans le gène codant pour la TI les mutations **Lys103Asn**, **Val108Ile**, **Tyr181Cys** et **Tyr188Cys**.

Pour des raisons liées notamment à la production des souches mutantes (obtenues pour la plupart en Septembre 2003) et à la réalisation des tests biologiques, seul l'effet des composés de la série Z sur la souche **Tyr188Cys** a pour l'instant été examiné de manière approfondie. De plus, certaines des valeurs d'EC₅₀ renseignées dans ce manuscrit résultent de tests isolés et doivent encore être reproduites. Dans ces conditions, la suite de cette discussion doit être perçue comme un ensemble de résultats préliminaires et non comme une conclusion définitive.

5.4.1. Relations structure-activité face à la souche Tyr188Cys

L'effet de la mutation Tyr188Cys sur l'activité des composés de la série Z est très variable (tableau 54). Les **facteurs de résistance (FR)**, calculés par comparaison des valeurs d'EC₅₀ sur le virus le plus courant (« *wild type* ») et le virus mutant varient en effet **de plus de 20 à moins de 0.1**. Certains composés perdent donc une grande part de leur pouvoir antiviral face à la souche mutante, tandis que d'autres sont sensiblement plus efficaces. Ceci est particulièrement le cas pour **Z55 et Z73** (figure 55), qui étaient **inactifs face à la souche «wild type»**. On remarque également que le facteur de résistance des inhibiteurs de la série Z est souvent nettement inférieur à celui qui caractérise la Névirapine.

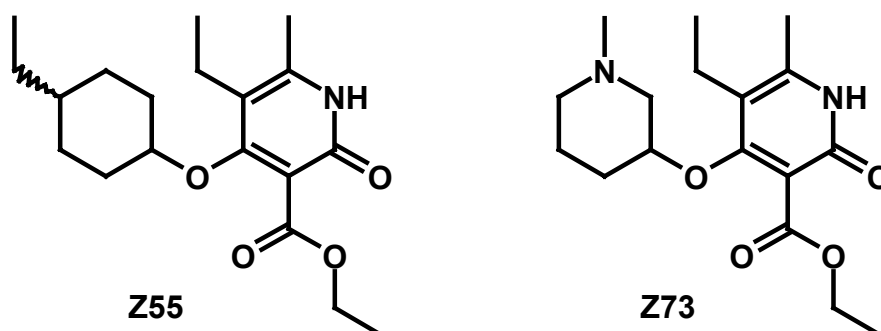


Figure 55 : Structure des composés Z55 et Z73

Une rapide analyse des données expérimentales montre que le comportement d'un composé face au virus mutant Tyr188Cys est en grande partie **fonction du groupement présent en position 4 du cycle pyridinone**. Cette observation est cohérente avec le modèle d'interaction proposé pour les inhibiteurs de la série Z, qui indique que ce fragment de la molécule est **en**

contact avec le résidu muté (figure 56). Ainsi, les composés portant des **cycles non substitués** (à l'exception de Z54) tendent à **perdre leur activité**, tandis que ceux porteurs de **cycles substitués** ne sont que **peu ou pas affectés par la mutation**. L'examen de ces valeurs suggère également que les composés les moins efficaces sur le virus *wild type* sont souvent ceux qui présentent le meilleur facteur de résistance face au virus mutant, ce qui peut paraître paradoxal.

Cycles non substitués				Cycles substitués			
Composé	EC50 WT	EC50 Y188C	FR*	Composé	EC50 WT	EC50 Y188C	FR*
6 carbones				Z30 ⁽¹⁾	0,23	0,11	0,48
Z5 ⁽¹⁾	0,77	6,5	8,43	Z37A ⁽³⁾	0,24	0,039	0,16
Z17 ⁽¹⁾	0,48	>10	>20	Z37B ⁽³⁾	0,085	0,025	0,29
Z39 ⁽¹⁾	0,57	6,3	10,98	Z37inv ⁽³⁾	0,022	0,01	0,45
Z72 ⁽¹⁾	1,17	6,6	5,64	Z45inv ⁽²⁾	0,0037	0,0079	2,14
7 carbones				Z55 ⁽¹⁾	>4	0,41	<0,1
Z25 ⁽¹⁾	0,48	3,3	6,85	Divers			
8 carbones				Z73 ⁽¹⁾	4	0,29	<0,07
Z54 ⁽¹⁾	1,35	0,12	0,09	Z114 ⁽¹⁾	0,00053	0,0051	9,62
				Nevirapine ⁽³⁾	0,028	1,78	63,57

* : FR = Facteurs de résistance ; ⁽¹⁾ : Un seul test d'activité antivirale réalisé ; ⁽²⁾ : Moyenne de deux tests d'activité antivirale ; ⁽³⁾ : Moyenne d'au moins trois tests d'activité antivirale. Valeurs EC₅₀ exprimées en μM

Tableau 54 : Effet de la mutation Tyr188Cys sur l'activité antivirale des inhibiteurs de la série Z.

Le comportement des inhibiteurs de la série Z face au mutant Tyr188Cys peut s'expliquer de **manière qualitative**. Le phénomène de résistance est en temps normal lié à la **perte des interactions** réalisées avec Tyr188 et le facteur de résistance observé dépend donc logiquement de l'apport relatif des résidus Tyr188 ou Cys188 à la stabilisation du complexe TI-INNTI. Ainsi, pour la **Névirapine**, la mutation Tyr188Cys implique la **perte d'une interaction de π -stacking**, très favorable. Le facteur de résistance associé à cette mutation est donc important (67). Les composés de la série Z étant **dépourvus de système π en position 4**, cette même modification du site de liaison entraîne uniquement la perte de contacts hydrophobes, dont la

contribution à la stabilisation du complexe est plus faible. Dans la plupart des cas, le facteur de résistance lié à Tyr188Cys n'excède donc pas 10.

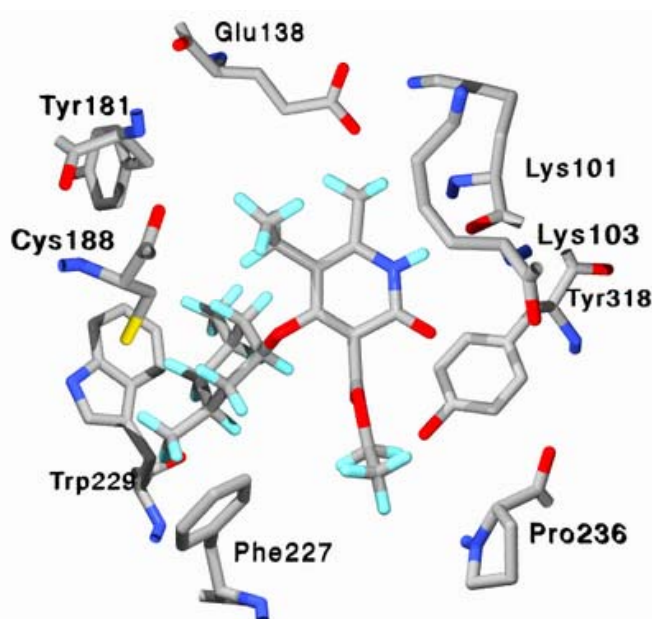


Figure 56 : Le groupement en position 4 du cycle pyridinone (miméthylcyclohexyloxy) est situé à proximité du résidu 188

Un des mécanismes qui permettent à certains composés de la série Z de posséder un facteur de résistance très favorable est de **réaliser avec le résidu Cys188 des interactions qui n'étaient pas possibles avec Tyr188**. Ainsi, la mutation **Tyr188Cys diminue nettement le caractère hydrophobe du site allostérique** et permet la liaison d'espèces très polaires ou même chargées. C'est le cas du composé Z73 (figure 56), pour lequel le groupe placé en position 4 est protonné à pH physiologique. En présence de l'enzyme *wild type*, la formation d'un complexe TI-Z73 est très nettement pénalisée par le coût énergétique lié à la désolvatation du ligand et à son insertion dans un site hydrophobe. Dans le cas de l'enzyme mutée, de fortes interactions sont réalisées avec la chaîne latérale de Cys188, ce qui stabilise nettement le complexe et compense la pénalité de désolvatation.

La molécule Z73 n'est pas la seule à tirer parti des modifications du site allostérique de la TI liées à la mutation Tyr188Cys. Ainsi, Z55 possède également un facteur de résistance inférieur à 0.1. Cette molécule est inactive sur la TI « *wild type* » et ne peut être insérée dans le site allostérique à l'aide des algorithmes de *docking* utilisés dans le cadre de ce travail. Par contre,

une nouvelle étude de *docking* utilisant une structure de la TI portant la mutation Tyr188Cys montre que le **Z55 est en mesure de se lier au site allostérique modifié**, pour peu que le groupe 4-éthyle présent sur le fragment 4-éthyl-cyclohexyloxy soit placé **en position axiale**. L'inhibiteur exploite alors l'espace laissé vacant suite à la mutation Tyr188Cys (figure 57).

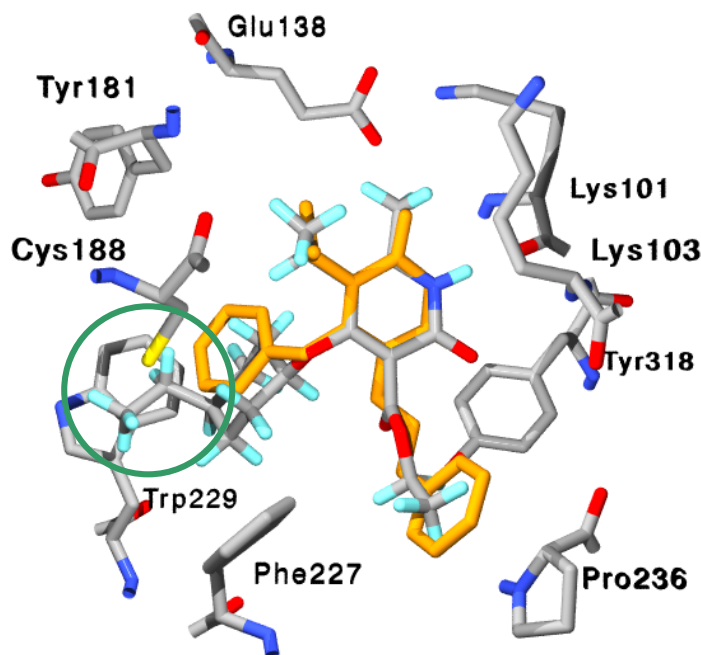


Figure 57 : Mode de liaison de Z55 au sein d'une TI portant la mutation Tyr188Cys

En résumé, le facteur de résistance favorable qui caractérise **Z55 ou Z73** provient surtout du fait que la structure de ces composés ne permet pas d'interactions favorables avec la forme *wild type* de la TI. Ces composés ne présentent donc que **peu d'intérêt** dans le cadre du développement de nouveaux traitements anti-VIH, car leur **spectre d'activité** est vraisemblablement **limité aux souches du VIH-1 porteuses de la mutation Tyr188Cys**. Il est plus important de s'attacher à l'étude et à l'exploitation des mécanismes qui permettent à un composé doté d'une bonne activité sur le virus *wild type* de **conserver son efficacité** face à une souche mutante du virus.

Dans le cas de la série Z, un des ces mécanismes est sans doute lié à l'espace conformationnel accessible à l'inhibiteur, qui peut lui permettre d'occuper de la manière la plus favorable possible le site allostérique d'une transcriptase inverse mutée. Ce rôle joué par la **flexibilité de l'inhibiteur** a déjà été mis en évidence par Hsiou *et al*^[8].

Ainsi, le Z54, caractérisé par un facteur de résistance favorable (0.09) possède un groupe **cyclooctyloxy** et peut adopter des conformations différentes au sein de la TI *wild type* et de la TI mutée (figure 58), afin d'**occuper l'espace laissé libre suite à la disparition du résidu Tyr188**. Pour rappel, la modélisation du Z54 au sein d'une TI Wild type (cf point 4.3.1.1.) a révélé que cette molécule est soumise à de légères contraintes de conformationnelles. La mutation Tyr188Cys, qui tend à augmenter l'espace disponible dans le site allostérique de la TI (remplacement d'une Tyrosine par un résidu moins volumineux) lève en partie ces contraintes et permet au groupe cyclooctyle d'adopter une autre conformation. L'inhibiteur peut donc s'adapter à la topologie du site de liaison muté. Le même type d'observation peut être fait pour les isomères du Z37, où les composés qui étaient initialement les plus contraints au sein de la TI *wild type* (Z37A et, dans une moindre mesure, Z37B) sont également ceux qui présentent les facteurs de résistance les plus favorables face à la mutation Tyr188Cys.

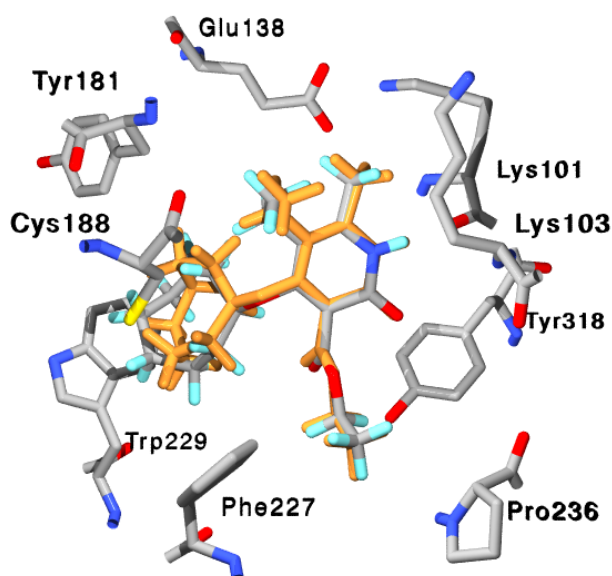


Figure 58 : La conformation du groupe cyclooctyloxy du Z54 est différente dans la TI « *wild type* » (orange) et la TI portant la mutation Tyr188Cys

Parfois, la perte des interactions liées au résidu Tyr188 ne peut être évitée, par exemple suite à la **rigidité** du groupement présent dans la zone hydrophobe du site de liaison. Dans ce cas, la meilleure manière de concevoir un inhibiteur doté d'un facteur de résistance acceptable consiste à **minimiser la contribution de Tyr188 dans la stabilisation du complexe TI-INNTI**. La priorité est alors donnée aux points d'ancrage qui impliquent d'autres résidus, tout

particulièrement si ceux-ci sont bien **conservés**^[9, 10] (Trp229, Tyr318,...). Le rôle qui peut être joué par ces points d'ancrage est ainsi bien illustré par les composés Z37inv et Z45inv qui conservent une puissante activité antivirale face au mutant Tyr188Cys, et possèdent un facteur de résistance nettement plus attractif que celui de la Névirapine.

5.4.2. Activité sur la souche Tyr181Cys

La mutation **Tyr181Cys** est connue pour conférer au VIH-1 une **résistance importante à la plupart des INNTI** (phénomène de résistance croisée). L'obtention récente de cette souche au laboratoire de virologie moléculaire a permis de mesurer l'effet de cette mutation sur certains des composés les plus attractifs de la série Z (tableau 59). Comme dans le cas de la souche Tyr188Cys, ces résultats doivent encore être considérés comme **préliminaires** à l'heure où ce travail est rédigé.

Composé	EC ₅₀ WT	EC ₅₀ Y181C (μM)	FR
Z37inv	0,022	1,97	89
Z45inv	0,0037	0,50	135
Z113	0,0021	0,59	280
Z114	0,00053	0,060	113
Névirapine	0.028	4.8	171

Tableau 59 : Activité de quelques composés de la série Z face à la souche Tyr181Cys

Le **peu de composés testés** n'autorise pas une interprétation de ces données en termes de relations structure-activité et ce d'autant plus que Z37inv, Z45inv ou Z113 positionnent les mêmes groupes fonctionnels à proximité du résidu Cys181. On constate que, la **perte d'activité** antivirale liée à la mutation Tyr181Cys est **nettement plus importante** que dans le cas de Tyr188Cys et est également observée chez la Névirapine. Le composé **Z114 conserve cependant un pouvoir antiviral tout à fait exploitable** (EC₅₀=0.060 μM) face à cette souche mutante. Ces résultats laissent donc espérer la conception de nouveaux inhibiteurs dotés de propriétés plus attractives suite à un processus d'optimisation centré d'avantage sur la variante Tyr181Cys du VIH-1.

5.4.3. Conclusion

A ce jour, l'étude de l'effet des composés de la série Z sur les souches mutantes du VIH s'est limitée aux variantes Tyr188Cys et Tyr181Cys du virus. Les relations structure-activité liées à la souche Tyr188Cys ont pu être expliquées de manière qualitative grâce au modèle d'interaction TI-pyridinone proposé. Plusieurs molécules étudiées possèdent une puissante activité antivirale sur Tyr188Cys. Un dérivé doté d'une activité antivirale exploitable face à la souche Tyr181Cys a également été identifiée au cours de tests préliminaires.

5.5. Prédiction de propriétés pharmacocinétiques

Même si l'**optimisation de l'activité biologique** d'un composé est essentielle au développement d'un nouveau médicament, elle **ne constitue qu'un des multiples aspects** de ce processus. Ainsi, de nombreuses molécules dotées d'une activité antivirale attractive sont régulièrement abandonnées par l'industrie pharmaceutique suite à leurs **propriétés pharmacologiques défavorables**. Parmi ces propriétés figurent les **paramètres ADME-Tox**^[11, 12], relatifs au sort d'un médicament dans l'organisme. Cette appellation regroupe l'**absorption** du composé (biodisponibilité), sa **distribution** dans l'organisme, sa **métabolisation**, son **excrétion** et sa **toxicité**.

L'étude expérimentale des paramètres ADME-Tox d'une série de composés est souvent coûteuse en temps et en équipement et dépasse donc le cadre actuel de ce travail. L'avènement de la chimie combinatoire et des méthodes de *high throughput screening* (criblage de banques de composés à haut débit) au sein de la recherche pharmaceutique a cependant favorisé le développement de **modèles théoriques visant à prédire rapidement ces propriétés**.

5.5.1. Absorption

Diverses **règles** régissant l'**absorption d'un composé par la muqueuse gastro-intestinale** ont été proposées dans la littérature, sur base de **corrélations** entre des **données expérimentales** et certaines **propriétés simples** d'une molécule telles que sa masse moléculaire, son nombre de donneurs et d'accepteurs d'hydrogène dans des ponts H, sa lipophilie (affinité d'une substance pour les graisses, caractérisée par une valeur de log P) ou sa surface polaire accessible (PSA). Parmi les modèles les plus connus, les **critères de Lipinski**^[13] fixent les conditions générales pour une bonne **biodisponibilité**, en tenant compte uniquement du **transport passif** d'un composé (ç-à-d de sa simple diffusion à travers une membrane biologique).

Critères de Lipinski :

- Masse moléculaire (MM) inférieure à 500 (avec un optimum aux environs de 360)
- Nombre de donneurs de ponts H (ND) inférieur à 5
- Nombre d'accepteurs de ponts H (NA) inférieur à 10
- Surface polaire accessible (PSA) inférieure à 140Å²
- Lipophilie (Log P) inférieure à 5 (avec un optimum entre 0 et 3)

Ces paramètres ont dans un premier temps été calculés pour les trois INNTI faisant l'objet d'applications cliniques (Névirapine, Delavirdine et Efavirenz). La PSA et le log P ont été déterminés théoriquement sur base des contributions fragmentales (logiciel *Molinspiration*^[14]).

Les résultats des prédictions théoriques sont repris dans le tableau 60 et indiquent que les **critères de Lipinski** sont **respectés** pour les trois composés, ce qui laisse présager des propriétés d'absorption favorables. Les **études de pharmacocinétique** ont effectivement montré que ces composés présentent une **bonne biodisponibilité** par voie orale^[15]. Les propriétés d'une série de composés étudiés dans le cadre de notre travail ont ensuite été calculées (tableau 60). L'examen des valeurs obtenues indique que **la plupart des inhibiteurs de la série Z répondent aux critères de Lipinski**. Ainsi, pour tous les composés, la masse moléculaire est inférieure à 500, le nombre de donneurs et d'accepteurs de ponts H est

respectivement inférieur à 5 et 10, et la PSA est inférieure à 140Å². Dans la majorité des cas, la lipophilie des inhibiteurs de la série Z dépasse la gamme de valeurs optimales (comprise entre 0.0 et 3.0), mais reste acceptable. Seul le dérivé Z39 présente une valeur de log P qui pourrait nuire à son absorption.

Composé	MM <500	LogP <5	PSA <140Å ²	NA <10	ND <5
Névirapine	266	1.81	63.6	4	1
Delavirdine	453	1.76	110.4	6	3
Efavirenz	316	4.39	38.3	2	1
Z3	293	3,59	68,4	4	1
Z5	307	4,02	68,4	4	1
Z7	265	2,87	62,3	2	2
Z17	307	3,38	68,4	4	1
Z25	321	4,46	68,4	4	1
Z26	335	3,97	68,4	4	1
Z29	337	3,19	71,6	5	1
Z30	321	4,18	68,4	4	1
Z35	293	3,43	51,3	3	1
Z37	335	4,33	68,4	4	1
Z39	351	5,44	68,4	4	1
Z45	293	3,18	62,3	2	2
Z46	307	3,83	51,3	3	1
Z54	335	4,89	68,4	4	1
Z55	335	4,61	68,4	4	1
Z63	335	3,69	68,4	4	1
Z69	351	3,3	77,6	5	1
Z70	380	4,17	75,1	4	1
Z72	333	3,21	71,6	3	2
Z113	324	4,57	42,1	3	1
Z114	***	3.69	59.2	4	1

Tableau 60 : La plupart des composés de la série Z respectent les critères de Lipinski

En conclusion, ces prédictions indiquent que la grande majorité des molécules de la série Z devraient être caractérisées par une bonne biodisponibilité.

5.5.2. Distribution

La capacité d'une molécule à traverser la **barrière hémato-encéphalique** (Blood Brain Barrier, ou BBB) est souvent importante lors du développement d'un nouveau médicament. Ainsi, l'activité d'un composé destiné à agir sur le système nerveux central (SNC) de l'organisme dépend largement de cette propriété^[16]. Dans le cas des médicaments antiviraux tels que ceux utilisés pour traiter l'infection par le VIH, il est important qu'un inhibiteur puisse **supprimer au mieux la réplication virale dans l'ensemble de l'organisme**, y compris dans le système nerveux central, qui peut constituer un réservoir anatomique de virus^[17].

Plusieurs règles relatives au **passage de la barrière hémato-encéphalique** (quantifié par le **logBB**, qui correspond au logarithme du rapport des concentrations dans le fluide cérébro-spinal et dans le plasma) ont été définies dans la littérature. Ces règles, qui impliquent souvent la **lipophilie** d'une molécule^[18] et sa **surface polaire accessible**, sont généralement plus strictes que celles concernant l'absorption par la muqueuse gastro-intestinale. Parmi les différents modèles proposés pour prédire le logBB, celui de **Clark et al**^[19], se base sur des paramètres simples qui peuvent être calculés dans le cadre de nos travaux (logP et PSA) et présente une bonne corrélation entre les données expérimentales et les calculs théoriques ($r^2 = 0.79$). Il a donc été utilisé pour évaluer la capacité des composés étudiés à traverser la BBB, au même titre que deux règles très simples extraites de l'article de **Norinder et Haberlein**^[16]. Rappelons néanmoins que, comme dans le cas de la prédiction de la biodisponibilité, ces modèles ne concernent que le **transport passif** de la molécule, c'est à dire sa diffusion à travers une membrane biologique.

Clark^[19] :

$$\text{LogBB} = -0.0148 \text{ PSA} + 0.152 \log P + 0.139$$

Norinder et Haeberlein^[16] :

- Règle 1 : la PSA doit être inférieure à 70Å²
- Règle 2 : $\text{LogBB} = 0.2[\log P - (N+O)]$
(où N+O = nombre d'atomes d'azote et d'oxygène dans la molécule)

Ces règles indiquent clairement que le passage de la barrière hématoencéphalique est favorisé par des valeurs de logP importantes et une faible surface polaire accessible. **Une augmentation de la lipophilie est donc favorable au passage de la BBB mais nuit à la biodisponibilité. Il convient donc de trouver un équilibre entre ces paramètres.**

Appliquées aux trois INNTI de référence, ces règles indiquent que la **Délavirdine**, à l'inverse des deux autres composés, présente un **log BB très négatif** (-1.23 selon l'équation de Clark et -1.45 selon celle de Norinder et Haeblerlein), qui correspond à un rapport de concentration cérébrospinale/concentration plasmatique de 0.06. Ces valeurs théoriques sont en **accord avec les données expérimentales** qui montrent que la délavirdine ne traverse pas la barrière hématoencéphalique^[15]. Les paramètres relatifs aux composés de la série Z ont ensuite été calculés et sont repris au tableau 61.

De manière générale, les prédictions issues des trois modèles sont en bon accord et semblent encourageantes. Il est en effet intéressant de constater que **la plupart des composés de la série Z étudiés dans le cadre de ce travail présentent un log BB supérieur à la valeur de -0.50 qui caractérise la Névirapine**, ce qui correspond à un rapport concentration cérébrospinale / concentration plasmatique supérieur à 0.30.

Les composés les plus actifs de la série Z, parmi lesquels **Z37, Z45, Z113 et Z114***, présentent tous des rapports de concentration cérébrospinale/concentration plasmatique **supérieurs à 0.5, indicatifs d'un bon passage de la BBB**. Ces deux derniers composés représentent avec Z35 et Z46 les **meilleurs compromis** entre passage de la BBB et biodisponibilité, en associant une valeur de logBB très favorable et une lipophilie acceptable.

* Structure du Z114 non divulguée, pour des raisons de confidentialité

Composé	logP	PSA (Å²)	log BB (Clark)	C _{BB} /C _P (Clark)	Règle1 (N&H)	log BB (N&H)
Névirapine	1.81	63.6	-0,53	0,30	OK	-0,64
Delavirdine	1.76	110.4	-1,23	0,06	NON	-1,45
Efavirenz	4.39	38.3	0,24	1,74	OK	0,28
Z3	3,59	68,4	-0,33	0,47	OK	-0,28
Z5	4,02	68,4	-0,26	0,55	OK	-0,20
Z7	2,87	62,3	-0,35	0,45	OK	-0,23
Z17	3,38	68,4	-0,36	0,44	OK	-0,32
Z25	4,46	68,4	-0,20	0,64	OK	-0,11
Z26	3,97	68,4	-0,27	0,54	OK	-0,21
Z29	3,19	71,6	-0,44	0,37	NON	-0,56
Z30	4,18	68,4	-0,24	0,58	OK	-0,16
Z35	3,43	51,3	-0,10	0,80	OK	-0,11
Z37	4,33	68,4	-0,22	0,61	OK	-0,13
Z39	5,44	68,4	-0,05	0,90	OK	0,09
Z45	3,18	62,3	-0,30	0,50	OK	-0,16
Z46	3,83	51,3	-0,04	0,92	OK	-0,03
Z54	4,89	68,4	-0,13	0,74	OK	-0,02
Z55	4,61	68,4	-0,17	0,67	OK	-0,08
Z63	3,69	68,4	-0,31	0,49	OK	-0,26
Z69	3,3	77,6	-0,51	0,31	NON	-0,54
Z70	4,17	75,1	-0,34	0,46	NON	-0,17
Z72	3,21	71,6	-0,43	0,37	NON	-0,36
Z113	4,57	42,1	0,16	1,46	OK	0,25
Z114	3.69	59.2	-0.18	0.67	OK	-0.06

C_{BB}/C_P : rapport entre les concentrations en composé dans le fluide cérébrospinal et les concentrations Plasmatiques, calculé grâce à l'équation de Clark

Tableau 61 : Prédiction des valeurs de logBB : Un nombre important de composés de la série Z devraient être en mesure de traverser la barrière hématoencéphalique.

5.5.3. Cytotoxicité et indice de sélectivité

Même si elle ne peut évidemment se substituer à une étude pharmacologique et toxicologique rigoureuse, la mesure de la **cytotoxicité** d'un composé est souvent utilisée pour fournir une première estimation de la sélectivité d'un composé. Le rapport CC₅₀/EC₅₀ (concentration cytotoxique pour 50% des cellules / concentration supprimant de moitié la réplication virale)

permet de définir un **indice de sélectivité (IS)**, également appelé indice thérapeutique. Dans le cadre de ce projet, les valeurs de CC_{50} qui caractérisent chaque composé ont été mesurées parallèlement aux valeurs d' EC_{50} , par l'équipe du laboratoire de virologie moléculaire. L'ensemble de ces données et les indices de sélectivité correspondants sont récapitulés dans le tableau 62.

Composé	EC_{50} (μ M)	CC_{50} (μ M)	IS
Z3	1,9	>100	>53
Z5	0,77	>100	>130
Z7	0,12	>100	>830
Z17	0,48	87	181
Z25	0,48	65	135
Z26	0,63	>100	159
Z29	0,6	87	145
Z30	0,23	>100	>434
Z35	0,47	>100	>213
Z37	0,022	64	2900
Z39	0,57	>100	>175
Z45	0,0037	76	20500
Z46	0,83	nd	ND
Z54	1,4	57	41
Z55	6,1	58	9,5
Z63	0,1	>100	>1000
Z69	2,7	>100	>37
Z70	6,6	nd	ND
Z72	1,2	>100	>83
Z113	0,0021	46	21900
Z114	0,00053	15,5	29250
Z114 (Y181C)	0.060	15.5	258
Nevirapine	0,028	>100	>3570

Tableau 62 : Cytotoxicité (CC_{50}) et indice de sélectivité des inhibiteurs étudiés dans le cadre de ce travail.

L'examen de ces valeurs indique que les molécules les plus actives contre le VIH-1 sont légèrement cytotoxiques. Cependant, leur seuil de toxicité est très nettement supérieur aux concentrations auxquelles elles exercent leur pouvoir antiviral. Par conséquent, **les molécules les plus efficaces de la série Z sont aussi celles dotées du meilleur indice de sélectivité**. On constate également que la valeur de CC_{50} associée au Z114* est suffisamment élevée pour

* Structure du Z114 non divulguée, pour des raisons de confidentialité

conserver un indice de sélectivité acceptable (258) face à la souche mutante Tyr181Cys du VIH-1.

5.5.4. Conclusion sur la prédiction des propriétés pharmacocinétiques

La prédiction de certaines propriétés pharmacocinétiques des composés de la série Z a globalement fourni des résultats très encourageants dans le cadre de la conception de nouveaux médicaments anti-VIH-1. La plupart de ces molécules semblent en effet caractérisées par une bonne biodisponibilité et devraient être en mesure de traverser la barrière hématoencéphalique. De plus, la faible cytotoxicité de ces composés leur confère un excellent indice de sélectivité.

5.6. Conclusion

Cette seconde partie de notre travail de thèse est consacrée à la **conception rationnelle de nouveaux INNTI**, sur base de la structure de la TI. Le **point de départ** de cette démarche est constitué de **cinq dérivés** du cycle pyridinone présentant plusieurs analogies structurales avec les composés de la série *Merck*. L'étude de ces molécules à l'aide des outils de modélisation moléculaire et des algorithmes de docking démontre cependant qu'elles sont **incapables de se lier au site allostérique de la TI**. Ceci explique leur absence d'activité inhibitrice.

Suite à ces premiers résultats, le projet s'est orienté vers la conception d'**analogues des pyridinones de la série Curie**. La synthèse de ces composés est rendue délicate suite à l'existence de plusieurs **formes tautomères** du cycle pyridinone. Les **voies de synthèse** utilisées ont donc été **validées** grâce à l'étude par diffraction de rayons X des produits qui en sont issus. Ces travaux ont débouché sur une première molécule « **chef de file** », le **Z3**.

Diverses **variations moléculaires** ont été réalisées sur les **positions 3 et 4 du cycle pyridinone**. En dépit de quelques limitations, la **fonction d'affinité** développée au chapitre 4

s'avère d'une grande utilité dans cette démarche, en identifiant à plusieurs reprises les **substituants les plus propices à une bonne activité antivirale**.

Au terme de ce processus de conception rationnelle, nous disposons de **plusieurs inhibiteurs puissants** de la réplication du VIH-1. Certains de ces dérivés sont de plus caractérisés par une bonne activité antivirale face aux souches mutantes Tyr181Cys et Tyr188 et semblent posséder un **profil d'absorption et de distribution** favorable, combiné à une **faible cytotoxicité**.

Bibliographie

1. Gold, H.J., *Molecular orbital studies on bifunctional catalysis of glucose mutarotation. The hydrogen bond with 2-pyridone*. Journal of the American Chemical Society, 1971. **93**(24): p. 6387-6392.
2. Wiberg, K.B., *Application of the Pople-Santry-Segal complete neglect of differential overlap method to the cyclopropyl-carbinyl and cyclobutyl cation and to bicyclobutane*. Tetrahedron, 1968. **24**(3): p. 1083-96.
3. Dolle, V.; E. Fan; C.H. Nguyen; A.-M. Aubertin; A. Kim; M.L. Andreola; G. Jamieson; L. Tarrago-Litvak; E. Bisagni, *A New Series of Pyridinone Derivatives as Potent Non-Nucleoside Human Immunodeficiency Virus Type 1 Specific Reverse Transcriptase Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 1995. **38**(23): p. 4679-86.
4. Ooi, T.; M. Oobatake; G. Nemethy; H.A. Scheraga, *Accessible surface areas as a measure of the thermodynamic parameters of hydration of peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1987. **84**(10): p. 3086-90.
5. Murguly, E.; T.B. Norsten; N. Branda, *Tautomerism of 4-hydroxyterpyridine in the solid, solution and gas phases : an X-ray, FT-IR and NMR study*. J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1999. **2**: p. 2789-2794.
6. Hopkins, A.L.; J. Ren; H. Tanaka; M. Baba; M. Okamoto; D.I. Stuart; D.K. Stammers, *Design of MKC-442 (emivirine) analogues with improved activity against drug-resistant HIV mutants*. Journal of Medicinal Chemistry, 1999. **42**(22): p. 4500-5.
7. Redinbo, M.R.; S. Bencharit; P.M. Potter, *Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery*. Biochemical Society Transactions, 2003. **31**(3): p. 620-624.
8. Hsiou, Y.; K. Das; J. Ding; A.D. Clark; J.-P. Kleim; M. Rösner; I. Winkler; G. Riess; S.H. Hughes; E. Arnold, *Structures of Tyr188Leu mutant and wild type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBY-097 : Inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance*. J. Mol. Biol., 1998. **284**(313-323).
9. Pelemans, H.; R. Esnouf; E. De Clercq; J. Balzarini, *Mutational analysis of Trp-229 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) identifies this amino acid residue as a prime target for the rational design of new non-nucleoside RT inhibitors*. Molecular Pharmacology, 2000. **57**: p. 954-960.
10. Pelemans, H.; R. Esnouf; H. Jonckheere; E. De Clercq; J. Balzarini, *Mutational analysis of Tyr-318 within the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(51): p. 34234-34239.

11. Yu, H.; A. Adedoyin, *ADME-Tox in drug discovery : integration of experimental and computational technologies*. Drug Discovery Today, 2003. **8**(18): p. 852-861.
12. Di, L.; E.H. Kerns, *Pharmaceutical profiling in drug discovery*. Drug Discovery Today, 2003. **8**(7): p. 316-323.
13. Lipinski, C.A.; F. Lombardo; B.W. Dominy; P.J. Feeney, *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **23**: p. 4-25.
14. Molinspiration property calculator, Molinspiration cheminformatics.<http://www.molinspiration.com/services/logp.html>
15. Abu-Ata, O.; J. Slim; G. Perez; S.M. Smith, *HIV Therapeutics : Past, present, and future.*, in *HIV-1 : Molecular biology and pathogenesis*. 2000, Academic Press. p. 1-40.
16. Norinder, U.; M. Haeberlein, *Computational approaches to the prediction of the blood-brain distribution*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**: p. 291-313.
17. Blankson, J.N.; D. Persaud; R.F. Silciano, *The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection*. Annu Rev Med., 2002. **53**: p. 557-593.
18. Ajay, G.W.B.; M.A. Murcko, *Disigning libraries with CNS activity*. J. Med. Chem., 1999. **42**: p. 4942-4951.
19. Clark, D.E., *Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration*. J. Pharm. Sci., 1999. **88**: p. 815-821.

Chapitre 6 : Conclusions et perspectives

*« Lorsque tu ne sais pas où tu vas, regarde d'où tu viens. »
(Proverbe africain)*

Depuis de nombreuses années, le **syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)** constitue un problème de santé majeur, au niveau mondial. On estime ainsi à environ 40 millions le nombre de personnes contaminées par le **Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)**, responsable de cette pathologie. La plupart d'entre elles sont localisées dans les pays en voie de développement et tout particulièrement en Afrique. Il existe deux formes principales du VIH : le VIH-1 et le VIH-2, la première étant de loin la plus courante dans les pays industrialisés.

Depuis sa découverte en 1983, le VIH a fait l'objet d'une multitude de recherches visant à mieux comprendre les **mécanismes** qui régissent sa **transmission** et sa **réplication** et à les enrayer. En l'absence de vaccin efficace, la lutte contre le VIH est principalement basée sur la **prévention de la transmission** du virus et sur le **traitement des patients infectés** à l'aide de **molécules synthétiques** destinées à perturber son cycle de réplication (chimiothérapie). Si la plupart des étapes de ce cycle constituent des cibles d'action potentielles, seules trois d'entre elles ont pour l'instant mené à des applications thérapeutiques concrètes : la **fusion** de la membrane virale et de la membrane cellulaire, la **rétrotranscription** du génome viral par la transcriptase inverse et la **maturation** des virions suite à l'action de la protéase virale.

La **transcriptase inverse du VIH** constitue une cible attractive dans le cadre d'une thérapie antirétrovirale, car elle est **essentielle à la réplication du virus**, alors qu'elle n'intervient dans aucun processus physiologique d'un sujet sain. Elle exerce les activités enzymatiques d'**ADN polymérase** ARN et ADN dépendante et de **ribonucléase H** (RNase H). Deux types d'inhibiteurs de la TI font pour l'instant l'objet d'une utilisation clinique. Les **inhibiteurs nucléosidiques de transcriptase inverse (INTI)** sont des analogues des nucléosides naturels, qui sont les substrats de l'enzyme. En agissant au niveau du site catalytique de la TI en tant que **substrats alternatifs**, ils bloquent la croissance d'une chaîne d'ADN viral, ce qui conduit à

la synthèse d'un brin incomplet et non fonctionnel. Les **inhibiteurs non nucléosidiques de transcriptase inverse (INNTI)** agissent pour leur part au niveau d'un **site allostérique**, localisé à 10Å du site catalytique (figure 1) et spécifique à la TI du VIH-1. En se liant à l'enzyme, ils induisent un changement de conformation qui déforme le site catalytique tout proche et suppriment son activité ADN polymérase.

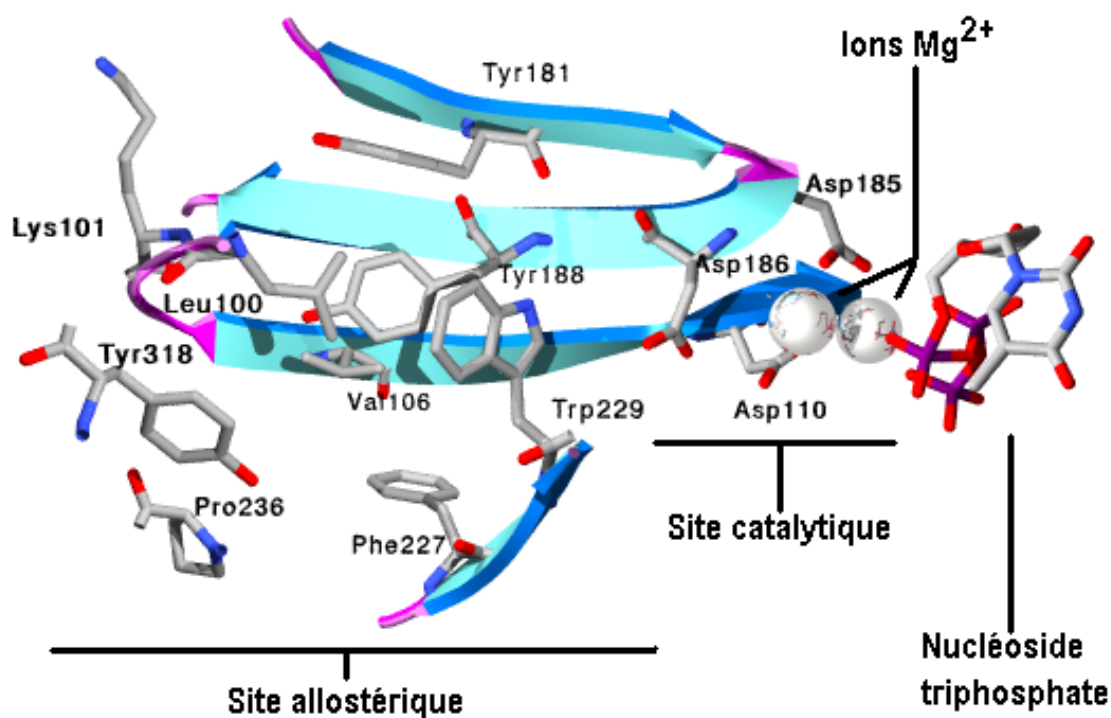


Figure 1 : Site catalytique et site allostérique de la transcriptase inverse du VIH-1

La combinaison de différents types de molécules antivirales a permis l'élaboration de **traitements efficaces** (HAART, pour *Highly Active Antiretroviral Therapy*), qui permettent d'**améliorer nettement l'état de santé des patients** atteints par le VIH et d'**augmenter leur espérance de vie**. En dépit des succès indéniables obtenus, ces thérapies restent **coûteuses, contraignantes et imparfaites**. Elles sont notamment **incapables d'éradiquer le virus** de l'organisme d'un patient infecté et perdent de leur activité face aux **souches mutantes** du VIH. De plus, elles engendrent de nombreux **effets secondaires**. C'est pourquoi le développement de composés plus puissants, plus sélectifs et capables de conserver leur efficacité face aux souches mutantes du VIH reste encore une réelle priorité.

C'est dans cette optique qu'un programme de recherche dédié à la **conception**, la **synthèse** et l'**évaluation** de nouvelles molécules antirétrovirales a été initié conjointement par l'ULB et les FUNDP. Il est le fruit d'une collaboration entre les laboratoires de chimie moléculaire structurale (CMS), de chimie des matériaux organiques (CMO), de virologie moléculaire et le service de génétique appliquée (SGA). Notre travail de thèse, qui s'inscrit dans le cadre de ce projet, vise à la **conception rationnelle de nouveaux INNTI dérivés du cycle 2-pyridinone**, à l'aide des outils de modélisation moléculaire et de diffraction de rayons X.

Malgré la présence d'un nombre important de **structures cristallographiques de la transcriptase inverse** au sein de la banque de données de protéines de Brookhaven (PDB), **aucune structure d'un complexe TI-pyridinone** n'a à ce jour été publiée dans la littérature. La conception de nouveaux dérivés du cycle 2-pyridinone sur base de la topologie du site de liaison des INNTI doit donc se baser sur un **modèle théorique** qui décrit de la manière la plus réaliste possible leur mode de liaison au sein de l'enzyme. Bien que plusieurs **modèles d'interaction** de ce type aient été proposés dans la littérature, la plupart d'entre eux présentent de **sérieuses lacunes** et se révèlent incapables d'expliquer de manière convaincante les relations structure-activité relevées au sein des diverses familles de pyridinones. Ce travail se devait donc de débiter par l'élaboration d'un modèle plus fiable.

Dans un premier temps, la **superposition** de sept inhibiteurs, choisis parmi les complexes TI-INNTI présents dans la banque de données de protéines (PDB), sur base de leur position au sein de la transcriptase inverse, a permis d'identifier une série d'**éléments stéréoelectroniques communs** à l'ensemble de ces molécules : un système π délocalisé, un groupe hydrophobe et un groupe de contrainte stérique

La définition d'un **volume commun** aux sept INNTI montre que ces trois éléments sont disposés dans une **configuration en « ailes de papillon »** qui permet d'occuper les régions du site de liaison essentielles à l'activité de ces composés. La combinaison de ces éléments a permis de construire une version actualisée du pharmacophore « butterfly », proposé en 1993 par Schäfer *et al* (figure 2).

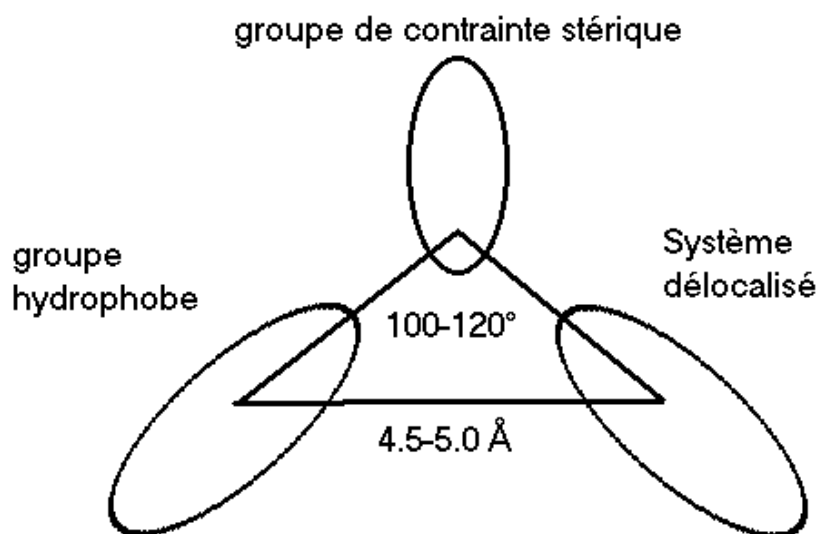


Figure 2 : Version actualisée du pharmacophore « *butterfly* » utilisée dans le cadre de nos travaux

Les **outils de modélisation moléculaire** ont ensuite été utilisés afin d'élaborer un **modèle d'interaction TI-INNTI** pour les trois séries de pyridinones décrites dans la littérature (*Merck, Curie et Janssen*). D'une part, l'**analyse conformationnelle** de ces composés indique qu'ils peuvent aisément adopter une conformation en accord avec le pharmacophore « *butterfly* ». D'autre part, l'utilisation des **algorithmes de docking** permet de proposer deux modes de liaison TI-Pyridinone cohérents vis-à-vis de ce même modèle.

Afin d'identifier l'hypothèse la plus crédible, plus de quarante structures, sélectionnées parmi les trois familles de dérivés, ont été étudiées et évaluées à l'aide d'une **fonction d'affinité** qui tient compte de leur **stabilisation** au sein du site de liaison, de leur **énergie de désolvatation** et de leur **énergie de conformation**. Ces données ont été mises en **corrélation avec l'activité biologique** de chaque composé. Les résultats obtenus permettent dans la majorité des cas de reproduire, parfois avec une très bonne fidélité, les **relations structure-activité**, ce qui atteste de la qualité des modèles proposés. Ils indiquent également que **malgré leurs analogies structurales, les différentes séries de pyridinones n'adoptent pas toutes le même mode de liaison au sein de la TI** (figure 3).

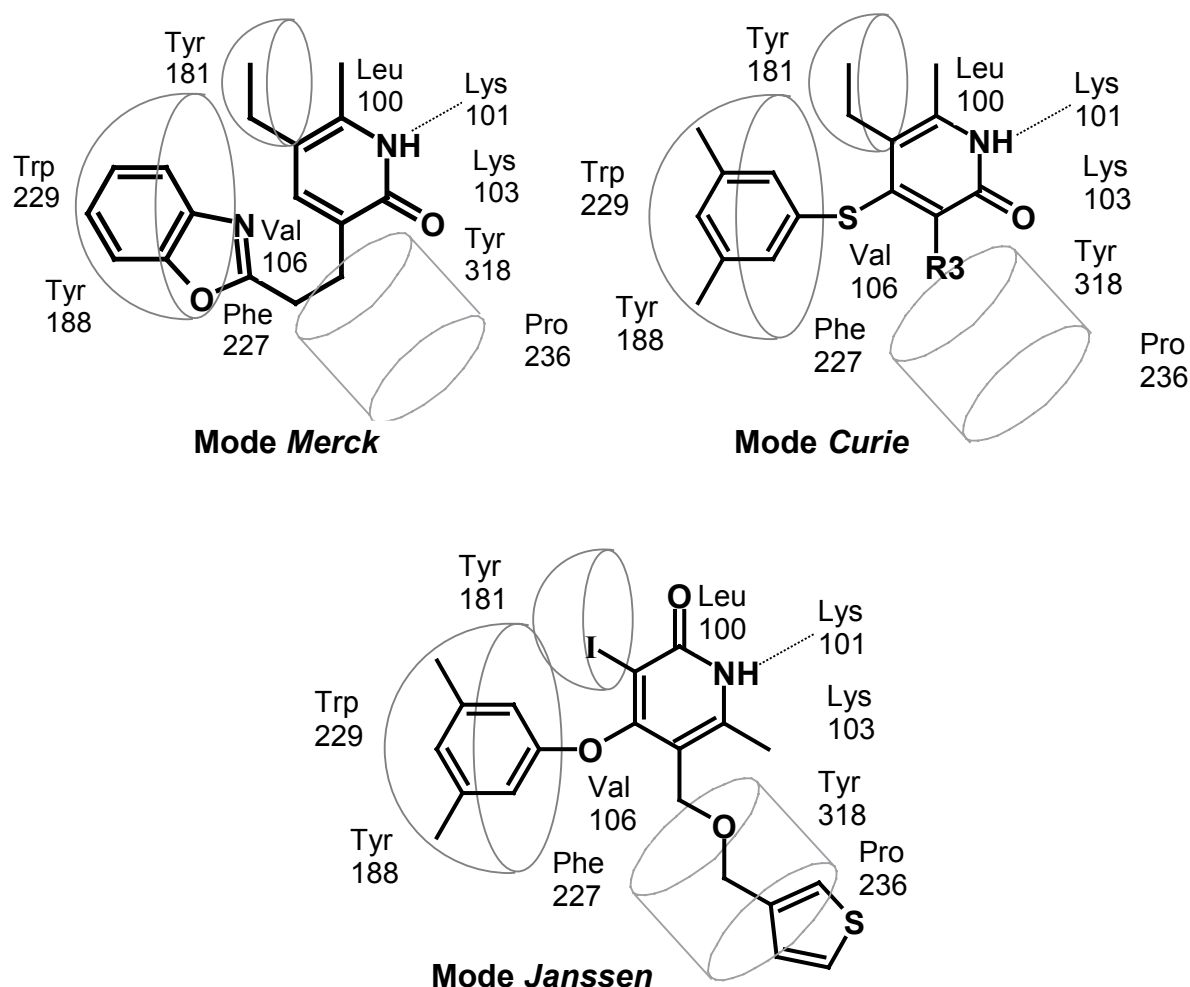
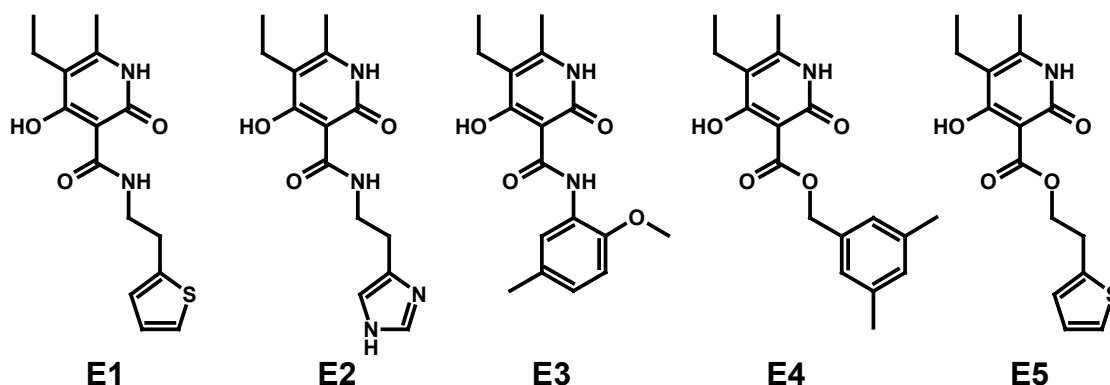


Figure 3 : Modes de liaison adoptés par les différentes séries de pyridinones au sein de la TI

Dans un second temps, ces informations ont été exploitées pour faciliter la **conception rationnelle de nouveaux INNTI dérivés du noyau pyridinone**. Nous avons tout d'abord tenté d'interpréter les résultats biologiques liés à une série de cinq **analogues des pyridinones Merck** (figure 4), synthétisés avant le début de notre thèse. Leur analyse à l'aide des outils de diffraction de rayons X et de modélisation moléculaire a révélé qu'ils sont **incapables d'adopter une conformation qui leur permette** de se lier au site allostérique de la TI selon l'un ou l'autre des modes d'interaction proposés pour les pyridinones. Ceci explique l'absence d'activité inhibitrice chez ces composés.

Figure 4 : Structure des cinq analogues des pyridinones de la série *Merck*

Suite à ces constatations, le projet s'est orienté vers la conception d'**analogues des pyridinones de la série Curie**. L'obtention de tels dérivés s'est avérée **problématique**, en raison de l'existence de plusieurs **formes tautomères** du composé à la base de leur synthèse. Les **voies de synthèse** envisagées par les chimistes organiciens ont donc dû être **validées**, en déterminant par diffraction de rayons X la structure de plusieurs molécules qui en sont issues. Ces travaux ont contribué à l'obtention du composé **Z3** (figure 5), une première 4-cycloalkoxy-pyridinone dotée d'une **activité antivirale** (EC_{50}) de l'ordre du micromolaire. Ce **chef de file** a ensuite fait l'objet d'une **optimisation**.

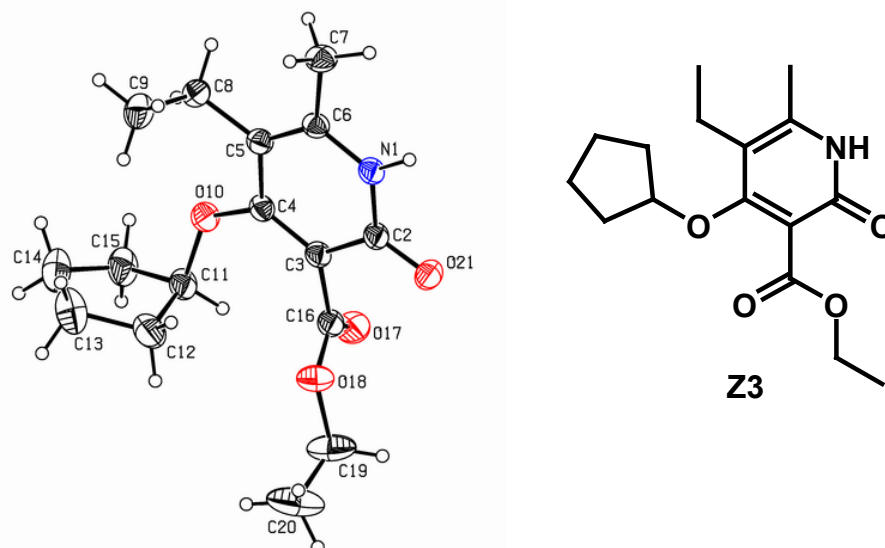


Figure 5 : Structure du composé Z3

Différentes **variations moléculaires** sur la **position 4** du cycle pyridinone ont été analysées. De manière générale, la **fonction d'affinité** précédemment utilisée se révèle d'une aide

précieuse pour le développement de nouveaux inhibiteurs. Ainsi, les composés dotés de **cycles saturés à six ou sept carbones** sont prédits comme étant ceux dotés du meilleur pouvoir inhibiteur, conformément à l'expérience. De même, les prédictions liées à la **substitution** de ce cycle ont été confirmées par des l'évaluation des inhibiteurs au cours de tests *in vitro* et *ex vivo*. L'isomère le plus actif du composé Z37(Z37inv, figure 6), qui permet d'occuper de manière optimale la zone hydrophobe du site de liaison (figure 7), a ainsi pu être identifié; il est caractérisé par une EC₅₀ de 22nM.

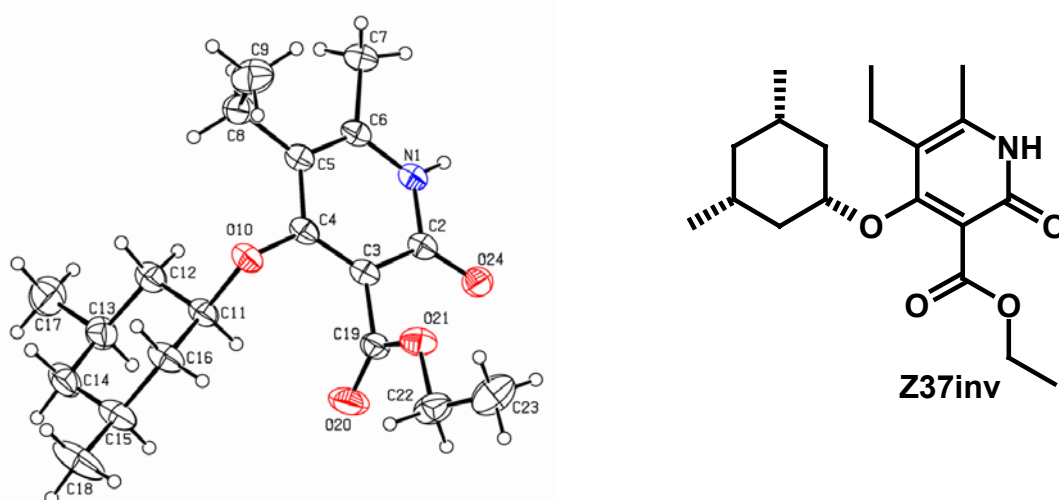


Figure 6 : Structure du composé Z37inv

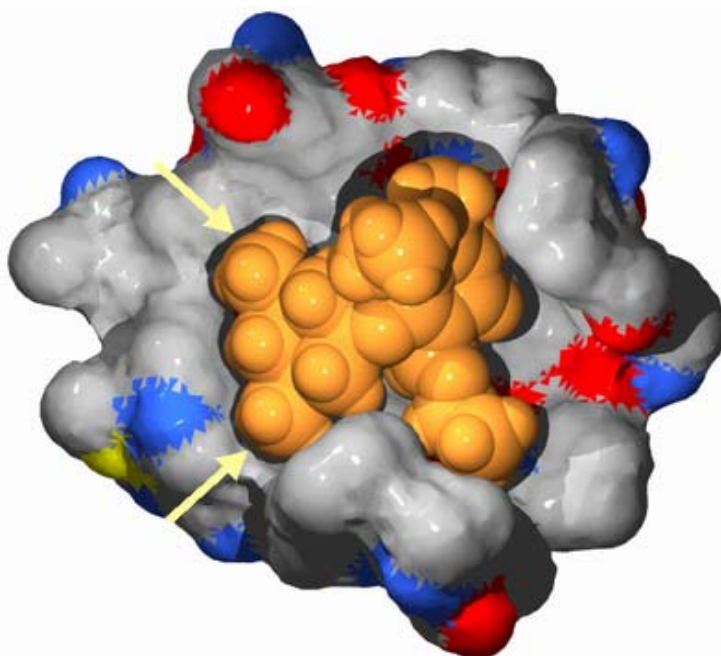


Figure 7 Occupation du site allostérique de la TI par le composé Z37inv

Prédire l'effet des variations moléculaires réalisées sur la **chaîne latérale** en **position 3** du cycle pyridinone se révèle délicat. Ce groupement est en effet localisé dans une **zone très flexible du site de liaison**, qui peut en partie s'adapter à la structure d'un ligand. Cette partie de l'inhibiteur peut également rester en contact avec le milieu extérieur à l'enzyme (solvant), ce qui complique le calcul de l'énergie de désolvatation du composé. Dans la plupart des cas, la **corrélation** obtenue entre la fonction d'affinité utilisée et les données biologiques est cependant suffisante pour permettre de **différencier les inhibiteurs les plus attractifs de ceux qui ne possèdent qu'une faible activité**. La **combinaison** des variations moléculaires les plus favorables sur les positions 3 et 4 du cycle pyridinone a finalement mené à l'obtention de plusieurs molécules inhibant très efficacement la réplication du VIH-1. L'une d'entre elles (Z114*) est caractérisée par une valeur d' EC_{50} de 0.00053 μ M, et conserve de plus une activité antivirale exploitable face aux souches mutantes Tyr181Cys et Tyr188Cys.

Enfin, deux **paramètres pharmacologiques** importants dans le cadre du développement d'un nouveau médicament, l'**absorption** par la muqueuse gastro-intestinale et le **passage de la barrière hématoencéphalique**, ont été estimés pour les inhibiteurs de la série Z, à l'aide de modèles théoriques simples décrits dans la littérature. Les résultats obtenus indiquent que les molécules les plus attractives de cette famille semblent dotées de propriétés d'absorption et de distribution favorables.

En conclusion, les recherches réalisées au cours de ce travail de thèse ont permis la proposition d'un modèle d'interaction TI-pyridinone cohérent vis à vis des relations structure-activité relevées au sein de cette catégorie d'INNTI. Ils ont également contribué à l'identification et au développement d'une nouvelle série d'inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH-1. Plusieurs des structures étudiées sont caractérisées par une excellente activité antivirale et devraient présenter de bonnes propriétés pharmacologiques.

Les **perspectives** qui découlent de ce travail sont nombreuses. Sur un plan purement académique, le **développement de fonctions de score** capables de prédire rapidement et de manière fiable les relations structure-activité au sein d'une famille de composés est toujours

* Structure non divulguée pour raisons de confidentialité

d'actualité. La **validation** de la **fonction d'affinité** utilisée au cours de ces travaux, son application à la **modélisation d'autres séries de composés** et surtout son **amélioration** constitue donc un sujet de recherche potentiel. Ces perfectionnements pourraient ainsi inclure un meilleur **traitement de la flexibilité de l'enzyme** grâce à la dynamique moléculaire, l'emploi d'un **terme de solvation plus rigoureux** que celui actuellement utilisé ou encore l'application d'une correction liée à la **perte d'entropie** causée par la liaison d'un inhibiteur à une enzyme.

D'autre part, la co-cristallisation d'un inhibiteur de la série Z avec la transcriptase inverse du VIH-1 et la résolution de la structure du complexe par diffraction de rayons X constituerait une validation idéale pour les modèles d'interaction proposés.

Enfin, la recherche de nouveaux médicaments antirétroviraux passe actuellement par la prise en compte des diverses **souches mutantes** du VIH. Il serait donc intéressant d'appliquer la fonction d'affinité utilisée au cours de ces travaux à la modélisation d'INNTI au sein des transcriptases inverses porteuses de ces mutations.

Sur un plan plus **appliqué**, les perspectives de ce travail concernent principalement la **valorisation des inhibiteurs étudiés** dans le cadre de notre projet. Plusieurs d'entre eux possèdent en effet une puissante activité antivirale combinée à un excellent indice de sélectivité et semblent de plus dotés de propriétés d'absorption et de distribution favorables, ce qui permet d'envisager la **réalisation d'essais toxicologiques, puis cliniques**. Pour ce faire, les données actuellement disponibles devront tout d'abord être complétées par l'évaluation des molécules candidates sur un **éventail plus étendu de souches mutantes** afin de sélectionner celles caractérisées par le profil de résistance le plus attractif. De même les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion de ces composés devront être caractérisées expérimentalement.

Même si ces étapes restent à franchir, les résultats encourageants obtenus avec les inhibiteurs de la série Z ont d'ores et déjà conduit les partenaires de ce projet de recherche à entreprendre plusieurs démarches relatives à leur protection et à leur valorisation. Le dépôt d'une **demande**

de brevet auprès de l'office européen des brevets représente la première étape de ces démarches et constitue une conclusion heureuse à ce travail de thèse.

Données cristallographiques du composé E1

1) Crystal Data and Details of the Structure Determination

Crystal Data

Empirical Formula	C15 H18 N2 O3 S				
Formula Weight	306.37				
Crystal System	Monoclinic				
Space group	P21/n				
a, b, c [Angstrom]	6.0280(10)	13.7050(10)	18.4570(10)		
alpha, beta, gamma [deg]	90	90.027(5)	90		
V [Ang ³]	1524.8(3)				
Z	4				
D(calc) [g/cm ³]	1.335				
F(000)	648				
μ(CuK _α) [/mm]	0.047				
Crystal Size [mm]	0.10x	0.10x	0.10		

Data Collection

Diffractometer	Enraf-Nonius CAD-4		
Temperature (K)	293(2)		
Radiation [Angstrom]	CuK α	1.54178	
Theta Min-Max [Deg]	4.02, 71.89		
Scan	$\theta/2\theta$		
Absorption correction	analytical		
Max. and min. transmission	0.8258 and 0.8258		
Dataset	-7: 0 ; -16: 11 ; -22: 22		
Tot., Uniq. Data, R(int)	4307,	2997,	0.0121
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	3067		

Refinement

Method	on F ²	
Nref, Npar	2997, 215	
R, wR ² , S	0.0470, 0.1481, 1.047	
w = 1/[σ ² (F _o ²)+(0.1000P) ² + 0.0000P] where P=(F _o ² +2F _c ²)/3		
Max. and Av. Shift/Error	0.01, 0.00	
Min. and Max. resd. dens. [e/Ång ³]	-0.43, 0.39	

2) Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement for E1

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	---	---	---	-----
*S1	-0.16050	0.31885	0.60911	0.0786
O2	0.25566	0.06865	0.48498	0.0596
O6	0.01513	0.02894	0.24176	0.0782
O8	-0.20158	0.13791	0.32054	0.0800
N4	0.43342	-0.02973	0.40601	0.0523
N5	-0.11477	0.15785	0.43863	0.0601
*C3	0.11692	0.38845	0.53155	0.1040
C7	0.26530	0.03335	0.42195	0.0485
C9	0.11485	0.05418	0.36429	0.0505
C10	0.32702	-0.05526	0.28406	0.0546
C11	0.15042	0.01032	0.29678	0.0556
C12	-0.07632	0.11953	0.37404	0.0557
C13	0.46710	-0.07403	0.34048	0.0524
C14	-0.30049	0.22166	0.45385	0.0628
C15	-0.23264	0.32769	0.45998	0.0632
C16	0.65913	-0.14243	0.33779	0.0701
C17	-0.08220	0.34868	0.52295	0.0587
C18	0.35179	-0.10256	0.21096	0.0679
*C19	0.21328	0.39795	0.59709	0.0849
C20	0.21368	-0.19396	0.20202	0.0883
*C21	0.07807	0.36222	0.64633	0.0734
*C21'	0.05428	0.38453	0.63736	0.0880
*S3'	0.17119	0.38559	0.50889	0.0909
*C19'	0.22242	0.40467	0.59490	0.0849
*C1'	-0.12768	0.35125	0.59565	0.1040

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor
 Starred Atom sites have a S.O.F less than 1.0

3) Bond Distances (Angstrom) for E1

S1	-C17	1.7087		C13	-C16	1.4904
S1	-C21	1.7007		C14	-C15	1.5138
S3'	-C19'	1.6381		C15	-C17	1.5016
S3'	-C17	1.6299		C18	-C20	1.5130
O2	-C7	1.2613		C19	-C21	1.3156
O6	-C11	1.3269		C19'	-C21'	1.3109
O8	-C12	1.2680		C1'	-H1'	0.9301
O6	-H6	1.0555		C3	-H3	0.9300
N4	-C13	1.3685		C14	-H14B	0.9700
N4	-C7	1.3643		C14	-H14A	0.9700
N5	-C14	1.4482		C15	-H15A	0.9700
N5	-C12	1.3232		C15	-H15B	0.9699
N4	-H4	0.8600		C16	-H16B	0.9599
N5	-H5	0.8600		C16	-H16C	0.9601
C1'	-C21'	1.4153		C16	-H16A	0.9600
C1'	-C17	1.3701		C18	-H18B	0.9700
C3	-C19	1.3480		C18	-H18A	0.9700
C3	-C17	1.3277		C19	-H19	0.9300
C7	-C9	1.4268		C19'	-H19'	0.9300
C9	-C11	1.4001		C20	-H20A	0.9600
C9	-C12	1.4706		C20	-H20B	0.9600
C10	-C13	1.3648		C20	-H20C	0.9600
C10	-C18	1.5044		C21	-H21	0.9300
C10	-C11	1.4129		C21'	-H21'	0.9299

4) Bond Angles (Degrees)
for E1

C17	-S1	-C21	93.35	N4	-C13	-C10	119.91
C17	-S3'	-C19'	94.10	N5	-C14	-C15	112.66
C11	-O6	-H6	104.18	C14	-C15	-C17	113.88
C7	-N4	-C13	125.61	S3'	-C17	-C1'	109.63
C12	-N5	-C14	123.38	C1'	-C17	-C15	129.93
C7	-N4	-H4	117.19	S1	-C17	-C3	103.71
C13	-N4	-H4	117.20	S3'	-C17	-C15	120.12
C14	-N5	-H5	118.31	C3	-C17	-C15	135.79
C12	-N5	-H5	118.31	S1	-C17	-C15	120.50
C17	-C1'	-C21'	112.68	C10	-C18	-C20	113.56
C17	-C3	-C19	122.42	C3	-C19	-C21	108.49
O2	-C7	-C9	125.57	S3'	-C19'	-C21'	113.60
O2	-C7	-N4	118.46	S1	-C21	-C19	112.03
N4	-C7	-C9	115.97	C1'	-C21'	-C19'	109.99
C7	-C9	-C11	118.71	C21'	-C1'	-H1'	123.65
C7	-C9	-C12	121.90	C17	-C1'	-H1'	123.67
C11	-C9	-C12	119.39	C19	-C3	-H3	118.79
C13	-C10	-C18	122.78	C17	-C3	-H3	118.79
C11	-C10	-C13	117.32	C15	-C14	-H14A	109.06
C11	-C10	-C18	119.88	C15	-C14	-H14B	109.06
O6	-C11	-C10	117.26	H14A	-C14	-H14B	107.82
O6	-C11	-C9	120.28	N5	-C14	-H14A	109.05
C9	-C11	-C10	122.46	N5	-C14	-H14B	109.06
O8	-C12	-C9	119.47	C14	-C15	-H15A	108.78
O8	-C12	-N5	121.21	C17	-C15	-H15B	108.77
N5	-C12	-C9	119.31	C14	-C15	-H15B	108.79
N4	-C13	-C16	115.09	C17	-C15	-H15A	108.77
C10	-C13	-C16	124.99	H15A	-C15	-H15B	107.67
C13	-C16	-H16B	109.48	S3'	-C19'	-H19'	123.20
C13	-C16	-H16C	109.47	C21'	-C19'	-H19'	123.20
H16A	-C16	-H16C	109.47	C18	-C20	-H20A	109.48
H16B	-C16	-H16C	109.47	H20B	-C20	-H20C	109.47
H16A	-C16	-H16B	109.47	C18	-C20	-H20C	109.47
C13	-C16	-H16A	109.47	H20A	-C20	-H20B	109.47
C20	-C18	-H18A	108.85	C18	-C20	-H20B	109.47
C20	-C18	-H18B	108.85	H20A	-C20	-H20C	109.47
H18A	-C18	-H18B	107.71	S1	-C21	-H21	123.98
C10	-C18	-H18A	108.86	C19	-C21	-H21	123.99
C10	-C18	-H18B	108.85	C1'	-C21'	-H21'	125.01
C3	-C19	-H19	125.76	C19'	-C21'	-H21'	125.00
C21	-C19	-H19	125.75				

5) Torsion Angles (Degrees)
for E1

C17	-S1	-C21	-C19	0.00
C21	-S1	-C17	-C3	0.00
C21	-S1	-C17	-C15	-179.95
C7	-N4	-C13	-C10	0.82
C7	-N4	-C13	-C16	-178.11
C13	-N4	-C7	-O2	-179.93
C13	-N4	-C7	-C9	-0.43
C14	-N5	-C12	-C9	-178.99
C12	-N5	-C14	-C15	-104.19

C14	-N5	-C12	-08	0.81
C19	-C3	-C17	-S1	0.00
C17	-C3	-C19	-C21	0.00
C19	-C3	-C17	-C15	179.94
N4	-C7	-C9	-C12	178.92
O2	-C7	-C9	-C11	178.84
N4	-C7	-C9	-C11	-0.61
O2	-C7	-C9	-C12	-1.62
C12	-C9	-C11	-06	1.20
C7	-C9	-C12	-N5	-2.21
C7	-C9	-C11	-C10	1.30
C7	-C9	-C11	-06	-179.25
C11	-C9	-C12	-N5	177.33
C11	-C9	-C12	-08	-2.47
C12	-C9	-C11	-C10	-178.25
C7	-C9	-C12	-08	178.00
C13	-C10	-C11	-C9	-0.92
C18	-C10	-C13	-C16	-0.14
C13	-C10	-C18	-C20	93.79
C11	-C10	-C18	-C20	-85.02
C18	-C10	-C11	-06	-1.51
C13	-C10	-C11	-06	179.62
C11	-C10	-C13	-N4	-0.13
C18	-C10	-C13	-N4	-178.96
C11	-C10	-C13	-C16	178.70
C18	-C10	-C11	-C9	177.95
N5	-C14	-C15	-C17	-64.99
C14	-C15	-C17	-S1	-56.03
C14	-C15	-C17	-C3	124.06
C3	-C19	-C21	-S1	0.00

Données cristallographiques du composé M13

1) Crystal Data and Details of the Structure Determination

Crystal Data

Empirical Formula	C19 H22 Cl N O2 S
Formula Weight	363.90
Crystal System	Monoclinic
Space group	C2/c (No. 15)
a, b, c [Angstrom]	11.609(1) 13.261(1) 25.740(2)
alpha, beta, gamma [deg]	90 102.90(5) 90
V [Ang ³]	3862.6(9)
Z	8
D(calc) [g/cm ³]	1.252
F(000)	1536
μ (CuK α) [/mm]	2.8
Crystal Size [mm]	0.02 x 0.21 x 0.44

Data Collection

Diffractometer	Enraf-Nonius CAD-4
Temperature (K)	293(2)
Radiation [Angstrom]	CuK α 1.54178
Theta Min-Max [Deg]	3.5, 71.9
Scan	$\theta/2\theta$
Absorption correction	analytical
Max. and min. transmission	0.9454 and 0.3679
Dataset	-13: 14 ; 0: 16 ; -31: 26
Tot., Uniq. Data, R(int)	6084, 3784, 0.027
Observed data [$I > 2.0 \sigma(I)$]	3221

Refinement

Method	on F^2
Nref, Npar	3784, 221
R, wR ² , S	0.0465, 0.1117, 1.04
$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0604P)^2 + 2.0057P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	
Max. and Av. Shift/Error	0.00, 0.00
Min. and Max. resd. dens. [e/Ang ³]	-0.28, 0.30

Table S2 - Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement Parameters of the non-Hydrogen atoms for: hivm13

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	---	---	---	-----
Cl24	0.35943(4)	0.19196(4)	-0.02916(2)	0.0710(2)
S10	0.74233(5)	0.17626(4)	0.13501(2)	0.0620(2)
O20	0.49945(18)	0.33181(11)	0.08311(7)	0.0849(7)
O21	0.44147(16)	0.18610(12)	0.11270(7)	0.0768(6)
N1	0.55493(13)	0.10270(12)	-0.03526(6)	0.0539(5)
C2	0.50375(15)	0.15258(14)	-0.00270(7)	0.0500(5)
C3	0.55567(15)	0.17632(12)	0.04951(6)	0.0471(5)
C4	0.66941(15)	0.13943(12)	0.06943(6)	0.0465(5)
C5	0.72601(15)	0.08247(12)	0.03694(7)	0.0487(5)
C6	0.66584(16)	0.06909(14)	-0.01626(7)	0.0527(6)
C7	0.7208(2)	0.0183(2)	-0.05695(9)	0.0762(8)
C8	0.84677(16)	0.03761(15)	0.05772(9)	0.0610(6)

C9	0.94603(19)	0.1072(2)	0.05072(11)	0.0776(8)
C11	0.73203(16)	0.06777(14)	0.17426(7)	0.0531(5)
C12	0.64952(18)	-0.00804(15)	0.15942(7)	0.0598(6)
C13	0.6446(2)	-0.08786(18)	0.19376(8)	0.0701(7)
C14	0.7239(2)	-0.0888(2)	0.24301(9)	0.0783(8)
C15	0.8067(2)	-0.0136(2)	0.25842(8)	0.0777(8)
C16	0.81070(19)	0.06449(18)	0.22346(8)	0.0660(7)
C17	0.5536(3)	-0.1693(2)	0.17785(13)	0.1058(14)
C18	0.8922(3)	-0.0161(3)	0.31251(11)	0.1251(15)
C19	0.49577(18)	0.24129(15)	0.08308(7)	0.0587(6)
C22	0.3858(3)	0.2407(3)	0.15020(12)	0.1032(11)
*C23	0.3358(8)	0.1651(5)	0.1797(3)	0.144(3)
*C23'	0.4260(10)	0.1958(9)	0.2026(3)	0.144(3)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

Starred Atom sites have a S.O.F less than 1.0

Table S5 - Bond Distances (Angstrom)
for: hivm13

Cl24	-C2	1.7419(19)		C7	-H7A	0.9596
S10	-C4	1.7796(16)		C7	-H7B	0.9599
S10	-C11	1.7772(19)		C7	-H7C	0.9600
O20	-C19	1.201(2)		C8	-H8A	0.9695
O21	-C19	1.315(3)		C8	-H8B	0.9704
O21	-C22	1.467(4)		C9	-H9A	0.9595
N1	-C2	1.310(2)		C9	-H9B	0.9596
N1	-C6	1.347(2)		C9	-H9C	0.9606
C2	-C3	1.381(2)		C12	-H12	0.9303
C3	-C4	1.394(2)		C14	-H14	0.9290
C3	-C19	1.497(3)		C16	-H16	0.9306
C4	-C5	1.395(2)		C17	-H17A	0.9602
C5	-C6	1.403(2)		C17	-H17B	0.9592
C5	-C8	1.507(3)		C17	-H17C	0.9603
C6	-C7	1.502(3)		C18	-H18A	0.9592
C8	-C9	1.518(3)		C18	-H18B	0.9604
C11	-C12	1.382(3)		C18	-H18C	0.9597
C11	-C16	1.387(3)		C22	-H22A	0.9694
C12	-C13	1.388(3)		C22	-H22B	0.9694
C13	-C14	1.391(3)		C23	-H23A	0.9588
C13	-C17	1.502(4)		C23	-H23B	0.9602
C14	-C15	1.380(4)		C23	-H23C	0.9608
C15	-C16	1.379(3)		C23'	-H23D	0.9586
C15	-C18	1.519(4)		C23'	-H23E	0.9598
C22	-C23	1.454(9)		C23'	-H23F	0.9593
C22	-C23'	1.453(9)				

Table S6 - Bond Angles (Degrees)
for: hivm13

C4	-S10	-C11	103.82(10)		C14	-C15	-C18	121.2(2)
C19	-O21	-C22	116.5(2)		C16	-C15	-C18	120.3(2)
C2	-N1	-C6	117.92(16)		C11	-C16	-C15	120.5(2)
Cl24	-C2	-N1	115.81(14)		O20	-C19	-O21	125.3(2)
Cl24	-C2	-C3	119.01(15)		O20	-C19	-C3	123.68(19)
N1	-C2	-C3	125.18(17)		O21	-C19	-C3	111.04(17)
C2	-C3	-C4	116.73(16)		O21	-C22	-C23	106.8(4)

C2	-C3	-C19	122.34(17)		O21	-C22	-C23'	108.1(5)
C4	-C3	-C19	120.90(15)		C6	-C7	-H7A	109.45
S10	-C4	-C3	117.61(13)		C6	-C7	-H7B	109.44
S10	-C4	-C5	121.95(14)		C6	-C7	-H7C	109.43
C3	-C4	-C5	120.24(15)		H7A	-C7	-H7B	109.49
C4	-C5	-C6	117.07(17)		H7A	-C7	-H7C	109.51
C4	-C5	-C8	121.75(17)		H7B	-C7	-H7C	109.51
C6	-C5	-C8	121.18(17)		C5	-C8	-H8A	109.04
N1	-C6	-C5	122.68(17)		C5	-C8	-H8B	108.99
N1	-C6	-C7	114.56(17)		C9	-C8	-H8A	109.01
C5	-C6	-C7	122.75(18)		C9	-C8	-H8B	109.01
C5	-C8	-C9	112.87(18)		H8A	-C8	-H8B	107.80
S10	-C11	-C12	124.20(15)		C8	-C9	-H9A	109.49
S10	-C11	-C16	115.49(16)		C8	-C9	-H9B	109.49
C12	-C11	-C16	120.26(19)		C8	-C9	-H9C	109.47
C11	-C12	-C13	120.20(18)		H9A	-C9	-H9B	109.44
C12	-C13	-C14	118.3(2)		H9A	-C9	-H9C	109.53
C12	-C13	-C17	120.1(2)		H9B	-C9	-H9C	109.41
C14	-C13	-C17	121.6(2)		C11	-C12	-H12	119.89
C13	-C14	-C15	122.2(2)		C13	-C12	-H12	119.91
C14	-C15	-C16	118.5(2)		C13	-C14	-H14	118.92
C15	-C14	-H14	118.92		C23	-C22	-H22A	110.38
C11	-C16	-H16	119.77		C23	-C22	-H22B	110.36
C15	-C16	-H16	119.70		H22A	-C22	-H22B	108.64
C13	-C17	-H17A	109.44		C23'	-C22	-H22A	66.32
C13	-C17	-H17B	109.44		C23'	-C22	-H22B	140.06
C13	-C17	-H17C	109.43		C22	-C23	-H23A	109.49
H17A	-C17	-H17B	109.52		C22	-C23	-H23B	109.56
H17A	-C17	-H17C	109.54		C22	-C23	-H23C	109.39
H17B	-C17	-H17C	109.46		H23A	-C23	-H23B	109.43
C15	-C18	-H18A	109.53		H23A	-C23	-H23C	109.48
C15	-C18	-H18B	109.44		H23B	-C23	-H23C	109.48
C15	-C18	-H18C	109.47		C22	-C23'	-H23D	109.40
H18A	-C18	-H18B	109.41		C22	-C23'	-H23E	109.44
H18A	-C18	-H18C	109.48		C22	-C23'	-H23F	109.43
H18B	-C18	-H18C	109.51		H23D	-C23'	-H23E	109.50
O21	-C22	-H22A	110.28		H23D	-C23'	-H23F	109.64
O21	-C22	-H22B	110.37		H23E	-C23'	-H23F	109.42

Table S7 - Torsion Angles (Degrees)
for: hivm13

C4	-S10	-C11	-C16	161.58(16)
C11	-S10	-C4	-C3	103.71(15)
C11	-S10	-C4	-C5	-81.38(16)
C4	-S10	-C11	-C12	-21.0(2)
C22	-O21	-C19	-O20	-2.8(3)
C22	-O21	-C19	-C3	176.0(2)
C19	-O21	-C22	-C23	-177.9(4)
C6	-N1	-C2	-Cl24	-178.79(15)
C2	-N1	-C6	-C7	-176.41(19)
C2	-N1	-C6	-C5	2.2(3)
C6	-N1	-C2	-C3	2.0(3)
N1	-C2	-C3	-C4	-3.4(3)
Cl24	-C2	-C3	-C4	177.38(14)
N1	-C2	-C3	-C19	174.54(18)
Cl24	-C2	-C3	-C19	-4.7(2)
C2	-C3	-C4	-S10	175.68(14)
C4	-C3	-C19	-O21	-86.0(2)
C2	-C3	-C4	-C5	0.7(2)
C19	-C3	-C4	-C5	-177.31(17)

C19	-C3	-C4	-S10	-2.3(2)
C4	-C3	-C19	-O20	92.8(2)
C2	-C3	-C19	-O21	96.1(2)
C2	-C3	-C19	-O20	-85.1(3)
C3	-C4	-C5	-C6	3.0(2)
S10	-C4	-C5	-C6	-171.75(14)
C3	-C4	-C5	-C8	-177.34(17)
S10	-C4	-C5	-C8	7.9(2)
C8	-C5	-C6	-N1	175.72(18)
C4	-C5	-C6	-C7	173.89(19)
C4	-C5	-C8	-C9	-90.7(2)
C6	-C5	-C8	-C9	89.0(2)
C4	-C5	-C6	-N1	-4.6(3)
C8	-C5	-C6	-C7	-5.7(3)
S10	-C11	-C16	-C15	176.67(18)
C12	-C11	-C16	-C15	-0.8(3)
C16	-C11	-C12	-C13	0.2(3)
S10	-C11	-C12	-C13	-177.05(17)
C11	-C12	-C13	-C17	179.1(2)
C11	-C12	-C13	-C14	0.3(3)
C12	-C13	-C14	-C15	-0.2(4)
C17	-C13	-C14	-C15	-179.0(3)
C13	-C14	-C15	-C16	-0.3(4)
C13	-C14	-C15	-C18	179.8(3)
C14	-C15	-C16	-C11	0.9(3)
C18	-C15	-C16	-C11	-179.3(2)

Données cristallographiques du composé M18

1) Crystal Data and Details of the Structure Determination

Crystal Data

Empirical Formula	C16 H21 N O5
Formula Weight	307.34
Crystal System	Triclinic
Space group	P-1 (No. 2)
a, b, c [Angstrom]	7.790(1) 9.148(1) 12.313(1)
alpha, beta, gamma [deg]	96.063(6) 104.408(5) 103.500(5)
V [Ang ³]	813.80(16)
Z	2
D(calc) [g/cm ³]	1.254
F(000)	328
μ (CuK α) [/mm]	0.8
Crystal Size [mm]	0.04 x 0.09 x 0.17

Data Collection

Diffractometer	Enraf-Nonius CAD-4
Temperature (K)	293(2)
Radiation [Angstrom]	CuK α 1.54178
Theta Min-Max [Deg]	3.8, 71.9
Scan	$\theta/2\theta$
Absorption correction	analytical
Max. and min. transmission	0.9697 and 0.8766
Dataset	-9: 9 ; 0: 11 ; -15: 15
Tot., Uniq. Data, R(int)	3404, 3192, 0.008
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	2689

Refinement

Method	on F ²
Nref, Npar	3192, 206
R, wR ² , S	0.0393, 0.1185, 1.03
$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0580P)^2 + 0.2100P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	
Max. and Av. Shift/Error	0.00, 0.00
Min. and Max. resd. dens. [e/Ang ³]	-0.17, 0.21

**2) Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement
Parameters of the non-Hydrogen atoms
for M18**

Atom	x	y	z	U(eq) [Å ²]
----	----	----	----	-----
O10	1.09902(13)	0.15033(11)	0.31914(8)	0.0408(3)
O12	1.04904(17)	0.36951(13)	0.26910(10)	0.0571(4)
O18	0.66679(18)	-0.16087(13)	0.17675(10)	0.0623(4)
O19	0.77348(16)	0.06873(12)	0.13606(8)	0.0503(3)
O22	0.49772(14)	-0.04096(15)	0.35439(10)	0.0588(4)
N1	0.73134(16)	0.10286(14)	0.50428(10)	0.0423(4)
C2	0.66250(19)	0.03280(17)	0.39215(12)	0.0423(4)
C3	0.79342(19)	0.05466(16)	0.32716(12)	0.0388(4)
C4	0.96940(19)	0.14254(15)	0.38002(12)	0.0370(4)
C5	1.03287(19)	0.21377(16)	0.49527(12)	0.0391(4)
C6	0.9059(2)	0.18992(16)	0.55598(12)	0.0394(4)
C7	0.9425(2)	0.25362(19)	0.67899(13)	0.0511(5)
C8	1.2293(2)	0.30957(19)	0.54875(14)	0.0491(5)
C9	1.2528(3)	0.4805(2)	0.55176(17)	0.0682(6)
C11	1.1374(2)	0.27896(16)	0.26995(12)	0.0407(4)
C13	1.2972(2)	0.28065(17)	0.22772(13)	0.0455(5)
C14	1.3648(2)	0.38304(19)	0.16849(14)	0.0551(5)
C15	1.2824(4)	0.5065(3)	0.1309(2)	0.0950(11)
C16	1.5361(3)	0.3788(3)	0.13560(19)	0.0749(7)
C17	0.73583(19)	-0.02653(17)	0.20713(12)	0.0410(4)
C20	0.7452(3)	0.0006(2)	0.01925(13)	0.0565(6)
C21	0.7933(3)	0.1274(3)	-0.04362(16)	0.0753(8)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

**3) Bond Distances (Angstrom)
for M18**

O10	-C4	1.3932(18)		C20	-C21	1.489(3)
O10	-C11	1.3847(18)		C7	-H7A	0.9597
O12	-C11	1.194(2)		C7	-H7B	0.9595
O18	-C17	1.1974(19)		C7	-H7C	0.9607
O19	-C17	1.3344(18)		C8	-H8A	0.9695
O19	-C20	1.4472(19)		C8	-H8B	0.9705
O22	-C2	1.246(2)		C9	-H9A	0.9602
N1	-C2	1.3743(19)		C9	-H9B	0.9599
N1	-C6	1.358(2)		C9	-H9C	0.9597
N1	-H1	0.9324		C13	-H13	0.9300
C2	-C3	1.437(2)		C15	-H15A	0.9608
C3	-C4	1.371(2)		C15	-H15B	0.9591
C3	-C17	1.490(2)		C15	-H15C	0.9595
C4	-C5	1.410(2)		C16	-H16A	0.9601
C5	-C6	1.373(2)		C16	-H16B	0.9594
C5	-C8	1.514(2)		C16	-H16C	0.9597
C6	-C7	1.495(2)		C20	-H20A	0.9699
C8	-C9	1.527(3)		C20	-H20B	0.9696
C11	-C13	1.461(2)		C21	-H21A	0.9597
C13	-C14	1.339(2)		C21	-H21B	0.9594
C14	-C16	1.495(3)		C21	-H21C	0.9599
C14	-C15	1.484(3)				

4) Bond Angles (Degrees)
for M18

C4	-O10	-C11	116.58(11)		O18	-C17	-O19	123.28(13)
C17	-O19	-C20	116.78(12)		O18	-C17	-C3	125.04(14)
C2	-N1	-C6	126.26(13)		O19	-C17	-C3	111.67(12)
C6	-N1	-H1	120.11		O19	-C20	-C21	107.25(14)
C2	-N1	-H1	113.62		C6	-C7	-H7A	109.49
O22	-C2	-C3	125.37(13)		C6	-C7	-H7B	109.50
O22	-C2	-N1	119.90(14)		C6	-C7	-H7C	109.47
N1	-C2	-C3	114.72(13)		H7A	-C7	-H7B	109.47
C2	-C3	-C17	118.71(13)		H7A	-C7	-H7C	109.43
C2	-C3	-C4	118.65(13)		H7B	-C7	-H7C	109.46
C4	-C3	-C17	122.54(14)		C5	-C8	-H8A	108.87
O10	-C4	-C5	117.38(13)		C5	-C8	-H8B	108.86
C3	-C4	-C5	124.48(14)		C9	-C8	-H8A	108.88
O10	-C4	-C3	117.84(12)		C9	-C8	-H8B	108.85
C6	-C5	-C8	122.21(13)		H8A	-C8	-H8B	107.69
C4	-C5	-C6	115.83(14)		C8	-C9	-H9A	109.49
C4	-C5	-C8	121.96(14)		C8	-C9	-H9B	109.48
C5	-C6	-C7	125.09(14)		C8	-C9	-H9C	109.51
N1	-C6	-C7	114.85(13)		H9A	-C9	-H9B	109.40
N1	-C6	-C5	120.05(13)		H9A	-C9	-H9C	109.47
C5	-C8	-C9	113.52(15)		H9B	-C9	-H9C	109.47
O10	-C11	-O12	121.27(14)		C11	-C13	-H13	117.50
O10	-C11	-C13	108.86(13)		C14	-C13	-H13	117.50
O12	-C11	-C13	129.83(14)		C14	-C15	-H15A	109.40
C11	-C13	-C14	125.00(15)		C14	-C15	-H15B	109.47
C15	-C14	-C16	114.92(19)		C14	-C15	-H15C	109.46
C13	-C14	-C15	124.87(18)		H15A	-C15	-H15B	109.51
C13	-C14	-C16	120.21(17)		H15A	-C15	-H15C	109.45
H15B	-C15	-H15C	109.54		C21	-C20	-H20A	110.25
C14	-C16	-H16A	109.45		C21	-C20	-H20B	110.26
C14	-C16	-H16B	109.49		H20A	-C20	-H20B	108.52
C14	-C16	-H16C	109.47		C20	-C21	-H21A	109.51
H16A	-C16	-H16B	109.47		C20	-C21	-H21B	109.46
H16A	-C16	-H16C	109.44		C20	-C21	-H21C	109.48
H16B	-C16	-H16C	109.50		H21A	-C21	-H21B	109.43
O19	-C20	-H20A	110.31		H21A	-C21	-H21C	109.45
O19	-C20	-H20B	110.26		H21B	-C21	-H21C	109.50

5) Torsion Angles (Degrees)
for M18

C11	-O10	-C4	-C3	100.01(15)
C11	-O10	-C4	-C5	-85.94(16)
C4	-O10	-C11	-O12	-8.1(2)
C4	-O10	-C11	-C13	170.07(12)
C20	-O19	-C17	-O18	-6.4(2)
C20	-O19	-C17	-C3	172.48(15)
C17	-O19	-C20	-C21	179.31(17)
C2	-N1	-C6	-C5	-0.5(2)
C2	-N1	-C6	-C7	179.36(14)
C6	-N1	-C2	-C3	1.1(2)
C6	-N1	-C2	-O22	-178.11(15)
N1	-C2	-C3	-C4	-1.0(2)
N1	-C2	-C3	-C17	175.39(13)
O22	-C2	-C3	-C17	-5.4(2)
O22	-C2	-C3	-C4	178.23(15)
C4	-C3	-C17	-O18	124.18(18)
C2	-C3	-C4	-O10	173.84(13)

C2	-C3	-C4	-C5	0.3(2)
C17	-C3	-C4	-O10	-2.4(2)
C17	-C3	-C4	-C5	-175.97(14)
C2	-C3	-C17	-O18	-52.0(2)
C2	-C3	-C17	-O19	129.06(15)
C4	-C3	-C17	-O19	-54.7(2)
O10	-C4	-C5	-C6	-173.19(12)
O10	-C4	-C5	-C8	6.4(2)
C3	-C4	-C5	-C8	180.0(8)
C3	-C4	-C5	-C6	0.4(2)
C8	-C5	-C6	-N1	-179.89(14)
C4	-C5	-C6	-C7	179.8(2)
C4	-C5	-C6	-N1	-0.3(2)
C6	-C5	-C8	-C9	-83.85(19)
C8	-C5	-C6	-C7	0.3(2)
C4	-C5	-C8	-C9	96.62(18)
O10	-C11	-C13	-C14	175.26(15)
O12	-C11	-C13	-C14	-6.7(3)
C11	-C13	-C14	-C16	176.37(16)
C11	-C13	-C14	-C15	-3.4(3)

Données cristallographiques du composé M13b

1) Crystal Data and Details of the Structure Determination

Crystal Data

Empirical Formula	C19 H23 N O3 S		
Formula Weight	345.45		
Crystal System	Monoclinic		
Space group	Cc	(No. 9)	
a, b, c [Angstrom]	16.344(2)	10.289(1)	12.941(2)
alpha, beta, gamma [deg]	90	118.608(10)	90
V [Ang ³]	1910.5(5)		
Z	4		
D(calc) [g/cm ³]	1.201		
F(000)	736		
μ(CuKα) [/mm]	1.6		
Crystal Size [mm]	0.12 x	0.14 x	0.18

Data Collection

Diffractometer	Enraf-Nonius CAD-4
Temperature (K)	293(2)
Radiation [Angstrom]	CuK α 1.54178
Theta Min-Max [Deg]	5.3, 71.9
Scan	$\theta/2\theta$
Absorption correction	analytical
Max. and min. transmission	0.8286 and 0.7581
Dataset	-20: 17 ; -12: 12 ; 0: 15
Tot., Uniq. Data, R(int)	3940, 1970, 0.030
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	1504

Refinement

Method	on F ²
Nref, Npar	1970, 226
R, wR ² , S	0.0524, 0.1463, 1.10
$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0690P)^2 + 1.2000P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	
Max. and Av. Shift/Error	0.02, 0.00
Min. and Max. resd. dens. [e/Ang ³]	-0.28, 0.47

**2) Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement
Parameters of the non-Hydrogen atoms
for M13b**

Atom	x	y	z	U(eq) [Å ²]
----	----	----	----	-----
S10	0.46380(9)	0.39995(14)	0.44867(11)	0.0641(4)
O20	0.4916(4)	0.1868(4)	0.2487(5)	0.101(2)
O21	0.4185(3)	0.3657(4)	0.1527(4)	0.0853(16)
O24	0.6333(3)	0.3981(5)	0.2071(3)	0.0781(15)
N1	0.6284(3)	0.5070(5)	0.5027(4)	0.0595(14)
C2	0.5590(3)	0.4344(5)	0.4240(4)	0.0498(14)
C3	0.5595(3)	0.3932(5)	0.3234(4)	0.0527(14)
C4	0.6338(4)	0.4352(6)	0.3004(4)	0.0608(19)
C5	0.7062(4)	0.5089(8)	0.3886(5)	0.081(2)
C6	0.7008(4)	0.5452(7)	0.4878(5)	0.076(2)
C7	0.7722(6)	0.6269(11)	0.5837(6)	0.129(4)
C8	0.7969(5)	0.5287(10)	0.3786(7)	0.140(5)
C9	0.7735(7)	0.6547(10)	0.3070(9)	0.148(5)
C11	0.5126(4)	0.2850(6)	0.5659(5)	0.0627(17)
C12	0.5616(5)	0.1808(6)	0.5625(6)	0.077(2)
C13	0.5946(6)	0.0886(7)	0.6521(7)	0.093(3)
C14	0.5701(6)	0.1041(8)	0.7410(6)	0.096(3)
C15	0.5185(5)	0.2094(8)	0.7440(6)	0.089(3)
C16	0.4902(4)	0.3015(6)	0.6566(5)	0.0703(19)
C17	0.6483(9)	-0.0284(10)	0.6488(10)	0.151(6)
C18	0.4926(7)	0.2219(10)	0.8417(7)	0.119(4)
C19	0.4871(4)	0.3036(6)	0.2393(5)	0.0636(19)
C22	0.3481(7)	0.2801(9)	0.0637(7)	0.132(4)
C23	0.2754(8)	0.3712(11)	-0.0285(11)	0.180(6)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

**3) Bond Distances (Angstrom)
for M13b**

S10	-C2	1.768(6)		C15	-C16	1.375(10)
S10	-C11	1.783(6)		C22	-C23	1.535(16)
O20	-C19	1.207(7)		C7	-H7A	0.9604
O21	-C19	1.311(8)		C7	-H7B	0.9598
O21	-C22	1.469(10)		C7	-H7C	0.9596
O24	-C4	1.263(7)		C8	-H8A	0.9700
N1	-C2	1.332(7)		C8	-H8B	0.9694
N1	-C6	1.345(9)		C9	-H9A	0.9602
N1	-H1	0.67(6)		C9	-H9B	0.9604
C2	-C3	1.373(7)		C9	-H9C	0.9601
C3	-C4	1.448(9)		C12	-H12	0.9292
C3	-C19	1.484(8)		C14	-H14	0.9300
C4	-C5	1.409(9)		C16	-H16	0.9296
C5	-C8	1.562(12)		C17	-H17A	0.9603
C5	-C6	1.380(9)		C17	-H17B	0.9599
C6	-C7	1.491(11)		C17	-H17C	0.9598
C8	-C9	1.532(14)		C18	-H18A	0.9606
C11	-C12	1.351(10)		C18	-H18B	0.9599
C11	-C16	1.397(9)		C18	-H18C	0.9601
C12	-C13	1.392(10)		C22	-H22A	0.9701
C13	-C17	1.502(15)		C22	-H22B	0.9692
C13	-C14	1.397(13)		C23	-H23A	0.9596
C14	-C15	1.385(13)		C23	-H23B	0.9605
C15	-C18	1.519(13)		C23	-H23C	0.9598

4) Bond Angles (Degrees)
for M13b

C2	-S10	-C11	102.3(3)	C13	-C14	-C15	122.1(7)
C19	-O21	-C22	114.0(5)	C14	-C15	-C16	119.1(7)
C2	-N1	-C6	122.6(5)	C16	-C15	-C18	120.6(8)
C2	-N1	-H1	110(6)	C14	-C15	-C18	120.4(7)
C6	-N1	-H1	127(6)	C11	-C16	-C15	119.2(6)
S10	-C2	-N1	118.4(4)	O20	-C19	-O21	123.9(6)
N1	-C2	-C3	120.6(5)	O20	-C19	-C3	123.8(6)
S10	-C2	-C3	121.0(4)	O21	-C19	-C3	112.3(5)
C4	-C3	-C19	119.2(5)	O21	-C22	-C23	105.5(7)
C2	-C3	-C19	121.5(5)	C6	-C7	-H7A	109.48
C2	-C3	-C4	119.3(5)	C6	-C7	-H7B	109.51
O24	-C4	-C3	119.0(5)	C6	-C7	-H7C	109.48
O24	-C4	-C5	123.8(6)	H7A	-C7	-H7B	109.50
C3	-C4	-C5	117.1(5)	H7A	-C7	-H7C	109.40
C4	-C5	-C6	119.8(7)	H7B	-C7	-H7C	109.46
C6	-C5	-C8	121.9(6)	C5	-C8	-H8A	111.52
C4	-C5	-C8	117.7(6)	C5	-C8	-H8B	111.61
N1	-C6	-C7	115.9(6)	C9	-C8	-H8A	111.56
N1	-C6	-C5	120.4(6)	C9	-C8	-H8B	111.62
C5	-C6	-C7	123.6(7)	H8A	-C8	-H8B	109.47
C5	-C8	-C9	100.9(8)	C8	-C9	-H9A	109.46
S10	-C11	-C12	122.0(5)	C8	-C9	-H9B	109.49
C12	-C11	-C16	121.4(6)	C8	-C9	-H9C	109.55
S10	-C11	-C16	116.4(5)	H9A	-C9	-H9B	109.38
C11	-C12	-C13	120.9(7)	H9A	-C9	-H9C	109.44
C12	-C13	-C17	121.4(8)	H9B	-C9	-H9C	109.50
C12	-C13	-C14	117.3(8)	C11	-C12	-H12	119.56
C14	-C13	-C17	121.1(8)	C13	-C12	-H12	119.58
C13	-C14	-H14	118.96	H18A	-C18	-H18C	109.42
C15	-C14	-H14	118.96	H18B	-C18	-H18C	109.49
C11	-C16	-H16	120.47	O21	-C22	-H22A	110.64
C15	-C16	-H16	120.37	O21	-C22	-H22B	110.60
C13	-C17	-H17A	109.48	C23	-C22	-H22A	110.68
C13	-C17	-H17B	109.49	C23	-C22	-H22B	110.73
C13	-C17	-H17C	109.55	H22A	-C22	-H22B	108.66
H17A	-C17	-H17B	109.42	C22	-C23	-H23A	109.49
H17A	-C17	-H17C	109.44	C22	-C23	-H23B	109.47
H17B	-C17	-H17C	109.45	C22	-C23	-H23C	109.48
C15	-C18	-H18A	109.47	H23A	-C23	-H23B	109.49
C15	-C18	-H18B	109.50	H23A	-C23	-H23C	109.49
C15	-C18	-H18C	109.50	H23B	-C23	-H23C	109.41
H18A	-C18	-H18B	109.45				

5) Torsion Angles (Degrees)
for M13b

C11	-S10	-C2	-N1	-73.1(5)
C11	-S10	-C2	-C3	110.2(5)
C2	-S10	-C11	-C12	-48.8(7)
C2	-S10	-C11	-C16	137.0(5)
C22	-O21	-C19	-O20	-2.4(11)
C22	-O21	-C19	-C3	176.5(6)
C19	-O21	-C22	-C23	-179.8(8)
C2	-N1	-C6	-C5	-0.5(10)
C2	-N1	-C6	-C7	179.6(6)
C6	-N1	-C2	-S10	-175.7(5)
C6	-N1	-C2	-C3	1.1(8)

N1	-C2	-C3	-C4	-3.3(8)
S10	-C2	-C3	-C4	173.3(4)
S10	-C2	-C3	-C19	-8.4(7)
N1	-C2	-C3	-C19	175.0(5)
C4	-C3	-C19	-O20	92.4(8)
C4	-C3	-C19	-O21	-86.6(7)
C2	-C3	-C19	-O21	95.2(7)
C2	-C3	-C4	-O24	-179.2(5)
C2	-C3	-C4	-C5	4.9(8)
C19	-C3	-C4	-O24	2.5(8)
C19	-C3	-C4	-C5	-173.4(6)
C2	-C3	-C19	-O20	-85.9(9)
C3	-C4	-C5	-C6	-4.3(10)
O24	-C4	-C5	-C6	180(4)
O24	-C4	-C5	-C8	-9.0(10)
C3	-C4	-C5	-C8	166.7(6)
C8	-C5	-C6	-N1	-168.4(7)
C4	-C5	-C6	-N1	2.2(11)
C4	-C5	-C6	-C7	-177.8(7)
C4	-C5	-C8	-C9	90.5(8)
C6	-C5	-C8	-C9	-98.7(8)
C8	-C5	-C6	-C7	11.6(12)
C12	-C11	-C16	-C15	-0.2(11)
S10	-C11	-C16	-C15	174.1(6)
S10	-C11	-C12	-C13	-176.4(6)
C16	-C11	-C12	-C13	-2.5(11)
C11	-C12	-C13	-C14	3.9(12)
C11	-C12	-C13	-C17	179.4(8)
C17	-C13	-C14	-C15	-178.2(9)
C12	-C13	-C14	-C15	-2.7(13)
C13	-C14	-C15	-C16	0.2(12)
C13	-C14	-C15	-C18	179.4(9)
C18	-C15	-C16	-C11	-177.9(7)
C14	-C15	-C16	-C11	1.3(11)

Données cristallographiques du composé M7

1) Crystal Data and Details of the Structure Determination

Crystal Data

Empirical Formula	C16 H23 N O4
Formula Weight	293.35
Crystal System	Triclinic
Space group	P-1 (No. 2)
a, b, c [Angstrom]	6.312(1) 10.571(1) 12.396(2)
alpha, beta, gamma [deg]	84.205(7) 77.098(8) 88.827(5)
V [Ang ³]	802.1(2)
Z	2
D(calc) [g/cm ³]	1.215
F(000)	316
μ (CuK α) [/mm]	0.709
Crystal Size [mm]	0.09 x 0.10 x 0.21

Data Collection

Diffractometer	Enraf-Nonius CAD-4
Temperature (K)	293(2)
Radiation [Angstrom]	CuK α 1.54178
Theta Min-Max [Deg]	3.7, 71.9
Scan	$\theta/2\theta$
Absorption correction	analytical
Max. and min. transmission	0.939 and 0.865
Dataset	-5: 7 ; -13: 13 ; -14: 15
Tot., Uniq. Data, R(int)	3449, 3147, 0.022
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	1678

Refinement

Method	on F ²
Nref, Npar	3147, 194
R, wR ² , S	0.0594, 0.1854, 1.01
$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0760P)^2 + 0.2720P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	
Max. and Av. Shift/Error	0.03, 0.00
Min. and Max. resd. dens. [e/Ang ³]	-0.19, 0.26

2) Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement Parameters of the non-Hydrogen atoms for M7

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	---	---	---	-----
O10	0.0536(3)	0.33292(16)	0.77986(18)	0.0715(8)
O17	0.2449(3)	-0.01468(18)	0.90672(18)	0.0730(8)
O18	0.2799(3)	0.19478(17)	0.89384(16)	0.0598(7)
O21	-0.0112(3)	-0.11607(16)	0.81140(17)	0.0664(8)
N1	-0.1688(4)	0.2399(2)	0.68816(19)	0.0552(8)
C2	-0.0294(4)	0.2274(2)	0.7535(2)	0.0510(9)
C3	0.0362(4)	0.1097(2)	0.7996(2)	0.0456(8)
C4	-0.0610(4)	0.0022(2)	0.7733(2)	0.0483(9)
C5	-0.2152(4)	0.0128(2)	0.7074(2)	0.0513(9)
C6	-0.2595(4)	0.1335(3)	0.6662(2)	0.0524(9)
C7	-0.4164(5)	0.1593(3)	0.5912(3)	0.0729(12)

C8	-0.3176(5)	-0.1063(3)	0.6833(3)	0.0643(11)
C9	-0.1810(6)	-0.1667(3)	0.5855(3)	0.0819(14)
C11	0.0025(6)	0.4580(3)	0.7292(3)	0.0729(13)
C12	0.1611(6)	0.4829(3)	0.6220(3)	0.0813(16)
C13	0.3618(6)	0.5244(4)	0.6530(3)	0.0957(17)
C14	0.2913(7)	0.5872(4)	0.7560(4)	0.1093(19)
C15	0.0536(7)	0.5541(3)	0.8038(3)	0.0926(15)
C16	0.1938(4)	0.0912(3)	0.8713(2)	0.0511(9)
C19	0.4424(5)	0.1777(3)	0.9605(2)	0.0630(11)
C20	0.5104(6)	0.3064(3)	0.9781(3)	0.0901(17)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

3) Bond Distances (Angstrom) for M7

010	-C2	1.341(3)		C7	-H7A	0.9598
010	-C11	1.467(4)		C7	-H7B	0.9606
017	-C16	1.224(4)		C7	-H7C	0.9599
018	-C16	1.314(4)		C8	-H8A	0.9701
018	-C19	1.452(4)		C8	-H8B	0.9697
021	-C4	1.348(3)		C9	-H9A	0.9604
021	-H21	1.0131		C9	-H9B	0.9596
N1	-C2	1.319(4)		C9	-H9C	0.9602
N1	-C6	1.351(4)		C11	-H11	0.9801
C2	-C3	1.410(3)		C12	-H12A	0.9700
C3	-C16	1.473(4)		C12	-H12B	0.9691
C3	-C4	1.402(3)		C13	-H13A	0.9702
C4	-C5	1.400(4)		C13	-H13B	0.9695
C5	-C8	1.512(4)		C14	-H14A	0.9691
C5	-C6	1.373(4)		C14	-H14B	0.9698
C6	-C7	1.506(4)		C15	-H15A	0.9703
C8	-C9	1.513(5)		C15	-H15B	0.9699
C11	-C15	1.526(5)		C19	-H19A	0.9701
C11	-C12	1.478(5)		C19	-H19B	0.9703
C12	-C13	1.490(5)		C20	-H20A	0.9596
C13	-C14	1.475(6)		C20	-H20B	0.9594
C14	-C15	1.519(6)		C20	-H20C	0.9593
C19	-C20	1.486(5)				

4) Bond Angles (Degrees) for M7

C2	-O10	-C11	120.0(2)		018	-C16	-C3	116.3(2)
C16	-O18	-C19	116.9(2)		017	-C16	-C3	122.1(3)
C4	-O21	-H21	104.38		018	-C19	-C20	107.3(3)
C2	-N1	-C6	118.1(2)		C6	-C7	-H7A	109.48
010	-C2	-N1	118.4(2)		C6	-C7	-H7B	109.53
010	-C2	-C3	117.3(2)		C6	-C7	-H7C	109.55
N1	-C2	-C3	124.2(2)		H7A	-C7	-H7B	109.40
C2	-C3	-C4	115.4(2)		H7A	-C7	-H7C	109.43
C2	-C3	-C16	126.1(2)		H7B	-C7	-H7C	109.45
C4	-C3	-C16	118.6(2)		C5	-C8	-H8A	109.02
021	-C4	-C5	117.0(2)		C5	-C8	-H8B	109.05
C3	-C4	-C5	121.7(2)		C9	-C8	-H8A	108.98
021	-C4	-C3	121.3(2)		C9	-C8	-H8B	109.06
C4	-C5	-C8	119.4(2)		H8A	-C8	-H8B	107.82
C6	-C5	-C8	124.1(2)		C8	-C9	-H9A	109.46
C4	-C5	-C6	116.5(2)		C8	-C9	-H9B	109.45
N1	-C6	-C7	113.5(3)		C8	-C9	-H9C	109.43
C5	-C6	-C7	122.5(3)		H9A	-C9	-H9B	109.53

N1	-C6	-C5	124.1(2)	H9A	-C9	-H9C	109.45
C5	-C8	-C9	112.8(3)	H9B	-C9	-H9C	109.51
O10	-C11	-C12	107.3(3)	O10	-C11	-H11	112.47
C12	-C11	-C15	105.9(3)	C12	-C11	-H11	112.42
O10	-C11	-C15	105.8(3)	C15	-C11	-H11	112.47
C11	-C12	-C13	104.5(3)	C11	-C12	-H12A	110.87
C12	-C13	-C14	106.8(3)	C11	-C12	-H12B	110.86
C13	-C14	-C15	107.7(3)	C13	-C12	-H12A	110.79
C11	-C15	-C14	104.1(3)	C13	-C12	-H12B	110.84
O17	-C16	-O18	121.6(2)	H12A	-C12	-H12B	108.97
C12	-C13	-H13A	110.30	C14	-C15	-H15B	110.98
C12	-C13	-H13B	110.38	H15A	-C15	-H15B	108.95
C14	-C13	-H13A	110.34	O18	-C19	-H19A	110.26
C14	-C13	-H13B	110.34	O18	-C19	-H19B	110.25
H13A	-C13	-H13B	108.63	C20	-C19	-H19A	110.29
C13	-C14	-H14A	110.19	C20	-C19	-H19B	110.23
C13	-C14	-H14B	110.17	H19A	-C19	-H19B	108.54
C15	-C14	-H14A	110.16	C19	-C20	-H20A	109.40
C15	-C14	-H14B	110.11	C19	-C20	-H20B	109.42
H14A	-C14	-H14B	108.46	C19	-C20	-H20C	109.43
C11	-C15	-H15A	110.93	H20A	-C20	-H20B	109.48
C11	-C15	-H15B	110.93	H20A	-C20	-H20C	109.50
C14	-C15	-H15A	110.92	H20B	-C20	-H20C	109.59

5) Torsion Angles (Degrees)
for M7

C11	-O10	-C2	-N1	-4.9(4)
C11	-O10	-C2	-C3	176.2(2)
C2	-O10	-C11	-C12	-86.2(3)
C2	-O10	-C11	-C15	161.1(3)
C19	-O18	-C16	-O17	1.4(4)
C19	-O18	-C16	-C3	-177.4(2)
C16	-O18	-C19	-C20	-178.2(2)
C6	-N1	-C2	-C3	1.9(4)
C6	-N1	-C2	-O10	-176.9(2)
C2	-N1	-C6	-C5	-0.2(4)
C2	-N1	-C6	-C7	179.8(2)
N1	-C2	-C3	-C16	178.9(2)
O10	-C2	-C3	-C4	177.6(2)
N1	-C2	-C3	-C4	-1.2(4)
O10	-C2	-C3	-C16	-2.2(4)
C2	-C3	-C4	-C5	-1.1(4)
C16	-C3	-C4	-O21	-0.6(4)
C2	-C3	-C4	-O21	179.5(2)
C2	-C3	-C16	-O17	-178.8(3)
C2	-C3	-C16	-O18	0.1(4)
C16	-C3	-C4	-C5	178.8(2)
C4	-C3	-C16	-O18	-179.8(2)
C4	-C3	-C16	-O17	1.3(4)
O21	-C4	-C5	-C8	0.4(4)
O21	-C4	-C5	-C6	-178.0(2)
C3	-C4	-C5	-C6	2.6(4)
C3	-C4	-C5	-C8	-179.0(3)
C6	-C5	-C8	-C9	93.8(3)
C8	-C5	-C6	-C7	-0.3(4)
C4	-C5	-C8	-C9	-84.5(3)
C4	-C5	-C6	-N1	-2.0(4)
C4	-C5	-C6	-C7	178.1(3)
C8	-C5	-C6	-N1	179.7(3)
C15	-C11	-C12	-C13	33.6(4)

O10	-C11	-C15	-C14	89.3(3)
O10	-C11	-C12	-C13	-79.1(3)
C12	-C11	-C15	-C14	-24.5(4)
C11	-C12	-C13	-C14	-29.8(4)
C12	-C13	-C14	-C15	14.4(4)
C13	-C14	-C15	-C11	6.0(4)

Données cristallographiques du composé Z3

1) Crystal Data and Details of the Structure Determination

Crystal Data

Empirical Formula	C16 H23 N O4
Formula Weight	293.35
Crystal System	Triclinic
Space group	P-1 (No. 2)
a, b, c [Angstrom]	8.508(1) 8.632(1) 12.322(1)
alpha, beta, gamma [deg]	82.541(5) 87.087(6) 63.100(6)
V [Ang ³]	800.16(15)
Z	2
D(calc) [g/cm ³]	1.218
F(000)	316
μ (CuK α) [/mm]	0.710
Crystal Size [mm]	0.06 x 0.40 x 0.42

Data Collection

Diffractometer	Enraf-Nonius CAD-4
Temperature (K)	293(2)
Radiation [Angstrom]	CuK α 1.54178
Theta Min-Max [Deg]	3.6, 72.0
Scan	$\theta/2\theta$
Absorption correction	analytical
Max. and min. transmission	0.9586 and 0.7546
Dataset	-9: 10 ; 0: 10 ; -15: 15
Tot., Uniq. Data, R(int)	3369, 3149, 0.018
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	2695

Refinement

Method	on F ²
Nref, Npar	3149, 194
R, wR ² , S	0.0778, 0.2524, 1.09
$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.1730P)^2 + 0.2010P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	
Max. and Av. Shift/Error	0.01, 0.00
Min. and Max. resd. dens. [e/Ang ³]	-0.31, 0.28

**2) Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement
Parameters of the non-Hydrogen atoms
for Z3**

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	----	----	----	-----
O10	0.2712(2)	0.20400(19)	0.32558(12)	0.0545(5)
O17	0.5957(2)	-0.1298(2)	0.18055(14)	0.0636(6)
O18	0.3570(2)	-0.1658(2)	0.15559(13)	0.0629(6)
O21	0.5247(2)	-0.42190(19)	0.36102(12)	0.0586(5)
N1	0.4086(2)	-0.2690(2)	0.50598(13)	0.0443(5)
C2	0.4483(3)	-0.2780(3)	0.39702(16)	0.0441(6)
C3	0.4008(3)	-0.1134(3)	0.33029(15)	0.0422(6)
C4	0.3184(2)	0.0412(3)	0.37657(16)	0.0413(6)
C5	0.2772(3)	0.0407(3)	0.49100(16)	0.0425(6)
C6	0.3243(2)	-0.1178(3)	0.55236(15)	0.0418(6)
C7	0.2887(3)	-0.1404(3)	0.67238(18)	0.0559(7)
C8	0.1775(3)	0.2104(3)	0.53943(18)	0.0499(7)
C9	-0.0211(3)	0.2774(4)	0.5301(3)	0.0716(9)
C11	0.2538(3)	0.2506(3)	0.20833(18)	0.0558(7)
C12	0.0897(4)	0.2497(4)	0.1654(3)	0.0799(11)
C13	-0.0577(5)	0.4312(5)	0.1746(4)	0.1003(14)
C14	0.0235(5)	0.5451(5)	0.1917(4)	0.1052(14)
C15	0.2194(4)	0.4410(3)	0.1888(3)	0.0722(9)
C16	0.4635(3)	-0.1362(3)	0.21491(16)	0.0465(6)
C19	0.4144(6)	-0.2047(7)	0.0446(2)	0.0983(15)
C20	0.2672(8)	-0.1887(8)	-0.0179(3)	0.124(2)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

**3) Bond Distances (Angstrom)
for Z3**

O10	-C4	1.348(3)	C7	-H7A	0.9603
O10	-C11	1.445(3)	C7	-H7B	0.9599
O17	-C16	1.204(3)	C7	-H7C	0.9603
O18	-C16	1.321(3)	C8	-H8A	0.9697
O18	-C19	1.458(3)	C8	-H8B	0.9694
O21	-C2	1.243(3)	C9	-H9A	0.9602
N1	-C2	1.371(3)	C9	-H9B	0.9603
N1	-C6	1.360(3)	C9	-H9C	0.9601
N1	-H1	0.9618	C11	-H11	0.9806
C2	-C3	1.438(3)	C12	-H12A	0.9708
C3	-C16	1.498(3)	C12	-H12B	0.9702
C3	-C4	1.381(3)	C13	-H13A	0.9698
C4	-C5	1.435(3)	C13	-H13B	0.9694
C5	-C8	1.508(3)	C14	-H14A	0.9704
C5	-C6	1.368(3)	C14	-H14B	0.9697
C6	-C7	1.500(3)	C15	-H15A	0.9700
C8	-C9	1.523(4)	C15	-H15B	0.9704
C11	-C15	1.521(3)	C19	-H19A	0.9702
C11	-C12	1.522(5)	C19	-H19B	0.9698
C12	-C13	1.515(5)	C20	-H20A	0.9603
C13	-C14	1.474(6)	C20	-H20B	0.9607
C14	-C15	1.495(6)	C20	-H20C	0.9602
C19	-C20	1.447(8)			

4) Bond Angles (Degrees)
for Z3

C4	-O10	-C11	124.50(17)	O17	-C16	-O18	124.02(19)
C16	-O18	-C19	116.1(3)	O17	-C16	-C3	124.1(2)
C2	-N1	-C6	124.67(17)	O18	-C16	-C3	111.8(2)
C6	-N1	-H1	119.37	O18	-C19	-C20	109.2(4)
C2	-N1	-H1	115.80	C6	-C7	-H7A	109.45
O21	-C2	-C3	123.43(18)	C6	-C7	-H7B	109.50
O21	-C2	-N1	120.61(19)	C6	-C7	-H7C	109.50
N1	-C2	-C3	115.93(19)	H7A	-C7	-H7B	109.46
C2	-C3	-C16	112.32(19)	H7A	-C7	-H7C	109.44
C2	-C3	-C4	120.09(18)	H7B	-C7	-H7C	109.47
C4	-C3	-C16	127.4(2)	C5	-C8	-H8A	109.31
O10	-C4	-C5	112.27(19)	C5	-C8	-H8B	109.29
C3	-C4	-C5	120.9(2)	C9	-C8	-H8A	109.29
O10	-C4	-C3	126.84(18)	C9	-C8	-H8B	109.26
C6	-C5	-C8	121.75(19)	H8A	-C8	-H8B	107.99
C4	-C5	-C6	117.7(2)	C8	-C9	-H9A	109.49
C4	-C5	-C8	120.5(2)	C8	-C9	-H9B	109.45
C5	-C6	-C7	124.2(2)	C8	-C9	-H9C	109.48
N1	-C6	-C7	115.11(19)	H9A	-C9	-H9B	109.45
N1	-C6	-C5	120.71(17)	H9A	-C9	-H9C	109.46
C5	-C8	-C9	111.6(2)	H9B	-C9	-H9C	109.49
O10	-C11	-C12	111.2(2)	O10	-C11	-H11	111.56
O10	-C11	-C15	105.6(2)	C12	-C11	-H11	111.52
C12	-C11	-C15	105.1(2)	C15	-C11	-H11	111.57
C11	-C12	-C13	105.4(3)	C11	-C12	-H12A	110.67
C12	-C13	-C14	107.7(4)	C11	-C12	-H12B	110.66
C13	-C14	-C15	108.8(3)	C13	-C12	-H12A	110.67
C11	-C15	-C14	105.2(3)	C13	-C12	-H12B	110.67
H12A	-C12	-H12B	108.76	C14	-C15	-H15B	110.72
C12	-C13	-H13A	110.18	H15A	-C15	-H15B	108.75
C12	-C13	-H13B	110.18	O18	-C19	-H19A	109.84
C14	-C13	-H13A	110.14	O18	-C19	-H19B	109.89
C14	-C13	-H13B	110.21	C20	-C19	-H19A	109.82
H13A	-C13	-H13B	108.46	C20	-C19	-H19B	109.83
C13	-C14	-H14A	109.87	H19A	-C19	-H19B	108.28
C13	-C14	-H14B	109.93	C19	-C20	-H20A	109.46
C15	-C14	-H14A	109.95	C19	-C20	-H20B	109.47
C15	-C14	-H14B	109.97	C19	-C20	-H20C	109.51
H14A	-C14	-H14B	108.36	H20A	-C20	-H20B	109.50
C11	-C15	-H15A	110.70	H20A	-C20	-H20C	109.44
C11	-C15	-H15B	110.69	H20B	-C20	-H20C	109.45
C14	-C15	-H15A	110.74				

5) Torsion Angles (Degrees)
for Z3

C11	-O10	-C4	-C3	18.1(4)
C11	-O10	-C4	-C5	-163.4(2)
C4	-O10	-C11	-C12	72.9(3)
C4	-O10	-C11	-C15	-173.7(2)
C19	-O18	-C16	-O17	4.5(4)
C19	-O18	-C16	-C3	-174.9(3)
C16	-O18	-C19	-C20	-165.2(4)
C6	-N1	-C2	-O21	-179.5(2)
C6	-N1	-C2	-C3	2.2(4)
C2	-N1	-C6	-C7	177.6(2)
C2	-N1	-C6	-C5	-2.2(3)
O21	-C2	-C3	-C4	-179.0(2)

N1	-C2	-C3	-C16	174.8(2)
O21	-C2	-C3	-C16	-3.5(4)
N1	-C2	-C3	-C4	-0.8(4)
C16	-C3	-C4	-O10	3.0(4)
C2	-C3	-C4	-C5	-0.7(4)
C2	-C3	-C4	-O10	177.8(2)
C16	-C3	-C4	-C5	-175.5(3)
C2	-C3	-C16	-O17	-98.4(3)
C2	-C3	-C16	-O18	81.0(3)
C4	-C3	-C16	-O17	76.7(4)
C4	-C3	-C16	-O18	-103.8(3)
O10	-C4	-C5	-C6	-177.9(2)
O10	-C4	-C5	-C8	5.0(3)
C3	-C4	-C5	-C6	0.8(4)
C3	-C4	-C5	-C8	-176.3(2)
C6	-C5	-C8	-C9	-89.7(3)
C4	-C5	-C6	-N1	0.6(3)
C4	-C5	-C6	-C7	-179.2(2)
C8	-C5	-C6	-N1	177.6(2)
C8	-C5	-C6	-C7	-2.2(4)
C4	-C5	-C8	-C9	87.3(3)
O10	-C11	-C12	-C13	87.4(3)
C15	-C11	-C12	-C13	-26.3(3)
O10	-C11	-C15	-C14	-89.9(3)
C12	-C11	-C15	-C14	27.7(3)
C11	-C12	-C13	-C14	15.1(4)
C12	-C13	-C14	-C15	2.3(5)
C13	-C14	-C15	-C11	-18.8(4)

Données cristallographiques du composé Z37A

1) Crystal Data and Details of the Structure Determination

Crystal Data

Empirical Formula	C19 H29 N O4
Formula Weight	335.43
Crystal System	Triclinic
Space group	P-1 (No. 2)
a, b, c [Angstrom]	8.518(1) 9.220(2) 13.436(1)
alpha, beta, gamma [deg]	88.906(6) 82.053(4) 66.369(7)
V [Ang ³]	956.7(3)
Z	2
D(calc) [g/cm ³]	1.164
F(000)	364
μ (CuK α) [/mm]	0.7
Crystal Size [mm]	0.13 x 0.30 x 0.34

Data Collection

Diffractometer	Enraf-Nonius CAD-4
Temperature (K)	293(2)
Radiation [Angstrom]	CuK α 1.54178
Theta Min-Max [Deg]	3.3, 72.0
Scan	$\theta/2\theta$
Absorption correction	analytical
Max. and min. transmission	0.9201 and 0.8089
Dataset	-9: 10 ; 0: 11 ; -16: 16
Tot., Uniq. Data, R(int)	4012, 3764, 0.014
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	3067

Refinement

Method	on F ²
Nref, Npar	3764, 223
R, wR ² , S	0.0526, 0.1845, 1.46
$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.1000P)^2 + 0.0000P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	
Max. and Av. Shift/Error	0.01, 0.00
Min. and Max. resd. dens. [e/Ang ³]	-0.30, 0.29

2) Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement
Parameters of the non-Hydrogen atoms
for Z37A

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	----	----	----	-----
O10	0.30110(13)	0.70035(14)	0.17048(8)	0.0525(3)
O20	0.60539(18)	0.38326(16)	0.27968(10)	0.0685(5)
O21	0.69657(17)	0.56626(16)	0.32067(9)	0.0626(4)
O24	0.92254(14)	0.46173(18)	0.12472(9)	0.0697(5)
N1	0.77052(16)	0.59599(18)	0.00229(10)	0.0523(4)
C2	0.77901(19)	0.5409(2)	0.09734(11)	0.0515(5)
C3	0.61642(18)	0.57466(18)	0.15989(11)	0.0456(4)
C4	0.46376(17)	0.65951(17)	0.12198(11)	0.0427(4)
C5	0.46486(18)	0.71192(18)	0.02111(11)	0.0444(4)
C6	0.62154(19)	0.67725(19)	-0.03645(11)	0.0465(4)
C7	0.6462(2)	0.7237(2)	-0.14290(12)	0.0585(6)
C8	0.29756(19)	0.8064(2)	-0.01955(12)	0.0522(5)
C9	0.2399(3)	0.9835(2)	-0.00411(15)	0.0674(6)
C11	0.25389(19)	0.7002(2)	0.27879(12)	0.0536(5)
C12	0.2896(2)	0.8242(2)	0.33238(12)	0.0595(5)
C13	0.1792(2)	0.9929(2)	0.30831(13)	0.0593(6)
C14	-0.0120(2)	1.0227(2)	0.32324(15)	0.0646(6)
C15	-0.0505(2)	0.9031(2)	0.26617(13)	0.0568(5)
C16	0.0623(2)	0.7345(2)	0.29250(14)	0.0583(5)
C17	0.2149(3)	1.1119(3)	0.36907(18)	0.0869(9)
C18	-0.2416(2)	0.9340(3)	0.28488(19)	0.0817(8)
C19	0.63652(18)	0.49693(19)	0.25845(11)	0.0485(5)
C22	0.7322(4)	0.4918(3)	0.41606(16)	0.0914(9)
C23	0.7133(6)	0.6089(5)	0.4902(2)	0.1280(17)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

3) Bond Distances (Angstrom)
for Z37A

O10	-C4	1.352(2)		C7	-H7B	0.9597
O10	-C11	1.4553(19)		C7	-H7C	0.9599
O20	-C19	1.200(2)		C8	-H8A	0.9700
O21	-C19	1.330(2)		C8	-H8B	0.9702
O21	-C22	1.454(3)		C9	-H9A	0.9598
O24	-C2	1.250(2)		C9	-H9B	0.9597
N1	-C2	1.366(2)		C9	-H9C	0.9595
N1	-C6	1.359(2)		C11	-H11	0.9795
N1	-H1	0.8708		C12	-H12A	0.9705
C2	-C3	1.437(2)		C12	-H12B	0.9694
C3	-C4	1.384(2)		C13	-H13	0.9803
C3	-C19	1.492(2)		C14	-H14A	0.9703
C4	-C5	1.430(2)		C14	-H14B	0.9698
C5	-C8	1.513(2)		C15	-H15	0.9800
C5	-C6	1.365(2)		C16	-H16A	0.9701
C6	-C7	1.496(2)		C16	-H16B	0.9700
C8	-C9	1.514(2)		C17	-H17A	0.9593
C11	-C12	1.513(2)		C17	-H17B	0.9605
C11	-C16	1.517(3)		C17	-H17C	0.9606
C12	-C13	1.517(2)		C18	-H52A	0.9599
C13	-C17	1.527(3)		C18	-H52B	0.9604
C13	-C14	1.524(3)		C18	-H52C	0.9599
C14	-C15	1.518(3)		C22	-H22A	0.9707
C15	-C18	1.520(3)		C22	-H22B	0.9698

C15	-C16	1.530(2)		C23	-H23A	0.9592
C22	-C23	1.429(4)		C23	-H23B	0.9602
C7	-H7A	0.9606		C23	-H23C	0.9604

4) Bond Angles (Degrees)
for Z37A

C4	-O10	-C11	125.43(13)		C13	-C14	-C15	113.35(15)
C19	-O21	-C22	116.25(17)		C14	-C15	-C16	110.28(15)
C2	-N1	-C6	124.92(15)		C16	-C15	-C18	111.32(16)
C2	-N1	-H1	119.64		C14	-C15	-C18	111.90(16)
C6	-N1	-H1	115.44		C11	-C16	-C15	113.20(15)
O24	-C2	-N1	120.14(15)		O20	-C19	-O21	123.17(15)
N1	-C2	-C3	116.30(15)		O20	-C19	-C3	124.56(15)
O24	-C2	-C3	123.52(14)		O21	-C19	-C3	112.26(14)
C4	-C3	-C19	127.41(15)		O21	-C22	-C23	109.4(2)
C2	-C3	-C19	112.93(14)		C6	-C7	-H7A	109.47
C2	-C3	-C4	119.40(14)		C6	-C7	-H7B	109.48
O10	-C4	-C3	126.78(13)		C6	-C7	-H7C	109.46
O10	-C4	-C5	112.00(13)		H7A	-C7	-H7B	109.45
C3	-C4	-C5	121.20(14)		H7A	-C7	-H7C	109.46
C4	-C5	-C6	117.90(15)		H7B	-C7	-H7C	109.51
C6	-C5	-C8	121.11(14)		C5	-C8	-H8A	109.03
C4	-C5	-C8	120.98(14)		C5	-C8	-H8B	109.04
N1	-C6	-C7	114.86(15)		C9	-C8	-H8A	109.04
N1	-C6	-C5	120.27(14)		C9	-C8	-H8B	109.02
C5	-C6	-C7	124.87(15)		H8A	-C8	-H8B	107.81
C5	-C8	-C9	112.79(16)		C8	-C9	-H9A	109.47
O10	-C11	-C12	111.09(13)		C8	-C9	-H9B	109.44
C12	-C11	-C16	111.94(14)		C8	-C9	-H9C	109.47
O10	-C11	-C16	104.26(13)		H9A	-C9	-H9B	109.46
C11	-C12	-C13	113.78(15)		H9A	-C9	-H9C	109.47
C12	-C13	-C17	111.00(16)		H9B	-C9	-H9C	109.51
C12	-C13	-C14	110.94(15)		O10	-C11	-H11	109.77
C14	-C13	-C17	112.21(16)		C12	-C11	-H11	109.83
C16	-C11	-H11	109.82		C13	-C17	-H17B	109.50
C11	-C12	-H12A	108.78		C13	-C17	-H17C	109.48
C11	-C12	-H12B	108.80		H17A	-C17	-H17B	109.50
C13	-C12	-H12A	108.80		H17A	-C17	-H17C	109.47
C13	-C12	-H12B	108.82		H17B	-C17	-H17C	109.40
H12A	-C12	-H12B	107.70		C15	-C18	-H52A	109.47
C12	-C13	-H13	107.53		C15	-C18	-H52B	109.46
C14	-C13	-H13	107.44		C15	-C18	-H52C	109.45
C17	-C13	-H13	107.47		H52A	-C18	-H52B	109.50
C13	-C14	-H14A	108.91		H52A	-C18	-H52C	109.48
C13	-C14	-H14B	108.92		H52B	-C18	-H52C	109.47
C15	-C14	-H14A	108.89		O21	-C22	-H22A	109.77
C15	-C14	-H14B	108.92		O21	-C22	-H22B	109.80
H14A	-C14	-H14B	107.70		C23	-C22	-H22A	109.79
C14	-C15	-H15	107.73		C23	-C22	-H22B	109.86
C16	-C15	-H15	107.74		H22A	-C22	-H22B	108.24
C18	-C15	-H15	107.67		C22	-C23	-H23A	109.48
C11	-C16	-H16A	108.93		C22	-C23	-H23B	109.47
C11	-C16	-H16B	108.96		C22	-C23	-H23C	109.47
C15	-C16	-H16A	108.94		H23A	-C23	-H23B	109.46
C15	-C16	-H16B	108.94		H23A	-C23	-H23C	109.50
H16A	-C16	-H16B	107.73		H23B	-C23	-H23C	109.44
C13	-C17	-H17A	109.48					

5) Torsion Angles (Degrees)
for Z37A

C11	-010	-C4	-C3	17.2(2)
C11	-010	-C4	-C5	-164.03(14)
C4	-010	-C11	-C12	66.16(19)
C4	-010	-C11	-C16	-173.09(14)
C22	-021	-C19	-020	3.1(3)
C22	-021	-C19	-C3	-175.76(18)
C19	-021	-C22	-C23	-152.2(3)
C2	-N1	-C6	-C7	-179.47(15)
C6	-N1	-C2	-024	177.10(17)
C6	-N1	-C2	-C3	-0.8(2)
C2	-N1	-C6	-C5	1.1(3)
024	-C2	-C3	-C4	-178.12(16)
024	-C2	-C3	-C19	-3.6(2)
N1	-C2	-C3	-C4	-0.3(2)
N1	-C2	-C3	-C19	174.22(14)
C4	-C3	-C19	-020	68.6(2)
C4	-C3	-C19	-021	-112.60(19)
C2	-C3	-C4	-010	179.69(16)
C2	-C3	-C4	-C5	1.1(2)
C19	-C3	-C4	-010	6.0(3)
C19	-C3	-C4	-C5	-172.59(15)
C2	-C3	-C19	-020	-105.4(2)
C2	-C3	-C19	-021	73.40(18)
010	-C4	-C5	-C6	-179.58(14)
010	-C4	-C5	-C8	1.9(2)
C3	-C4	-C5	-C6	-0.8(2)
C3	-C4	-C5	-C8	-179.25(15)
C4	-C5	-C6	-N1	-0.3(2)
C4	-C5	-C6	-C7	-179.65(15)
C8	-C5	-C6	-N1	178.18(15)
C6	-C5	-C8	-C9	-87.28(19)
C8	-C5	-C6	-C7	-1.2(3)
C4	-C5	-C8	-C9	91.16(19)
C12	-C11	-C16	-C15	51.69(19)
010	-C11	-C12	-C13	65.11(19)
C16	-C11	-C12	-C13	-50.99(19)
010	-C11	-C16	-C15	-68.49(17)
C11	-C12	-C13	-C14	51.46(19)
C11	-C12	-C13	-C17	176.95(16)
C12	-C13	-C14	-C15	-53.5(2)
C17	-C13	-C14	-C15	-178.26(16)
C13	-C14	-C15	-C16	54.1(2)
C13	-C14	-C15	-C18	178.57(17)
C14	-C15	-C16	-C11	-53.0(2)
C18	-C15	-C16	-C11	-177.80(16)

Données cristallographiques du composé Z37inv

1) Crystal Data and Details of the Structure Determination

Crystal Data

Empirical Formula	C19 H29 N O4
Formula Weight	335.43
Crystal System	Monoclinic
Space group	P21/c (No. 14)
a, b, c [Angstrom]	13.488(3) 9.064(2) 16.5840(10)
alpha, beta, gamma [deg]	90 110.617(16) 90
V [Ang ³]	1897.6(6)
Z	4
D(calc) [g/cm ³]	1.174
F(000)	728
μ (CuK α) [/mm]	0.7
Crystal Size [mm]	0.25 x 0.34 x 0.45

Data Collection

Diffractometer	Enraf-Nonius CAD4
Temperature (K)	293(2)
Radiation [Angstrom]	CuK α 1.54178
Theta Min-Max [Deg]	3.5, 75.0
Scan	$\theta/2\theta$
Absorption correction	none
Max. and min. transmission	/
Dataset	0: 16 ; 0: 11 ; -20: 19
Tot., Uniq. Data, R(int)	4075, 3907, 0.097
Observed data [I > 2.0 sigma(I)]	3223

Refinement

Method	on F ²
Nref, Npar	3907, 221
R, wR ² , S	0.0825, 0.2219, 1.69
$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.1000P)^2 + 0.0000P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	
Max. and Av. Shift/Error	0.00, 0.00
Min. and Max. resd. dens. [e/Ang ³]	-0.34, 0.42

**2) Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement
Parameters of the non-Hydrogen atoms
for Z37inv**

Atom	x	y	z	U(eq) [Ang ²]
----	---	---	---	-----
O10	0.29246	0.63443	0.43058	0.0508
O20	0.22981	0.94247	0.31657	0.0863
O21	0.32634	1.02604	0.44610	0.0603
O24	0.09143	1.05223	0.45023	0.0566
N1	0.08081	0.83770	0.51823	0.0457
C2	0.12266	0.92349	0.46935	0.0459
C3	0.19935	0.85091	0.44179	0.0448
C4	0.22367	0.70576	0.46152	0.0444
C5	0.18426	0.62580	0.51780	0.0461
C6	0.11118	0.69770	0.54431	0.0457
C7	0.05942	0.63227	0.60299	0.0583
C8	0.22577	0.47512	0.55008	0.0572
C9	0.32938	0.48299	0.62713	0.0847
C11	0.24852	0.59931	0.33817	0.0498
C12	0.18079	0.46346	0.32217	0.0560
C13	0.14044	0.41942	0.22683	0.0629
C14	0.23400	0.40634	0.19571	0.0721
C15	0.30371	0.54271	0.21270	0.0692
C16	0.34129	0.58281	0.30810	0.0619
C17	0.07490	0.27994	0.21253	0.0877
C18	0.39700	0.52410	0.18180	0.1150
C19	0.25139	0.94246	0.39271	0.0492
C22	0.38529	1.12049	0.40817	0.0719
C23	0.44833	1.22522	0.47542	0.0923

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

**3) Bond Distances (Angstrom)
for Z37inv**

O10	-C4	1.3702	C7	-H7B	0.9600
O10	-C11	1.4702	C7	-H7C	0.9601
O20	-C19	1.1918	C8	-H8A	0.9700
O21	-C19	1.3227	C8	-H8B	0.9700
O21	-C22	1.4536	C9	-H9A	0.9600
O24	-C2	1.2432	C9	-H9B	0.9601
N1	-C2	1.3794	C9	-H9C	0.9599
N1	-C6	1.3566	C11	-H11	0.9801
N1	-H1	0.8901	C12	-H12A	0.9700
C2	-C3	1.4299	C12	-H12B	0.9701
C3	-C4	1.3675	C13	-H13	0.9800
C3	-C19	1.4987	C14	-H14A	0.9699
C4	-C5	1.4242	C14	-H14B	0.9701
C5	-C8	1.5014	C15	-H15	0.9801
C5	-C6	1.3765	C16	-H16A	0.9700
C6	-C7	1.5049	C16	-H16B	0.9700
C8	-C9	1.5275	C17	-H17A	0.9601
C11	-C12	1.5002	C17	-H17B	0.9600
C11	-C16	1.5087	C17	-H17C	0.9599
C12	-C13	1.5328	C18	-H18A	0.9601
C13	-C17	1.5127	C18	-H18B	0.9600
C13	-C14	1.5269	C18	-H18C	0.9598
C14	-C15	1.5181	C22	-H22A	0.9700
C15	-C18	1.5259	C22	-H22B	0.9700

C15	-C16	1.5256		C23	-H23A	0.9600
C22	-C23	1.4833		C23	-H23B	0.9602
C7	-H7A	0.9600		C23	-H23C	0.9600

4) Bond Angles (Degrees)
for Z37inv

C4	-O10	-C11	114.51		C13	-C14	-C15	113.93
C19	-O21	-C22	116.95		C14	-C15	-C16	110.14
C2	-N1	-C6	125.07		C16	-C15	-C18	111.25
C2	-N1	-H1	116.36		C14	-C15	-C18	112.19
C6	-N1	-H1	118.20		C11	-C16	-C15	110.80
O24	-C2	-N1	120.46		O20	-C19	-O21	123.58
N1	-C2	-C3	114.85		O20	-C19	-C3	126.09
O24	-C2	-C3	124.65		O21	-C19	-C3	110.32
C4	-C3	-C19	122.95		O21	-C22	-C23	107.92
C2	-C3	-C19	116.66		C6	-C7	-H7A	109.48
C2	-C3	-C4	120.38		C6	-C7	-H7B	109.47
O10	-C4	-C3	120.09		C6	-C7	-H7C	109.48
O10	-C4	-C5	117.61		H7A	-C7	-H7B	109.47
C3	-C4	-C5	122.21		H7A	-C7	-H7C	109.46
C4	-C5	-C6	116.29		H7B	-C7	-H7C	109.47
C6	-C5	-C8	122.40		C5	-C8	-H8A	109.25
C4	-C5	-C8	121.21		C5	-C8	-H8B	109.25
N1	-C6	-C7	114.71		C9	-C8	-H8A	109.24
N1	-C6	-C5	120.72		C9	-C8	-H8B	109.25
C5	-C6	-C7	124.57		H8A	-C8	-H8B	107.92
C5	-C8	-C9	111.85		C8	-C9	-H9A	109.47
O10	-C11	-C12	111.04		C8	-C9	-H9B	109.47
C12	-C11	-C16	112.61		C8	-C9	-H9C	109.47
O10	-C11	-C16	106.81		H9A	-C9	-H9B	109.47
C11	-C12	-C13	111.66		H9A	-C9	-H9C	109.48
C12	-C13	-C17	110.79		H9B	-C9	-H9C	109.47
C12	-C13	-C14	109.47		O10	-C11	-H11	108.77
C14	-C13	-C17	112.89		C12	-C11	-H11	108.76
C16	-C11	-H11	108.77		C13	-C17	-H17B	109.47
C11	-C12	-H12A	109.28		C13	-C17	-H17C	109.47
C11	-C12	-H12B	109.29		H17A	-C17	-H17B	109.48
C13	-C12	-H12A	109.30		H17A	-C17	-H17C	109.47
C13	-C12	-H12B	109.29		H17B	-C17	-H17C	109.48
H12A	-C12	-H12B	107.95		C15	-C18	-H18A	109.47
C12	-C13	-H13	107.84		C15	-C18	-H18B	109.47
C14	-C13	-H13	107.83		C15	-C18	-H18C	109.48
C17	-C13	-H13	107.84		H18A	-C18	-H18B	109.47
C13	-C14	-H14A	108.77		H18A	-C18	-H18C	109.47
C13	-C14	-H14B	108.77		H18B	-C18	-H18C	109.47
C15	-C14	-H14A	108.77		O21	-C22	-H22A	110.12
C15	-C14	-H14B	108.77		O21	-C22	-H22B	110.11
H14A	-C14	-H14B	107.66		C23	-C22	-H22A	110.12
C14	-C15	-H15	107.68		C23	-C22	-H22B	110.12
C16	-C15	-H15	107.68		H22A	-C22	-H22B	108.45
C18	-C15	-H15	107.69		C22	-C23	-H23A	109.47
C11	-C16	-H16A	109.49		C22	-C23	-H23B	109.47
C11	-C16	-H16B	109.49		C22	-C23	-H23C	109.47
C15	-C16	-H16A	109.48		H23A	-C23	-H23B	109.47
C15	-C16	-H16B	109.48		H23A	-C23	-H23C	109.47
H16A	-C16	-H16B	108.06		H23B	-C23	-H23C	109.47
C13	-C17	-H17A	109.47					

5) Torsion Angles (Degrees)
for Z37inv

C11	-010	-C4	-C5	109.88
C4	-010	-C11	-C16	156.77
C4	-010	-C11	-C12	-80.11
C11	-010	-C4	-C3	-73.48
C22	-021	-C19	-C3	179.31
C19	-021	-C22	-C23	168.49
C22	-021	-C19	-020	-0.86
C2	-N1	-C6	-C7	175.33
C6	-N1	-C2	-C3	3.67
C6	-N1	-C2	-024	-178.28
C2	-N1	-C6	-C5	-4.38
N1	-C2	-C3	-C4	2.22
024	-C2	-C3	-C19	5.37
N1	-C2	-C3	-C19	-176.67
024	-C2	-C3	-C4	-175.73
C19	-C3	-C4	-C5	171.40
C19	-C3	-C4	-010	-5.08
C4	-C3	-C19	-021	-100.22
C2	-C3	-C19	-020	-101.18
C2	-C3	-C4	-C5	-7.43
C2	-C3	-C4	-010	176.09
C4	-C3	-C19	-020	79.95
C2	-C3	-C19	-021	78.65
010	-C4	-C5	-C8	6.77
C3	-C4	-C5	-C8	-169.79
C3	-C4	-C5	-C6	6.65
010	-C4	-C5	-C6	-176.78
C6	-C5	-C8	-C9	-94.27
C4	-C5	-C8	-C9	81.96
C4	-C5	-C6	-C7	179.46
C8	-C5	-C6	-C7	-4.14
C8	-C5	-C6	-N1	175.55
C4	-C5	-C6	-N1	-0.85
010	-C11	-C16	-C15	178.77
C12	-C11	-C16	-C15	56.63
C16	-C11	-C12	-C13	-56.45
010	-C11	-C12	-C13	-176.17
C11	-C12	-C13	-C14	53.29
C11	-C12	-C13	-C17	178.43
C17	-C13	-C14	-C15	-177.60
C12	-C13	-C14	-C15	-53.68
C13	-C14	-C15	-C18	179.18
C13	-C14	-C15	-C16	54.66
C14	-C15	-C16	-C11	-54.33
C18	-C15	-C16	-C11	-179.39