

MASTER 1^{re} année CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UEM 919 – Initiation à la Découverte de Médicaments

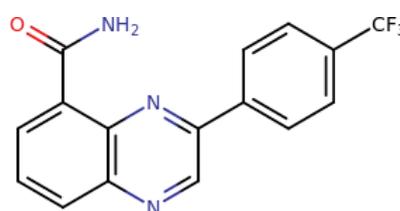
Travaux Pratiques de Modélisation Moléculaire

Introduction

Les Poly(ADP-Ribose)-Polymérase (PARP) sont des enzymes essentielles à la réparation des molécules d'ADN endommagées et constituent des cibles biologiques importantes dans la recherche contre le cancer. Cependant la plupart des inhibiteurs de PARP ne sont pas sélectifs des différentes isoformes de la protéine, pouvant entraîner des effets secondaires indésirables. L'objectif de ces TP est d'identifier et d'optimiser des inhibiteurs sélectifs de PARP-2 par rapport à PARP-1, à l'aide d'outils de modélisation moléculaire et de chimoinformatique. Pour cela, nous nous appuyerons sur les travaux d'Ishida *et al.* publiés dans l'article « Discovery of potent and selective PARP-1 and PARP-2 inhibitors ». *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14 : 1378-1390, et notamment sur leur découverte de deux inhibiteurs sélectifs de PARP-2 à base de quinoxaline (figure ci-dessous).



Inhibiteur 1
PARP-1 IC₅₀ = 101 nM
PARP2 IC₅₀ = 8 nM



Inhibiteur 2
PARP-1 IC₅₀ = 118 nM
PARP2 IC₅₀ = 11 nM

Partie I : Étude des interactions de deux inhibiteurs sélectifs connus de PARP-1 et PARP-2

Récupération des structures de PARP-1 et PARP-2 :

- Aller sur le site de la Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>).
- Rechercher et étudier la fiche PDB des deux complexes 1WOK (PARP-1) et 4ZZX (PARP-2).
- Télécharger leur structure (1wok.pdb et 4zzx.pdb) sur l'ordinateur.

Préparation d'une structure « apo » de PARP-1 et localisation du site catalytique :

- Ouvrir le fichier 1wok.pdb avec le logiciel Chimera.
- Actionner le menu Select > Chain > A puis Select > Invert (all models) puis Actions > Atoms/Bonds > Delete.
- Sauvegarder la structure restante avec le menu File > Save PDB... en renseignant le champ File name avec le nom 1wok_chA.pdb.
- Actionner le menu Select > Residue > CNQ et lancer la commande Tools > Structure

Analysis > Axes/Planes/Centroids. Dans la fenêtre qui apparaît, cliquer sur Define centroid... puis sur OK puis Close. Revenir à la fenêtre principale de Chimera, actionner la commande Favorites > Reply Log et relever les coordonnées du centroïde du ligand qui permet de localiser le site de liaison. Cliquer sur Close.

- Lancer le menu Actions > Atoms/Bonds > Delete.
- Sauvegarder la structure de la protéine sous le nom 1wok_apo.pdb.
- Actionner le menu File > Close session.

Préparation d'une structure « apo » de PARP-2 et localisation du site catalytique :

- Procéder de même avec le fichier 4zzx.pdb. À noter que dans cette structure PDB, le ligand a pour code FSU. Après l'avoir supprimé, supprimer également les molécules d'eau co-cristallisées (Select > Residue > HOH puis Actions > Atoms/Bonds > Delete) avant de sauvegarder la structure de la protéine sous le nom de fichier 4zzx_apo.pdb.

Génération d'une structure 3D des inhibiteurs 1 et 2 :

- Ouvrir la page <https://molview.org> avec un navigateur internet.
- Dessiner la structure plane de l'inhibiteur 1 puis cliquer sur le bouton 2D to 3D.
- Actionner le menu Tools > MOL file et enregistrer la structure tridimensionnelle de la molécule sous le nom inhibiteur1.mol.
- Procéder de même pour l'inhibiteur 2.

Amarrage moléculaire de l'inhibiteur 1 sur PARP-1 :

- Ouvrir successivement le fichier 1wok_apo.pdb puis le fichier inhibiteur1.mol dans Chimera.
- Lancer l'interface de contrôle du programme d'amarrage moléculaire AutoDock Vina en actionnant le menu Tools > Surface/Binding Analysis > AutoDock Vina.
- Dans la fenêtre qui apparaît, cliquer sur Browse, saisir un nom pour le fichier de résultats (parp1_inhib1.pdbqt par exemple), et cliquer sur Set Output Location. Choisir respectivement les modèles #0 et #1 dans les champs Receptor et Ligand. Recopier les coordonnées du barycentre du site catalytique dans les 3 champs Center (en appuyant sur la touche tabulation (⇧) à la fin de chaque saisie), puis indiquer 20 (Å) pour chacune des dimensions de la boîte (Size). Le volume dans lequel la recherche sera effectuée doit apparaître sous forme d'un cube aux arêtes vertes. Lancer l'amarrage moléculaire en cliquant sur OK, puis attendre la fin du calcul.
- Lorsqu'il est terminé, une fenêtre de résultats appelée ViewDock doit apparaître. Visualiser les modes de liaisons théoriques proposées par AutoDock Vina en cliquant successivement sur la ligne correspondant à chaque modèle.
- Pour sélectionner le mode de liaison le plus probable, ouvrir la structure 1wok_chA.pdb et comparer les modèles proposés par AutoDock Vina avec le mode de liaison expérimentale du ligand CNQ.
- Noter la valeur de l'énergie libre d'association (colonne score en kcal/mol) de l'inhibiteur 1.
- Pour le mode de liaison le plus probable, cliquer sur un des atomes du ligand en maintenant la touche Ctrl puis appuyer sur la flèche ↑.
- Actionner la commande Tools > Structure Analysis > Find Clashes/Contacts. Dans la fenêtre qui apparaît, cliquer sur les boutons Designate puis cocher l'option second set of designated atoms. Revenir à la fenêtre principale de Chimera et actionner le menu Select > Chain > A > 1wok_apo.pdb. Revenir à la fenêtre Find Clashes/Contacts et cliquer sur Designate selection as second set. Cliquer sur Contact, vérifier que l'option If hidden, show endpoint residue est bien cochée, puis cliquer sur OK.
- Faire un schéma des interactions de l'inhibiteur 1 avec la protéine en dessinant la structure 2D du ligand et en positionnant autour les acides aminés qui sont en contact.

Amarrage moléculaire de l'inhibiteur 2 sur PARP-1 puis des inhibiteurs 1 et 2 sur PARP-2 :

- Procéder de même pour l'inhibiteur 2.
- Puis lancer un *docking* des inhibiteurs 1 et 2 sur la structure 4zzx_apo.pdb de PARP-2.

Conclusion :

- Peut-on vérifier qualitativement que les inhibiteurs 1 et 2 sont sélectifs de PARP-2 ?

Partie II : Criblage de fingerprints

Recherche de composés similaires aux inhibiteurs 1 ou 2 :

- Aller sur le site de SwissSimilarity (<http://www.swisssimilarity.ch>).
- Dessiner la structure plane de l'inhibiteur 1 ou 2.
- Dans la colonne FP2 fingerprints, choisir la base de données ChEMBL (activity < 10 μM).
- Cliquer sur le bouton Submit et attendre plusieurs minutes les résultats de la recherche.

Sélection de composés similaires aux deux inhibiteurs 1 et 2 :

- Parmi les molécules issues du criblage, sélectionner deux molécules (qu'on appellera 3 et 4) ayant une charpente différente des inhibiteurs 1 et 2. Générer leur structure 3D avec molview (et enregistrer les dans des fichiers inhibiteur3.mol et inhibiteur4.mol).

Amarrage moléculaire des composés sélectionnés sur PARP-1 et PARP-2 :

- En mettant en œuvre un protocole analogue à celui employé dans la **Partie I**, lancer un *docking* des composés 3 et 4 sur les structures 1wok_apo.pdb de PARP-1 et 4zzx_apo.pdb de PARP-2.

Conclusions :

- Comparer l'affinité des composés 3 et 4 avec celle des inhibiteurs 1 et 2.
- Ces composés sont-ils plus sélectifs de PARP-2 que les inhibiteurs 1 et 2 ?

Partie III : Criblage de pharmacophores

Recherche de composés ayant les mêmes pharmacophores que les inhibiteurs 1 ou 2 :

- Aller sur le site de ZINCPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu/pharmer.html>).
- En bas à gauche de la page d'accueil, cliquer sur le bouton Load Features... puis ouvrir le fichier .mol de l'inhibiteur 1 ou 2.
- Parmi les pharmacophores proposés, retirer les moins pertinents pour l'affinité avec les protéines PARP-1 et PARP-2 en décochant les cases correspondantes dans la colonne Enabled.
- Cliquer sur le bouton Submit Query et attendre plusieurs minutes les résultats de la recherche.
- Dans la fenêtre des résultats, à droite de l'écran, cliquer sur RMSD pour classer les résultats dans l'ordre croissant.
- Dans l'onglet Viewer, en bas de la page, décocher la case Visible du ligand.
- Cliquer sur les premières lignes du tableau de résultats pour afficher les structures des composés ayant les mêmes pharmacophores que les inhibiteurs 1 ou 2.

Sélection de composés ayant les mêmes pharmacophores que les inhibiteurs 1 ou 2 :

- Parmi les molécules issues du criblage, sélectionner deux molécules (qu'on appellera 5 et 6) ayant les mêmes pharmacophores que les inhibiteurs 1 et 2. Générer leur structure 3D avec molview (et enregistrer les dans des fichiers inhibiteur5.mol et inhibiteur6.mol).

Amarrage moléculaire des composés sélectionnés sur PARP-1 et PARP-2 :

– En mettant en œuvre un protocole analogue à celui employé dans la **Partie I**, lancer un *docking* des composés **5** et **6** sur les structures **1wok_apo.pdb** de PARP-1 et **4zzx_apo.pdb** de PARP-2.

Conclusions :

– Comparer l'affinité des composés **5** et **6** avec celle des inhibiteurs **1** et **2**.
– Ces composés sont-ils plus sélectifs de PARP-2 que les inhibiteurs **1** et **2** ?

Partie IV : Optimisation d'un *hit* par pharmacomodulation

Analyse des interactions d'un hit avec PARP-2 :

– Ouvrir dans Chimera la structure **4zzx_apo.pdb** de PARP-2. Afficher la surface de la protéine avec le menu **Action > Surface > show**. Colorer la surface selon la densité de charge avec la commande **Tools > Surface/Binding Analysis > Coulombic Surface Coloring**.
– Pour l'un des composés **3**, **4**, **5**, ou **6** identifiés précédemment, ouvrir le fichier **pdbqt** contenant ses modes de liaison et indiquer à Chimera qu'il s'agit d'un fichier de type **PDB**.
– Actionner le menu **Favorites > Model Panel**. Dans la fenêtre qui apparaît, cliquer sur la ligne des modes de liaison du ligand et cliquer sur le bouton **group/ungroup**. Dans la colonne **S**, décocher tous les modes de liaison sauf le premier.
– Essayer de repérer des sous-poches inoccupées par le ligand et identifier leur caractère électrique.
– Imaginer un ou des substituants chimiques que l'on pourrait greffer au ligand afin d'améliorer son affinité pour la protéine PARP-2.

Amarrage moléculaire du hit optimisé sur PARP-1 et PARP-2 :

– En mettant en œuvre un protocole analogue à celui employé dans la **Partie I**, lancer un *docking* du *hit* optimisé sur les structures **1wok_apo.pdb** de PARP-1 et **4zzx_apo.pdb** de PARP-2.

Conclusions :

– L'affinité du *hit* optimisé est-elle meilleure que celle des inhibiteurs **1** et **2** ?
– Ce composé est-il plus sélectif de PARP-2 que les inhibiteurs **1** et **2** ?

Partie V : Propriétés ADME

Prédiction des propriétés ADME des composés les plus prometteurs :

– Aller sur le site de SwissADME (<http://www.swissadme.ch>).
– Pour chacune des molécules étudiées dans ces TP, incluant les inhibiteurs **1** et **2**, dessiner ou importer sa structure dans le cadre approprié.
– Cliquer sur la double flèche rouge puis sur le bouton **Run!**
– Quelles molécules ont le plus de chance de devenir un bon candidat-médicament ?

Conclusion

Rapport de TP :

– Chaque binôme devra rédiger un compte-rendu de TP de 6 pages maximum. Le rapport devra être rendu à la fin de la dernière séance de TP.