

Caractérisation de complexes d'inhibiteurs à visée thérapeutique : application à l'intégrase du VIH-1

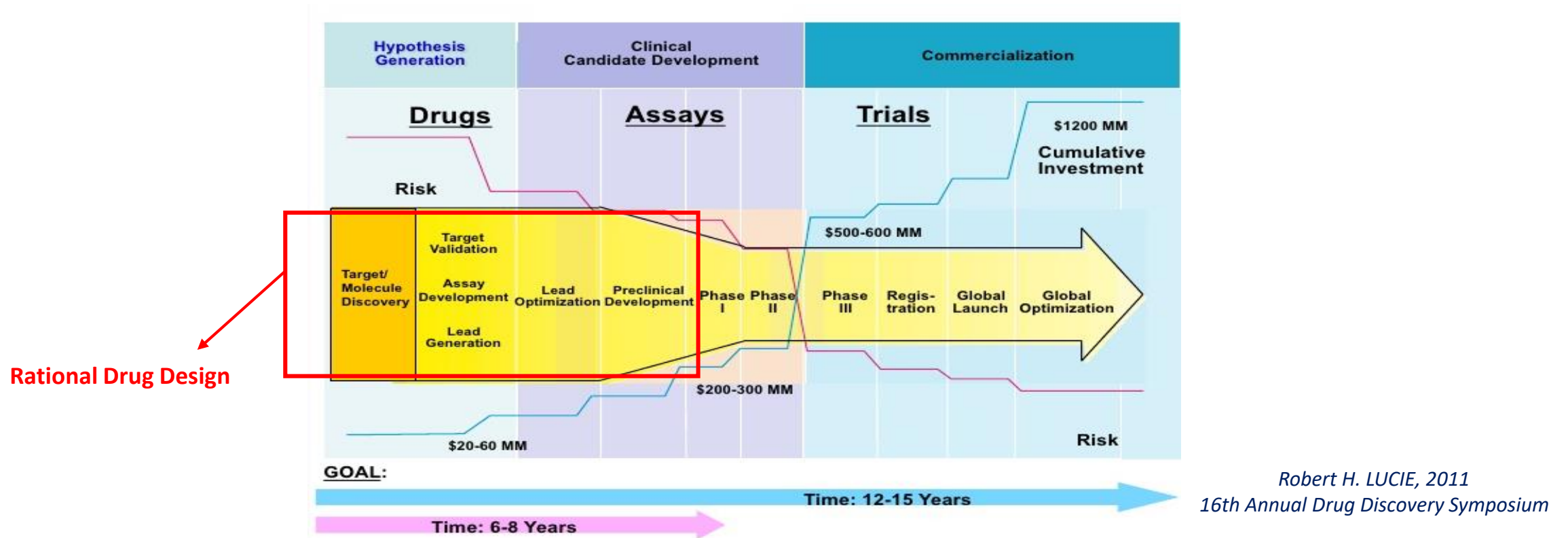
Equipe Structure et interactions des macromolécules, UR EGP, FS, USJ: **Dr Zeina Hobaika**

Plan

- ❖ Introduction générale
- ❖ Projets de recherche
 - ❖ Inhibition de l'intégrase du VIH-1
 - A. Introduction
 - B. Système étudié
 - C. Etude du mécanisme d'action des inhibiteurs DKAs
 - D. Modélisation de nouveaux inhibiteurs dérivés
- ❖ Conclusions générales et Perspectives

Conception rationnelle de médicaments

Le développement de médicaments est une procédure longue (12-15 ans) et coûteuse (1 milliard d'euros).

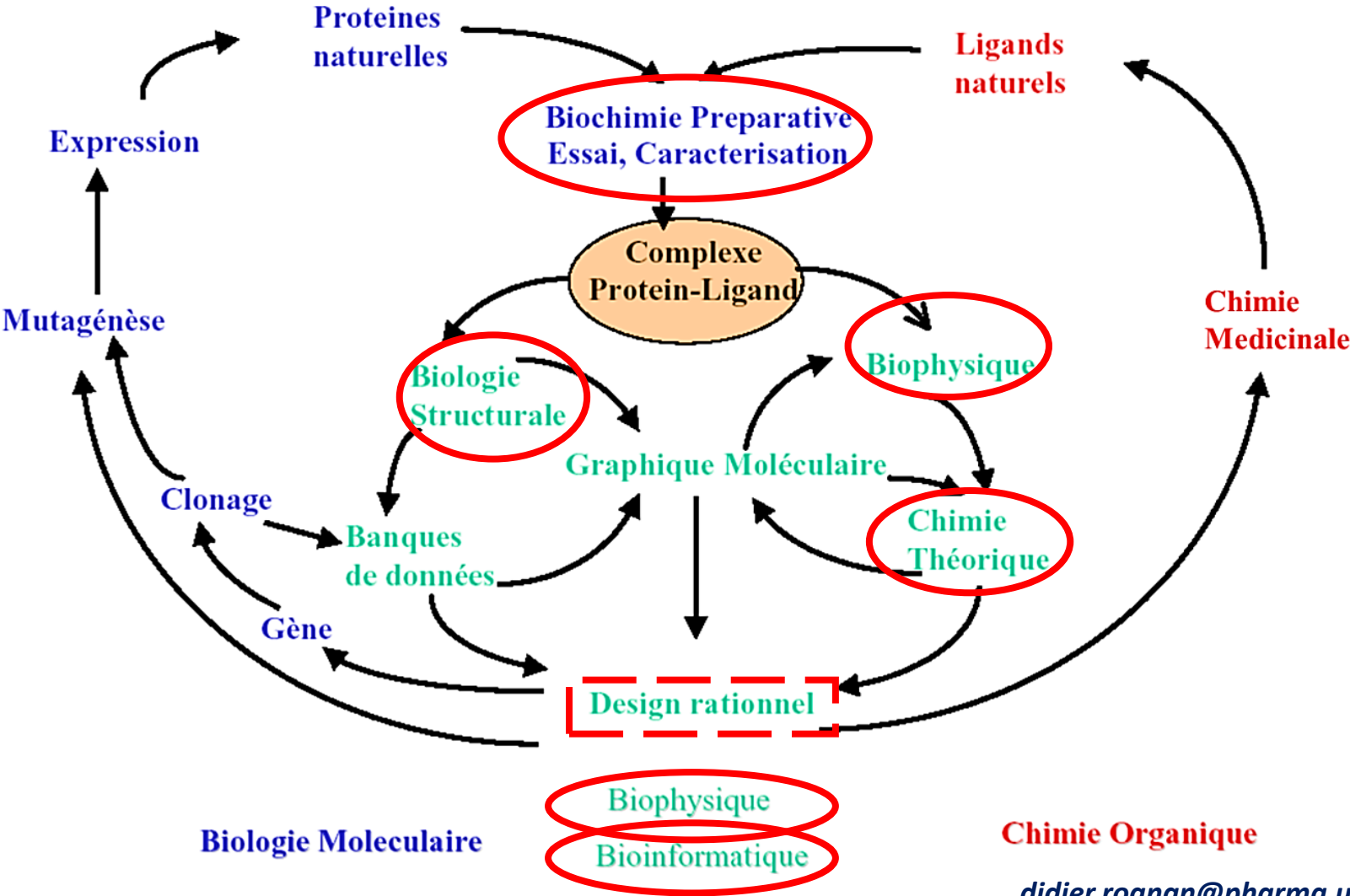


Effort de développer des médicaments sur une base la plus rationnelle possible, impliquant ainsi une réduction au strict minimum du facteur d'essai et d'erreur, diminuant ainsi la durée et le coût du

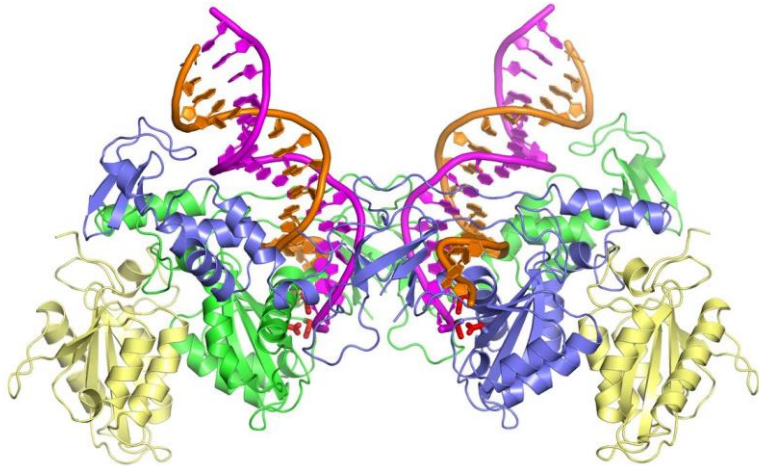
- **Etude clinique:** la molécule est évaluée chez l'homme avant d'être mise sur le marché

Conception rationnelle de médicaments

Approche multidisciplinaire



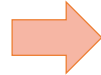
Stratégie de lutte contre les pathologies



Hare et al 2010

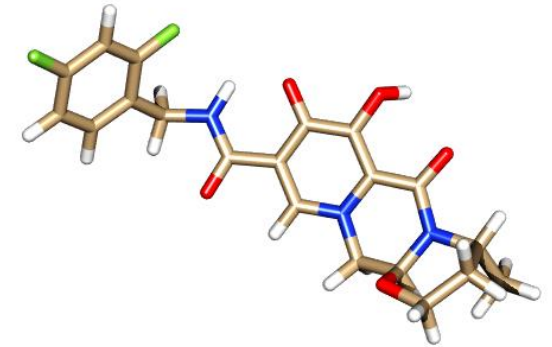
Caractérisation de cibles

- Spectroscopie
- Modélisation moléculaire
- Dynamique moléculaire



Identification de ligands / inhibiteurs

- Conception de ligands
- Screening virtuel



Optimisation

- Substitution, ajout ou délétion de groupements chimiques

Projets de recherche

Raffinement du potentiel SIBFA

Etalement des paires libres

Validation du potentiel polarisable SIBFA comme méthode d'études du trou sigma

Calibration du potentiel polarisable SIBFA pour l'étude des metalloprotéines

Validation des paramètres optimisés sur les sites actifs des métalloenzymes

Inhibition du VIH-1

Intégrase du VIH-1

Etude du mécanisme d'action des inhibiteurs de la famille des dikétoacides à l'interface intégrase-ADN viral

Etude de l'inhibition de l'intégrase par deux anticorps monoclonaux

NCp7

Dynamique moléculaire polarisable des complexes NCp7, NCp7-ADN

Etude de l'inhibition de la NCp7 par C247

Inhibition de CDK5

Optimisation du noyau benzénique

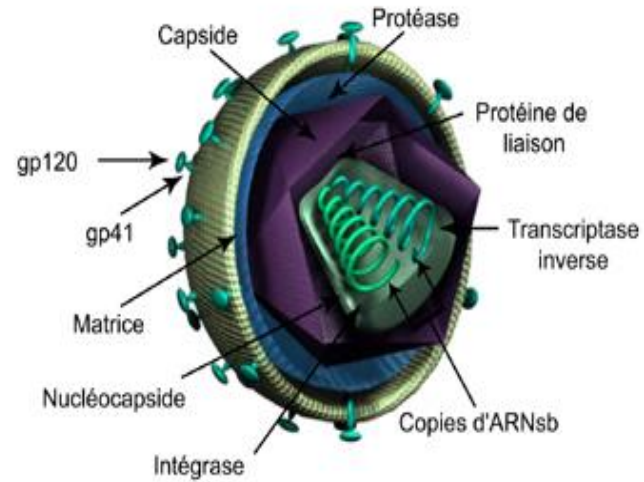
Optimisation du scaffold

Plan

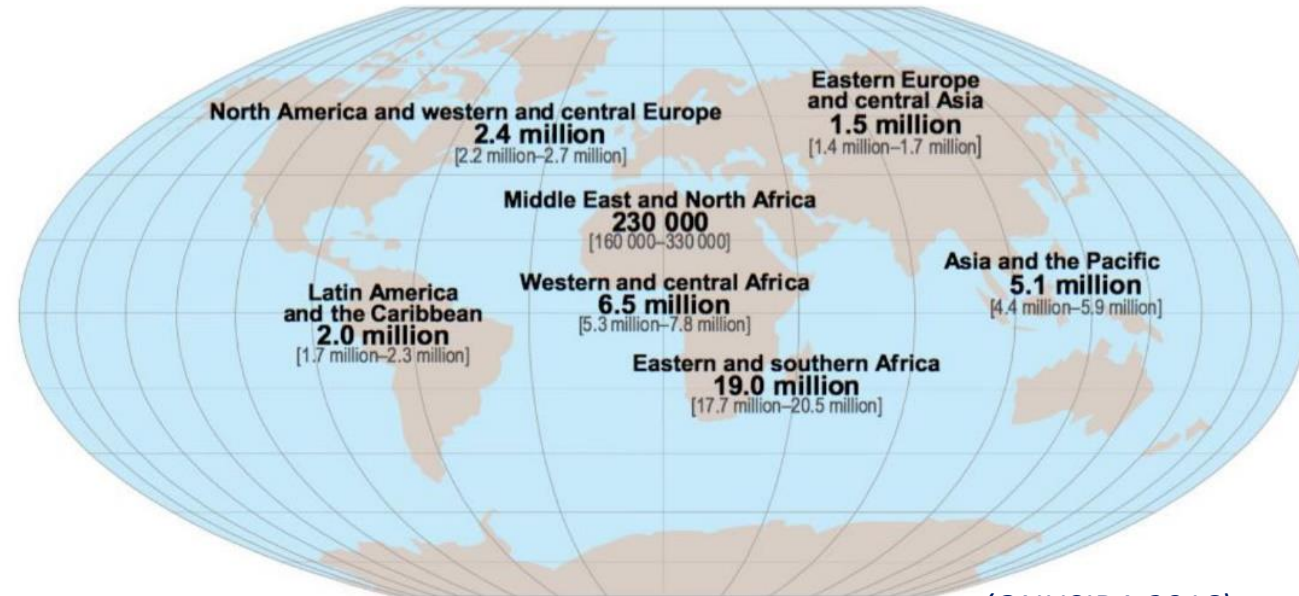
- ❖ Introduction générale
- ❖ Projets de recherche
- ❖ **Inhibition de l'intégrase du VIH-1**
 - A. Introduction**
 - B. Système étudié
 - C. Etude du mécanisme d'action des inhibiteurs DKAs
 - D. Modélisation de nouveaux inhibiteurs dérivés
- ❖ Conclusions générales et Perspectives

Le VIH-1

Structure



- **SIDA: Syndrome de l'immunodéficience acquise**
- ✓ 36,7 millions de personnes atteintes, 1 personne /17 s
- **VIH-1: Virus de l'Immunodéficience Humaine-1**
- ✓ Famille: Retroviridae
- ✓ Genre: Lentivirus

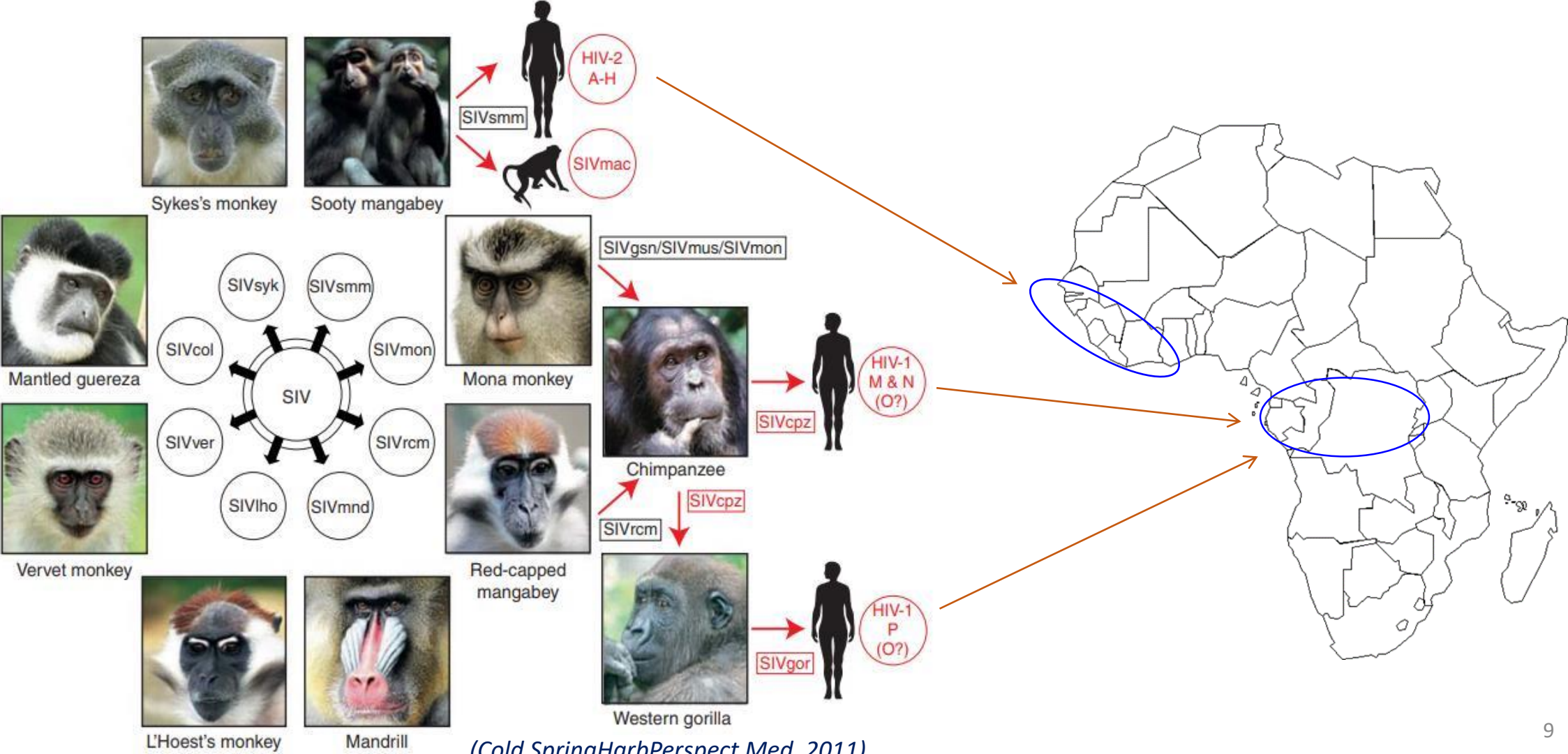


(ONUSIDA 2016)



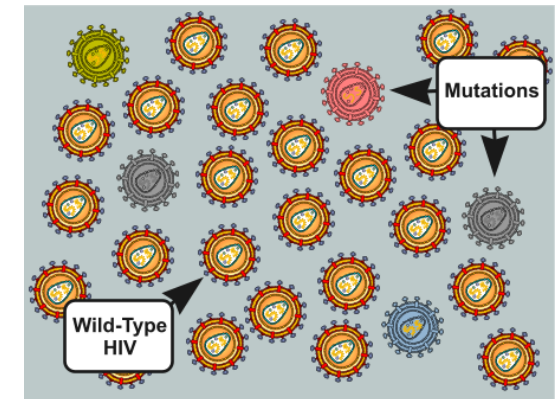
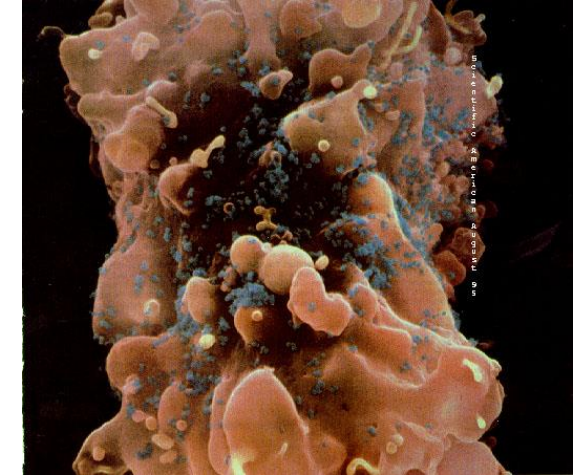
Origine du VIH-1

Les VIH-1 et 2 ont pénétré l'espèce humaine à travers de multiples infections zoonotiques des VIS-primates non humains

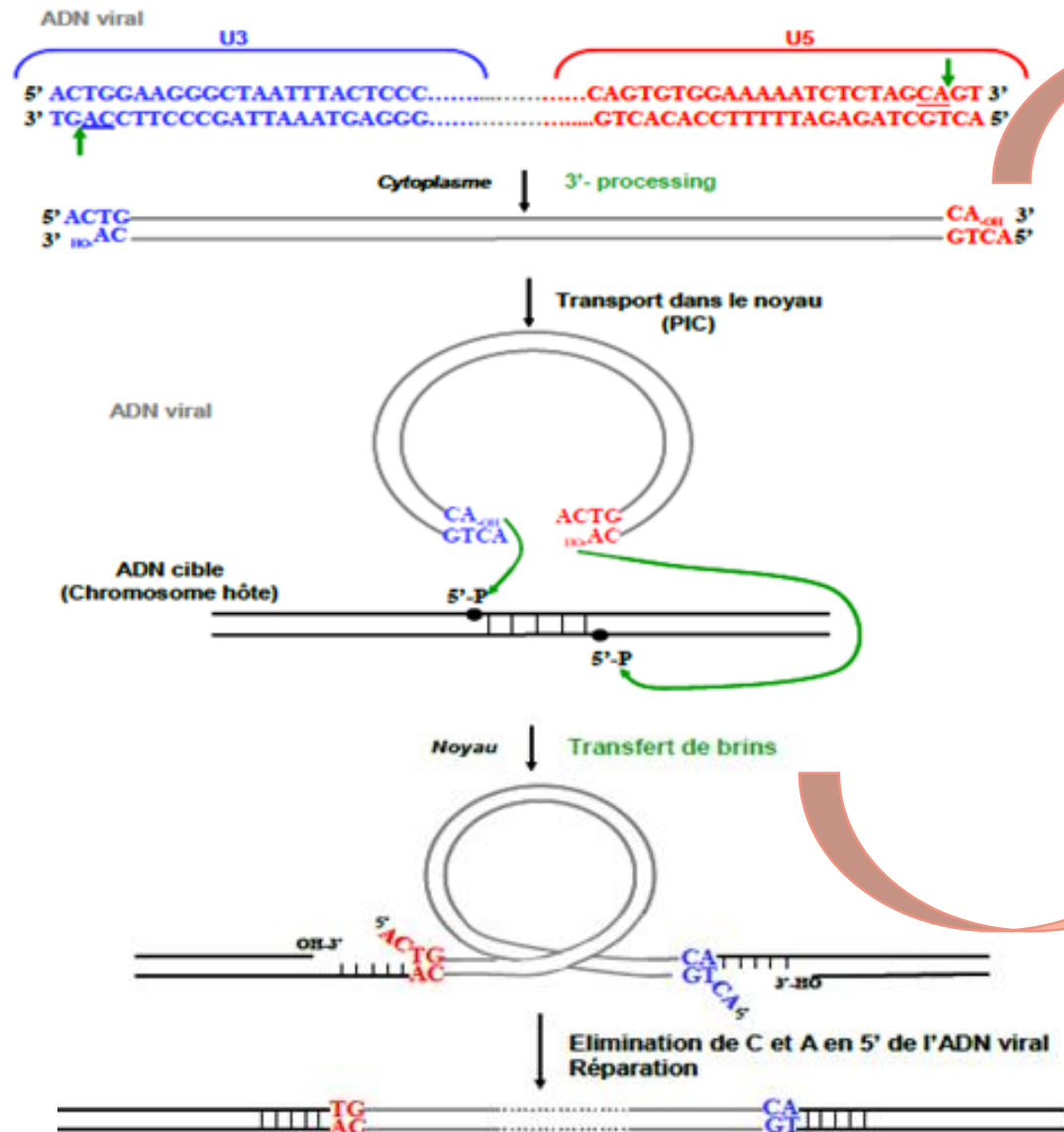


Diversité du VIH-1

- ❖ Taux de mutations élevé = **1** substitution/ génome/ cycle viral
- ❖ **7-30** recombinaisons / génome/ cycle viral
- ❖ Réplication rapide= **10^{10}** par jour par individu
- ❖ Infections HIV en 2015 = **34×10^6** individus
- ❖ Soit **10^{17}** virus par jour sur terre
Presque tous différents !



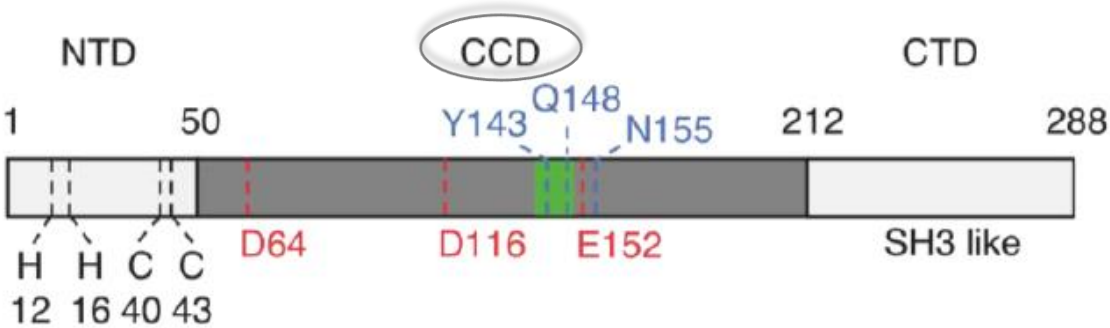
La réaction d'intégration



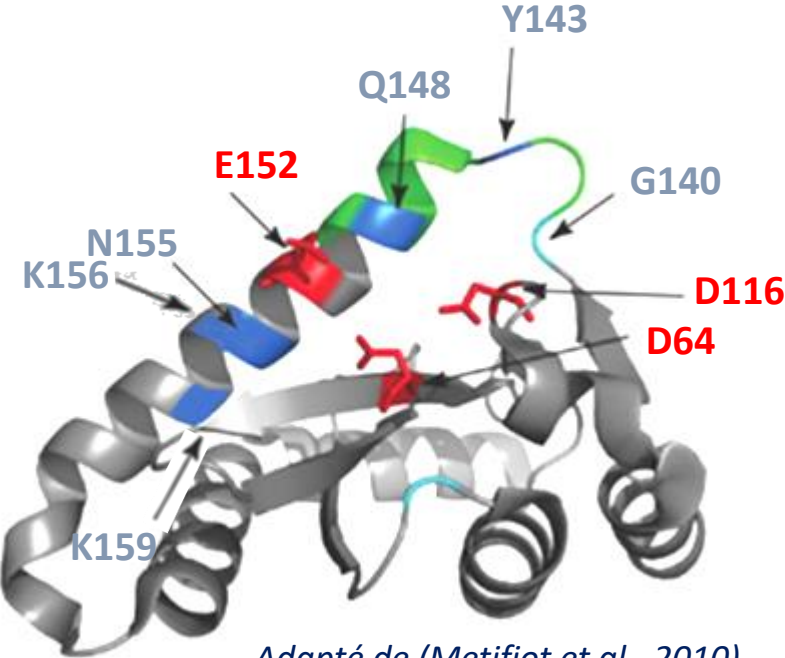
Clivage en 3' d'un dinucléotide GT en aval d'un dinucléotide CA très conservé

Attaque nucléophile de 3'OH de l'ADN viral sur l'ADN de la cellule hôte

Structure de l'intégrase



288 acides aminés
4153 atomes



Adapté de (Metifiot et al., 2010)

- ❖ L'hélice $\alpha 4$ interagit avec
 - L' ADN viral
 - Les inhibiteurs DiKetoAcides (DKA)
- ❖ Boucle 140 : site d'interaction avec les DKA
- ❖ Hélice $\alpha 5$: multimérisation de l'intégrase, interaction avec LEDGF
- ❖ Hélices $\alpha 4$ -début $\alpha 5$: site d'interaction avec des anticorps monoclonaux

Objectifs

- ❖ L'intégrase (IN) cruciale pour la réplication du VIH-1
- ❖ Pas de contreparties cellulaires de IN
- ❖ Le cœur catalytique de IN
 - Site d'interaction avec les DKA
 - Site d'interaction avec l'ADN viral
 - Site d'interaction avec les anticorps monoclonaux



Contribuer aux thérapies anti-intégrase du VIH-1

Inhibition de IN par les DKA

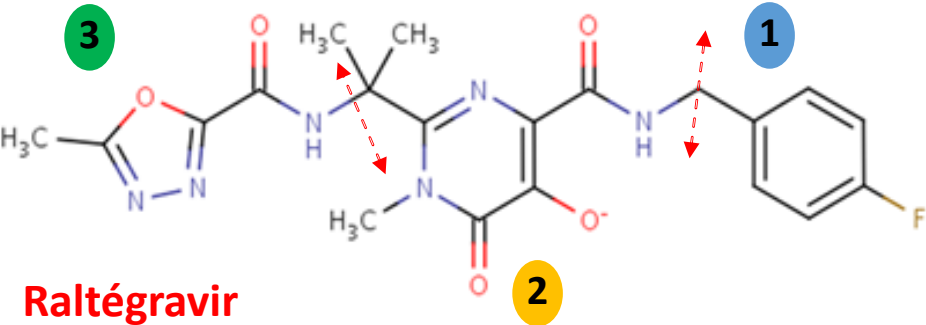


Inhibition de IN par des anticorps monoclonaux

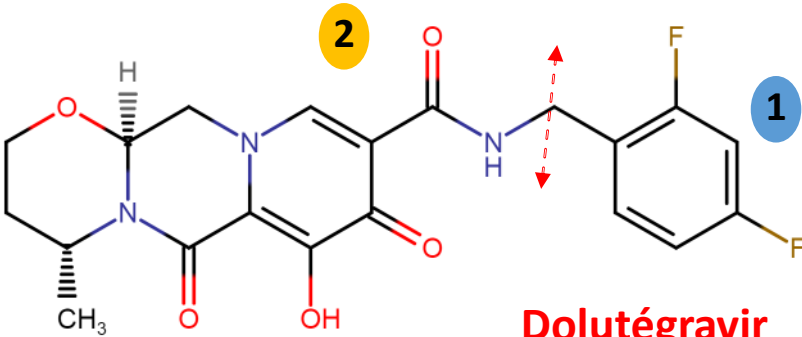


Les inhibiteurs Dikétoacides

Les inhibiteurs de l'étape de transfert de brin (INSTI)

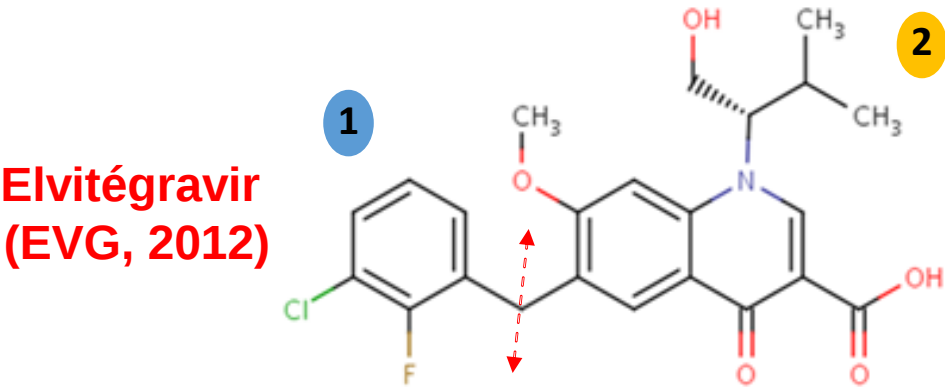


Raltégravir
(RAL, 2007)

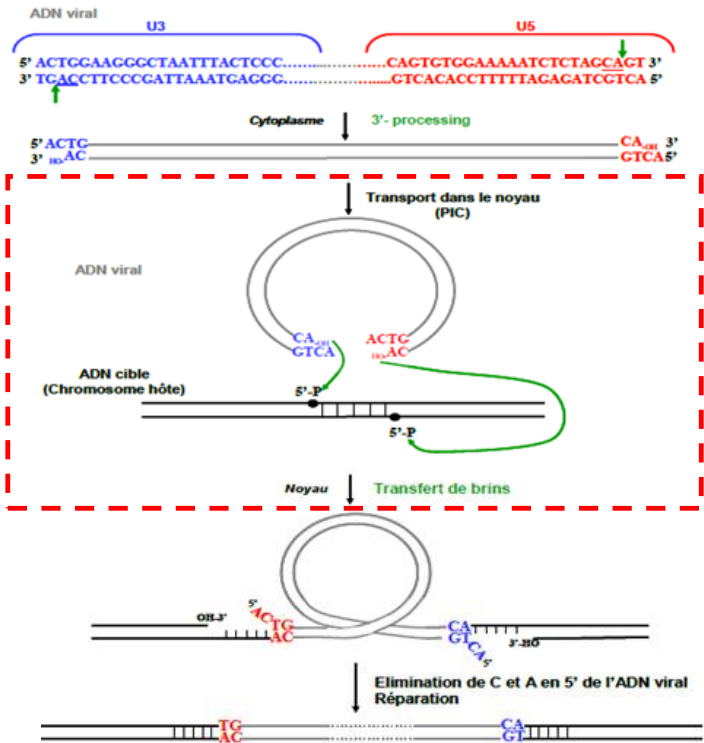


Dolutégravir
(DTG, 2013)

- 1 Halobenzène
- 2 Dicétone
- 3 Oxadiazole

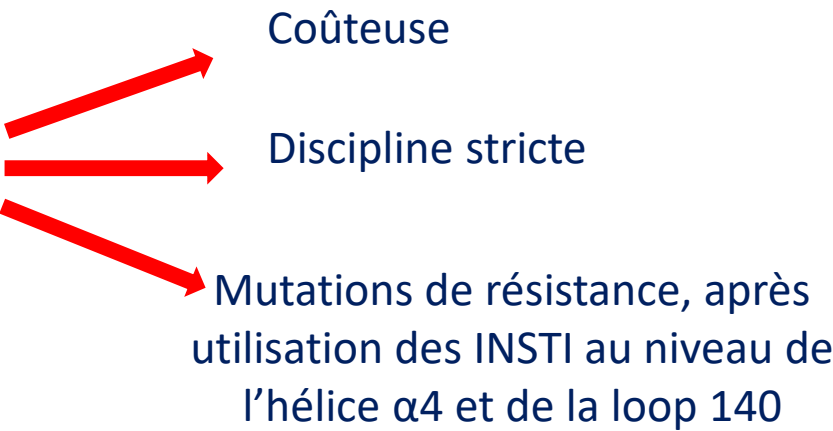


Elvitégravir
(EVG, 2012)

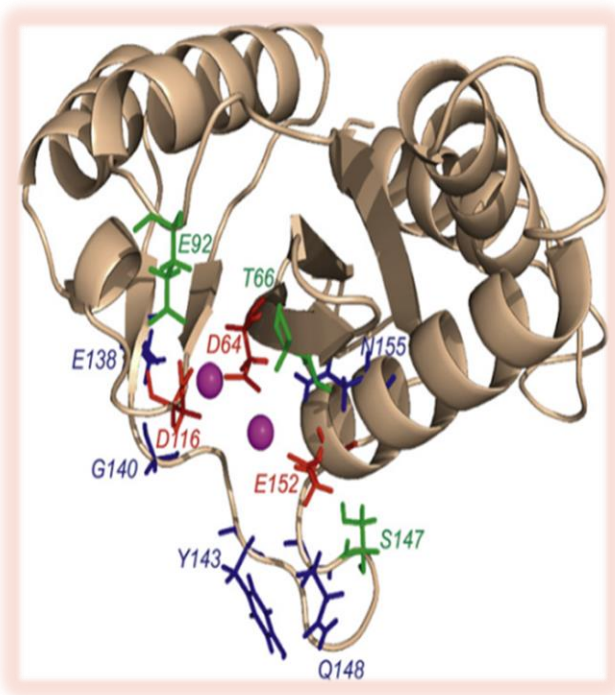


Emergence de résistance

❖ Multithérapie
Cocktail d'inhibiteurs de plusieurs
cibles du cycle réplcatif du VIH-1



<u>Primaires</u>		<u>Secondaires</u>	
❖ Y143R/C/H	} RAL	❖ H51Y	} RAL
❖ Q148H/R/K		❖ T66A/K	
❖ N155H		❖ G140S/A/C	
❖ T66I	} EVG	❖ H51Y	} EVG
❖ S147G		❖ R166S	
		❖ K160N	
❖ Q148H/R	DTG		
		❖ G140S	DTG

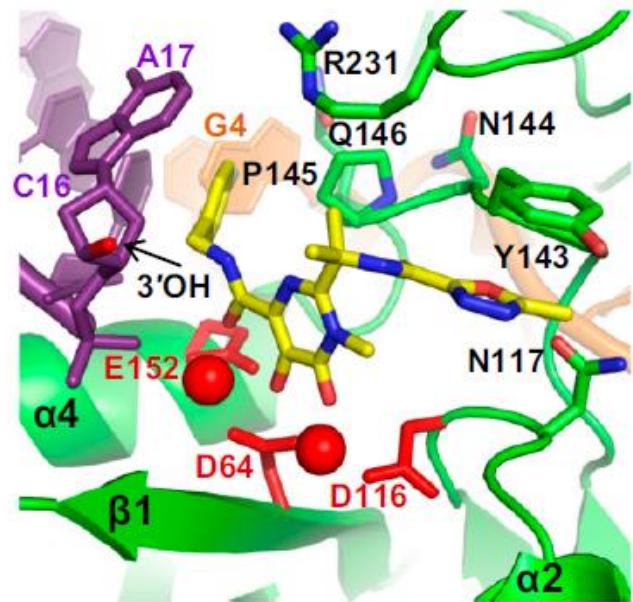


(Mouscadet et al., 2010)

❖ Dolutégravir est moins sensible aux mutations ➡ Plus efficace que RAL et EVG

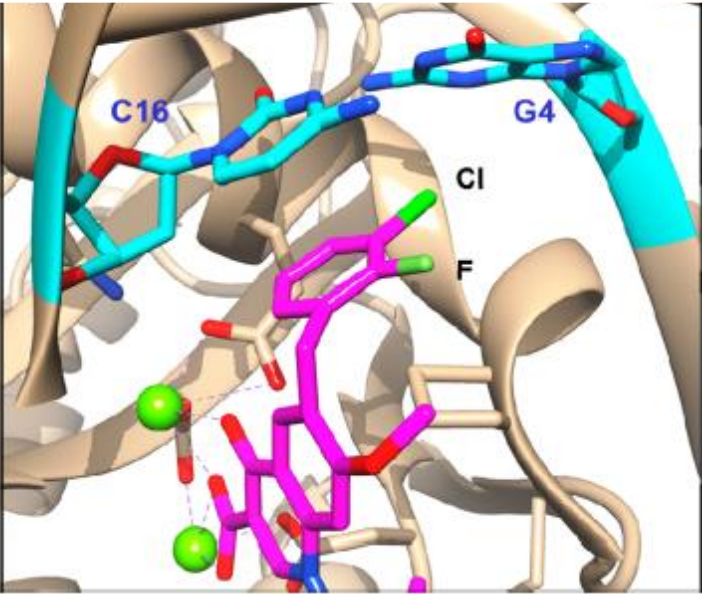
Stratégie de recherche

Investir le mode d'action des INSTI



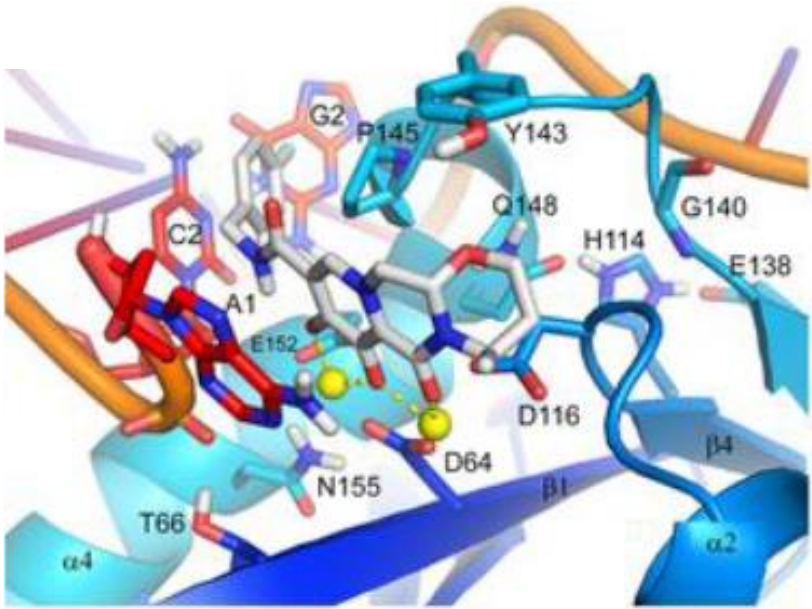
(Krishnan et al, 2010)

Integrase du VIH-1 (vert) complexée avec RAL (jaune et bleu); ADN viral est en mauve



(El Hage et al, 2014)

Integrase du VIH-1 (beige) complexée avec EVG (magenta); ADN viral est en bleu et rouge



(El Khoury et al, 2017)

Integrase du VIH-1 (bleu) complexée avec DTG (gris); ADN viral est en bleu et rouge

- ✓ Comment expliquer l'inhibition préférentielle des DKA de l'étape de transfert de brins
- ✓ Est-ce que l'efficacité accrue de DTG serait due à une meilleure affinité à l'ADN viral?
- ✓ Proposition de dérivés plus affins à l'ADN viral que les DKA actuels, afin de surmonter le problème de résistance

Plan

- ❖ Introduction générale
- ❖ Projets de recherche
- ❖ **Inhibition de l'intégrase du VIH-1**
 - A. Introduction
 - B. Système étudié**
 - C. Etude du mécanisme d'action des inhibiteurs DKAs
 - D. Modélisation de nouveaux inhibiteurs dérivés
- ❖ Conclusions générales et Perspectives

Eléments du système

Anisotropie de fluorescence

Thermodynamique des interactions, Quantifications (10^{-8} - 10^{-9} M)

1. Oligonucléotides

LTR34
Non-processé



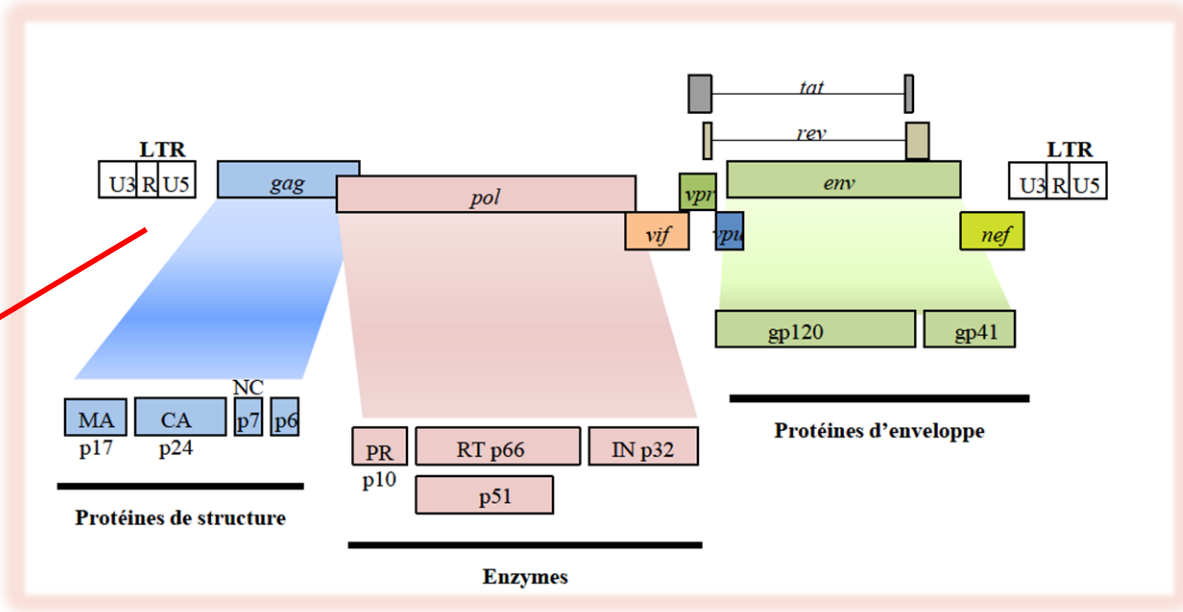
LTR32
Processé



LTR32
inversé



LTR30



2. Inhibiteurs de transfert de brin:

Raltégravir

Elvitégravir

Dolutégravir

Le potentiel SIBFA

Un champ de force polarisable

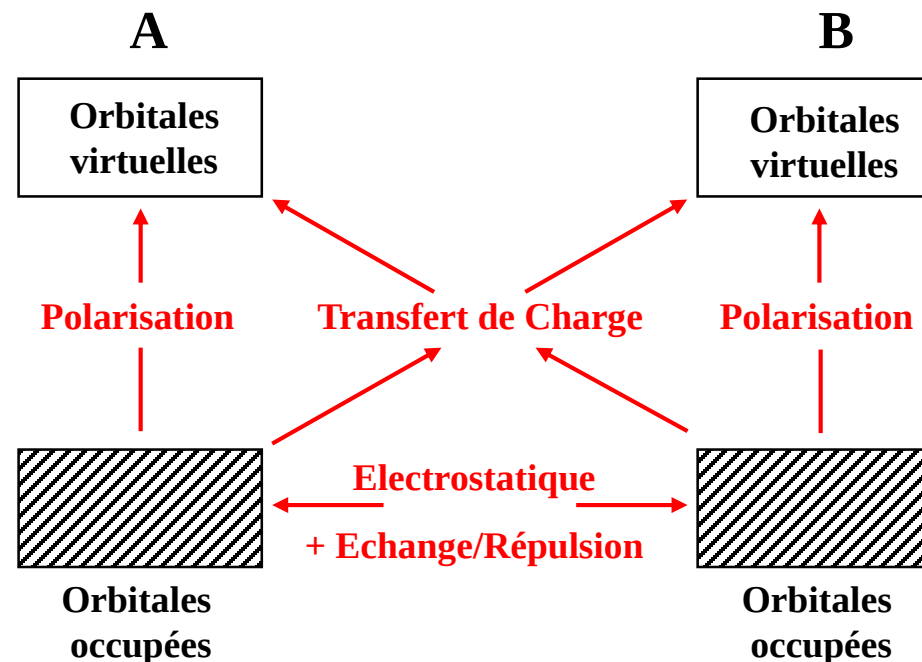
Gresh et al. *Anisotropic, polarizable molecular mechanics studies of inter-, intra-molecular interactions, and ligand-macromolecule complexes. A bottom-up strategy. J. Chem. Theor. Comput.* 2007, 3, 1960)

SIBFA (Sum of Interaction Between Fragments Ab-initio computed)

ΔE est calculée comme étant la somme de cinq contributions séparées, ayant chacune une équivalente QC :

$$\Delta E_{\text{TOT}} = E_{\text{MTP}^*} + E_{\text{rep}} + E_{\text{pol}} + E_{\text{ct}} + E_{\text{disp}}$$

- E_{MTP} : énergie électrostatique
- E_{rep} : énergie de répulsion
- E_{pol} : énergie de polarisation
- E_{ct} : énergie de transfert de charge
- E_{disp} : énergie de dispersion



Interaction entre les orbitales des molécules A et B
(méthode RVS), Stevens, W. J., et al 1987

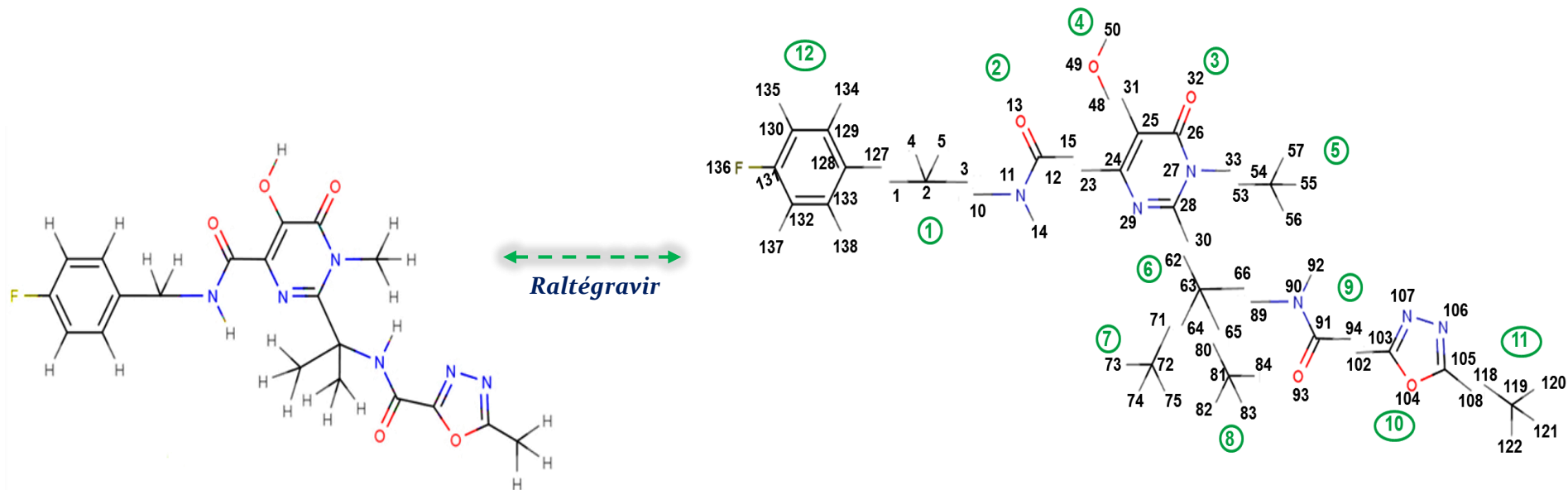
Le potentiel SIBFA

Procédure

Gresh et al. J. Chem. Theor. Comput. 2007, 3, 1960

1- Fragmentation et Assemblage des protéines, des ADNs, et des ligands

- Fragmentation
- Obtention pour les fragments moléculaires et par la chimie quantique de Multipôles (*charges, dipôles et quadrupôles*) et de Polarisabilités distribués sur les atomes et les milieux des liaisons
- Assemblage de la molécule « Lego moléculaire »



Le potentiel SIBFA

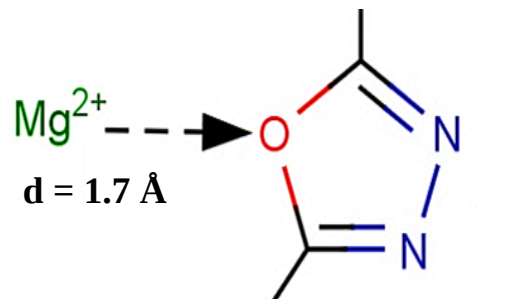
Procédure

Gresh et al. *J. Chem. Theor. Comput.* 2007, 3, 1960

2- Paramétrisation

a. Sondes :

- H_2O : molécule dipolaire
- Mg^{2+} : la charge 2+ pour amplifier les effets électroniques



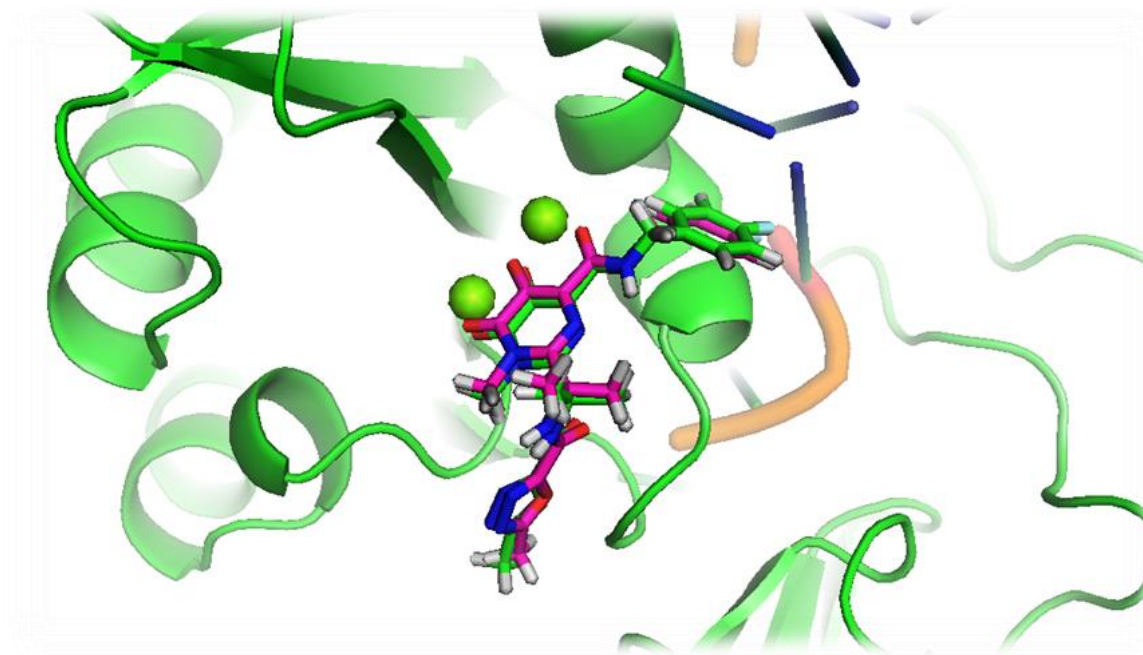
ΔE (kcal/mol)	E_{MTP}	E_{rep}	E_{pol}	E_{ct}	E_{TOT}
RVS	-47.8	58.3	-83.2	-2.5	-75.5
SIBFA	-48.6	58.0	-84.6	-0.5	-75.6

Le potentiel SIBFA

Procédure

Gresh et al. *J. Chem. Theor. Comput.* 2007, 3, 1960

3- Construction et Validation du modèle par superposition de sa structure à la structure obtenue par cristallographie ou par RMN



PDB 3OYA (3.15 Å)

Amarrage du Raltégravir dans le site actif de l'intégrase du VIH-1 (SIBFA en rose/PDB en vert)

Plan

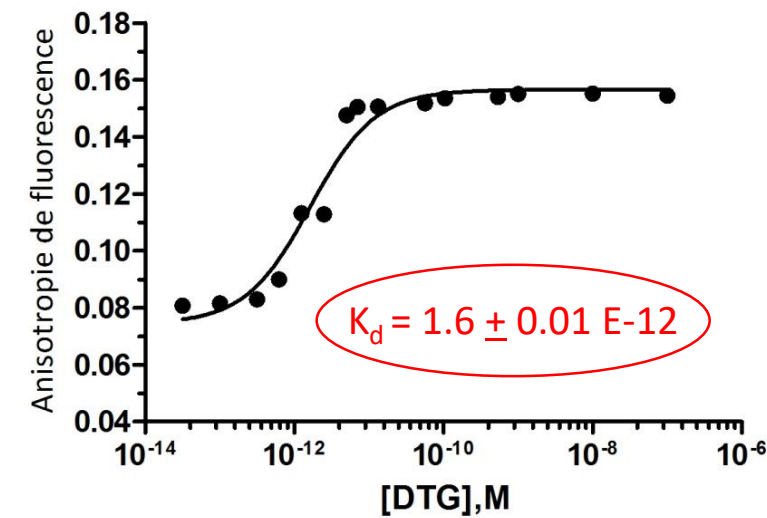
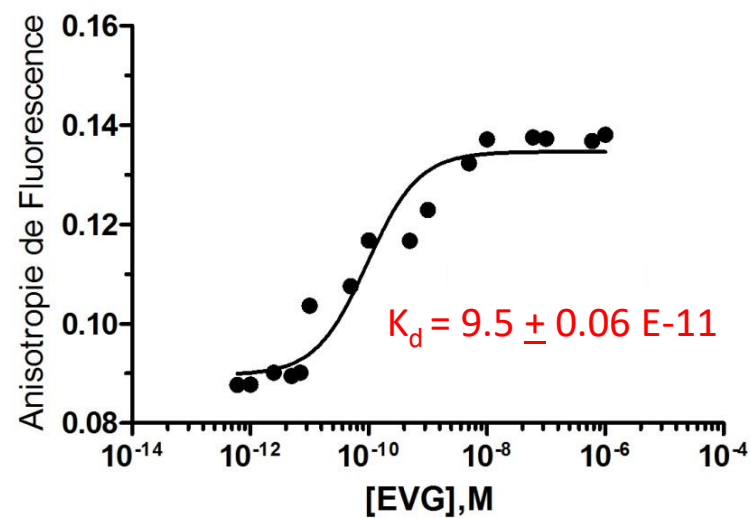
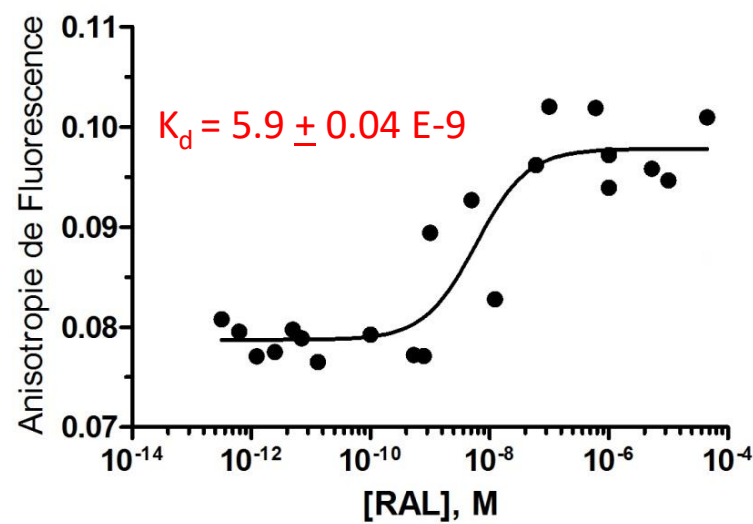
- ❖ Introduction générale
- ❖ Projets de recherche
- ❖ **Inhibition de l'intégrase du VIH-1**
 - A. Introduction
 - B. Système étudié
 - C. Etude du mécanisme d'action des inhibiteurs DKAs**
 - D. Modélisation de nouveaux inhibiteurs dérivés
- ❖ Conclusions générales et Perspectives

Résultats

- a. Caractérisation de l'interaction des DKAs avec l'ADN viral**
- b. Détermination des sites d'interaction des DKAs avec l'ADN viral**

Caractérisation de l'interaction des dikétoacides avec l'ADN viral

Interactions ADN processé (LTR32)-DKAs



RAL, EVG et DTG reconnaissent l'ADN viral processé avec des affinités spécifiques



K_d de LTR32-DTG est le plus bas → DTG présente la meilleure affinité envers l'ADN viral processé

Caractérisation de l'interaction des dikétoacides avec l'ADN viral

Interactions ADN traité-DKAs

Anisotropie de fluorescence

$\Delta G = -R T \ln K_{eq}$

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

Tableau I. Paramètres thermodynamiques de l'interaction Raltégravir-LTR32

Température	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
278	-10.07	-14.16	4.09
288	-10.29	-14.53	4.24
298	-10.37	-14.75	4.39

Les valeurs des paramètres ΔG , ΔH et $T\Delta S$ sont en kcal/mol
Les températures sont exprimées en Kelvin

Tableau II. Paramètres thermodynamiques de l'interaction Elvitégravir-LTR32

Température	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
278	-12.266	-16.353	4.087
288	-12.479	-16.713	4.234
298	-12.564	-16.941	4.381

Les valeurs des paramètres ΔG , ΔH et $T\Delta S$ sont en kcal/mol
Les températures sont exprimées en Kelvin

Tableau III. Paramètres thermodynamiques de l'interaction Dolutégravir-LTR32

Température	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
278	-14.43	-18.50	4.07
288	-14.66	-18.88	4.22
298	-14.72	-19.08	4.37

Les valeurs des paramètres ΔG , ΔH et $T\Delta S$ sont en kcal/mol
Les températures sont exprimées en Kelvin



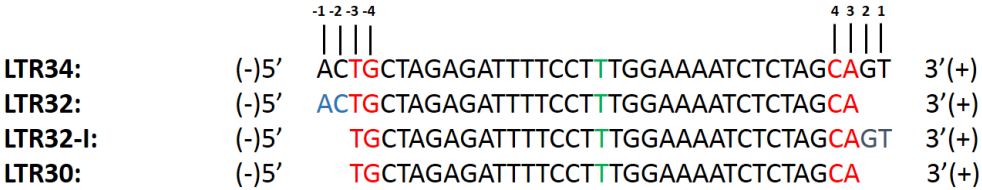
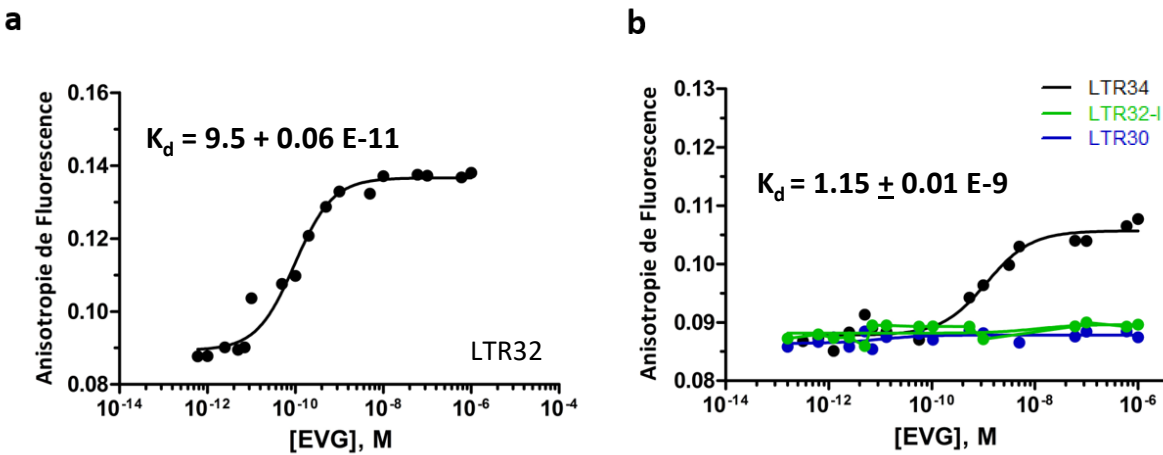
- ΔH plus favorable que ΔG
- $T\Delta S$ = constant pour RAL, EVG et DTG
- $\Delta H / \Delta G$ compris entre 1,3 et 1,4



La contribution enthalpique est celle qui régit la complexation d'un DKA à l'ADN viral

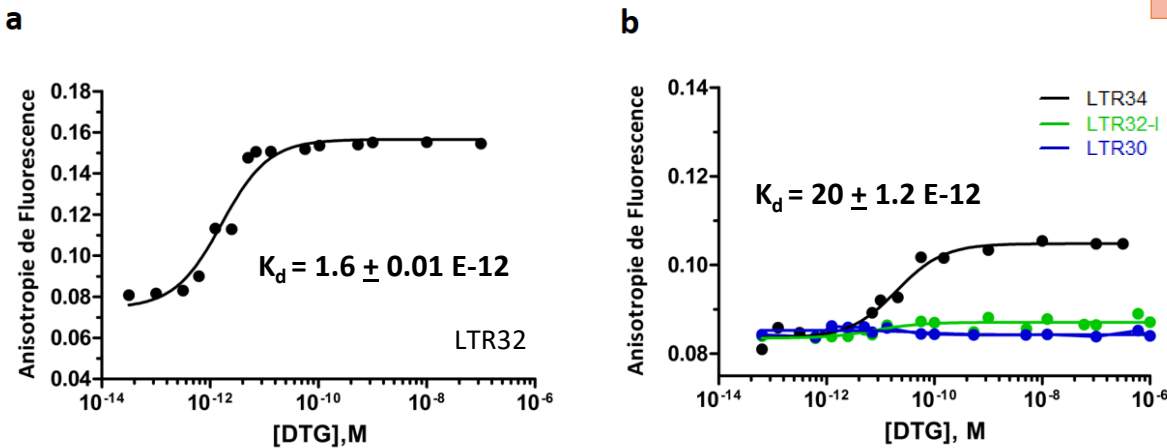
Détermination des sites d'interaction des DKAs avec l'ADN viral

Interactions ADN viral-EVG



- L'affinité la plus élevée de DTG et de EVG est pour LTR32
- Le rôle clé de d(A⁻¹C⁻²)₂ pour la liaison des INSTIS aux LTRs
- L'implication directe de d(T₁G₂)₂ dans l'interaction des INSTIs avec les extrémités de l'ADN viral
- Résultats en accord avec les données structurales des rayons X sur les liaisons de EVG / DTG au sein de l'intasome entier
- Résultats cohérents avec l'étude réalisée avec RAL, (*Ammar et al, 2012*)

Interactions ADN viral-DTG

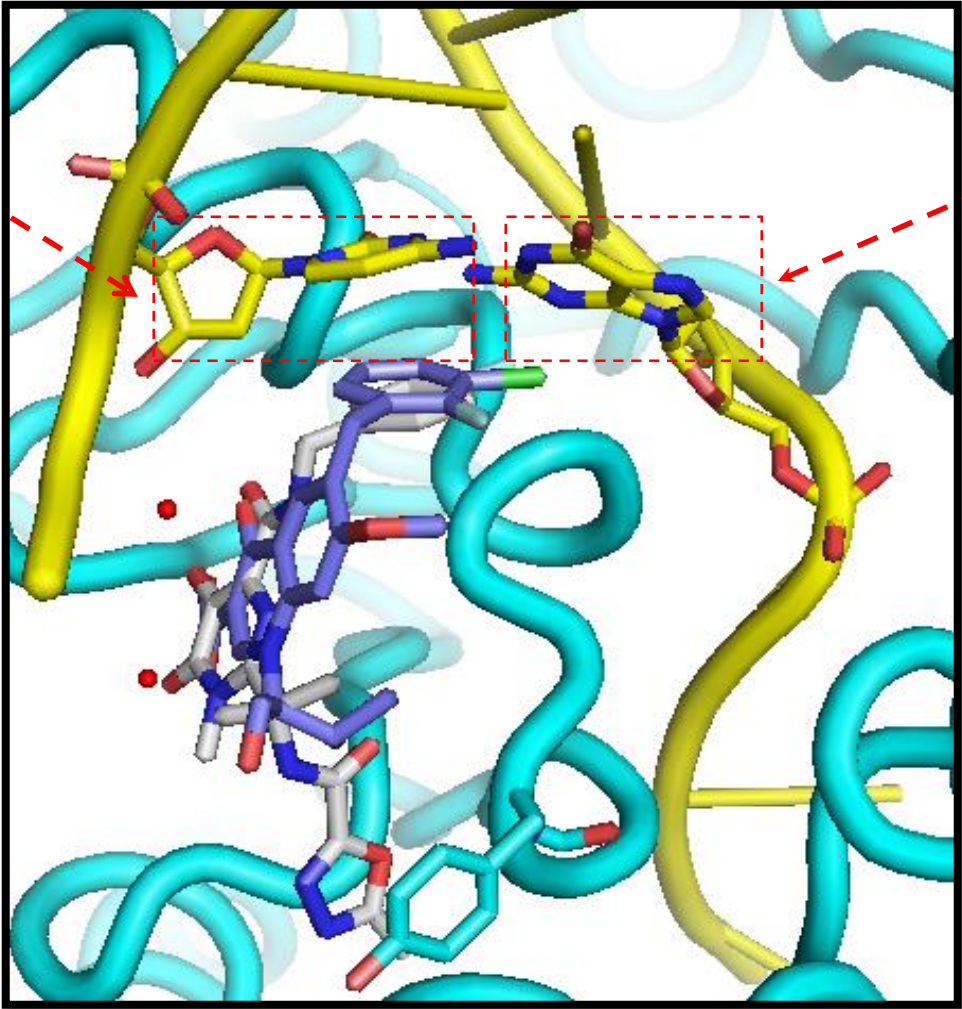


Détermination des sites d'interaction des DKAs avec l'ADN viral

SIBFA

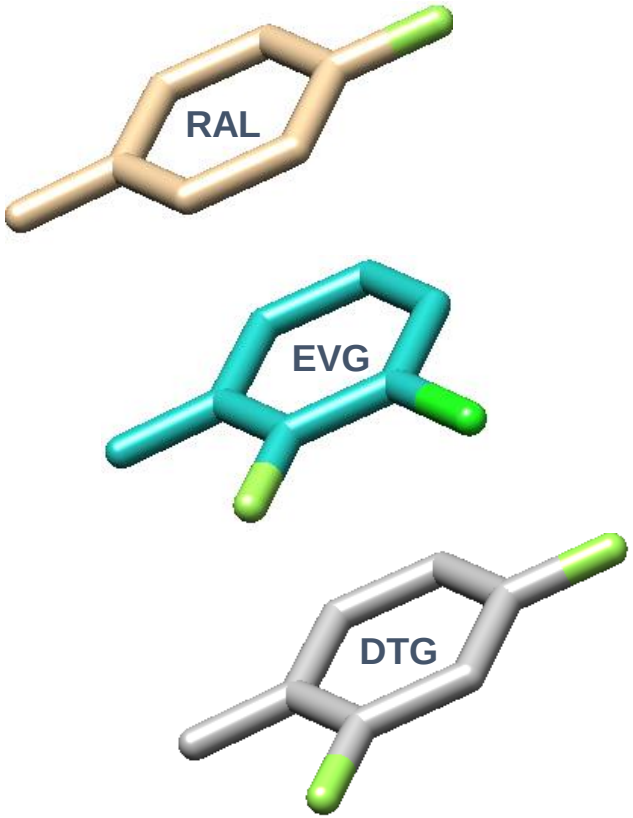
C⁴A³

CA GT
GT CA



G⁻⁴

CA GT
GT CA



- ❖ F (RAL) en para
- ❖ F (EVG) en ortho et Cl (EVG) en méta
- ❖ 2F (DTG) en ortho et para

➡ Interaction des halobenzènes des DKAs avec G⁻⁴ et C⁴ de l'ADN viral traité au sein de l'intasome

Détermination des sites d'interaction des DKAs avec l'ADN viral

SIBFA

Interaction des halobenzènes des DKAs avec G⁻⁴ et C⁴ de l'ADN viral traité au sein de l'intasome

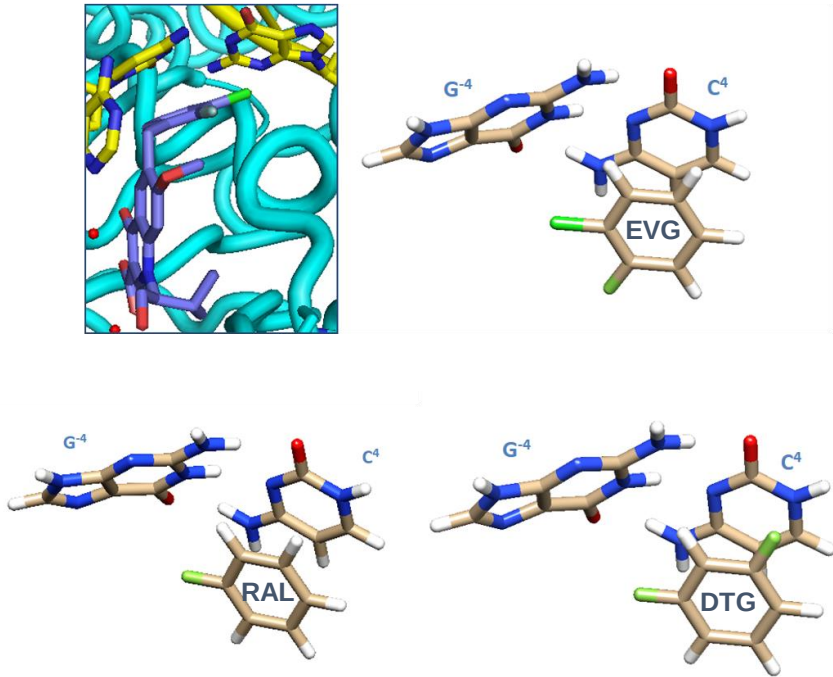


Table IV. Les interactions au niveau du site de reconnaissance ADN-DKA

	Raltegravir		Elvitegravir		Dolutegravir	
	QC	SIBFA	QC	SIBFA	QC	SIBFA
ES/E _{MTP} *	-26.1	-31.6	-32.4	-33.2	-34.7	-35.2
EX/E _{rep}	23.7	27.8	30.6	25.1	29.0	27.3
E ₁	-2.4	-3.8	-1.8	-8.1	-5.7	-7.9
E _{pol}	-4.3	-7.0	-2.7	-6.5	-7.6	-6.3
E _{ct}	-3.3	-3.4	-4.2	-2.8	-4.4	-2.9
E _{ct} *	-1.9	-3.4	-2.9	-2.8	-2.9	-2.9
ΔE	-12.2	-14.2	-14.3	-17.4	-18.6	-17.1
ΔE*	-10.8	-14.2	-13.1	-17.4	-17.4	-17.1
E _{disp}	-17.4	-17.5	-18.4	-18.1	-16.3	-19.9
ΔE _{tot} ^a	-29.5	-31.7	-32.8	-35.5	-34.9	-37.0

Les valeurs des énergies d'interaction QC et SIBFA et leurs contributions sont en kcal/mol

ΔE*: l'énergie d'interaction intermoléculaire corrigée par l'erreur de la superposition de base (BSSE)

^a La fonctionnelle B97-D

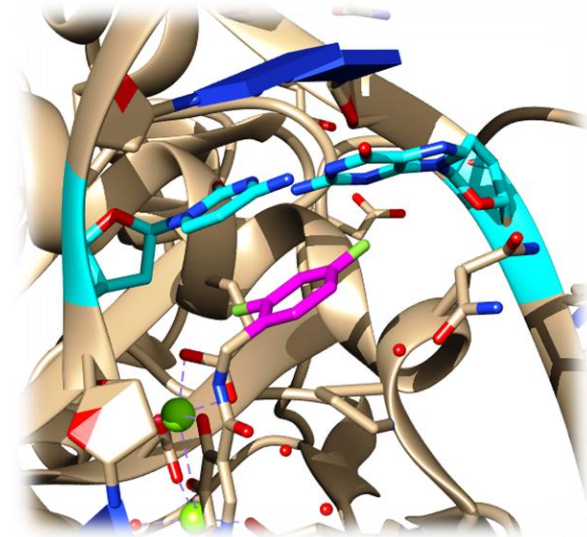
- ➡ L'halobenzène de DTG affiche les interactions les plus favorables avec les bases terminales C⁴ et G⁻⁴ de l'ADN viral traité
- ➡ Résultats en accord avec ceux expérimentaux trouvés en anisotropie de fluorescence

Conclusions

- ❖ Affinité élevée des trois inhibiteurs pour l'ADN viral du VIH-1 , particulièrement après l'étape du 3'Processing
- ❖ L'interaction DKA-ADN viral est régie par la composante enthalpique ΔH
- ❖ Les énergies d'interaction en parfait accord avec les données bibliographiques et les résultats cliniques
- ❖ L'affinité la plus importante entre DTG et l'ADN viral traité ➔ Efficacité accrue comparée à celles de RAL et EVG
- ❖ Implication directe des $d(A^{-1}C^{-2})_2$ et $d(T_1G_2)_2$ dans l'interaction avec les DKAs
- ❖ L'interaction la plus spécifique entre l'halobenzène du DTG et les bases terminales C^4 et G^{-4} situées aux extrémités de l'ADN viral



Meilleure spécificité de DTG



Plan

- ❖ Introduction générale
- ❖ Projets de recherche
- ❖ **Inhibition de l'intégrase du VIH-1**
 - A. Introduction
 - B. Système étudié
 - C. Etude du mécanisme d'action des inhibiteurs DKAs
 - D. Modélisation de nouveaux inhibiteurs dérivés**
- ❖ Conclusions générales et Perspectives

Résultats

- a. Conception de nouveaux noyaux halobenzéniques**
- b. Caractérisation de l'interaction des noyaux dérivés avec l'ADN viral**

Stratégie de conception

Conception de nouveaux noyaux halobenzéniques d'affinités augmentées à l'ADN viral sur la base du modèle de DTG, à partir de substitutions



Modélisation du complexe ternaire ; noyau substitué + C⁴ + G⁻⁴



Etude qualitative de l'interaction des trois partenaires



Visualisation des interactions non covalentes (NCI)



Détermination des contours des potentiels électrostatiques (MEP)



Etude quantitative de l'interaction des trois partenaires



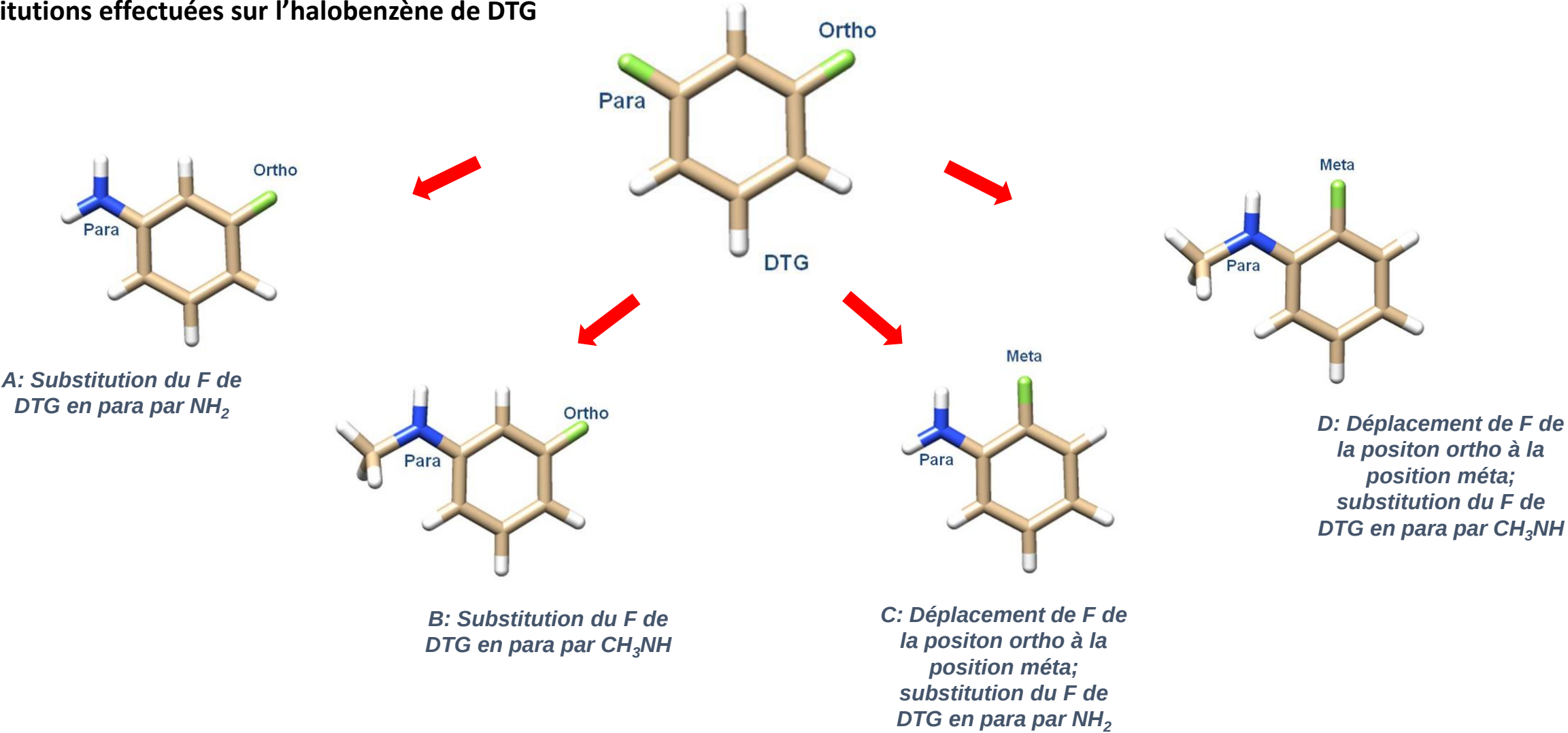
Calcul de l'énergie d'interaction du complexe par chimie quantique



Calcul de l'énergie d'interaction du complexe par champs de force polarisable SIBFA

Conception de nouveaux dérivés de DTG

Substitutions effectuées sur l'halobenzène de DTG

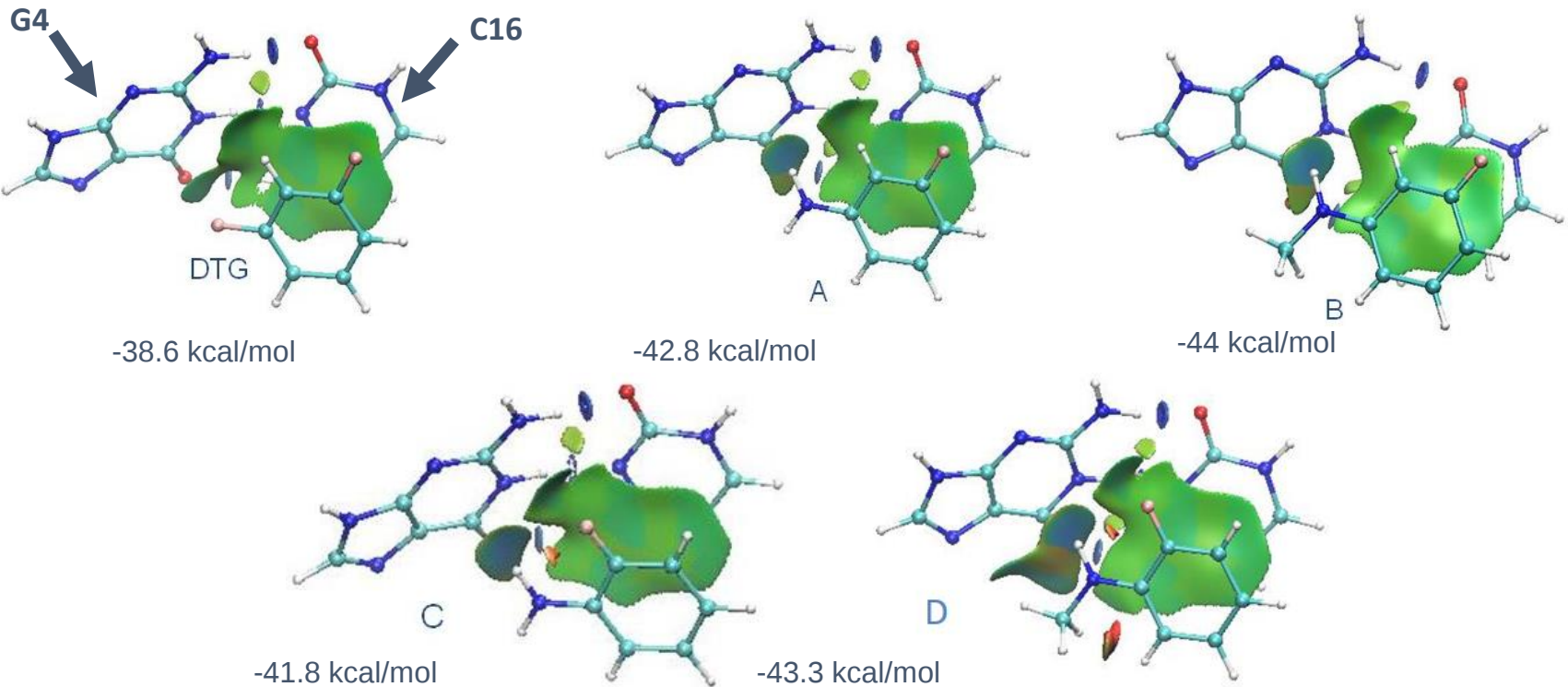


Evaluation des interactions des halobenzènes dérivés avec l'ADN viral

Evaluation des interactions des nouveaux halobenzènes dérivés de DTG avec G⁻⁴ et C⁴ de l'ADN viral traité au sein de l'intasome

Non Covalent Interactions-plot

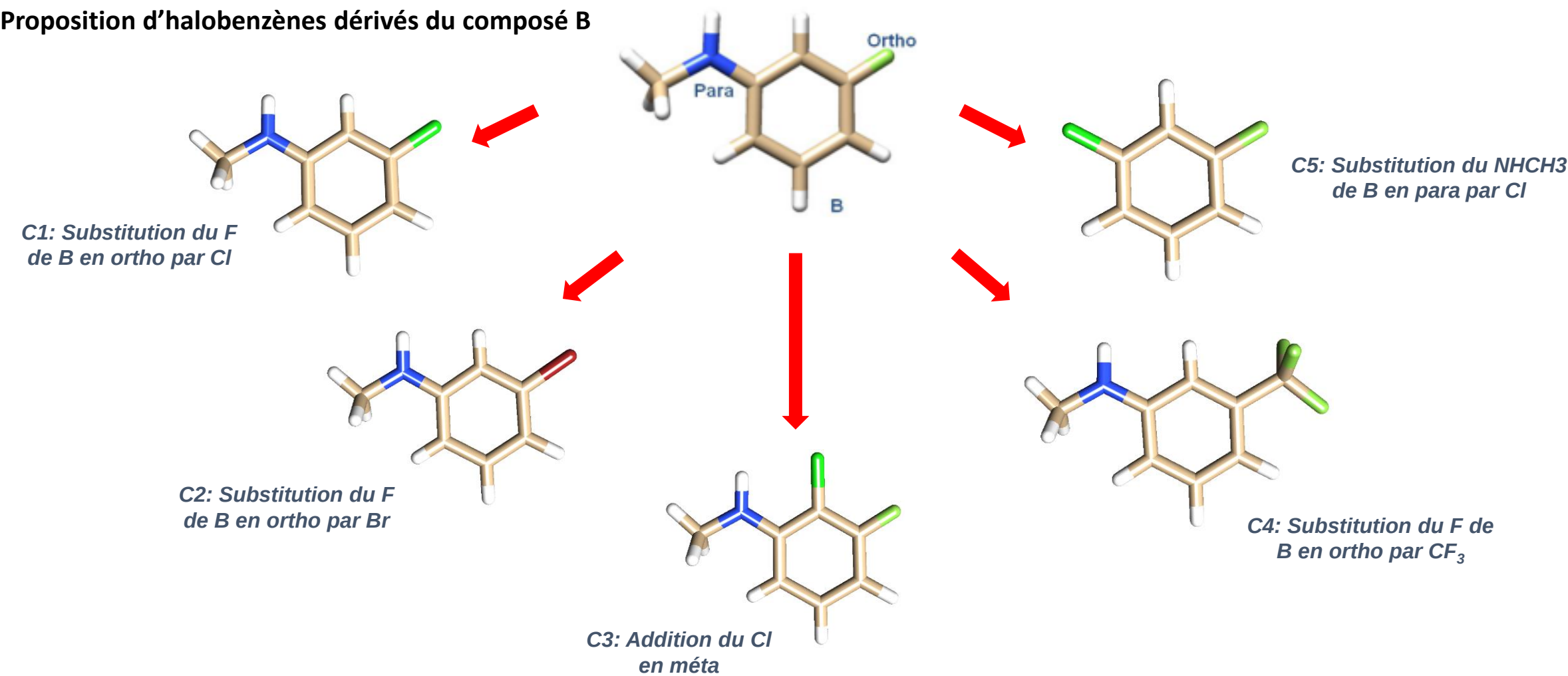
Calcul des énergies d'interaction



- Les quatre composés présentent tous de meilleures zones d'interaction que le DTG avec C⁴ et G⁻⁴
- ➡ ○ Le dérivé (B) affiche les zones d'interactions les plus denses et les plus larges, donc la meilleure affinité aux nucléotides
- Les calculs des énergies d'interaction confirment les résultats NCI-plot

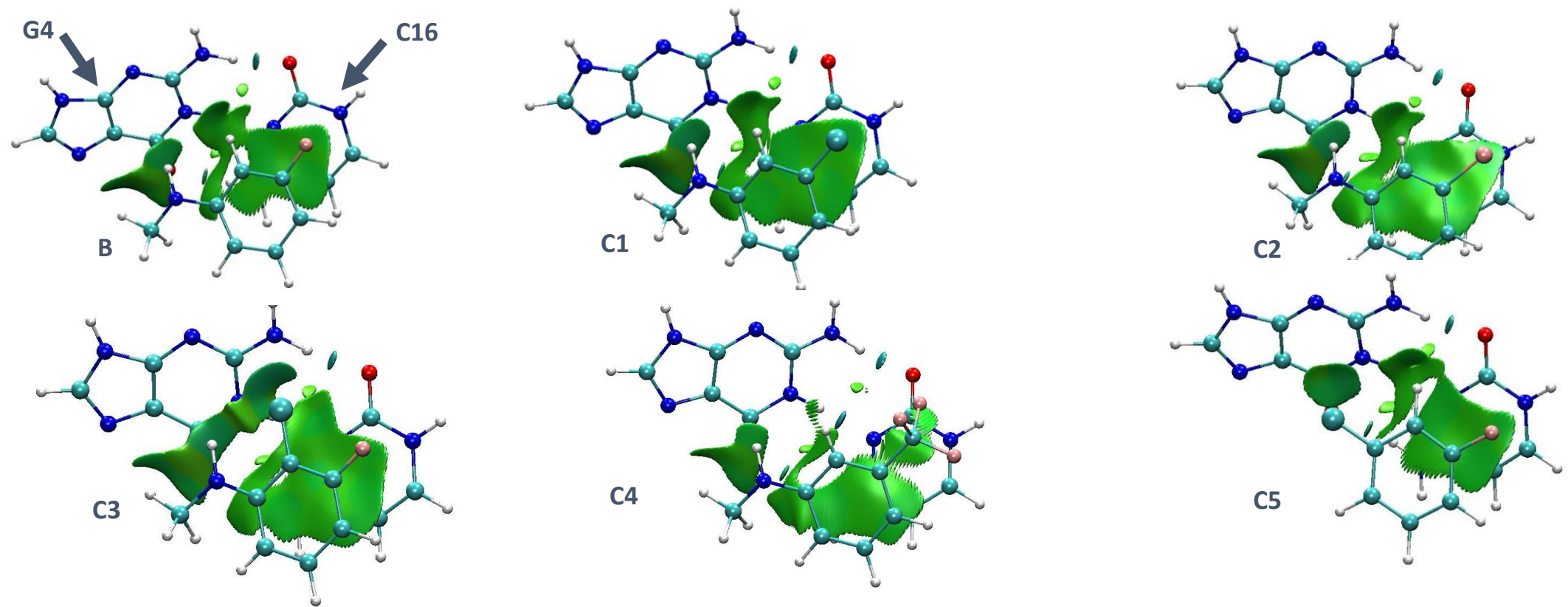
Conception d'une deuxième série d'inhibiteurs

Proposition d'halobenzènes dérivés du composé B



Analyse topographique des complexes d'inhibiteurs

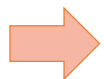
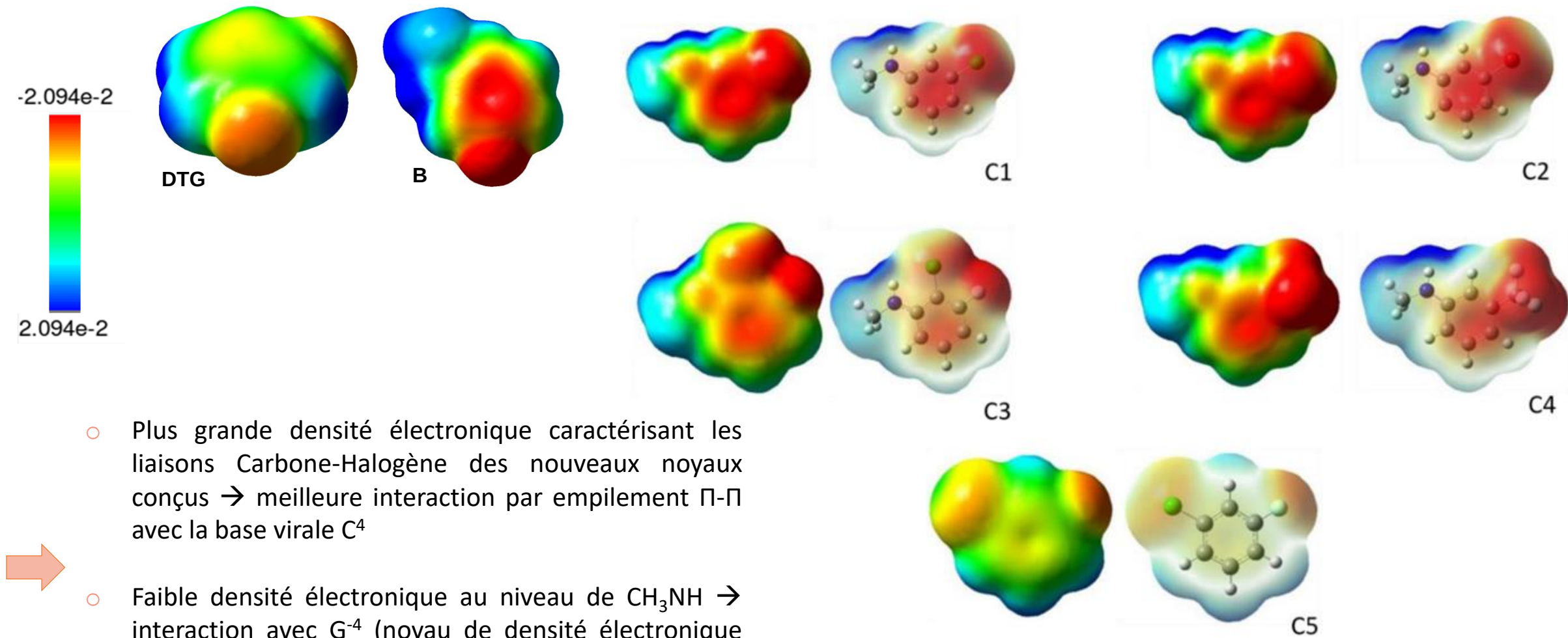
Non Covalent Interactions-plot



- Meilleurs scores d'interaction des nouveaux noyaux conçus avec les deux bases d'ADN, en comparaison avec DTG
- ➡ ○ Zones d'interactions particulièrement favorables pour C1, C2 et C4, donc meilleure affinité aux nucléotides que le composé B
- Le composé C4 inhibiteur le plus spécifique: liaisons électrostatiques favorisées avec G⁻⁴ via CH₃NH et empilement π - π fort avec C⁴ via CF₃

Analyse topographique des complexes d'inhibiteurs

Potentiel électrostatique moléculaire (MEP)



- Plus grande densité électronique caractérisant les liaisons Carbone-Halogène des nouveaux noyaux conçus → meilleure interaction par empilement π - π avec la base virale C⁴
- Faible densité électronique au niveau de CH₃NH → interaction avec G⁻⁴ (noyau de densité électronique élevé)
- Résultats en accord avec NCI Plot

Détermination des énergies d'interaction du complexe ternaire

Energie d'interaction totale= ΔE totale = Energie du complexe (Dérivé de DTG + C₁₆ + G₄) – (Energie de l'inhibiteur+ Energie C₁₆ + Energie G₄)

Composés	ΔE (kcal/mol) (Chimie Quantique)
DTG	-37,4
Compound B	-44,0
Composé C1	-44,7
Composé C2	-44,9
Composé C3	-43,0
Composé C4	-45,5
Composé C5	-37,5



- Meilleures affinités aux nucléotides obtenues avec 3 composés de la seconde génération
- Les calculs des énergies d'interaction confirment l'analyse topographique des complexes d'inhibiteurs

Conclusions

- ❖ Conception de nouveaux inhibiteurs halogénés d'INSTIs plus efficaces que DTG



Halogénations (Fluor, Chlore et Brome)



Substitutions (groupements donneurs d'électrons CH_3NH , groupements attracteurs d'électrons CF_3 et Fluor)

- ❖ Renforcement des interactions entre les nouveaux halobenzènes et C^4 et G^{-4}



Augmentation des interactions non covalentes



Optimisation du potentiel électrostatique au sein des complexes d'inhibiteurs

- ❖ Affinités d'interaction plus spécifiques avec les bases virales des nouveaux noyaux conçus, par rapport à DTG

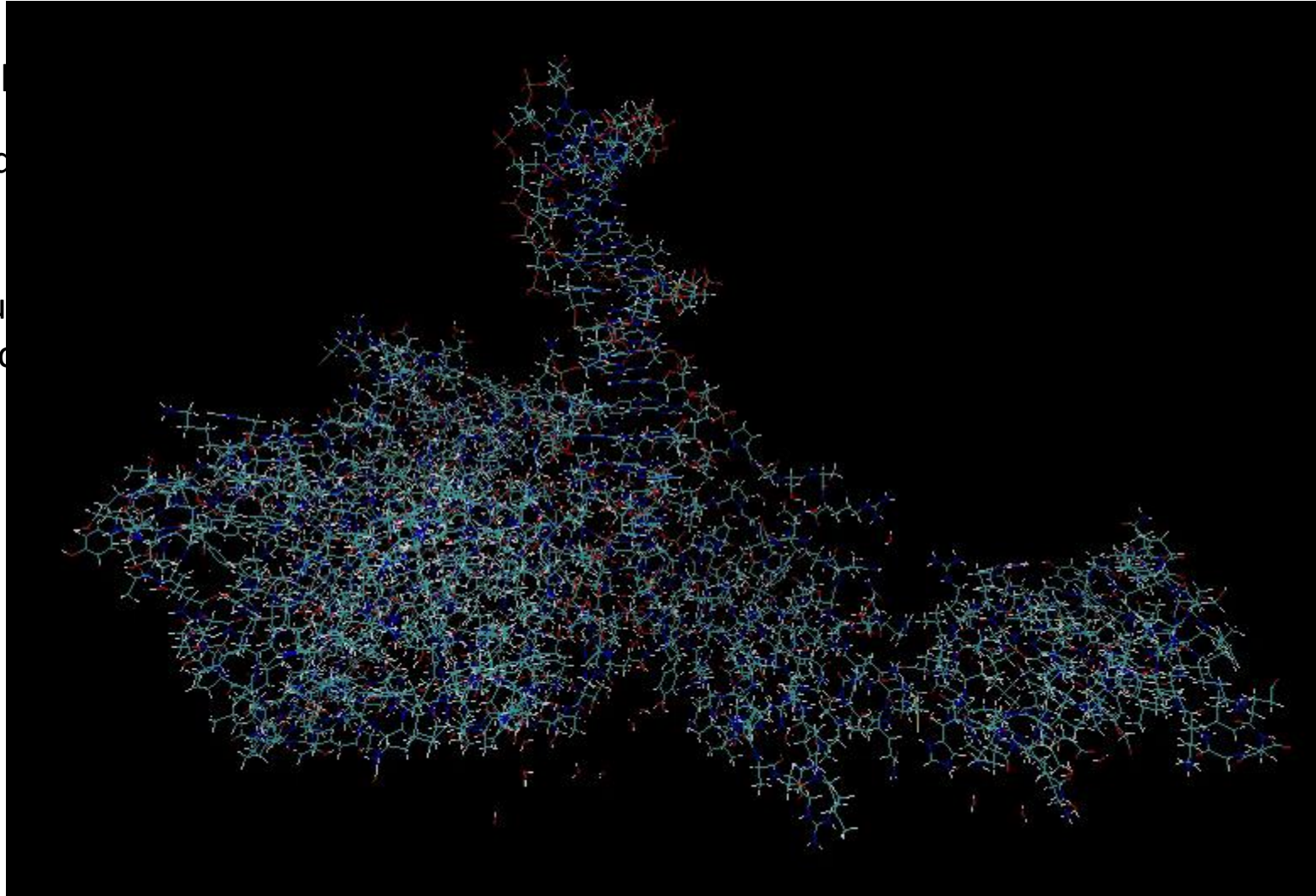
Conclusions générales

- Détermination du mécanisme d'action des DKA
- Explication du potentiel de DTG à surmonter la résistance virale
- Renforcement des affinités de liaison des ligands pour leurs cibles par des halogénations et substitutions sélectives
- Conception de dérivés de DTG, prometteurs en complexe avec l'ADN viral de l'intégrase du VIH-1

Perspectives

L'intasome du VIH-1 construit et solvato par TINKER HP

- Explorer la nature et l'impact des interactions
- Amarrer les dérivés de l'EVG dans le sein du complexe
- Réaliser la dynamique moléculaire de l'EVG, le DTG et les nucléotides
- Effectuer la synthèse chimique

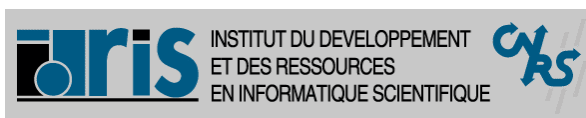


seins du complexe

re ultérieurement



Remerciements



Pr Richard Maroun
Dr Zeina Hobaika
Dr Farah Ammar
Mlle Perla El Darazi
Mlle Dina El Ahdab
Mlle Dima Daccache
Mlle Stephanie Khabbaz
Mlle Yara Tabet
M. Joseph Francis

Pr Jean-Philip Piquemal
Dr Nohad Gresh
Dr Olivier Parisel
Mlle Sehr-Naseem Khan
Mlle Perla El Darazi
Mlle Dina El Ahdab
M. Louis Lagardère
M. Felix Aviat

Dr Krystel El Hage,
Universität Basel, Suisse

Dr Léa El Khoury
University of California,
Irvine, USA

Dr Christophe North,
Sorbonne Universités,
France

Publications: 14 parues, 4 en cours
de rédaction, 1 en cours de préparation,
Communications affichées: 5
Communications orales: 9
1 Brevet d'invention

2 thèses de doctorat soutenues, 1 thèse en
cours
14 stages de Master
L'Oréal Unesco FWIS Pan Arab Program 2011
TechWomen Program 2012