Université de Lille
Année Universitaire 2022/2023

Faculté de Pharmacie de Lille

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 06 juillet 2023
Par Mme BOUREL Louisa

Les interactions protéine-protéine : de la druggabilité des interfaces d'interaction au ciblage thérapeutique

---

Membres du jury :

Président et directeur de thèse : **Professeur Nicolas LEBEGUE**
Professeur de chimie thérapeutique, Faculté de Pharmacie, Lille, UFR3S

Assesseurs : **Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET**
Professeur de chimie thérapeutique, Faculté de Pharmacie, Caen

Docteur Thomas GUERRIER
Docteur en Pharmacie, Docteur en Sciences, Ingénieur de recherche, INFINITE U1286, Lille

REDACTION	VERIFICATION	APPROBATION
Audrey Hennebelle **Assistante de direction**	**Cyrille Porta** **Responsable des Services**	**Delphine Allorge** **Doyen**

Université de Lille

Président	Régis BORDET
Premier Vice-président	Etienne PEYRAT
Vice-présidente Formation	Christel BEAUCOURT
Vice-président Recherche	Olivier COLOT
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens	Kathleen O'CONNOR
Vice-président Ressources humaines	Jérôme FONCEL
Directrice Générale des Services	Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen	Dominique LACROIX
Premier Vice-Doyen	Guillaume PENEL
Vice-Doyen Recherche	Éric BOULANGER
Vice-Doyen Finances et Patrimoine	Damien CUNY
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires	Sébastien D'HARANCY
Vice-Doyen RH, SI et Qualité	Hervé HUBERT
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie	Caroline LANIER
Vice-Doyen Territoires-Partenariats	Thomas MORGENROTH
Vice-Doyenne Vie de Campus	Claire PINÇON
Vice-Doyen International et Communication	Vincent SOBANSKI
Vice-Doyen étudiant	Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen	Delphine ALLORGE
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études	Benjamin BERTIN
Assesseur aux Ressources et Personnels	Stéphanie DELBAERE
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement	Anne GARAT
Assesseur à la Vie de la Faculté	Emmanuelle LIPKA
Responsable des Services	Cyrille PORTA
Représentant étudiant	Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSE	Régis	Sciences végétales et fongiques	87

M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85

Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87

M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85

Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86

Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87

M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

CYCLE DE VIE DU DOCUMENT

Version	Modifié par	Date	Principales modifications
1.0		20/02/2020	Création
2.0		02/01/2022	Mise à jour

Faculté de Pharmacie de Lille

3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
https://pharmacie.univ-lille.fr

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Nicolas Lebègue, Professeur de chimie thérapeutique à l'Université de Lille qui a assuré la direction de cette thèse. Votre gentillesse, votre disponibilité et vos nombreux conseils ont été précieux durant la rédaction de cette thèse. Merci également pour l'honneur que vous me faites en présidant ce jury.

Je tenais à témoigner toute ma gratitude au Professeur Anne-Sophie Voisin-Chiret, Professeur de chimie thérapeutique à l'Université de Caen, pour l'honneur que vous me faite d'accepter de juger ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Docteur Thomas Guerrier pour faire partie de mon jury de thèse mais également pour son aide quotidienne au laboratoire.

Enfin, un grand merci à toutes celles et ceux qui me sont chers dont leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée durant toutes ces années.
Je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien et pour toujours avoir cru en moi.
Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai partagé mes études et qui m'ont permis d'en être là aujourd'hui.
Pour finir, je remercie tous mes collègues d'Infinite, pour m'avoir aidé durant la fin de ma rédaction et avoir relu ce mémoire.

Sommaire

Remerciements 15
Sommaire 17
Liste des illustrations 19
Liste des tableaux 23
Introduction 25
Partie 1 : Les interactions protéine–protéine 27
I. Caractérisation des interactions protéine-protéine 27
A. Définition des interactions protéine-protéine 27
B. Le rôle physiologique des IPP 28
C. Régulation des IPPs 30
II. Caractéristiques d'une interaction protéine-protéine 31
A. Interfaces de contact 31
B. Surface d'interaction et *hotspots* 34
Partie 2 : Inhibition des interactions protéine-protéine 37
I. Druggabilité des IPP 37
A. Structure des IPP 38
B. Présence de cavités 41
C. Caractère hydrophobe 42
D. Taille des interfaces 44
E. Complémentarité 46
II. Les stratégies pour cibler les IPP 47
B. Criblage à haut débit 49
C. Développement de molécules inhibitrices d'IPP par approche par fragment 55
D. Peptidomimétiques 60
F. Protéomimétiques 64
Conclusion 71
Bibliographie 75

Liste des illustrations

Figure 1 Répartition des classes biochimiques des cibles des médicaments sur le marché, adapté de Zheng et al.(1).....25
Figure 2 Exemple de rôles des IPP avec un exemple de protéines ayant ce rôle. Adapté de Ottmann (5).....29
Figure 3 Classification structurelle des interactions protéine-protéine avec a) une interaction entre 2 protéines globulaires avec des surfaces préformées ; b) une interaction entre deux protéines globulaires où au moins l'un des partenaires va changer de conformation lors de la liaison ; c) Interaction d'une protéine globulaire avec un peptide désordonné ; d) Interaction d'une protéine globulaire avec un peptide ordonné; e) Interaction de deux peptides. Adapté de Scott et al. (14).....32
Figure 4 Caractéristiques des sites de liaison d'IPP avec le nombre de poches occupées par protéine lors de A. l'interaction entre une protéine et son ligand et B. une IPP. Adapté de Fuller et al. (17).....33
Figure 5 Modélisation de l'énergie libre de liaison de chaque résidu et de leur localisation dans le complexe protéine-protéine entre A) D1.3, l'idiotope de l'anticorps monoclonal murin anti-lysozyme et B) E5.2, un anticorps monoclonal murin anti-idiotope. Les couleurs des résidus sont définies par leur contribution énergétique à la liaison (déterminées par alanine scanning) avec en bleu : <0,5 kcal/mol ; en vert foncé : 0,5 à 2,0 kcal/mol ; en vert clair : 2,0 à 3,5 kcal/mol ; en rouge : >3,5 kcal/mol. Adapté de Bogan et Thorn (15).....35
Figure 6 Liaison entre deux protéines avec l'exclusion du solvant autour des hotspots permettant l'interaction entre les résidus 36
Figure 7 Arbre de décision pour évaluer la druggabilité d'une interface d'IPP. NF : non favorable. Adapté de Chène (3).....38
Figure 8 Méthodes de modélisation de la structure des complexes protéine-protéine avec a) le docking à partir des deux structures connues des protéines non complexées et b) le template-based modeling où sont comparées les séquences des protéines d'intérêt avec des protéines dont la structure est connue. Repris de Szilagyi et Zhang (23).....40
Figure 9 Types d'interfaces d'interaction avec A) interface avec une poche de liaison dans une liaison protéine-ligand ; B) IPP avec une protéine avec une poche en sillon ;

C) protéine avec une interface d'interaction étendue pour les IPP. Adapté de Raj et al. (25).....42
Figure 10 Calcul de la pénalité de désolvatation induite par une sonde neutre placée à la surface d'une protéine. La sonde va être placée à différents endroits sur la surface de la protéine, tous les 3 A. Repris de Fiorucci et Zacharias (26). 43
Figure 11 Types d'interface en fonction de la taille de la surface d'interaction. Adapté de London et al. (27).....45
Figure 12 Représentation des différents types d'interfaces en fonction de la complémentarité entre les deux protéines lors d'une IPP avec des exemples d'inhibiteur correspondant au type d'IPP. Adapté de Smith et Gestwicki (29).....47
Figure 13 Inhibition d'une IPP par : un modulateur allostérique qui se fixe sur un site différent de l'interface de contact et qui va moduler la conformation de la protéine ; un modulateur orthostérique qui va se fixer au niveau de l'interface protéine-protéine et qui rend l'interaction entre les deux protéines impossible 48
Figure 14 Grandes étapes de développement d'un composé identifié par criblage ..49
Figure 15 Comparaison des profils physicochimiques de molécules issues d'une chimiothèque focalisée en iPPI (bleu) et actives par voie orale (rouge) approuvées par la FDA. Adapté de Labbé et al. (34) 51
Figure 16. Rôle de p53. p53 et MDM2 sont impliqués dans une boucle d'autorégulation avec p53 induisant l'expression de MDM2 et MDM2 inhibant p53. La régulation de p53 par MDM2 est normalement inhibée lors d'une lésion de l'ADN. Inspiré de Theobald et Offringa (35).....52
Figure 17 Intérêt de cibler l'interaction p53/MDM2 dans le cancer.....53
Figure 18 Structure des Nutlines et évaluation de l'affinité des composés pour l'interaction p53/MDM2. Adapté de Vassilev et al.(36) 54
Figure 19 A) Superposition de la Nutline-2 avec les chaines latérales de Phe19, Trp23 et Leu26 de p53 représentées en vert ; B) Interaction de MDM2 et la Nutline-2 avec les poches en vert, les régions exposées au solvant en rouge, il est possible de voir que l'un des groupement bromophényl est entré dans la poche Trp de MDM2. Adapté de Vassilev et al. (36) 54
Figure 20 La famille de protéines de Bcl-2 peut être séparée en protéines anti- et pro-apoptotiques. Toutes les protéines présentent au moins une homologie de séquence avec Bcl-2. La plupart des protéines de la famille de Bcl-2 possède un domaine

transmembranaire du côté C-ter qui est responsable de leur localisation membranaire. Inspiré de Giam et al. (41) 56
Figure 21 Mécanisme de régulation de la formation du pore mitochondrial par les protéines de type Bcl. Adapté de Willis et al. (43) 57
Figure 22 **A.** Structure du complexe Bcl-2 (gris) domaine BH3-only de Bax (jaune). **B**. Hotspots et sites de liaison dans Bcl-2 58
Figure 23 Structure des inhibiteurs de Bcl-2/Bax avec leur affinité pour Bcl-2 59
Figure 24 Exemples de stratégies pour mimer les acides aminés. Repris de Avan et al. (52) 61
Figure 25 Voies d'activation de l'apoptose. La voie extrinsèque implique la liaison d'un ligand de mort cellulaire à un récepteur de mort cellulaire à la surface de la cellule. La caspase-8 va être clivée et va activer les caspases 3 et 7 ce qui va induire l'apoptose. La voie intrinsèque va débuter par la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale suite à des signaux intrinsèques de mort cellulaire. Cela va induire la libération de protéines solubles intermembranaires comme le cytochrome c et Smac (second mitochondria derived activator of caspase). Le cytochrome c va se lier à APAF-1 (apoptosis protease-activating factor 1) et la procaspase 9 ce qui va conduire à la formation d'apoptosomes et induire l'activation de la caspase 9. La caspase 9 va ensuite activer les procaspases 3 et 7. Smac va inhiber XIAP (X linked inhibitor of apoptosis) ce qui va libérer la caspase-3 et la caspase-9. Les caspases 3 et 7 vont conduire à l'apoptose. Repris de Lu et al. 62
Figure 26 Structure des séquences qui lient le domaine BIR3 de XIAP avec ATPF : la partie N-ter de la caspase-9 ; AVPI : la structure N-ter de Smac 63
Figure 27 Structure chimique du peptide AVPI de Smac, du peptidomimétique 1 et du xevinapant. Adapté de Cai et al. (58) 64
Figure 28 Structure générale des oligooxipipérazines (OHM) mimant les hélices α et orientant les chaines latérales correctement. Adapté de Lao et al. (61) 65
Figure 29 A) Représentation de l'interaction entre HIF1α et le domaine CH1 de p300 avec en bleu les résidus clés Leu818, Leu822 et Gln824 de HIF1α, en orange le domaine CH1 de p300 avec une superposition à droite de l'hélice α de HIF1α en bleu avec un inhibiteur OHM en vert. B) Structure de l'inhibiteur OHM. Adapté de Lao et al. (61) 66
Figure 30 Exemple d'agrafage d'un peptide linéaire en hélice α, adapté de Moiola et al.(63) 67

Figure 31 Structure des composés SAH-p53-8 et ATSP-7041, des stapled peptides mimes de l'hélice alpha de p53, capables d'inhiber MDM2 et MDMX 69
Figure 32 ATSP-7041 restaure l'apoptose dans les cellules cancéreuses p53WT avec A) Viabilité cellulaire de quatre lignées cellulaires p53WT (SJSA-1, MCF-7, HCT-116, RKO) et deux lignées où p53 est mutée (SW480 et MDA-MB-435), le graphe représente un pourcentage de cellules viables par rapport au contrôle sans ATSP-704. B) ATSP-7041 induit une réduction de la taille de la tumeur in vivo dans un modèle de xénogreffe d'ostéosarcome SJSA-1 où il y a une amplification de MDM2. Adapté de Chang et al. (64) 70

Liste des tableaux

Tableau 1 Nombre de protéines et d'interactions dans chaque réseau. Adapté de Kar et al. (22) 39
Tableau 2 Comparaison des techniques de criblage haut débit avec l'approche par fragment (40) 55
Tableau 3 Avantages et inconvénients d'utiliser des peptides pour inhiber une IPP. 60
Tableau 4 Exemples d'inhibiteurs d'IPP évalués en clinique en 2020. Repris de Lu et al. (54) 74

Introduction

La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques est un challenge constant pour la recherche pharmaceutique. La découverte de nouveaux médicaments passe essentiellement par la recherche et le développement de molécules qui agissent sur une cible thérapeutique présélectionnée. Les progrès en données omiques, en biologie structurale et dans les connaissances en mécanismes physiopathologiques ont suscité un intérêt croissant pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques (1).

Au cours des dernières décennies, la majorité des médicaments qui ont été développés sont des inhibiteurs d'enzymes (Figure 1). En effet, les substrats des enzymes sont généralement de petites molécules ce qui facilite le développement d'inhibiteurs de bas poids moléculaire qui ont une biodisponibilité acceptable.

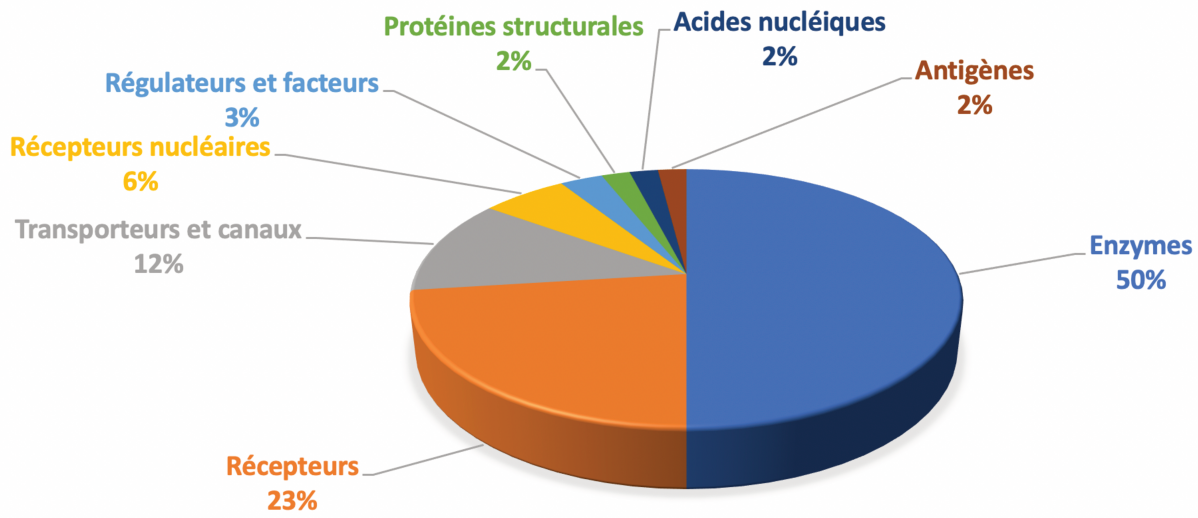


Figure 1 Répartition des classes biochimiques des cibles des médicaments sur le marché, adapté de Zheng et al.(1)

Aujourd'hui l'industrie pharmaceutique se tourne vers d'autres opportunités que le ciblage enzymatique qui a conduit à une faible innovation thérapeutique ces dernières années.

D'après une étude par Overington et al. (2) sur les molécules approuvées par la FDA (*food and drug administration*) aux Etats-Unis entre 1989 et 2000, seules 6 % des molécules avaient pour cible un nouveau domaine. Au contraire, 76% des

médicaments approuvés par la FDA étaient dirigés contre un domaine déjà ciblé par d'autres médicaments déjà sur le marché, ce qui a conduit à une faible innovation.

Parmi les candidats potentiels, les inhibiteurs d'interactions protéine-protéine constituent une nouvelle classe de molécules attrayante. De nombreuses protéines, incluant les enzymes, exercent leur activité biologique en interagissant avec d'autres protéines. La prévention de ces interactions pourrait être un moyen d'inhiber l'activité de ces protéines (3).
La diversité structurale et le large nombre d'interactions protéine-protéine offrent beaucoup de cibles potentielles et nouvelles pour la recherche pharmaceutique. En effet, il a été estimé qu'il y avait entre 130 000 et 650 000 interactions protéine-protéine dans l'interactome chez l'Homme (4).

Partie 1 : Les interactions protéine–protéine

I. Caractérisation des interactions protéine-protéine

A. Définition des interactions protéine-protéine

Les interactions protéine-protéine (IPP) sont impliquées dans la majorité des processus biologiques, dans leur réalisation et leur régulation. L'étude des IPP d'une protéine est nécessaire à la compréhension du/des mode(s) d'action de celle-ci. Il ne faut pas uniquement regarder son activité intrinsèque biochimique, mais également ses interactions avec les autres protéines, notamment au sein de pathologies liées à des mutations sur des protéines oncogènes ou suppresseur de tumeur (5).
Les IPP concernent les contacts physiques entre des protéines au sein d'une cellule ou d'un organisme *in vivo* (6). Ces contacts physiques dans les IPP sont spécifiques, l'interface d'interaction est intentionnelle et non accidentelle, c'est à dire le résultat de forces/évènements biomoléculaires sélectionnés et spécifiques. Autrement dit, les collisions aléatoires en sont exclues, comme les interactions qu'une protéine fait lorsqu'elle est en train d'être synthétisée, pliée, vérifiée ou dégradée. Toutes les protéines vont interagir avec le ribosome, beaucoup vont toucher des protéines chaperonnes et la plupart vont entrer en contact avec les machineries de dégradation. L'interface d'interaction doit donc être impliquée dans un but spécifique, distinct des fonctions classiques comme la production de la protéine ou sa dégradation (6).

Un autre élément important pour définir les IPP concerne le contexte biologique de l'interaction. En effet, elles vont dépendre du type cellulaire, de la phase du cycle cellulaire, le stade de développement, des conditions environnementales, des modifications éventuelles des protéines (comme la phosphorylation), de la présence de cofacteurs ou d'autres partenaires de liaison (6).
Les IPP peuvent se produire entre des chaines identiques ou différentes, pour former respectivement des homo-oligomères ou des hétéro-oligomères. L'association peut être isologue, impliquant la même surface de contact sur les deux monomères, ou hétérologue (7).

Il faut différencier les IPP obligatoires des non-obligatoires. Dans le cas des IPP obligatoires, les protéines ne peuvent pas être stables ou fonctionnelles seules *in vivo* (par exemple l'ADN polymérase). A l'inverse, pour les IPP non-obligatoires, les protéines peuvent être stables et/ou fonctionnelles sans être associées à leur partenaire. Comme les complexes antigène-anticorps où les différentes protéines sont souvent localisées dans des endroits différents et nécessitent de ce fait d'être stable indépendamment.

De plus, les IPP peuvent aussi être définies par leur durée d'interaction. Il y a les interactions permanentes et les interactions transitoires. Les interactions permanentes sont souvent très stables, n'existant donc que sous cette forme complexée. Tandis que pour les interactions transitoires, les protéines vont s'associer et se dissocier *in vivo* ; au sein de ces associations transitoires, il faut distinguer les interactions transitoires faibles et fortes. Les interactions transitoires faibles impliquent un équilibre dynamique entre les oligomères en solution où l'interaction est rompue puis formée à nouveau continuellement. Pour les interactions transitoires fortes, un élément déclencheur est nécessaire pour rompre l'équilibre. Par exemple, la protéine G se dissocie en sous-unités Gα et Gβγ avec la liaison du GTP (guanosine triphosphate) alors que la protéine G forme un complexe stable avec le GDP (guanosine diphosphate) (7).
Dans ce mémoire seront présentées uniquement les IPP non covalentes c'est à dire lorsque les protéines réalisent des fonctions indépendantes avant leur association, à l'opposé des assemblages macromoléculaires permanents comme les protéines oligomériques, les capsides des virus ou encore les fibres musculaires (8).

B. Le rôle physiologique des IPP

Les interactions directes des protéines entre elles sont intrinsèquement impliquées dans la majorité des processus chez les organismes vivants (Figure 2).

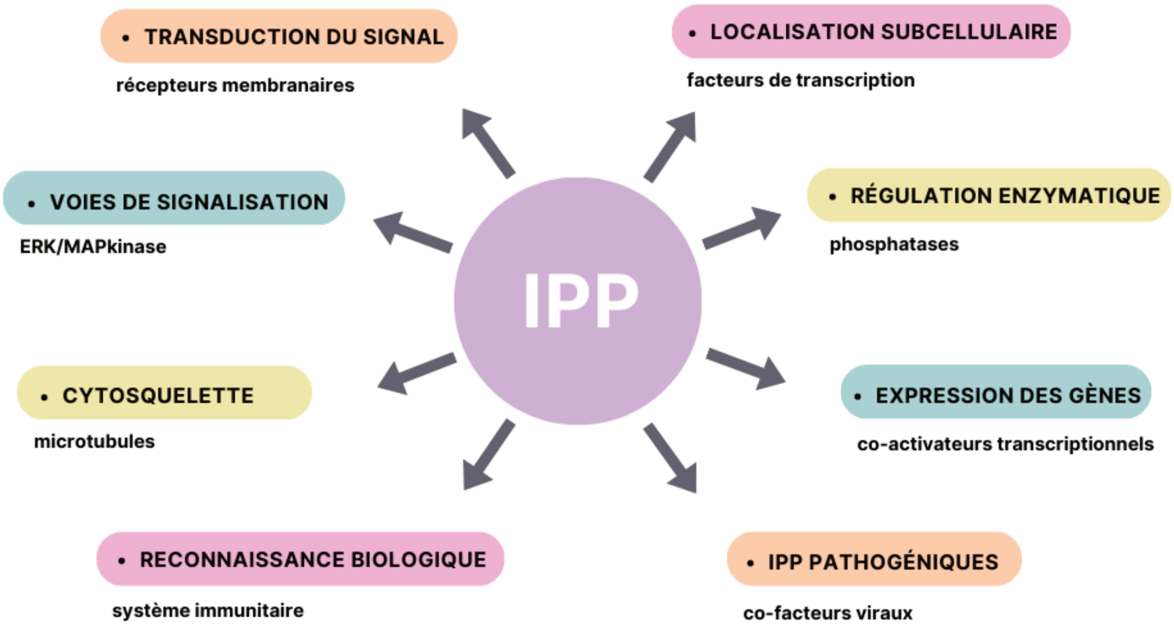


Figure 2 Exemple de rôles des IPP avec un exemple de protéines ayant ce rôle. Adapté de Ottmann (5)

Les IPP sont impliquées dans la réception et la propagation des signaux de croissance. La liaison protéique d'une molécule de signalisation comme l'EGF (e*pidermal growth factor*) à son récepteur membranaire l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) va déclencher un rassemblement intracellulaire et l'activation de complexes de signalisation (ERK/MAP par exemple) (5).

De nombreuses fonctions cellulaires comme la mobilité sont liées à des changements fonctionnels dans le cytosquelette. L'assemblage et le désassemblage dynamique des filaments d'actine sont basés sur l'interaction de l'actine avec d'autres molécules d'actine et d'autres protéines partenaires comme ADF/cofiline et la profiline (9).

La reconnaissance biologique, comme dans le système immunitaire, est aussi médiée par des IPP comme dans le cas de la diapédèse avec la liaison du LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen-1*) présent à la surface des cellules immunitaires et ICAM-1 (*intracelullar adhesion molecule-1*) trouvé à la surface des cellules endothéliales afin d'initier l'inflammation dans le tissu environnant (10).

Les IPP interviennent dans la régulation des protéines et ont un rôle très important dans le contrôle de la localisation subcellulaire de celles-ci et notamment des facteurs de transcription. Le facteur de transcription NFκB (*nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells*) est séquestré dans le cytoplasme lorsqu'il est lié à sa protéine inhibitrice IκB (*inhibitor of κ B*) par exemple. Quand NFκB n'interagit plus avec

IκB, il peut migrer dans le noyau et exercer son rôle de facteur de transcription, induisant l'expression d'une large gamme de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire et immunitaire (11).

De nombreuses IPP sont médiées elles-mêmes par des IPP. Par exemple la calcineurine phosphatase est activée après liaison avec la calmoduline (activée elle-même par sa liaison avec Ca^{2+}) et est inhibée lorsqu'elle est liée avec cabin-1 (*calcineurin binding protein-1*) ou avec la calcipressine (12).

De plus certains organismes pathogènes nécessitent des protéines hôtes comme cofacteurs pour exercer leur activité. L'exo-enzyme S de *Pseudomonas aeruginosa* (une bactérie opportuniste responsable d'infections graves et surtout nosocomiales) doit interagir avec les protéines 14-3-3 de l'hôte pour pouvoir transférer un groupement ADP-ribose du NAD+ (nicotinamide adénine dinucléotide) à des petites protéines G comme Ras ce qui va inhiber leur activité (13).

C. Régulation des IPPs

Les protéines sont très spécifiques dans leur choix de partenaire d'interaction. Cependant, certaines protéines peuvent être multi spécifiques en ayant soit plusieurs partenaires de liaison (pouvant entrer en compétition) sur la même interface de contact soit des interfaces qui se chevauchent. Au vu du rôle crucial et du nombre d'IPP dans chaque cellule, elles doivent être étroitement orchestrées.

Il y a trois types de contrôle (7) :

- La rencontre. L'association de deux protéines dépend de la rencontre de leur surface de contact respective, ce qui requiert une co-localisation dans le temps et l'espace. Cette rencontre peut se produire entre des protéines à l'intérieur d'un compartiment (par exemple les complexes de signalisation intracellulaires) ou alors entre des protéines provenant de localisations différentes. Pour ces rencontres, une diffusion ou un transport vasculaire est essentiel.
- La concentration locale. Il y a des mécanismes de contrôle qui vont altérer la concentration locale de la protéine, ce qui va inclure un contrôle de l'expression du gène de la protéine d'intérêt ou de ses niveaux de sécrétion, sa dégradation protéique, son stockage temporaire, l'environnement local moléculaire, sa diffusion ou la viscosité du milieu d'interaction.

- L'environnement physicochimique local. L'affinité entre les protéines du complexe peut être altérée par la présence d'une molécule effectrice (par exemple l'ATP ou le Ca^{2+}) ou un changement dans les conditions physiologiques. Concrètement, cela peut se traduire par une modification de la concentration d'ions ou de protéines, des changements dans le pH et la température ou encore par des modifications covalentes comme la phosphorylation.

Les IPP sont donc principalement régulées par deux variables principales qui sont les concentrations locales des protéines et leur énergie de liaison intrinsèque qui est déterminée par les propriétés physicochimiques et géométriques de l'interface d'interaction. En effet, les protéines sont généralement entourées de partenaires potentiels de liaison avec différentes propriétés de surface. La spécificité vient de la complémentarité de forme et de chimie qui détermine l'énergie libre de liaison mais la localisation a aussi un rôle à jouer (7).

II. Caractéristiques d'une interaction protéine-protéine

A. Interfaces de contact

L'interface de contact est l'aire de la surface accessible sur les deux partenaires qui devient inaccessible au solvant à cause du contact protéine-protéine (8).
Il est possible de classer les interfaces de contact selon la complexité des épitopes de liaison.
Les IPP peuvent être divisées en une série de classes structurales (Figure 3):

- Interaction de deux protéines globulaires via un épitope discontinu et où les partenaires ne subissent pas de changement conformationnel à la liaison (Figure 3a).
- Interaction de deux protéines globulaires où au moins un des partenaires subit un changement conformationnel à la liaison (Figure 3b).
- Les IPP impliquant une protéine globulaire et une seule chaine peptidique (Figure 3c et d).
- Les IPP entre deux chaines peptidiques (Figure 3e).

Ces deux dernières classes peuvent être différentiées encore si les peptides changent de conformation à la liaison. Dans certains cas, le peptide est intrinsèquement désordonné ou alors c'est une région d'une protéine qui lors de la liaison avec son partenaire, va se folder selon une conformation spécifique. Dans d'autres cas, c'est une région pré-foldée d'une protéine qui va interagir avec son partenaire de liaison (14).

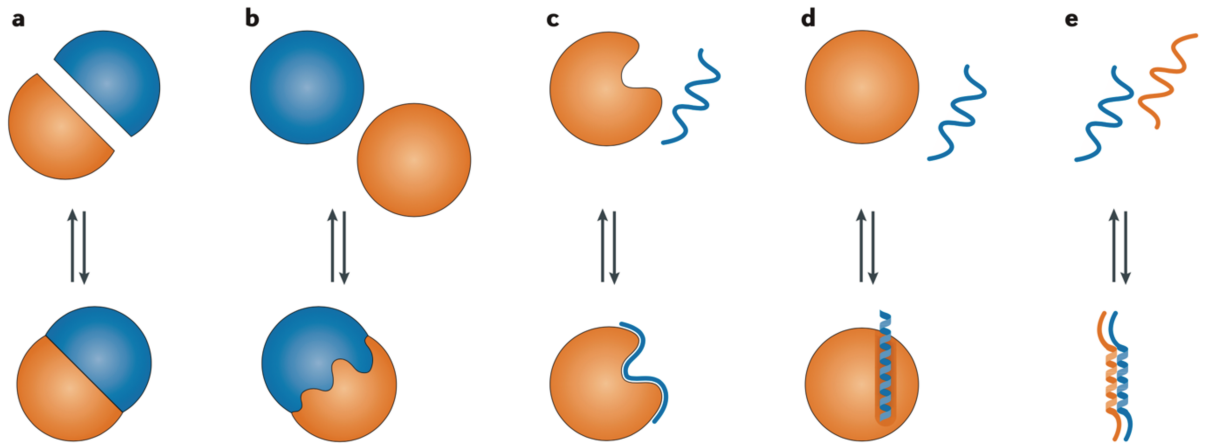


Figure 3 Classification structurelle des interactions protéine-protéine avec a) une interaction entre 2 protéines globulaires avec des surfaces préformées ; b) une interaction entre deux protéines globulaires où au moins l'un des partenaires va changer de conformation lors de la liaison ; c) Interaction d'une protéine globulaire avec un peptide désordonné ; d) Interaction d'une protéine globulaire avec un peptide ordonné; e) Interaction de deux peptides. Adapté de Scott et al. (14)

La plupart des interfaces de contact sont composées de deux protéines relativement larges avec une certaine complémentarité de forme et une complémentarité électrostatique (les zones à forte densité électronique d'une protéine et les zones à faible densité électronique de l'autre protéine s'attirent) (15). La taille standard d'une interface d'IPP est de 1200 à 2000 Å, mais cela peut varier en réalité entre 1000 et 6000 Å (16). Cependant, la taille de l'interface n'est pas corrélée à la taille du complexe protéique (8). En effet, les caractéristiques de liaison entre deux protéines sont différentes de celles d'une liaison entre une protéine et son ligand (17). Pour la liaison d'une protéine avec un ligand, une à deux poches de liaison larges vont être retrouvées (environ 530 $Å^3$) sur la protéine. Alors que pour les IPP, plusieurs poches de liaison de plus faibles tailles vont participer à l'interaction. Il va y avoir pour la plupart 6 poches de liaison mais avec des volumes plus petits (environ 55 $Å^3$) (Figure 4).

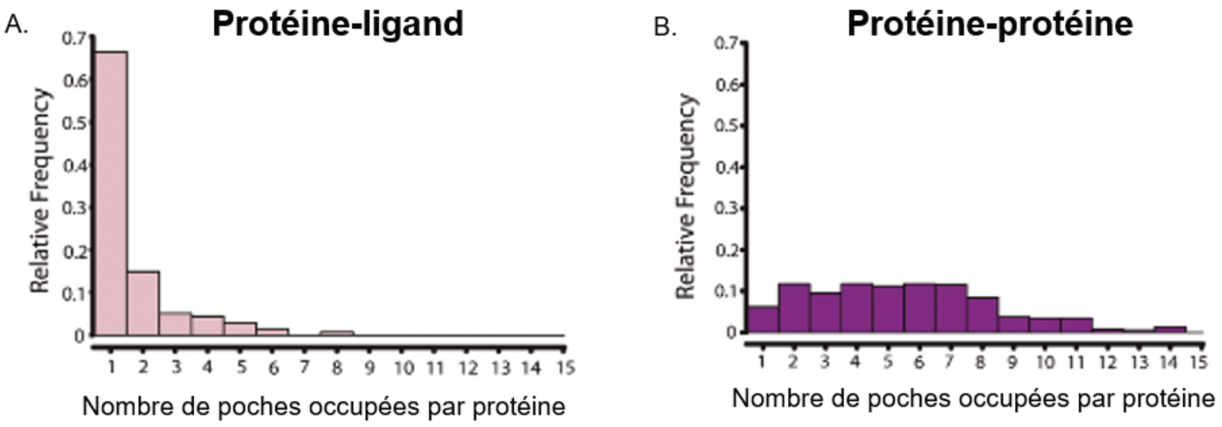


Figure 4 Caractéristiques des sites de liaison d'IPP avec le nombre de poches occupées par protéine lors de A. l'interaction entre une protéine et son ligand et B. une IPP. Adapté de Fuller et al. (17)

Ces interfaces de contact sont larges et plates, majoritairement hydrophobes (50-60%) et entourées de résidus polaires non chargés (25-35%) ou chargés (10-20%) ou sont des régions hydrophobes entrecoupées avec des interactions polaires et des molécules d'eau éparpillées sur la surface (14). Les interfaces d'IPP contiennent plus de résidus aromatiques (histidine, tyrosine, phénylalanine et tryptophane) que la surface normale d'une protéine (21% contre 8%) mais également plus de résidus aliphatiques (leucine, isoleucine, valine, méthionine) (17% contre 11%). Les interfaces présentent moins de résidus chargés : acide aspartique, acide glutamique, lysine, sauf pour l'arginine qui est l'acide aminé le plus présent au sein des interfaces d'IPP (10%) (8).

Pour les IPP obligatoires, les complexes ressemblent généralement à une structure globulaire plus grande avec une interface similaire à la structure interne de chaque protéine globulaire. Au contraire, pour les IPP non obligatoires, les interfaces sont en général plus petites et il y a moins d'interactions hydrophobes, vu que lors de la dissociation, les régions hydrophobes sont exposées au solvant ce qui n'est pas favorable énergétiquement (14).

B. Surface d'interaction et *hotspots*

Les interfaces protéine-protéine sont souvent plates, il n'y a généralement ni de site d'interaction apparent, ni de poche de liaison large disponible afin de permettre aux résidus d'interagir entre eux.

De plus, l'affinité d'interaction n'est pas distribuée uniformément sur toute la surface de contact, mais il y a la présence de *hotspots*. Ces *hotspots* sont des acides aminés situés au cœur de l'interface et qui contribuent de façon majeure à l'énergie libre d'interaction du complexe (14). On peut déterminer ces *hotspots* expérimentalement grâce à un test appelé *alanine scanning* (15). Cela permet de déterminer la contribution énergétique de chaque acide aminé dans une liaison en les mutant en alanine (et en mutant les résidus d'alanine en glycine). La mesure du changement d'énergie libre de liaison pour chaque mutant va alors permettre d'identifier quels sont les acides aminés les plus importants pour la liaison protéine-protéine.
Il pourrait être attendu que ces *hotspots* soient répartis uniformément au niveau de l'interface mais ils ont tendance à se situer au centre de l'interface et très peu se retrouvent en périphérie (Figure 5) (15).

La composition en acides aminés de ces *hotspots* diffère du reste de la surface de la protéine et présente une forte densité de résidus aromatiques, tyrosines et tryptophanes, ainsi que de résidus arginines (15). Ces résidus vont ainsi être impliqués dans différents types de liaison chimique ayant des énergies de liaison plus ou moins importantes (liaisons hydrogènes, électrostatiques, ioniques, hydrophobes aromatique, π-cation, etc…). Ces régions sont entourées par des résidus hydrophobes périphériques, énergiquement moins importants, qui ont pour rôle de favoriser les interactions hydrophobes en excluant les molécules d'eau.

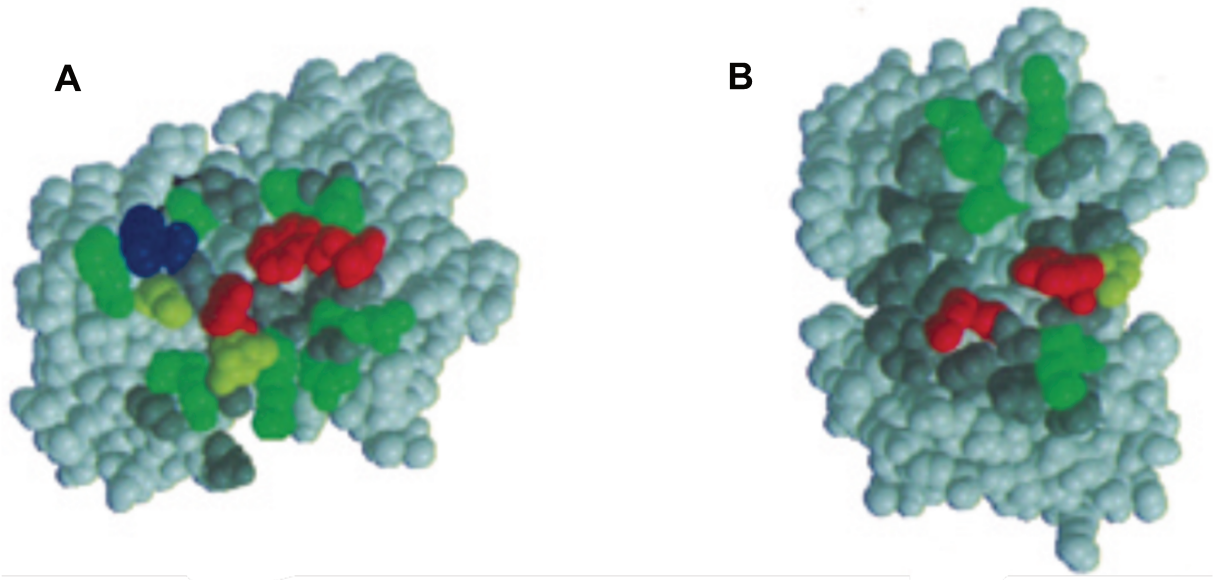


Figure 5 Modélisation de l'énergie libre de liaison de chaque résidu et de leur localisation dans le complexe protéine-protéine entre A) D1.3, l'idiotope de l'anticorps monoclonal murin anti-lysozyme et B) E5.2, un anticorps monoclonal murin anti-idiotope. Les couleurs des résidus sont définies par leur contribution énergétique à la liaison (déterminées par alanine scanning) avec en bleu : <0,5 kcal/mol ; en vert foncé : 0,5 à 2,0 kcal/mol ; en vert clair : 2,0 à 3,5 kcal/mol ; en rouge : >3,5 kcal/mol. Adapté de Bogan et Thorn (15)

Pour qu'un résidu ait une grande contribution à l'énergie libre de liaison, il doit être préservé du solvant, en plus d'autres facteurs comme la complémentarité des forces de van der Waals sur la surface.

Pour qu'une interaction avec une grande affinité puisse se faire, il faut l'exclusion du solvant au niveau des résidus impliqués dans l'interaction (18). Pour les interactions entre une protéine et une petite molécule, cette exclusion du solvant se fait parce que le ligand va interagir avec la protéine dans une poche de liaison en profondeur au niveau de la surface de la protéine.

Pour les IPP, l'exclusion du solvant est réalisée grâce à de multiples contacts de faible énergie de type van der Waals autour des *hotspots* (Figure 6). Ces contacts servent comme une sorte de « joint d'étanchéité » autour de ces résidus. Ce « joint » est nécessaire pour exclure les molécules de solvant et donc va permettre de générer des conditions physicochimiques appropriées pour la liaison entre les deux protéines (15). Si les augmentations d'énergie libre sont additionnées à partir de chaque interaction de van der Waals individuelle et en ajoutant le gain d'énergie associé à la désolvatation, le gain total d'énergie libre est grand et peut produire une stabilisation du complexe protéine-protéine.

Figure 6 Liaison entre deux protéines avec l'exclusion du solvant autour des hotspots permettant l'interaction entre les résidus

Le concept de *hotspots* dans les IPP est utile en *drug discovery* afin d'identifier des régions qui pourraient servir de ligand à un inhibiteur.

Partie 2 : Inhibition des interactions protéine-protéine

Les IPP représentent une classe de cibles pharmacologiques prometteuse en raison de leur implication dans beaucoup de processus biologiques. Il y a plus de 645 000 IPP décrites comme impliquées dans un processus physiopathologique dans l'interactome humain. Cependant, il est extrêmement compliqué de convertir ces potentielles cibles en thérapeutiques. Seules 2% de ces IPP ont été ciblées pour le développement de médicament en 2011 (19). En effet, le développement de molécules ciblant ces IPP est compliqué à cause de leur interface large et plate qui manque de poche pour la liaison d'un ligand, ce qui rend la plupart des IPP *undruggable* (20).
Pour qu'une cible soit considéré comme *druggable*, il faut qu'elle puisse lier des ligands avec une grande affinité et que ces ligands puissent moduler l'activité de cette cible (21).

I. Druggabilité des IPP

Afin de valider une IPP comme cible thérapeutique potentielle, il faut déterminer si celle-ci est nécessaire ou impliquée dans un processus physiopathologique et si sa modulation pourrait avoir un potentiel effet thérapeutique (19). Cependant, une cible validée n'implique pas toujours que ce soit une cible *druggable*, c'est-à-dire une cible qui peut être modulée par un médicament et généralement des molécules de bas poids moléculaire.
Pour identifier une cible qui pourrait être *druggable*, plusieurs paramètres sont à prendre en compte. Chène (3) a proposé un arbre de décision (Figure 7) afin d'identifier les interfaces protéine-protéine avec des propriétés physicochimiques et structurales qui permettent d'être modulées par un inhibiteur.

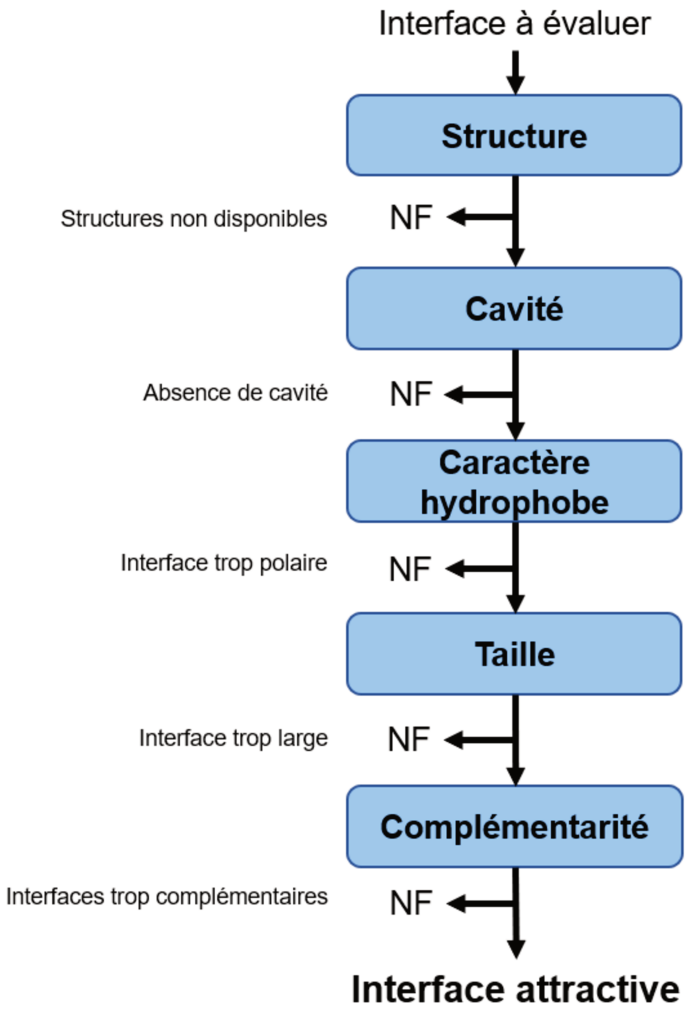


Figure 7 Arbre de décision pour évaluer la druggabilité d'une interface d'IPP. NF : non favorable. Adapté de Chène (3)

A. Structure des IPP

Le cas le plus favorable est de connaitre la structure des protéines seules ainsi que la structure du complexe protéine-protéine. Par exemple, Kar et al. ont essayé de déterminer quelles interfaces pouvaient être ciblées dans le cancer (22). Ils se sont basés sur les réseaux d'IPP qui vont refléter les fonctions d'une cellule à un moment donné et qui peuvent être dérégulés lors de maladies comme le cancer. Ils ont essayé de déterminer les propriétés des interfaces d'IPP impliquées dans le cancer et ils se sont basés sur plusieurs réseaux de protéines :

- PIN : *Protein Interaction Network* où il y a toutes les protéines connues pour être impliquées dans une interaction ;

- SPIN : *Structural Protein Interaction Network*, sous-réseau de PIN avec uniquement les protéines dont la structure 3D est connue ;
- iSPIN : *Interface Structural Protein Interaction Network,* sous-réseau de SPIN avec les informations structurales sur l'interface d'interaction.

Ensuite ils se sont concentrés sur un sous-réseau de iSPIN : ciSPIN où sont retrouvées uniquement les protéines impliquées dans le cancer dont la structure 3D est connue ainsi que les informations sur leur interface d'interaction. Dans le Tableau 1 sont recensés les nombres de protéines et d'interactions connues dans les différents réseaux ainsi que le nombre de structures de complexes connues. Il est possible de remarquer une forte diminution du nombre de protéines plus les réseaux sont fins.

Tableau 1 Nombre de protéines et d'interactions dans chaque réseau. Adapté de Kar et al. (22)

Réseau	**Nombre de protéines**	**Nombre d'interactions**	**Nombre de structures de complexes connues**
PIN	13584	85083	206
SPIN	1702	5312	206
iSPIN	534	549	206
ciSPIN	381	363	149

Ils ont pu déterminer que les interfaces des protéines impliquées dans le cancer étaient plus petites, plus planes, moins denses et plus hydrophiles que les protéines non cancéreuses. Pour certains phénotypes comme le cancer du sein, le cancer colorectal et la leucémie, ils ont pu déterminer des propriétés d'interfaces discriminantes par rapport aux interfaces non impliquées dans ces cancers avec une précision respective de 71%, 67% et 61%.

Connaitre la structure des interfaces est donc primordiale pour pouvoir développer un modulateur d'IPP.

Ne pas connaitre les structures des protéines est un cas défavorable, cependant il est tout de même possible de développer des inhibiteurs en prédisant les structures 3D des complexes. En effet, il est possible de ne pas avoir accès aux structures (à cause de difficultés à purifier les protéines ou à les cristalliser ou encore si elles sont instables seules par exemple). Dans l'interactome chez l'Homme, seules 6% des structures des

complexes protéiques ont été déterminés expérimentalement (23). C'est un chiffre relativement bas vu le nombre d'IPP.

Pour prédire la structure 3D d'un complexe protéique, il y a deux méthodes utilisant les outils de la modélisation moléculaire (Figure 8) (23).

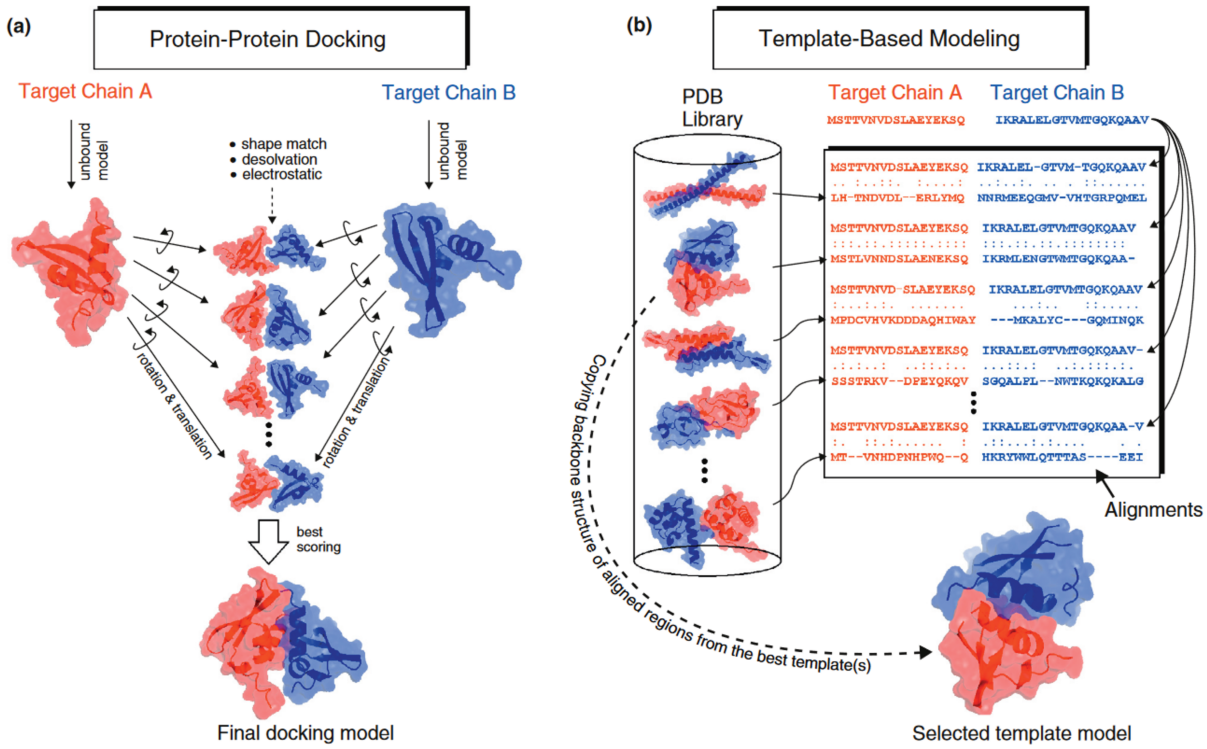


Figure 8 Méthodes de modélisation de la structure des complexes protéine-protéine avec a) le docking à partir des deux structures connues des protéines non complexées et b) le template-based modeling où sont comparées les séquences des protéines d'intérêt avec des protéines dont la structure est connue. Repris de Szilagyi et Zhang (23)

Le *docking* est une approche qui vise à prédire les parties des protéines qui vont interagir entre elles à partir des structures connues des deux protéines non complexées. Le *docking* va chercher à déterminer la meilleure orientation possible entre les deux protéines, cela va se baser principalement sur deux axes :

- La complémentarité de forme entre les deux protéines ;
- La correspondance de solvatation.

Cependant, comme mentionné dans l'introduction, lors d'une IPP, il est possible que l'un ou les deux partenaires subissent des changements conformationnels lors de la liaison. Cette méthode ne permet pas de prédire ces changements. De plus, il est

nécessaire d'avoir accès aux structures des deux protéines et une très grande majorité des structures des protéines n'est pas déterminée expérimentalement.

La deuxième méthode de prédiction de la structure du complexe protéine-protéine est le *template-based modeling*. Cette méthode se base sur l'homologie entre des protéines dont la structure n'est pas connue et des protéines dont les structures seules et complexées sont disponibles. Cette technique se base sur le principe que des protéines homologues avec des séquences similaires vont avoir la même structure. L'avantage contrairement au *docking*, est qu'il n'est pas nécessaire d'avoir la structure des protéines seules au départ.

Il y a également eu le développement de l'AlphaFold2 qui permet de prédire la structure des protéines même lorsqu'aucune structure de protéines similaires n'est connue (24). L'AlphaFold est une approche de *deep learning* qui va incorporer toutes les connaissances physiques et biologiques à propos des structures des protéines et qui va aussi optimiser l'alignement de plusieurs séquences. Le développement de cet algorithme a permis une avancée considérable dans les connaissances des structures des protéines.

B. Présence de cavités

Ensuite, il y a le critère de la présence ou non de cavités au niveau de l'interface. Le cas idéal est la présence d'une poche de liaison bien définie entre les deux protéines à la surface de l'interaction. Cependant, déterminer la présence ou non de cavités peut représenter un challenge. L'interaction peut se faire entre deux protéines où l'une ou les deux protéines peuvent subir des changements conformationnels lors de leur liaison. La structure du complexe ne permet pas de révéler de potentielles cavités qui pourraient être présentes à la surface des protéines lorsqu'elles ne sont pas liées. Développer un inhibiteur sur ces cavités qui ne sont plus visibles lorsque les protéines sont complexées permettrait d'empêcher les changements conformationnels nécessaires à la liaison entre les deux protéines. D'où l'importance de déterminer la structure du complexe mais également la structure de chaque protéine individuellement.

De plus, il y a deux types de cavités dans les IPP sur la surface d'interaction : les poches en sillon et les surfaces étendues (Figure 9) (25).

Figure 9 Types d'interfaces d'interaction avec A) interface avec une poche de liaison dans une liaison protéine-ligand ; B) IPP avec une protéine avec une poche en sillon ; C) protéine avec une interface d'interaction étendue pour les IPP. Adapté de Raj et al. (25)

Les poches en sillon lient souvent des hélices α et ont une forte densité de *hotspots* dans un petit rayon (7 Å). Les interfaces étendues présentent des *hotspots* avec une distribution plus espacée sur la surface de la protéine (7-30 Å).
Le cas le plus favorable est d'avoir une cavité en sillon plutôt qu'étendue puisque ce sera plus facile de développer un inhibiteur de petite taille pour ces interfaces.

C. Caractère hydrophobe

L'autre point très important est de déterminer le caractère hydrophobe de l'interface de liaison et plus particulièrement sur ces cavités. Lors d'une IPP, il est nécessaire que les molécules d'eau présentes à la surface des protéines soient déplacées lors de la liaison protéine-protéine. Il faut donc que la surface à inhiber ne soit pas trop polaire sinon il y aura une multiplication des liaisons hydrogène et les molécules d'eau ne pourront pas être déplacées. Idéalement, il y a la présence de résidus hydrophobes qui permettent le design d'inhibiteurs lipophiles. Augmenter le nombre de résidus hydrophobes (tout en gardant une solubilité acceptable) permet de développer des inhibiteurs puissants.
Lors de l'association des deux protéines, les molécules d'eau sont exclues de l'interface ce qui va induire une pénalité de désolvatation qui devra être compensée lors de la liaison des deux protéines par des liaisons hydrophobes et électrostatiques.

Il est possible de déterminer le caractère hydrophobe d'une interface protéine-protéine en calculant les pénalités de désolvatation de l'interface. Fiorucci et Zacharias (26) ont développé une approche pour estimer cette pénalité de désolvatation en calculant la différence d'énergie libre en plaçant une sonde neutre à plusieurs endroits sur la surface de la protéine (Figure 10). La sonde va perturber le champ électrique autour de la protéine et va donner lieu à une pénalité de désolvatation.

La pénalité calculée ne va pas dépendre uniquement des groupements chimiques proches de la sonde mais aussi de leurs voisins, ce qui va inclure les influences des forces électrostatiques de longue portée et va dépendre de la conformation de la protéine.

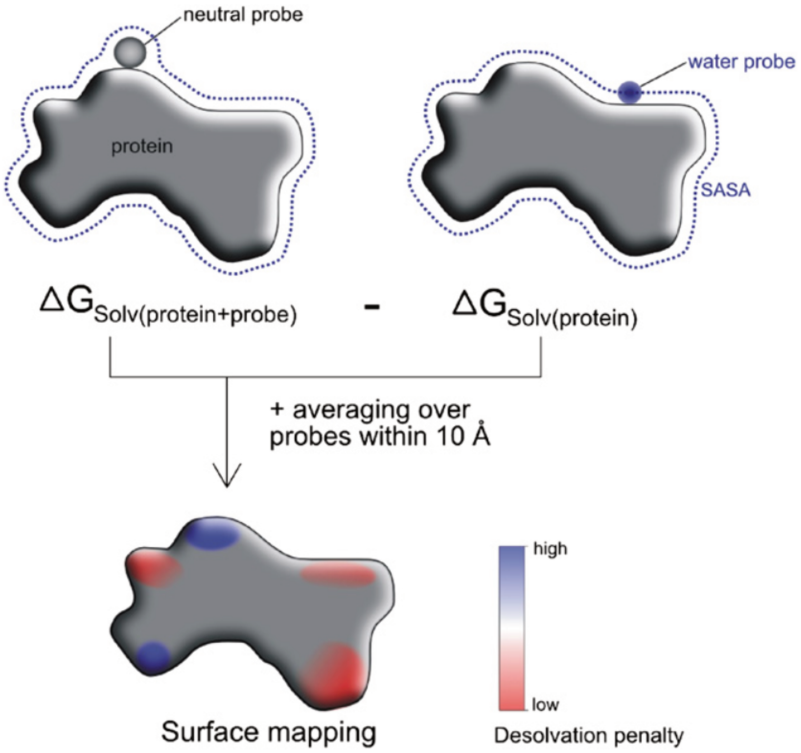


Figure 10 Calcul de la pénalité de désolvatation induite par une sonde neutre placée à la surface d'une protéine. La sonde va être placée à différents endroits sur la surface de la protéine, tous les 3 A. Repris de Fiorucci et Zacharias (26).

Les résidus avec l'énergie de désolvatation la plus élevée sont les quatre acides aminés chargés : glutamate, lysine, aspartate et l'arginine. Pour les autres acides aminés, cela suit plus ou moins la taille et la classification des acides aminés : aromatiques puis ceux contenant un soufre et enfin ceux avec une chaine latérale aliphatique.

Cette approche permet donc de déterminer le caractère hydrophobe de la surface d'une protéine en fonction de leur pénalité d'énergie de désolvatation qu'il faudra compenser lors de la liaison.

D. Taille des interfaces

La taille de l'interface est un paramètre important à prendre en compte. Elle doit être assez grande pour qu'un inhibiteur puisse s'y loger mais pas trop large pour éviter que les résidus clés pour l'interaction soient trop espacés. Si ces résidus sont trop éloignés les uns des autres, un inhibiteur serait donc d'une taille trop importante pour être considéré *drug-like*. Plus une molécule est large, moins elle sera considérée comme biodisponible par voie orale.

Il est possible de différencier deux types d'interfaces (27) (Figure 11) :

- Les interfaces qui possèdent un *hot segment* : un épitope continu contribuant à la majorité de l'énergie de liaison, qui va pouvoir être ciblé par de petites molécules ;
- Les interfaces sans *hot segment* qui vont être plus larges avec des cavités plus espacées, ce qui va rendre leur inhibition compliquée.

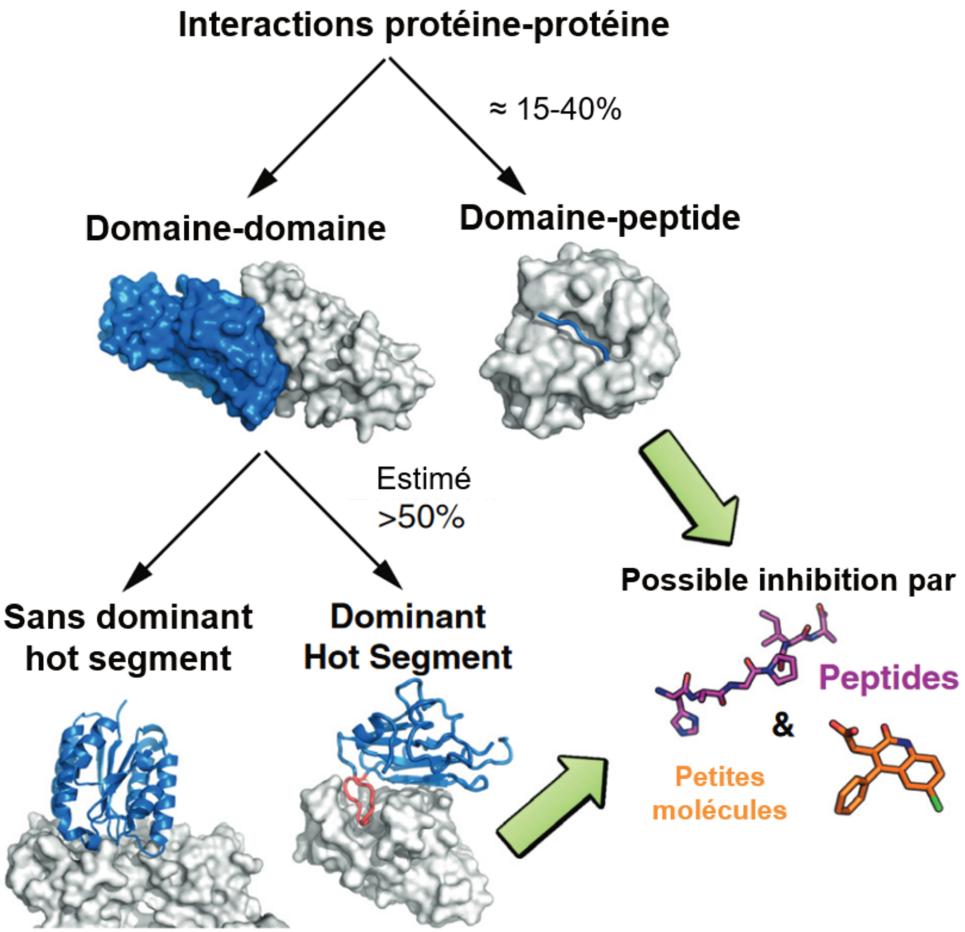


Figure 11 Types d'interface en fonction de la taille de la surface d'interaction. Adapté de London et al. (27)

La présence de *hotspots* dans les interfaces d'interaction a rendu possible l'inhibition des IPP. C'est sur ce même concept que les *hot segments* ont été définis. Un *hot segment* correspond à une interface de liaison continue, avec des *hotspots* proches sur la surface des protéines.

Comme mentionné dans la Partie 1, les IPP peuvent se produire entre deux domaines de deux protéines globulaires ou alors entre un domaine d'une protéine globulaire et un peptide. Il a été estimé qu'environ 40% des IPP impliqueraient une liaison domaine-peptide (28). Pour ces interactions, puisque les peptides sont de petites molécules, la surface d'interaction est réduite et cela va rendre possible leur inhibition. Cependant, pour les interactions domaine-domaine entre deux protéines globulaires, soit les *hotspots* sont espacés et il n'y a pas de *hot segment*, soit il y a un *hot segment* dominant, par exemple sous forme de boucle, où les *hotspots* sont localisés au même endroit sur la protéine. Ce *hot segment* va faciliter le développement d'une molécule de bas poids moléculaire.

E. Complémentarité

Le dernier critère est la complémentarité entre les deux sous-unités des protéines qui interagissent ensemble. Il peut y avoir quatre types d'interfaces plus ou moins complémentaires (29) représentées sur la Figure 12 :

- Les interfaces avec une forte affinité et étroites, c'est le cas le plus favorable pour développer un inhibiteur. Ces interfaces ressemblent aux cibles traditionnelles enzyme-ligand où il y a une forte affinité de liaison sur une petite surface. Ces interfaces présentent généralement des poches profondes et moins de 5 *hotspots.*

- Les interfaces avec une forte affinité et larges qui représentent le cas le plus défavorable pour la modulation par une petite molécule organique. Ces IPP présentent des surfaces d'interaction discontinues.

- Les interactions de faible affinité et étroites sont également faciles à moduler. Ces IPP présentent une liaison faible mais sur des surfaces petites. Ces IPP sont généralement transitoires et il est même possible que ces surfaces d'interaction soient partagées entre plusieurs partenaires en même temps. Les cavités impliquées dans la liaison sont peu profondes ce qui rend leur inhibition compliquée.

- Les interactions de faible affinité et larges sont les plus compliquées à cibler par une molécule organique de petite taille. Ce sont également des IPP transitoires comme par exemple lors de modifications post-traductionnelles avec le contact entre une kinase et une protéine à phosphoryler.

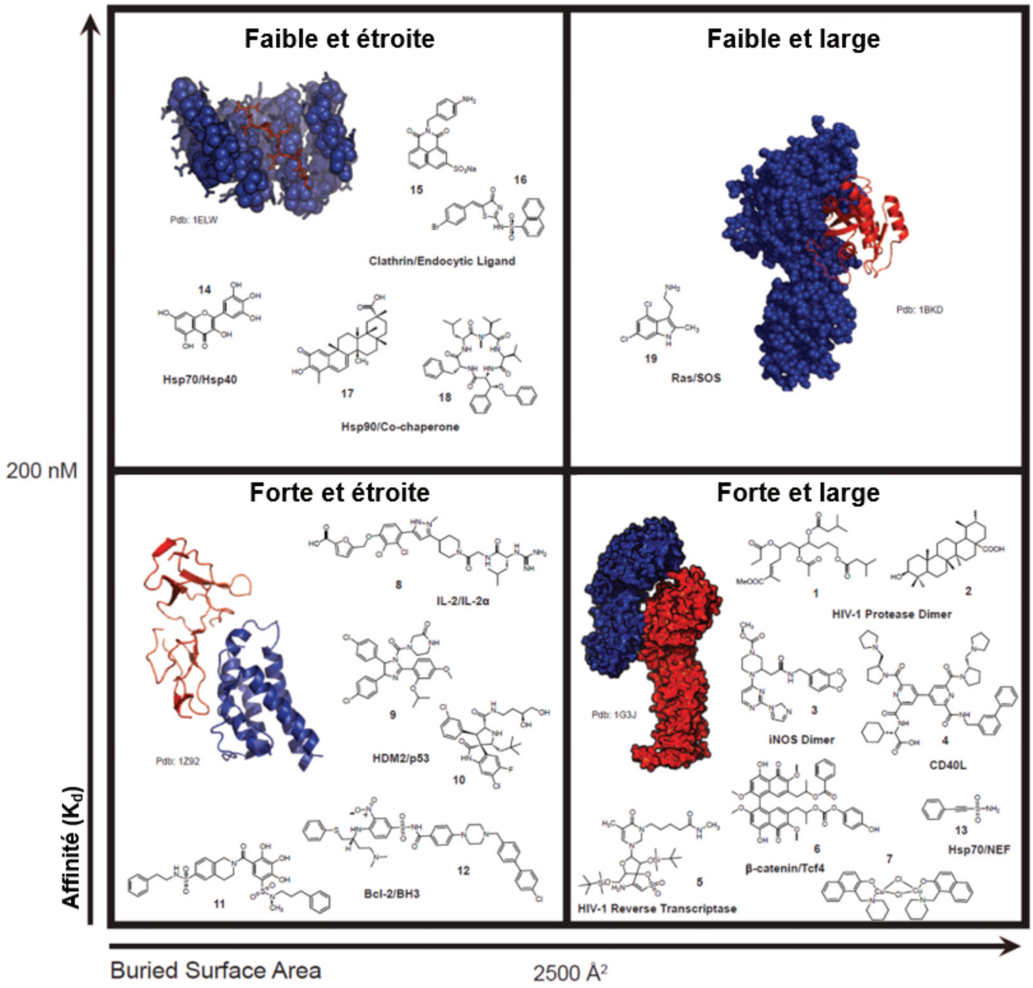


Figure 12 Représentation des différents types d'interfaces en fonction de la complémentarité entre les deux protéines lors d'une IPP avec des exemples d'inhibiteur correspondant au type d'IPP. Adapté de Smith et Gestwicki (29)

Si l'ensemble de chacune des étapes de l'arbre décisionnel est respecté, l'interface protéine-protéine est donc considérée comme *druggable* et les différentes stratégies de ciblage thérapeutique peuvent alors être mises en place afin d'identifier un inhibiteur conduisant par la suite à un candidat médicament.

II. Les stratégies pour cibler les IPP

Inhiber les IPP représente une stratégie très prometteuse dans beaucoup de maladies et surtout le cancer comme décrit précédemment. Inhiber les IPP plutôt que des enzymes présente l'avantage d'éviter un blocage de toutes les enzymes et tous les effets indésirables qu'il peut y avoir. Cependant, développer un inhibiteur d'IPP

représente un challenge puisqu'il faut un inhibiteur capable d'entrer en compétition avec un partenaire protéique, donc pourvu d'une forte affinité dans une interface de liaison défavorable (30), mais aussi présentant des paramètres ADME favorables conduisant à des paramètres pharmacocinétiques optimaux.

La première étape du développement d'un inhibiteur d'IPP consiste à évaluer la druggabilité de l'interface protéine-protéine selon l'arbre décisionnel décrit précédemment.
Pour inhiber une IPP, la modulation peut être directe/orthostérique où les inhibiteurs vont lier directement l'interface entre les deux protéines dont on cherche à inhiber l'interaction. Ou alors, la modulation peut être indirecte/allostérique où l'inhibiteur va se lier à la protéine d'intérêt mais pas au niveau de l'interface de liaison, plutôt dans des cavités qui se situent plus ou moins loin de cette interface. Une modulation allostérique va avoir comme conséquence une modification du *folding* de la protéine l'empêchant ainsi de se lier à son partenaire (Figure 13).

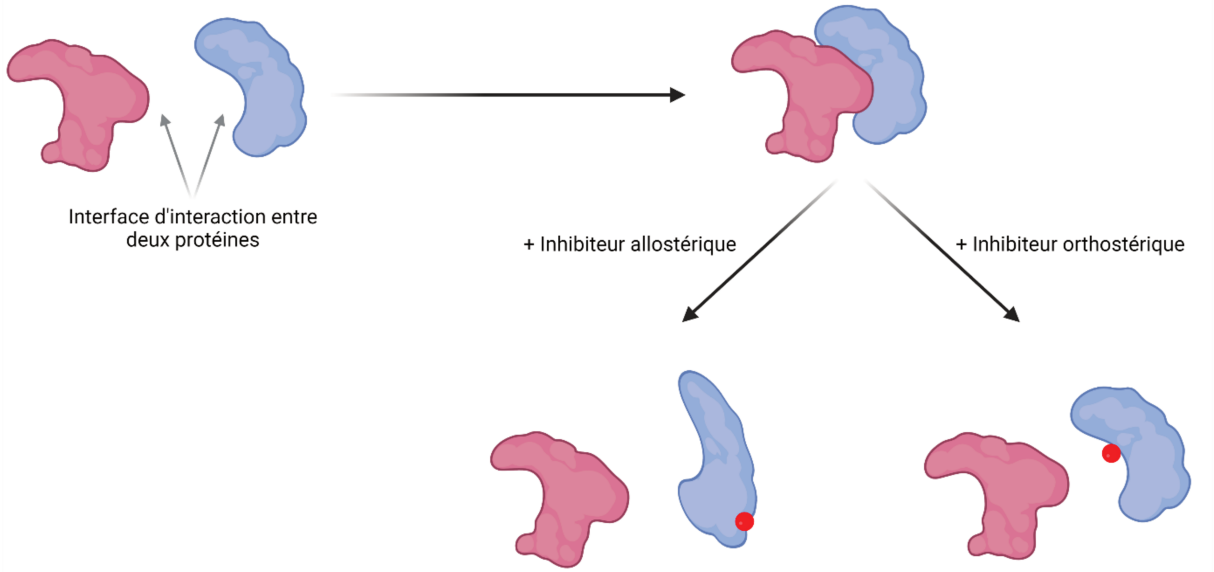


Figure 13 Inhibition d'une IPP par : un modulateur allostérique qui se fixe sur un site différent de l'interface de contact et qui va moduler la conformation de la protéine ; un modulateur orthostérique qui va se fixer au niveau de l'interface protéine-protéine et qui rend l'interaction entre les deux protéines impossible

Ne sera considéré dans ce mémoire que le développement de modulateurs orthostériques d'IPP. En effet, la qualification de modulateurs allostériques comme inhibiteurs d'IPP est difficile à positionner. Par exemple, le maraviroc est une molécule

antivirale utilisée pour empêcher l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) dans les cellules cibles. Le maraviroc est un antagoniste compétitif du récepteur CCR5 (*CC chemokine receptor 5*) ce qui va empêcher la liaison de CCL3 (*chemokine CC motif ligand 3*) et de la glycoprotéine de l'enveloppe virale gp120 qui est nécessaire pour l'entrée du VIH dans les cellules (31). Cependant c'est un modulateur allostérique qui n'est pas considéré comme un inhibiteur d'interaction protéine-protéine.

Les paragraphes suivants vont s'atteler à décrire différentes stratégies *in vitro*, non exhaustives, de découverte des inhibiteurs d'IPP et d'exposer pour chacune d'elles un exemple de réussite de ciblage thérapeutique.

B. Criblage à haut débit

L'une des méthodes classiquement utilisées en *drug discovery* est le criblage à haut débit ou HTS (*high-throughput screening*) (Figure 14). Cette méthode *in vitro* qui peut se faire de manière automatisée, consiste à tester un très grand nombre de composés chimiques généralement regroupés dans des chimiothèques sur une cible spécifique définie à travers par exemple des tests de liaison (32). Ce criblage va permettre d'identifier des *hits*, des composés avec une liaison spécifique à la cible (avec un résultat au-dessus d'un certain seuil défini par avance pendant les tests de liaison). L'étape suivante est de valider ces *hits* par un criblage secondaire permettant par exemple de quantifier une affinité de liaison ou une activité fonctionnelle vis-à-vis de la protéine cible. Un programme de chimie médicinale pourra par la suite être mis en place dans un processus de *hit to lead* jusqu'à l'identification d'un candidat médicament présentant les meilleures propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques.

Figure 14 Grandes étapes de développement d'un composé identifié par criblage

Le challenge dans le criblage haut-débit d'IPP est de sélectionner les bonnes chimiothèques. Il est possible de considérer qu'il pourrait exister plus de 166 milliards de composés de faible poids moléculaire constitués de 17 atomes et qui respectent les règles de chimie basique (33). Avec le criblage haut débit, il est possible de tester un grand nombre de composés. Cependant, il est impossible de tester les 166 milliards de composés possibles sur une cible. Il faut raffiner le nombre de composés à tester tout en focalisant les propriétés physicochimiques des molécules vers les IPP.
La plupart des chimiothèques utilisées pour le criblage sont généralement constituées de composés *drug-like* respectant les règles de Lipinski, Veber et les règles 3/75 de Pfizer permettant la prédiction de la biodisponibilité par voie orale. Cependant, la structure des IPP rend difficile le développement de molécules inhibitrices respectant ces règles. C'est une interface large, généralement plate. De plus, contrairement aux enzymes, les IPP n'ont pas de ligands naturels de petite taille dont la structure pourrait aider au développement d'un inhibiteur. Une étude a comparé les profils physicochimiques de 1650 composés issus d'une chimiothèque focalisée en inhibiteurs d'IPP par rapport à ceux issus des molécules disponibles en thérapeutique et actives par voie orale (34). L'ensemble des paramètres étudiés montrent bien une différence significative entre les propriétés physicochimiques des molécules issues des deux chimiothèques (Figure 15).

Ces études ont démontré que les inhibiteurs d'IPP ont tendance à être plus larges et plus lipophiles que les molécules qui lient les cibles classiques. Cependant, les composés permettant de moduler les IPP sont très peu représentés dans les librairies de molécules pour le screening. Il y a donc nécessité de développer des librairies de molécules adaptées à l'inhibition d'IPP.

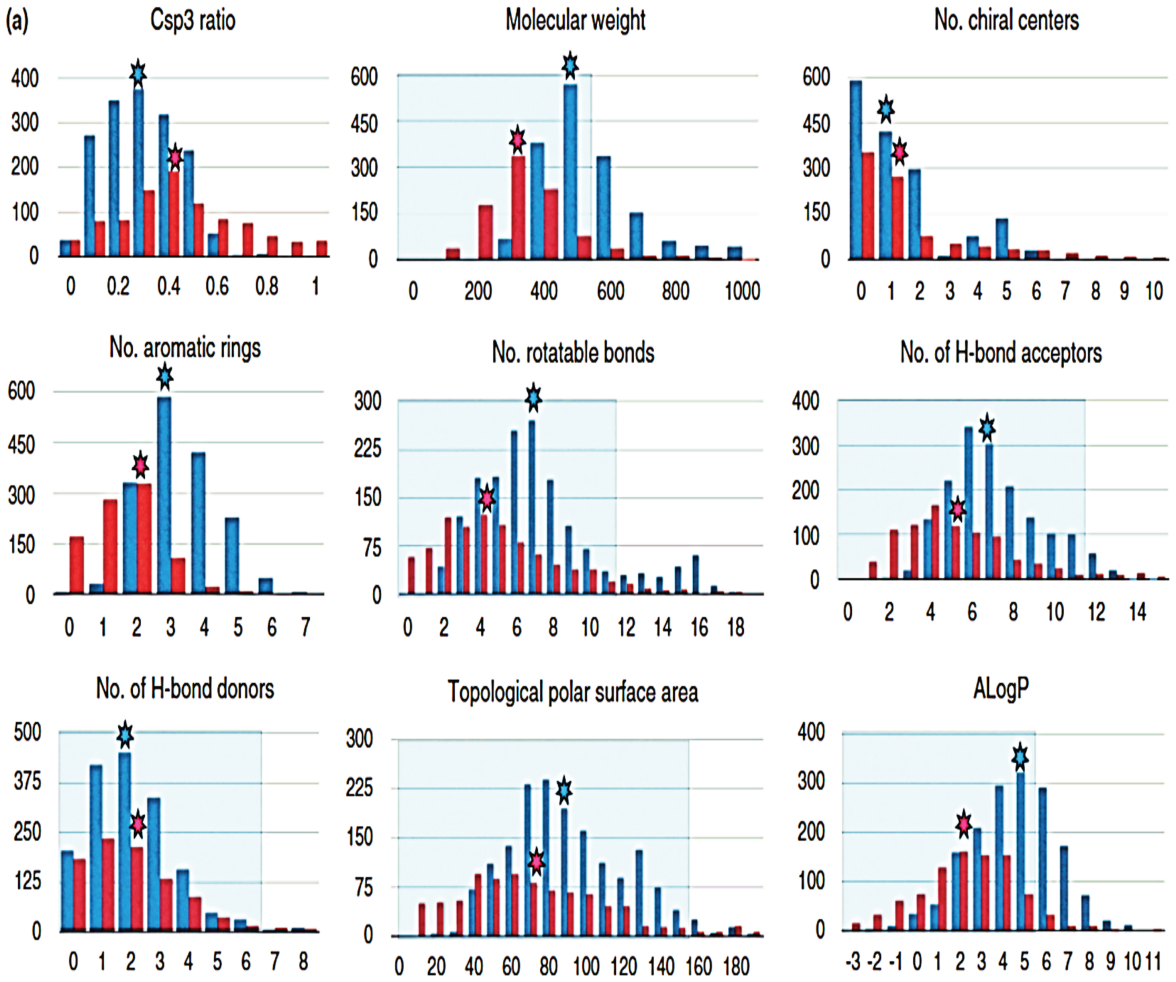


Figure 15 Comparaison des profils physicochimiques de molécules issues d'une chimiothèque focalisée en inhibition de PPI (bleu) et actives par voie orale (rouge) approuvées par la FDA. Adapté de Labbé et al. (34)

De plus en plus de librairies spécialisées dans la modulation d'interactions protéine-protéine sont en développement, par exemple à partir de macrocycles, des molécules contenant une large cycle d'au moins 12 atomes qui correspondrait plus à l'inhibition des peptides retrouvés à l'interface des IPP (30).

Même si le choix des chimiothèques à cribler pour moduler les IPP peut être limitant, le criblage haut-débit a permis d'identifier des molécules pouvant moduler la liaison p53/MDM2.

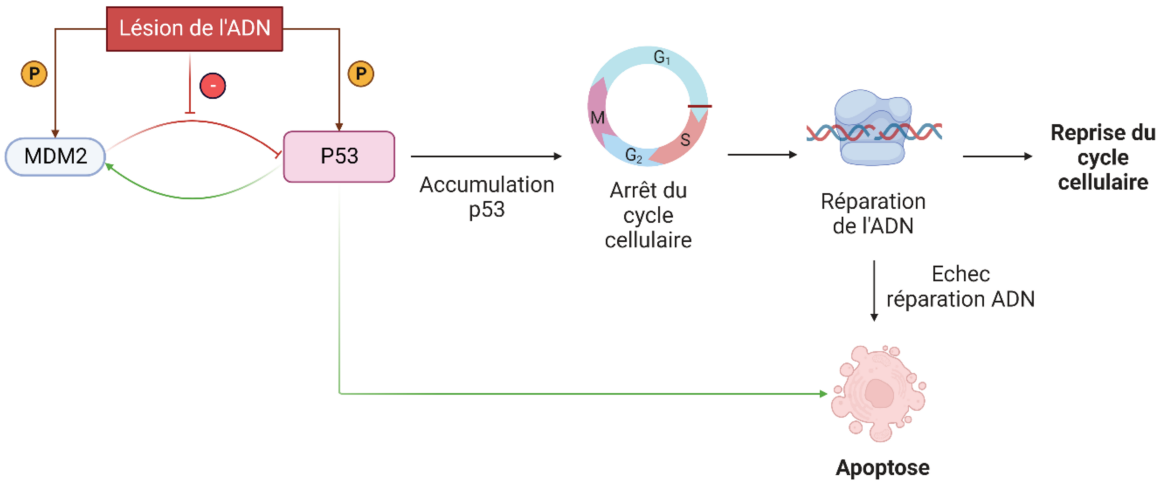


Figure 16. Rôle de p53. p53 et MDM2 sont impliqués dans une boucle d'autorégulation avec p53 induisant l'expression de MDM2 et MDM2 inhibant p53. La régulation de p53 par MDM2 est normalement inhibée lors d'une lésion de l'ADN. Inspiré de Theobald et Offringa (35)

La protéine p53 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et va agir comme suppresseur de tumeur en induisant l'apoptose (Figure 16). Il a été décrit que dans environ 50% des cancers, il y avait une altération dans le gène de p53 ce qui va induire soit une inactivation de la protéine soit une perte d'expression de celle-ci. Cependant, dans le reste des cas p53 n'est pas mutée et sa fonction est donc impactée par d'autres mécanismes. L'un des autres mécanismes possibles est une surproduction de la protéine MDM2 (*mouse double minute 2*). MDM2 est une protéine oncogène et un régulateur négatif de p53. La liaison de MDM2 à p53 va inhiber l'activation de p53 et va réguler l'expression de p53 selon une boucle de rétrocontrôle d'autorégulation.
Il existe trois mécanismes de répression de p53 par MDM2. Tout d'abord, MDM2 peut lier p53 sur son domaine d'activation et va directement l'inhiber. Ensuite MDM2 est impliqué dans l'export de p53 hors du noyau. Enfin, MDM2 peut servir d'ubiquitine ligase qui va entrainer la dégradation de p53 (36).

Inhiber cette interaction représente donc une stratégie intéressante dans le traitement de beaucoup de cancers (Figure 17).

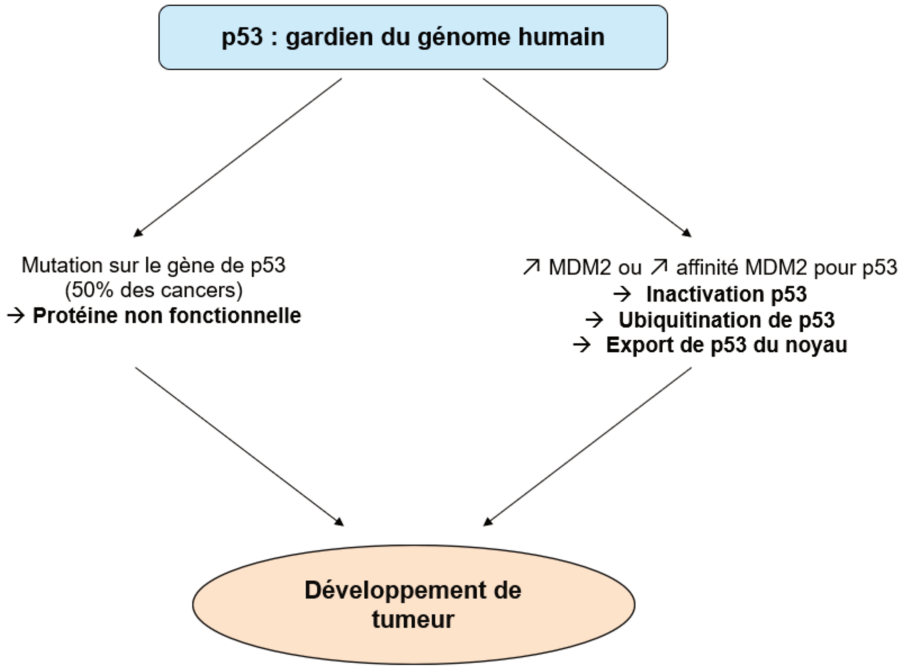


Figure 17 Intérêt de cibler l'interaction p53/MDM2 dans le cancer

La structure cristallographique du complexe a montré que l'interaction entre p53 et MDM2 impliquait une triade de résidus hydrophobes clés : Phe19, Trp23 et Leu26 (37). La protéine p53 va interagir avec MDM2 sous forme d'une hélice α dans une poche en sillon hydrophobe de petite taille mais profonde. La stratégie pour moduler cette interaction est donc de cibler ces *hotspots* pour empêcher l'interaction.

Vassilev et al. ont criblé différentes chimiothèques et ont identifié et optimisé une série de composés cis-imidazolines appelés les Nutlines (*Neutley inhibitor*) (36). Les Nutlines vont imiter la structure peptidique de p53 et vont lier la poche hydrophobe de MDM2, empêchant toute interaction entre les deux protéines.

Ces composés ont pu déplacer p53 de son complexe avec MDM2 avec des affinités de liaison de l'ordre de 90 à 260 nM (Figure 18). Ces composés sont synthétisés sous forme d'un mélange racémique. Concernant la Nutline-3, l'énantiomère **a** est 150 fois plus puissant que l'énantiomère **b**.

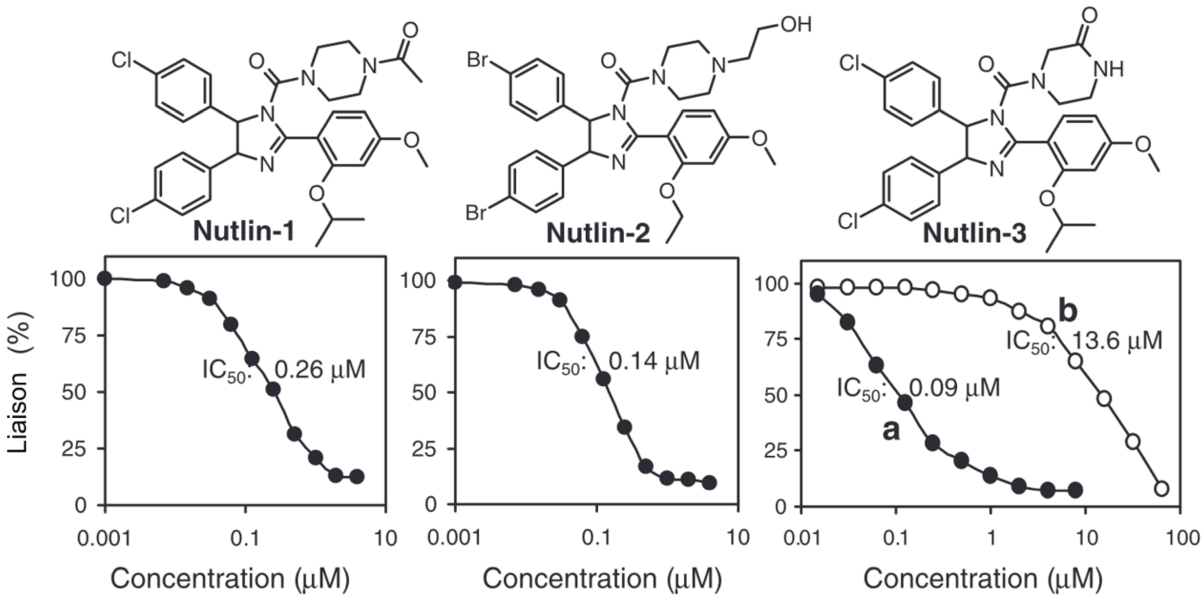


Figure 18 Structure des Nutlines et évaluation de l'affinité des composés pour l'interaction p53/MDM2. Adapté de Vassilev et al.(36)

Ils ont ensuite cristallisé le complexe MDM2/Nutline-2 pour déterminer le mode de liaison de ces composés. L'inhibiteur va mimer les interactions de p53 avec MDM2. En effet, la structure imidazoline va remplacer l'hélice du peptide de p53 et va pouvoir, de manière rigide, projeter ses groupements dans les cavités normalement occupées par les Phe19, Trp23 et Leu26 de p53 (Figure 19).

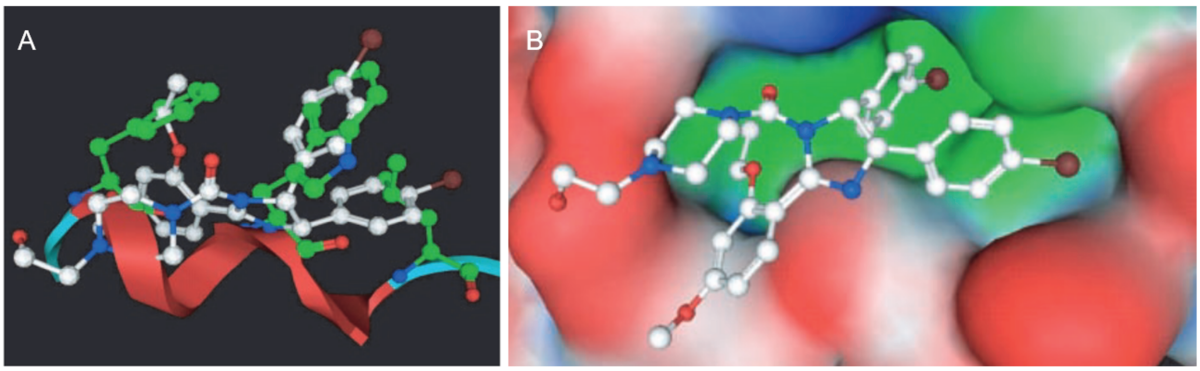


Figure 19 A) Superposition de la Nutline-2 avec les chaines latérales de Phe19, Trp23 et Leu26 de p53 représentées en vert ; B) Interaction de MDM2 et la Nutline-2 avec les poches en vert, les régions exposées au solvant en rouge, il est possible de voir que l'un des groupement bromophényl est entré dans la poche Trp de MDM2. Adapté de Vassilev et al. (36)

L'optimisation de ces composés a conduit à l'identification par Hoffmann-La Roche de l'idasanutline mais aussi d'autres séries chimiques sont actuellement en essais cliniques en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques (38).

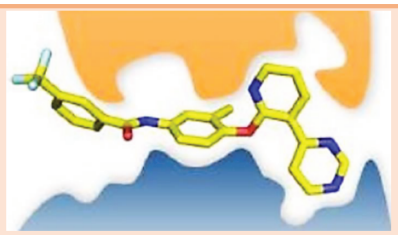
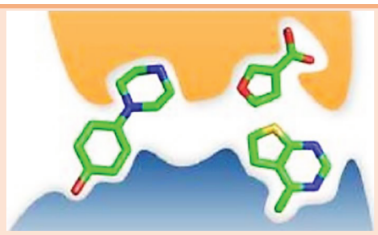
C. Développement de molécules inhibitrices d'IPP par approche par fragment

L'approche par criblage haut-débit est l'une des approches les plus utilisées en *drug discovery*. Cependant, pour moduler les IPP, cette approche n'a pas eu les meilleurs résultats pour les raisons décrites précédemment. Les premiers *hits* identifiés avaient une affinité plutôt basse. L'une des stratégies pour contrer ce problème est de diminuer la taille des molécules et de cribler des fragments, permettant de tester beaucoup plus de combinaisons possibles de composés (39). Le but avec cette approche n'est pas d'identifier une molécule capable de moduler seule l'interaction protéine-protéine, mais des petits fragments chimiques qui se lient avec un fort *ligand efficiency* au niveau de certains points stratégiques de l'IPP : les *hotspots*.

Le *ligand efficiency* est un rapport entre le nombre d'atome et l'affinité : il y a une très bonne répartition de l'affinité par rapport au nombre d'atomes dans le fragment.

En effet, contrairement au criblage haut débit classique (Tableau 2), l'approche par fragment va permettre d'exploiter toutes les poches de liaison sur l'interface d'interaction entre deux protéines où un fragment plus petit va se positionner dans une poche avec un fort *ligand efficiency*.

Tableau 2 Comparaison des techniques de criblage haut débit avec l'approche par fragment (40)

Criblage haut débit classique	Approche par fragment
	
Larges molécules (250-600 g/mole)	Petites molécules (150-300 g/mole)
Affinités de l'ordre du µM	Affinités de l'ordre du mM
Peut contenir des fonctions non favorables	Toutes les fonctions chimiques de la molécule sont impliquées → fort *ligand efficiency*
	Garde l'orientation de la molécule dans la poche

Ces fragments seront ensuite optimisés selon différentes stratégies (*linking, growing, merging*) afin d'améliorer l'affinité d'interaction.

L'exemple le plus connu de molécule découverte par approche par fragment est le développement du Vénétoclax, un inhibiteur de l'interaction Bcl-2/Bax.
La famille de protéine Bcl-2 est impliquée dans la régulation de l'apoptose. Il existe une vingtaine de protéines de la famille de Bcl-2 qui sont regroupées en 3 groupes de protéines. Selon leur rôle dans l'apoptose, les membres de la famille de Bcl-2 peuvent être séparés en deux catégories : les protéines pro-apoptotiques et les protéines anti-apoptotiques (41). Tous possèdent dans leur structure au moins l'un des 4 domaines conservés BH (*Bcl-2 homology*) comme montré dans la Figure 20.

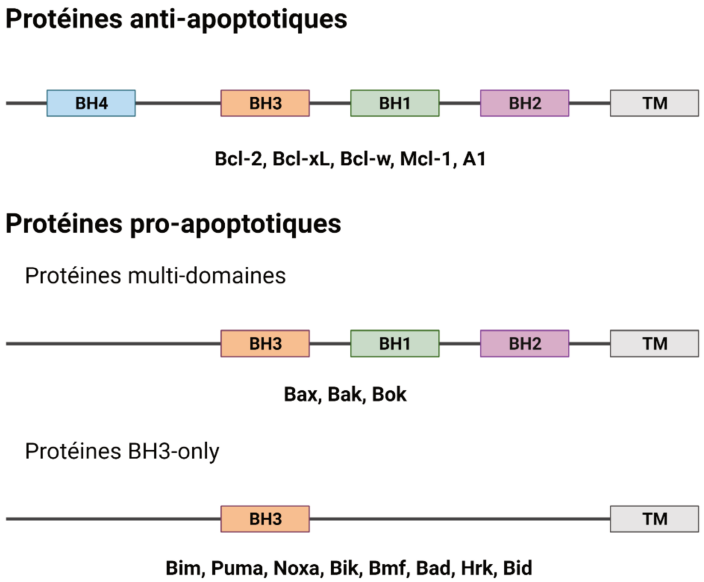


Figure 20 La famille de protéines de Bcl-2 peut être séparée en protéines anti- et pro-apoptotiques. Toutes les protéines présentent au moins une homologie de séquence avec Bcl-2. La plupart des protéines de la famille de Bcl-2 possède un domaine transmembranaire du côté C-ter qui est responsable de leur localisation membranaire. Inspiré de Giam et al. (41)

La protéine Bcl-2 est capable d'inhiber l'apoptose (42). Localisée dans la membrane mitochondriale, elle empêche l'homodimérisation de Bax, de Bak et de certaines autres protéines pro-apoptotiques de la même famille en interagissant avec celles-ci (Figure 21A). Dans une cellule normale, suite à des stimuli apoptotiques, Bcl-2 va être déplacé par des protéines BH3-only permettant la formation de l'homodimère de Bax (43). Celui-ci se fixe à la membrane externe mitochondriale et entraîne une perforation de la membrane mitochondriale et un relargage du cytochrome c dans le cytosol

conduisant à la formation de l'apoptosome (Figure 21B). En revanche, dans une cellule cancéreuse, la dérégulation du gène BCL2 va induire la surexpression de protéines anti-apoptotiques qui va altérer la balance entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille et va empêcher la formation de l'homodimère de Bax et ainsi conduire à l'inhibition de l'apoptose (Figure 21C). Cette inhibition de l'apoptose va conduire à la chimiorésistance et a été identifiée dans certains cancers comme les hémopathies malignes (myélome multiple, leucémie lymphoïde chronique, leucémie lymphoïde aigue, leucémie myéloïde aigue, les syndromes myélodysplasiques et les néoplasmes myéloprolifératifs) et les tumeurs solides (dans le cancer du sein, du poumon, le mélanome et le mésothéliome) (44).

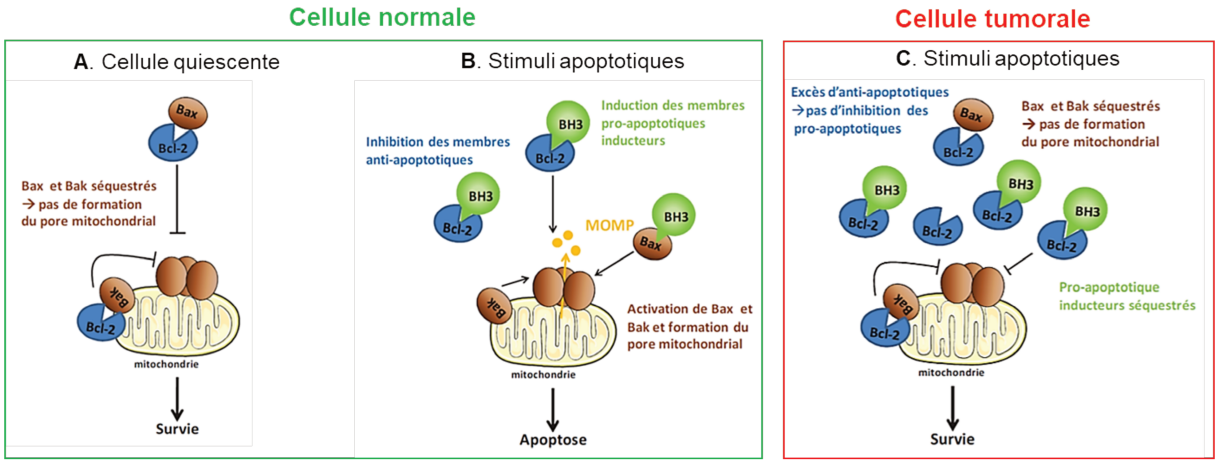


Figure 21 Mécanisme de régulation de la formation du pore mitochondrial par les protéines de type Bcl. Adapté de Willis et al. (43)

Cibler les protéines anti-apoptotiques de Bcl-2 en mimant les protéines pro-apoptotiques BH3-only est donc une stratégie thérapeutique intéressante dans le cancer où il existe un échappement à l'apoptose.

La structure de Bcl-2 est composée de deux hélices α hydrophobes entourées par six à sept hélices α amphiphiles dont quatre vont former une « poche » BH3 pour la liaison avec Bax (Figure 22A). Les laboratoires Abbott ont étudié la structure de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et ont pu déterminer que la poche hydrophobe était constituée de deux petites cavités distinctes (Figure 22B) (45).

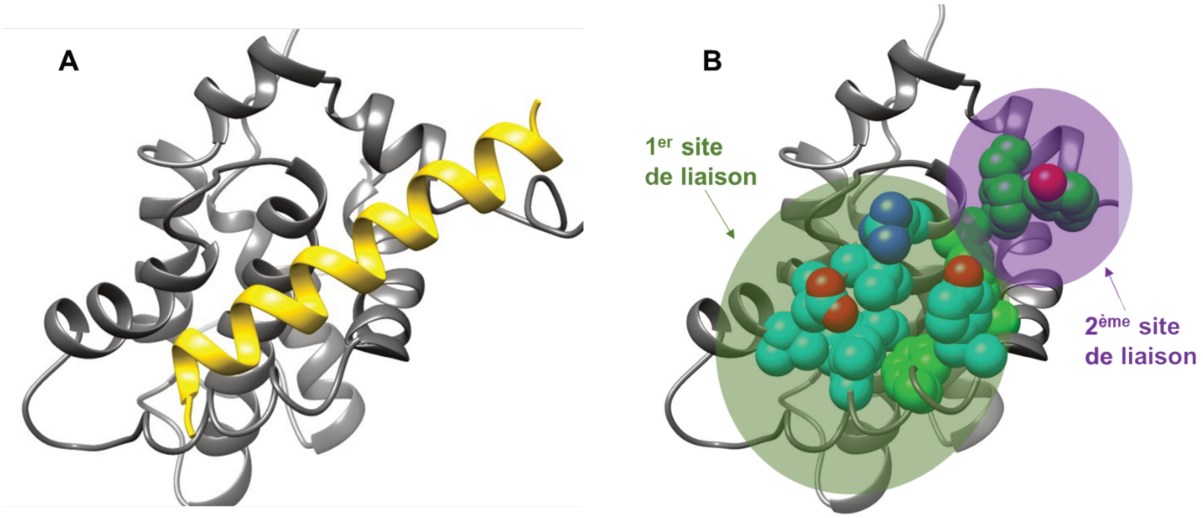


Figure 22 ***A.*** *Structure du complexe Bcl-2 (gris) domaine BH3-only de Bax (jaune).* ***B****. Hotspots et sites de liaison dans Bcl-2*

Ils ont ensuite utilisé l'approche par fragment en criblant des fragments par RMN et identifié deux *hits* représentés par les composés 1 et 2 avec de faibles affinités (Figure 23) (46). Par une stratégie de *fragment linking* le composé 3 présentant une affinité de l'ordre du micromolaire a été obtenu. L'optimisation thérapeutique a conduit à l'identification du composé ABT-263, appelé Navitoclax, qui va inhiber l'ensemble des protéines Bcl-2 (Ki < 1nM), Bcl-xL (Ki < 0,5 nM), Bcl-w (Ki < 1 nM) et Mcl-1 (Ki = 550 nM) (47).

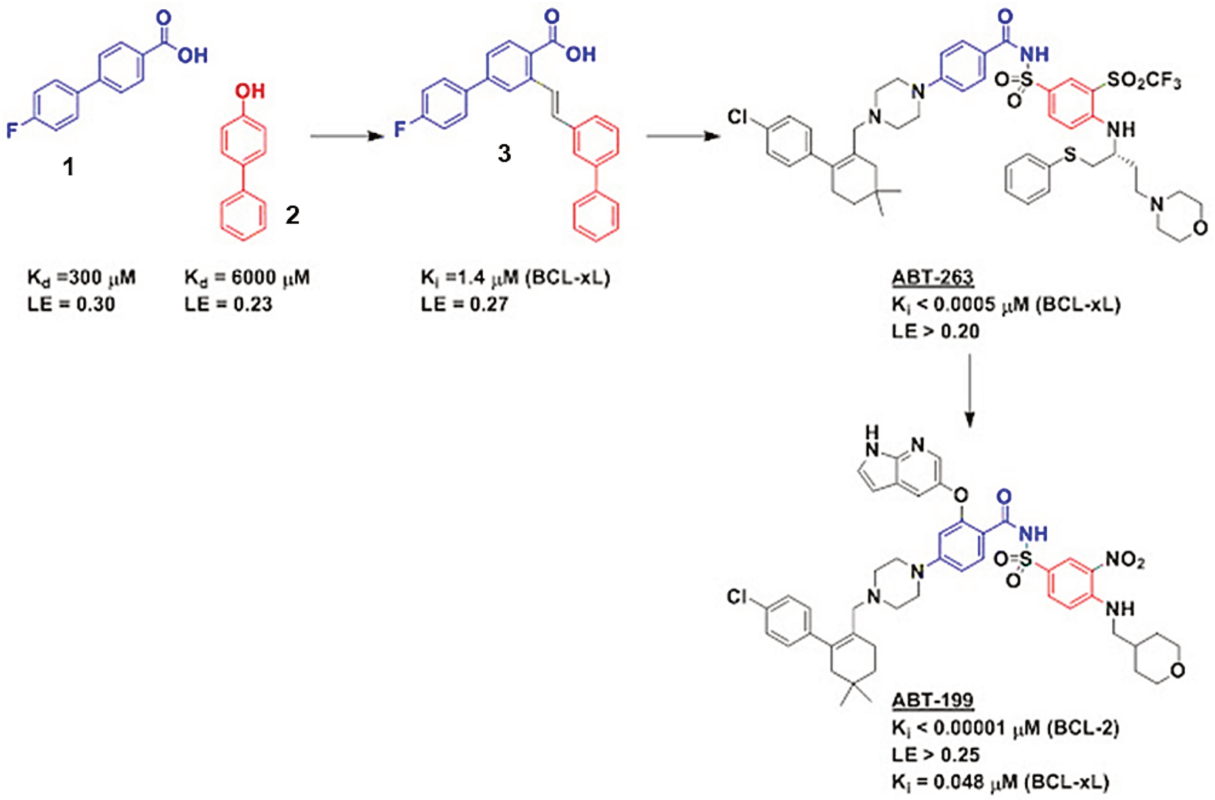


Figure 23 Structure des inhibiteurs de Bcl-2/Bax avec leur affinité pour Bcl-2 (46)

Les études précliniques ont montré des effets très prometteurs du Navitoclax. En effet, le composé seul inhibait efficacement la croissance des tumeurs xénogreffées du cancer du poumon à petites cellules chez la souris. De plus, le Navitoclax en combinaison avec d'autres agents antinéoplasiques, présentait un effet synergique afin d'inhiber la croissance de tumeur solides ainsi que de tumeurs sanguines.

Cependant, en clinique le composé ABT-263 présentait des effets indésirables trop importants, dus à l'inhibition de Bcl-xL, en induisant une chute des plaquettes et son développement a donc été arrêté. A partir de ce composé a été développé le composé ABT-199 (vénétoclax) qui est un inhibiteur sélectif de Bcl-2 grâce à l'introduction d'un groupement azaindole qui présente beaucoup moins d'effets secondaires que ABT-263 sur le nombre de plaquettes (48).

Le vénétoclax est commercialisé sous les noms commerciaux Venclexta®, Venclexto® et Venclyxto®. Il est disponible à l'hôpital depuis février 2017 et peut être délivré en officine depuis juin 2018 (49). C'est un agent antinéoplasique, indiqué en monothérapie ou en association dans la leucémie lymphoïde chronique et la leucémie aigüe myéloïde (50).

D. Peptidomimétiques

Une autre stratégie intéressante pour cibler les IPP est de développer des peptidomimétiques. Il a été estimé que 14 à 40% des IPP sont médiées par une courte séquence peptidique (51). Des peptides inhibiteurs peuvent être conçus à partir des séquences des protéines impliquées dans la liaison. Les peptides en *drug discovery* présentent beaucoup d'avantages mais également certains inconvénients surtout au niveau de leur pharmacocinétique qui freine leur développement (Tableau 3).

Tableau 3 Avantages et inconvénients d'utiliser des peptides pour inhiber une IPP

Avantages	Inconvénients
Forte activité	Faible stabilité métabolique
Forte sélectivité	Faible perméabilité membranaire
Moins toxique que des petites molécules	Faible biodisponibilité
Faible accumulation dans les tissus	Clairance rapide
Forte diversité chimique et biologique	Parfois faible solubilité
Large spectre d'activité	

La solution est donc de développer des peptidomimétiques. L'avantage est qu'il est possible de se baser sur le peptide natif et de garder l'affinité en mimant les acides aminés responsables de l'interaction par des fonctions chimiques plus stables. Par exemple, s'il y a la présence d'une lysine dans le peptide, il faudra la substituer par un groupement qui mime un cation, tout en gardant l'orientation des groupements.

Les peptidomimétiques vont mimer les propriétés physico-chimiques des acides aminés tout en introduisant une diversité chimique qui permet d'améliorer la spécificité et les propriétés pharmacocinétiques des peptides.

Il est possible de développer des peptidomimétiques qui miment ces structures et de les stabiliser via différents moyens comme exemplifié dans la Figure 24 (52).

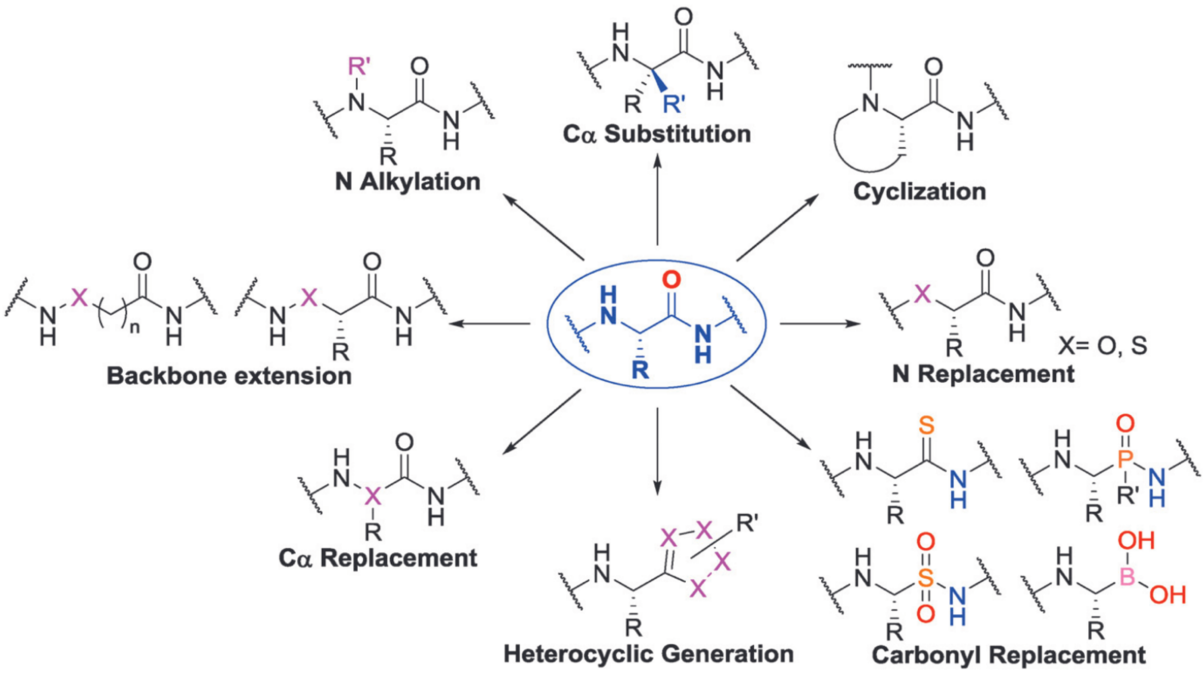


Figure 24 Exemples de stratégies pour mimer les acides aminés. Repris de Avan et al. (52)

Cette stratégie a été développée pour inhiber l'interaction XIAP/caspase-9 par exemple. Les inhibiteurs de protéines de l'apoptose (IAP) sont des protéines anti-apoptotiques. Les IAP vont se lier aux caspases ou autres protéines pro-apoptotiques et vont inhiber leurs fonctions et entrainer leur dégradation ce qui va conduire à l'inhibition de l'apoptose (Figure 25) (53).

Cette famille de protéines est composée de huit membres : XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP (ou Livin), ILP2, NAIP, Apollon (ou Bruce) et Survivin.

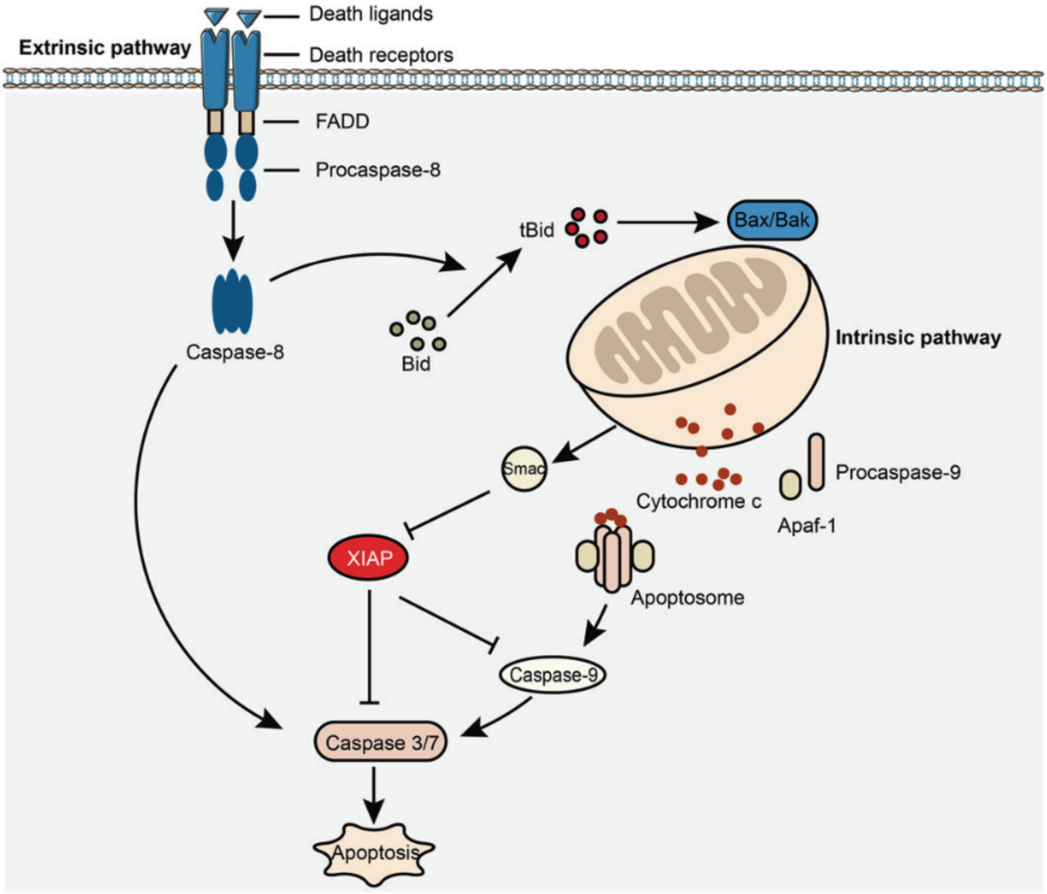


Figure 25 Voies d'activation de l'apoptose. La voie extrinsèque implique la liaison d'un ligand de mort cellulaire à un récepteur de mort cellulaire à la surface de la cellule. La caspase-8 va être clivée et va activer les caspases 3 et 7 ce qui va induire l'apoptose. La voie intrinsèque va débuter par la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale suite à des signaux intrinsèques de mort cellulaire. Cela va induire la libération de protéines solubles intermembranaires comme le cytochrome c et Smac (second mitochondria derived activator of caspase). Le cytochrome c va se lier à APAF-1 (apoptosis protease-activating factor 1) et la procaspase 9 ce qui va conduire à la formation d'apoptosomes et induire l'activation de la caspase 9. La caspase 9 va ensuite activer les procaspases 3 et 7. Smac va inhiber XIAP (X linked inhibitor of apoptosis) ce qui va libérer la caspase-3 et la caspase-9. Les caspases 3 et 7 vont conduire à l'apoptose. Repris de Lu et al. (54)

XIAP possède un domaine BIR3 (*baculovirus IAP repeat 3*) qui lie et inhibe la pro-caspase-9 ce qui va inhiber l'apoptose (55). Il existe un inhibiteur endogène de XIAP : la protéine Smac. Lorsque Smac est relargué lors de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale qui se produit lors du déclenchement de la voie intrinsèque de l'apoptose. Les acides aminés de sa partie N-terminale AVPI (alanine, valine, proline, isoleucine) vont lier le domaine BIR3 de XIAP ce qui va l'empêcher de lier la caspase-9 et donc permettre à l'apoptose d'être déclenchée. La partie N-terminale de la caspase-9, ATPF (alanine, thréonine, proline, phénylalanine), présente une homologie avec celle de Smac (Figure 26), ce qui va permettre de définir un motif conservé de liaison à XIAP (56). Smac et la caspase-9 entrent en compétition avec XIAP lors du déclenchement de l'apoptose selon la voie intrinsèque.

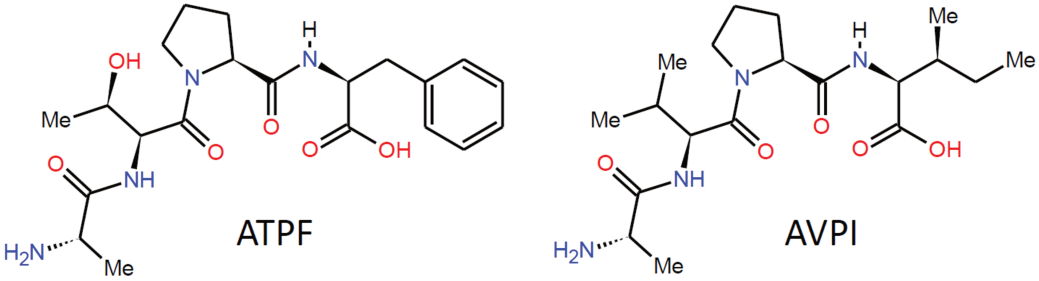


Figure 26 Structure des séquences qui lient le domaine BIR3 de XIAP avec ATPF : la partie N-ter de la caspase-9 ; AVPI : la structure N-ter de Smac

L'inhibition de l'apoptose par XIAP pourrait être responsable de la résistance des cellules cancéreuses aux traitements. Dans les traitements induisant des dommages à l'ADN comme la radiothérapie, il est possible de déclencher une augmentation des niveaux de XIAP ce qui peut induire une résistance à l'apoptose des cellules de carcinome (53).

Afin de développer un inhibiteur de XIAP, il est possible de se baser sur la structure de la partie N-ter de Smac : AVPI. Développer un peptide inhibiteur est compliqué à cause des propriétés pharmacocinétiques non idéales des peptides comme décrit précédemment. Les chercheurs se sont donc concentrés sur le développement de peptidomimétiques à partir de la séquence AVPI de Smac (57).

Cai et al. ont ainsi développé un composé peptidomimétique 1 à partir de la structure AVPI de Smac, capable d'entrer en compétition avec celui-ci et présentant une meilleure affinité pour le domaine de liaison BIR3-IAP (Figure 27) (58). Le composé **1** a ensuite été optimisé pour présenter le meilleur profil pharmacologique et pharmacocinétique et conduire au xevinapant.

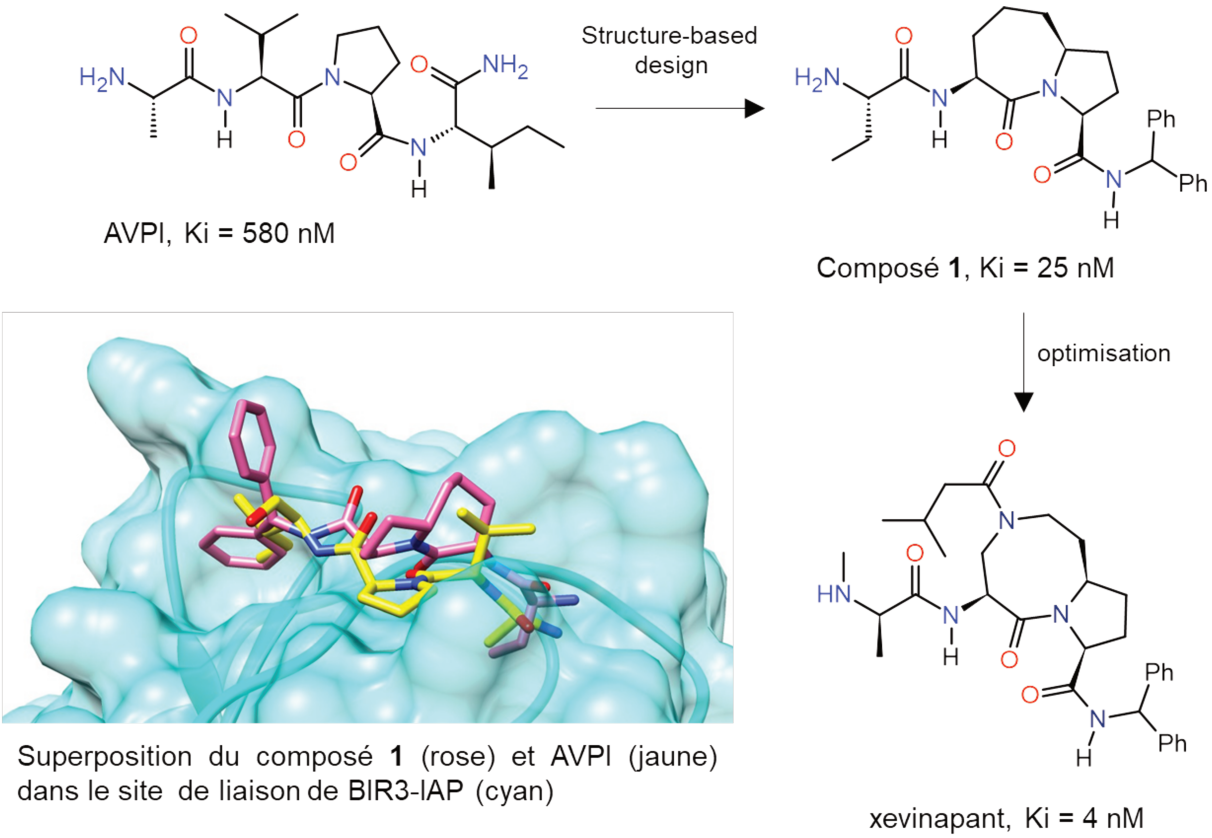


Figure 27 Structure chimique du peptide AVPI de Smac, du peptidomimétique 1 et du xevinapant. Adapté de Cai et al. (58)

Le xevinapant développé par Debiopharm est actuellement évalué en essais clinique de phase III pour le traitement du carcinome épidermoïde localement avancé de la tête et du cou (59). Les résultats de cette étude sont attendus pour 2027.

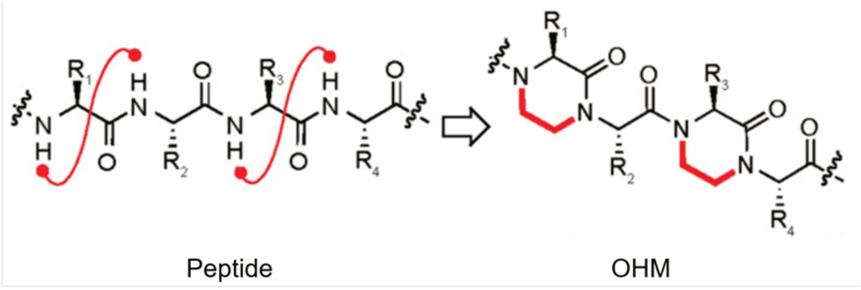
F. Protéomimétiques

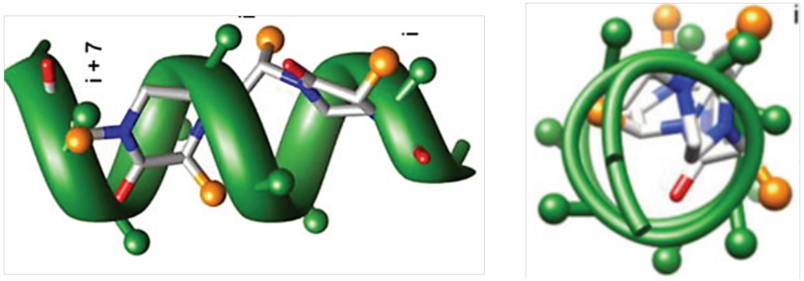
Une autre approche pour cibler les IPP est de développer des protéomimétiques. Il est possible de développer des foldamères qui possèdent une structure générale qui va imiter la projection spatiale des chaines latérales des *hotspots* au niveau de l'interface d'IPP d'intérêt (60). Ces foldamères vont être capables de mimer les structures secondaires des protéines, représentées souvent par des hélices α ou des feuillets β, en améliorant leurs propriétés physicochimiques (passage membranaire, stabilité métabolique) et donc pharmacocinétiques.

L'origine des foldamères est de deux types : peptidique ou hétérocyclique.

Les protéomimétiques hétérocycliques vont mimer l'ensemble des acides aminés de la protéine, mais également la structure de celui-ci (hélices α, β turn, feuillet antiparallèle) en remplaçant les acides aminés par un hétérocycle substitué par des groupements qui vont mimer les propriétés physicochimiques ainsi que l'orientation des groupements de chaque acide aminé.

Parmi les exemples de foldamères mimant les hélices α, des oligooxipipérazines (OHM) ont été développées et possèdent des acides aminés dont la structure a été cyclisée sous forme de pipérazine au niveau des amides des AA (Figure 28).





Superposition d'un peptide sous forme d'hélice α (vert) et d'une oligooxipipérazine (atomes de couleur).

Figure 28 Structure générale des oligooxipipérazines (OHM) mimant les hélices α et orientant les chaines latérales correctement. Adapté de Lao et al. (61)

Certaines d'entre elles ont montré une activité inhibitrice du complexe protéique HIFα/p300 impliqué dans l'angiogenèse des cellules cancéreuses en hypoxie (61). La partie C-terminale de HIF1α va interagir avec le domaine CH1 (*cysteine-histidine rich 1*) de p300, son coactivateur, par l'intermédiaire d'une hélice α contenant 3 *hotspots* d'interaction : Leu818, Leu822 et Gln824 (Figure 29). Le complexe HIF/p300 va entrainer la transcription de gènes inductibles par l'hypoxie qui contribuent grandement à l'angiogenèse, à l'invasion et à l'altération du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses. Inhiber l'activation de la transcription de ces gènes, en inhibant leur facteur de transcription HIF/p300 représente donc une stratégie intéressante dans le cancer (62). Cependant, inhiber des facteurs de transcription est un challenge puisque

les IPP dans lesquelles ils sont impliqués, sont généralement transitoires et de très faible affinité.

Lao et al. ont développé une OHM possédant dans sa structure les chaines latérales des *hotspots* de liaison et présentant une affinité de 530 nM avec p300 (Figure 29) (61). Cette molécule a démontré, au niveau préclinique, une réduction de l'activité de HIF avec une diminution de l'expression des gènes inductibles par l'hypoxie qui entrainent une angiogenèse, une invasion et une glycolyse. Ils ont ensuite testé le composé *in vivo* dans un modèle de souris avec xénogreffes de lignée cellulaire de cancer du sein triple négatif (MDA-MB-231). Les injections du composé OHM a permis une réduction de la taille de la tumeur d'environ 50% par rapport au groupe non traité.

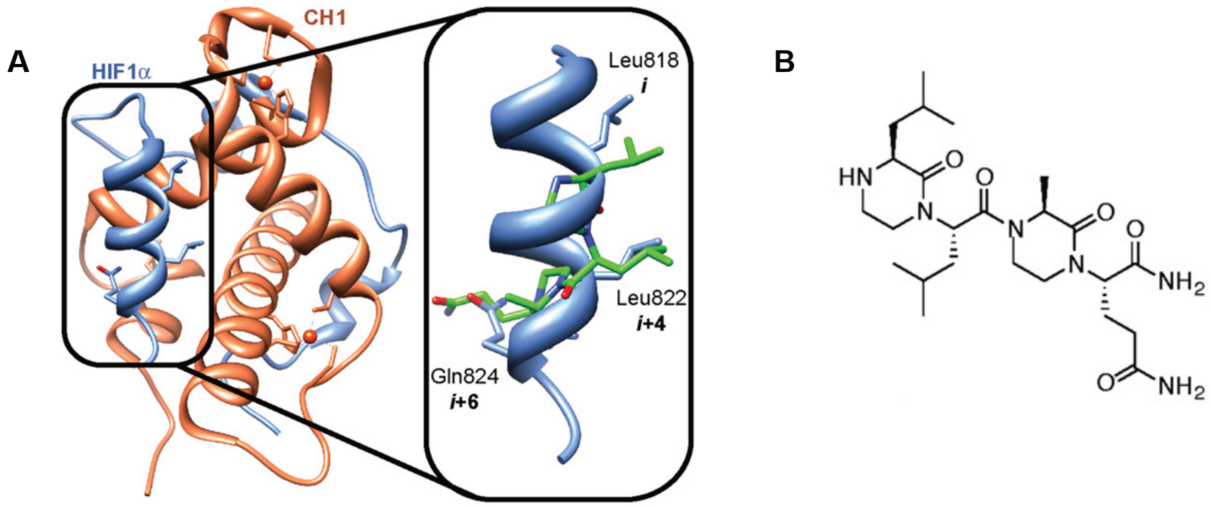


Figure 29 A) Représentation de l'interaction entre HIF1α et le domaine CH1 de p300 avec en bleu les résidus clés Leu818, Leu822 et Gln824 de HIF1α, en orange le domaine CH1 de p300 avec une superposition à droite de l'hélice α de HIF1α en bleu avec un inhibiteur OHM en vert. B) Structure de l'inhibiteur OHM. Adapté de Lao et al. (61)

Il existe également des foldamères dérivés des peptides capables de mimer la structure d'une hélice α (63). En plus des problèmes évoqués précédemment, une séquence peptidique isolée de son contexte protéique risque de perdre la structuration de sa conformation active. Une stratégie consiste à concevoir des peptides agrafés (*stapled peptides*) issus de la réaction chimique entre deux acides aminés modifiés de la séquence (Figure 30) ce qui va permettre de stabiliser sa conformation active, d'augmenter sa pénétration cellulaire, d'améliorer son affinité et sa spécificité ainsi que de diminuer sa dégradation protéolytique.

En effet, en stabilisant la structure du peptide en hélice α, cela va permettre de garder les liaisons peptidiques cachées, qui sont les cibles des protéases. De plus, stabiliser la structure du peptide va permettre d'améliorer sa résistance à des milieux acides, ce qui va permettre l'administration par voie orale.

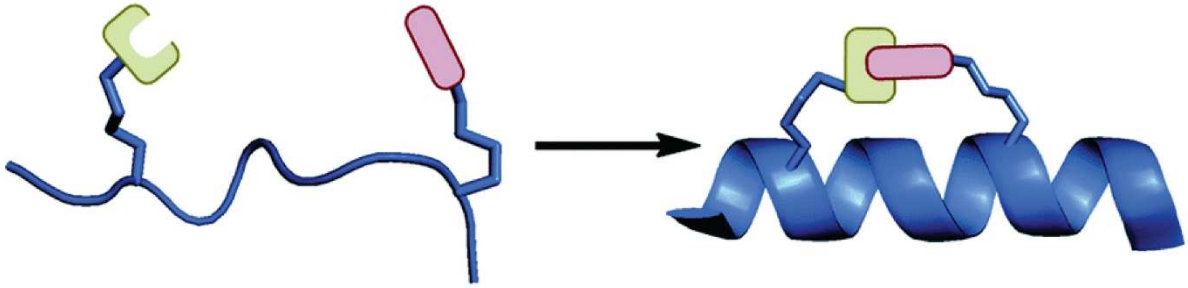


Figure 30 Exemple d'agrafage d'un peptide linéaire en hélice α, adapté de Moiola et al.(63)

Cette stratégie a été employée pour développer un inhibiteur de l'interaction p53 MDM2/MDMX.

Comme décrit précédemment, p53 a un rôle important dans beaucoup de cancers. Cette protéine impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en cas d'anomalie, va être mutée dans 50% des cancers et dans les autres cas où la protéine est native, il peut y avoir une surexpression de MDM2 qui la régule négativement. Il y a donc un réel intérêt à bloquer l'interaction p53/MDM2 afin de restaurer l'activité de p53 et de réintroduire l'apoptose dans les cellules cancéreuses. p53 a également un autre régulateur qui est MDMX qui va avoir le même rôle que la protéine MDM2 mais qui en plus va inhiber la transcription de p53 (64). MDMX va être amplifié dans beaucoup de cancers et son augmentation est associée à une protéine p53 non mutée et une absence d'amplification de MDM2. Même si les mécanismes de compensation entre MDM2 et MDMX ne sont pas très bien connus, ils peuvent compenser leur activité et réguler négativement p53.
Comme décrit précédemment, il y a eu le développement d'inhibiteurs p53/MDM2 de faible poids moléculaire comme les Nutlines. Sauf que ces molécules sont inactives sur MDMX et ne seront pas très efficaces dans les tumeurs avec un taux élevé de MDMX. Cependant, il est très difficile de développer un inhibiteur de petite taille capable d'inhiber à la fois MDM2 et MDMX. Même si les sites de fixation se

ressemblent, ils ne sont pas identiques et cela va rendre le développement d'antagonistes de petites tailles très compliqué.

La solution est donc de mimer l'hélice α de p53 qui est impliquée dans la liaison avec MDM2 et MDMX. Bernal et al. ont développé des *stapled peptides* à partir de la structure native de p53 en renforçant la structure en hélice α du peptide : les composés SAH-p53 (*stabilized α helix of p53*) (65). Ils ont inséré une agrafe, une chaine hydrocarbone entre deux peptides naturels de p53. Cette modification a permis à la molécule, contrairement au peptide de p53 non modifié, de pénétrer dans les cellules par un mécanisme d'absorption actif. Ils ont ensuite remplacé les acides aspartiques et les acides glutamiques par des asparagines et des glutamines pour ajuster la charge du peptide afin d'améliorer la pénétration intracellulaire et ils ont muté certains résidus présents sur p53 qui sont responsables de l'export nucléaire de p53 (L14Q) et de l'ubiquitylation de la protéine (K24R). Cela a permis de conduire au composé SAH-p53-8 dont la structure est stable, passe les membranes et avec une forte affinité pour hDM2 (Figure 31). Ce composé a permis *in vitro* dans des cellules cancéreuses d'avoir un effet pro-apoptotique en restaurant la voie de p53.

Chang et al. ont développé un *stapled peptide* : le composé ATSP-7041 (Figure 31) à partir des SAH-p53, qui va inhiber à la fois la liaison de p53 avec MDM2 et MDMX et qui a démontré son activité *in vitro* et *in vivo* (64). Ce composé a été obtenu en optimisant le composé SAH-p53-8 en diminuant la polarité de la molécule. Cela a permis d'augmenter l'affinité du composé à ses cibles. Le composé ATSP-7041 présente une affinité améliorée pour les cibles MDM2 (Ki = 0,9 nM) et MDMDX (Ki = 6,8 nM), comparées à celles de SAH-p53-8 : Ki MDM2 = 25,9 nM et Ki MDMX = 105,7 nM.

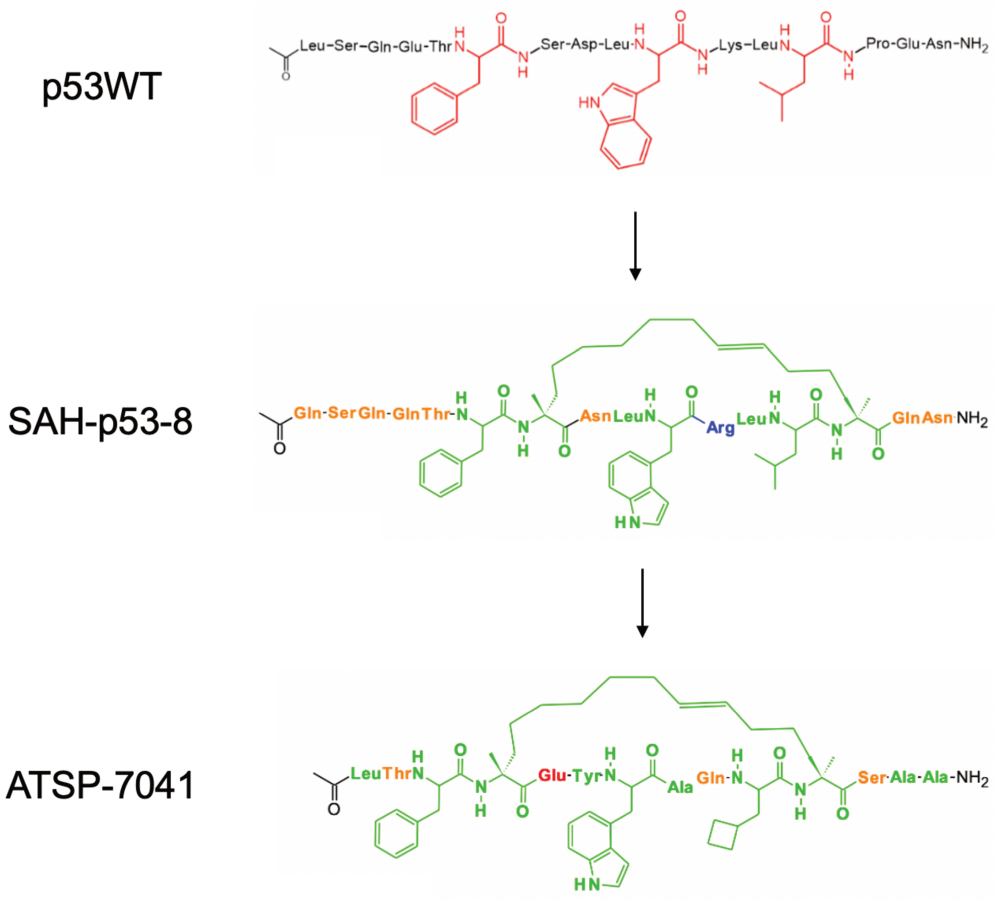


Figure 31 Structure des composés SAH-p53-8 et ATSP-7041, des stapled peptides mimes de l'hélice alpha de p53, capables d'inhiber MDM2 et MDMX

ATSP-7041 a permis d'induire l'apoptose via la voie de p53 et d'inhiber la croissance de cellules cancéreuses à la fois *in vitro* et *in vivo* (Figure 32). Cette molécule préserve la conformation en hélice α retrouvée dans p53 et possède des propriétés drug-like (pénètre à l'intérieur des cellules, possède une affinité spécifique pour ses cibles et est stable *in vivo*).

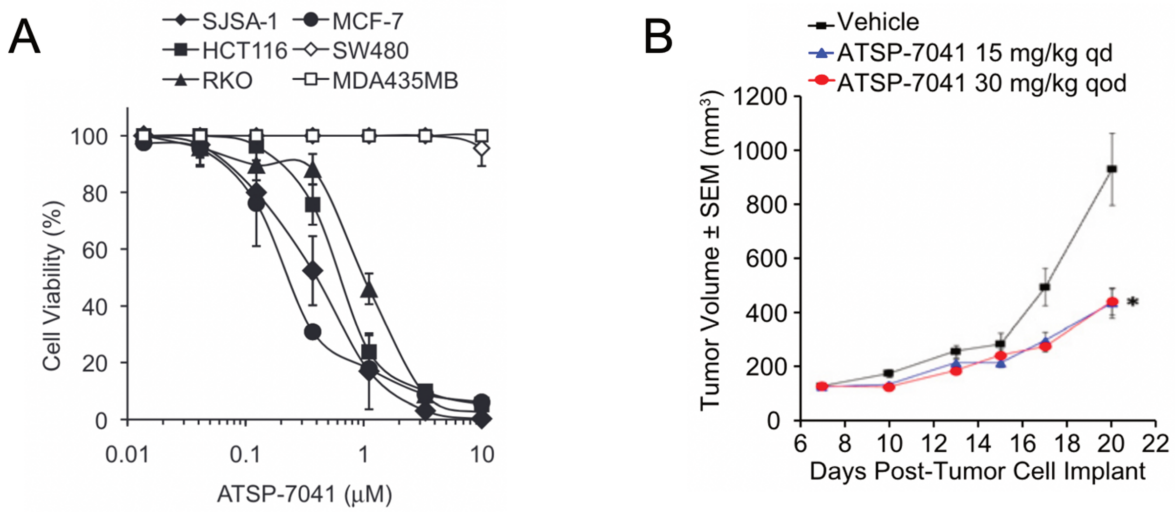


Figure 32 ATSP-7041 restaure l'apoptose dans les cellules cancéreuses p53WT avec A) Viabilité cellulaire de quatre lignées cellulaires p53WT (SJSA-1, MCF-7, HCT-116, RKO) et deux lignées où p53 est mutée (SW480 et MDA-MB-435), le graphe représente un pourcentage de cellules viables par rapport au contrôle sans ATSP-704. B) ATSP-7041 induit une réduction de la taille de la tumeur in vivo dans un modèle de xénogreffe d'ostéosarcome SJSA-1 où il y a une amplification de MDM2. Adapté de Chang et al. (64)

ATSP-7041 a ensuite été racheté par Aileron Therapeutics et est devenu le composé ALRN-6924. ALRN-6924 est actuellement évalué en clinique dans une phase 1 dans le cancer du sein où p53 est muté (66). Les résultats de cette étude devraient être connus d'ici la fin de l'année 2023.

Conclusion

Ces dernières années, la modulation des IPP a suscité un intérêt croissant dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les IPP ont des caractéristiques très différentes de celles des cibles classiques enzyme-ligand, ce qui rend la conception d'inhibiteurs plus complexe. Elles ont longtemps été considérées comme *undruggable*. Depuis quelques années cependant, avec la découverte des *hotspots* et une meilleure compréhension des propriétés des IPP, les cibler est devenu possible. Il a fallu remettre en question certaines propriétés *drug-like* classiques pour le développement de modulateurs et plusieurs stratégies peuvent être mises en place pour concevoir un inhibiteur sélectif avec une forte affinité.

Dans ce mémoire ont été présentées différentes méthodes pour le développement d'inhibiteurs d'IPP. Par rapport aux techniques classiques comme le criblage, il a fallu soit adapter les paramètres d'évaluation, soit changer d'approche en chimie médicinale pour développer des inhibiteurs d'interaction efficaces. Les techniques présentées ne sont pas exhaustives, il existe d'autres stratégies pour inhiber les IPP. Il y a également le développement d'anticorps monoclonaux ciblant une interface d'IPP, en particulier les anticorps monoclonaux ciblant l'interaction PD-1/PD-L1 liée à l'échappement de certaines cellules tumorales au système immunitaire. Il existe cinq anticorps monoclonaux sur le marché ciblant cette interaction, indiqués dans diverses pathologies comme le mélanome ou encore le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (54).

Les anticorps monoclonaux présentent une très forte affinité et spécificité pour leur cible. Cependant, développer des anticorps monoclonaux pour moduler une IPP présente beaucoup d'inconvénients. Tout d'abord, les anticorps monoclonaux ne se lient généralement qu'à des cibles extracellulaires. De plus, le développement d'anticorps est très coûteux, ils peuvent être instables *in vivo* car ils présentent des ponts disulfures et une glycosylation complexe. Ils peuvent causer des effets indésirables dû à l'immunogénicité des anticorps monoclonaux (qui est le développement d'une réponse immunitaire chez l'individu traité vis-à-vis de l'anticorps monoclonal) (67). Les anticorps sont des protéines avec un poids moléculaire élevé (150 kDa) cependant, qu'une petite partie de l'anticorps (le paratope) va servir pour la

reconnaissance de l'antigène. Il est possible de développer des protéomimétiques mimant le paratope de l'anticorps : les *Affibodies*. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire (6,5 kDa) composées de trois hélices α. Ces protéines sont dérivées du *Z domain* de la protéine A du staphylocoque qui peut être modifié et isolé dans le but d'avoir une grande spécificité et une affinité élevée pour une cible donnée. Les molécules *Affibodies* constituent des substituts attractifs par rapport aux anticorps grâce à leur petite taille, à leur faible immunogénicité ainsi que leurs paramètres pharmacocinétiques optimaux (68). Des *Affibodies* ont été développés pour cibler plusieurs protéines impliquées dans le développement de tumeurs comme HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*) ou encore IGF1R (*insulin-like growth factor type 1 receptor*).

En plus des inhibiteurs d'IPP, il est également possible de cibler l'interactome non en inhibant l'interaction entre deux protéines, mais en la stabilisant (69). Le modulateur peut se fixer sur un site allostérique d'une protéine et entrainer un changement de conformation de celle-ci. Cela va augmenter l'affinité de cette protéine à son partenaire et empêcher leur dissociation. L'autre possibilité est que le stabilisateur se fixe de manière orthostérique au niveau de l'interface et en étant lié aux deux protéines, la force de liaison est augmentée entre les deux. Le paclitaxel est le premier stabilisateur d'IPP sur le marché. Il favorise l'assemblage des dimères de tubulines en microtubules et stabilise les microtubules en empêchant leur dépolymérisation. Cela entraine l'inhibition de la réorganisation des microtubules qui est essentielle au cours de l'interphase et de la mitose ce qui va conduire à un arrêt du cycle cellulaire. Le paclitaxel est utilisé en cancérologie dans la prise en charge de cancers bronchopulmonaires non à petites cellules, de l'ovaire, du sein ou encore dans les sarcomes de Kaposi associés au sida.

La stabilisation d'IPP représente une approche prometteuse pour la modulation de celles-ci. Toutefois, ces dernières années l'attention a été principalement été portée sur le développement d'inhibiteurs d'IPP.
Certains ont démontré des résultats prometteurs et sont actuellement évalués en essais cliniques comme montré dans le Tableau 4 (54). Les inhibiteurs d'IPP en développement sont majoritairement des molécules indiquées dans la prise en charge de cancers. Cela est principalement dû à l'avancée des connaissances dans ce

domaine. Pour développer un inhibiteur d'IPP, comme décrit dans la Partie 2, il faut savoir si cette interaction fait partie des voies de signalisation impliquées dans un processus pathologique et avoir accès aux structures des protéines et des complexes, comme le démontre le travail de Kar et al (22).

Cette nouvelle classe médicamenteuse pourrait constituer un renfort de l'arsenal thérapeutique dans les prochaines années.

Tableau 4 Exemples d'inhibiteurs d'IPP évalués en clinique en 2020. Repris de Lu et al. (54)

PPI	Related disease	Drug	Developer	Status
Small molecules				
MDM2/p53	Acute myeloid leukemia	Idasanutlin	Roche	Phase III
MDM2/p53	Metastatic melanoma	AMG232	Amgen	Phase I/II
MDM2/p53	Solid tumor with p53 wild type status	CGM097	Novartis	Phase I
MDM2/p53	Advanced solid tumor, lymphoma	DS-3032b	Daiichi Sankyo	Phase I
MDM2/p53	Neoplasm malignant	SAR405838	Sanofi	Phase I
Bcl-2/Bax	Chronic lymphocytic leukemia	ABT-199	AbbVie	Approved in 2016
XIAP/caspase-9	Relapsed or refractory multiple myeloma	LCL-161	Novartis	Phase II
XIAP/caspase-9	Recurrent head and neck squamous cell carcinoma	TL32711	National Cancer Institute	Phase I
XIAP/caspase-9	Solid tumors, lymphoma	ASTX-660	Astex	Phase I/II
XIAP/caspase-9	Solid cancers	GDC-0917	Genentech	Phase I
PD-1/PD-L1	Prostatic neoplasms	CA-170	Astellas	Phase II
Gp120/CCR5	HIV	Maraviroc	Pfizer	Approved in 2007
LFA-1/ICAM-1	Dry eye	Lifitegrast	Lifelong Vision Foundation	Phase IV
B-catenin/CBP	Liver cirrhosis	RPI-724	Komagome Hospital	Phase I/II
Bromodomain/ histone	Cardiovascular diseases	RVX-208	Resverlogix	Phase III
Bromodomain/ histone	NUT midline carcinoma	GSK525762	GSK	Phase I
Peptides				
MDM2/p53	Advanced solid tumors, lymphomas	ALRN-6924	Aileron	Phase I/II
Antibodies				
CD40/CD40L	Kidney transplantation	Bleselumab	Astellas	Phase II
CD40/CD40L	Multiple myeloma	lucatumumab	Novartis	Phase I
CD40/CD40L	Relapsed diffuse large B-cell lymphoma	dacetuzumab	Seattle Genetics	Phase II
CD40/CD40L	Lupus Nephritis	BI655064	Boehringer Ingelheim	Phase II
CD40/CD40L	Advanced solid tumors	ABBV-428	AbbVie	Phase I
CD40/CD40L	Ulcerative colitis	ABBV-323	AbbVie	Phase II
PD-1/PD-L1	Non-small lung cancer	Keytruda	Merck Sharp & Dohme	Approved in 2014
PD-1/PD-L1	Non-small lung cancer	Opdivo	Bristol Myers Squibb	Approved in 2014
PD-1/PD-L1	Non-small lung cancer	Tecentriq	Roche	Approved in 2016
PD-1/PD-L1	Merkel cell carcinoma	Bavencio	Merck and Pfizer	Approved in 2017
PD-1/PD-L1	Non-small lung cancer	Imfinzi	AstraZeneca	Approved in 2017
PD-1/PD-L1	Unresectable or metastatic melanoma	JS001	Shanghai Junshi Bioscience	Phase III
PD-1/PD-L1	Advanced/metastatic solid malignancies	IBI308	Innovent Biologics	Phase I/II
PD-1/PD-L1	Locally advanced or metastatic urothelial bladder cancer	BGB-A317	BeiGene	Phase II

Bibliographie

1. Zheng CJ, Han LY, Yap CW, Ji ZL, Cao ZW, Chen YZ. Therapeutic Targets: Progress of Their Exploration and Investigation of Their Characteristics. Pharmacol Rev. 1 juin 2006;58(2):259-79.
2. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? Nat Rev Drug Discov. déc 2006;5(12):993-6.
3. Chène P. Drugs targeting protein-protein interactions. ChemMedChem. avr 2006;1(4):400-11.
4. Sheng C, Dong G, Miao Z, Zhang W, Wang W. State-of-the-art strategies for targeting protein–protein interactions by small-molecule inhibitors. Chem Soc Rev. 3 nov 2015;44(22):8238-59.
5. Ottman C. Protein–Protein Interactions: An Overview. In: Protein-Protein Interactions in Drug Discovery. John Wiley & Sons, Ltd; 2013;1-19.
6. Rivas JDL, Fontanillo C. Protein–Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks. PLOS Comput Biol. 24 juin 2010;6(6):e1000807.
7. Nooren IMA, Thornton JM. Diversity of protein–protein interactions. EMBO J. 15 juill 2003;22(14):3486-92.
8. Conte LL, Chothia C, Janin J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. J Mol Biol. 5 févr 1999;285(5):2177-98.
9. Bernstein BW, Bamburg JR. ADF/Cofilin: A Functional Node in Cell Biology. Trends Cell Biol. avr 2010;20(4):187.
10. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. Pharmacol Rep. janv 2009;61(1):22-32.
11. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther. 14 juill 2017;2(1):17023.
12. Liu JO. Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation. Immunol Rev. mars 2009;228(1):184-98.
13. Ganesan AK, Vincent TS, Olson JC, Barbieri JT. Pseudomonas aeruginosa Exoenzyme S Disrupts Ras-mediated Signal Transduction by Inhibiting Guanine Nucleotide Exchange Factor-catalyzed Nucleotide Exchange. J Biol Chem. juill 1999;274(31):21823-9.
14. Scott DE, Bayly AR, Abell C, Skidmore J. Small molecules, big targets: drug discovery

faces the protein–protein interaction challenge. Nat Rev Drug Discov. août 2016;15(8):533-50.
15. Bogan AA, Thorn KS. Anatomy of hot spots in protein interfaces. J Mol Biol. 3 juill 1998;280(1):1-9.
16. Ni D, Lu S, Zhang J. Emerging roles of allosteric modulators in the regulation of protein-protein interactions (PPIs): A new paradigm for PPI drug discovery. Med Res Rev. 2019;39(6):2314-42.
17. Fuller JC, Burgoyne NJ, Jackson RM. Predicting druggable binding sites at the protein–protein interface. Drug Discov Today. févr 2009;14(3-4):155-61.
18. Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ. Hot spots—A review of the protein–protein interface determinant amino-acid residues. Proteins Struct Funct Bioinforma. 2007;68(4):803-12.
19. Mabonga L, Kappo AP. Protein-protein interaction modulators: advances, successes and remaining challenges. Biophys Rev. 12 juill 2019;11(4):559-81.
20. Wang X, Ni D, Liu Y, Lu S. Rational Design of Peptide-Based Inhibitors Disrupting Protein-Protein Interactions. Front Chem. 4 mai 2021;9:682675.
21. Vistoli G, Pedretti A, Testa B. Assessing drug-likeness – what are we missing? Drug Discov Today. avr 2008;13(7-8):285-94.
22. Kar G, Gursoy A, Keskin O. Human Cancer Protein-Protein Interaction Network: A Structural Perspective. Nussinov R, éditeur. PLoS Comput Biol. 11 déc 2009;5(12):e1000601.
23. Szilagyi A, Zhang Y. Template-based structure modeling of protein–protein interactions. Curr Opin Struct Biol. févr 2014;24:10-23.
24. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature. août 2021;596(7873):583-9.
25. Raj M, Bullock BN, Arora PS. Plucking the high hanging fruit: A systematic approach for targeting protein–protein interactions. Bioorg Med Chem. juill 2013;21(14):4051-7.
26. Fiorucci S, Zacharias M. Prediction of Protein-Protein Interaction Sites Using Electrostatic Desolvation Profiles. Biophys J. mai 2010;98(9):1921-30.
27. London N, Raveh B, Schueler-Furman O. Druggable protein–protein interactions – from hot spots to hot segments. Curr Opin Chem Biol. déc 2013;17(6):952-9.
28. Arkin MR, Tang Y, Wells JA. Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing toward the Reality. Chem Biol. 18 sept 2014;21(9):1102-14.
29. Smith MC, Gestwicki JE. Features of protein–protein interactions that translate into potent inhibitors: topology, surface area and affinity. Expert Rev Mol Med. juill 2012;14:e16.
30. Silvian L, Enyedy I, Kumaravel G. Inhibitors of protein–protein interactions: New

methodologies to tackle this challenge. Drug Discov Today Technol. déc 2013;10(4):e509-15.
31. Villoutreix BO, Labbé CM, Lagorce D, Laconde G, Sperandio O. A leap into the chemical space of protein-protein interaction inhibitors. Curr Pharm Des. 2012;18(30):4648-67.
32. Bleicher KH, Böhm HJ, Müller K, Alanine AI. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. Nat Rev Drug Discov. mai 2003;2(5):369-78.
33. Ruddigkeit L, Van Deursen R, Blum LC, Reymond JL. Enumeration of 166 Billion Organic Small Molecules in the Chemical Universe Database GDB-17. J Chem Inf Model. 26 nov 2012;52(11):2864-75.
34. Labbé CM, Laconde G, Kuenemann MA, Villoutreix BO, Sperandio O. iPPI-DB: a manually curated and interactive database of small non-peptide inhibitors of protein–protein interactions. Drug Discov Today. oct 2013;18(19-20):958-68.
35. Theobald M, Offringa R. Anti-p53-directed immunotherapy of malignant disease. Expert Rev Mol Med. 28 mars 2003;5(11):1-13.
36. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. Science. 6 févr 2004;303(5659):844-8.
37. Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, et al. Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transactivation Domain. Science. 1996;274(5289):948-53.
38. Ding Q, Zhang Z, Liu JJ, Jiang N, Zhang J, Ross TM, et al. Discovery of RG7388, a Potent and Selective p53–MDM2 Inhibitor in Clinical Development. J Med Chem. 25 juill 2013;56(14):5979-83.
39. Lamoree B, Hubbard RE. Current perspectives in fragment-based lead discovery (FBLD). van Montfort RLM, Workman P, éditeurs. Essays Biochem. 8 nov 2017;61(5):453-64.
40. Scott DE, Coyne AG, Hudson SA, Abell C. Fragment-Based Approaches in Drug Discovery and Chemical Biology. Biochemistry. 26 juin 2012;51(25):4990-5003.
41. Giam M, Huang DCS, Bouillet P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. Oncogene. déc 2008;27(S1):S128-36.
42. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol. 4 janv 2013;5(4):a008714.
43. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-x_L, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. Genes Dev. 1 juin 2005;19(11):1294-305.
44. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Leverson JD, Souers AJ. From basic apoptosis

discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. Nat Rev Drug Discov. avr 2017;16(4):273-84.

45. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res. 1 mars 2004;1644(2):83-94.

46. Park CM, Bruncko M, Adickes J, Bauch J, Ding H, Kunzer A, et al. Discovery of an Orally Bioavailable Small Molecule Inhibitor of Prosurvival B-Cell Lymphoma 2 Proteins. J Med Chem. 13 nov 2008;51(21):6902-15.

47. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. Cancer Res. 1 mai 2008;68(9):3421-8.

48. Souers AJ, Leverson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. Nat Med. févr 2013;19(2):202-8.

49. Leucémie lymphoïde chronique : passage en ville du premier inhibiteur de BCL2, VENCLYXTO (vénétoclax) [Internet]. VIDAL. [cité 30 août 2022]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/actualites/22738-leucemie-lymphoide-chronique-passage-en-ville-du-premier-inhibiteur-de-bcl-2-venclyxto-venetoclax.html

50. VENCLYXTO 50 mg cp pellic - VIDAL eVIDAL [Internet]. [cité 30 août 2022]. Disponible sur: https://evidal-vidal-fr.ressources-electroniques.univ-lille.fr/medicament/venclyxto_50_mg_cp_pellic-176653.html

51. Cunningham AD, Qvit N, Mochly-Rosen D. Peptides and peptidomimetics as regulators of protein–protein interactions. Curr Opin Struct Biol. juin 2017;44:59-66.

52. Avan I, Hall CD, Katritzky AR. Peptidomimetics via modifications of amino acids and peptide bonds. Chem Soc Rev. 2014;43(10):3575.

53. Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. OncoTargets Ther. 16 sept 2013;6:1285-304.

54. Lu H, Zhou Q, He J, Jiang Z, Peng C, Tong R, et al. Recent advances in the development of protein–protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. Signal Transduct Target Ther. 23 sept 2020;5(1):213.

55. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. Apoptosis. 25 juill 2007;12(9):1543-68.

56. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. Nature. 1 mars 2001;410(6824):112-6.

57. Sun H, Nikolovska-Coleska Z, Yang CY, Xu L, Liu M, Tomita Y, et al. Structure-Based

Design of Potent, Conformationally Constrained Smac Mimetics. J Am Chem Soc. 1 déc 2004;126(51):16686-7.

58. Cai Q, Sun H, Peng Y, Lu J, Nikolovska-Coleska Z, McEachern D, et al. A Potent and Orally Active Antagonist (SM-406/AT-406) of Multiple Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) in Clinical Development for Cancer Treatment. J Med Chem. 28 avr 2011;54(8):2714-26.

59. EMD Serono Research & Development Institute, Inc. A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled, Phase 3 Study of Debio 1143 in Combination With Platinum-Based Chemotherapy and Standard Fractionation Intensity-Modulated Radiotherapy in Patients With Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Suitable for Definitive Chemoradiotherapy (TrilynX) [Internet]. clinicaltrials.gov; 2022 nov [cité 4 avr 2023]. Report No.: NCT04459715. Disponible sur: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04459715

60. Barnard A, Long K, Martin HL, Miles JA, Edwards TA, Tomlinson DC, et al. Selective and Potent Proteomimetic Inhibitors of Intracellular Protein-Protein Interactions. Angew Chem Int Ed. 2 mars 2015;54(10):2960-5.

61. Lao BB, Grishagin I, Mesallati H, Brewer TF, Olenyuk BZ, Arora PS. In vivo modulation of hypoxia-inducible signaling by topographical helix mimetics. Proc Natl Acad Sci. 27 mai 2014;111(21):7531-6.

62. Kushal S, Lao BB, Henchey LK, Dubey R, Mesallati H, Traaseth NJ, et al. Protein domain mimetics as in vivo modulators of hypoxia-inducible factor signaling. Proc Natl Acad Sci. 24 sept 2013;110(39):15602-7.

63. Moiola M, Memeo MG, Quadrelli P. Stapled Peptides—A Useful Improvement for Peptide-Based Drugs. Molecules. janv 2019;24(20):3654.

64. Chang YS, Graves B, Guerlavais V, Tovar C, Packman K, To KH, et al. Stapled α−helical peptide drug development: A potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. Proc Natl Acad Sci. 3 sept 2013;110(36):E3445-54.

65. Bernal F, Tyler AF, Korsmeyer SJ, Walensky LD, Verdine GL. Reactivation of the p53 Tumor Suppressor Pathway by a Stapled p53 Peptide. J Am Chem Soc. 1 mars 2007;129(9):2456-7.

66. Clinical Development • Aileron [Internet]. Aileron. [cité 9 juin 2023]. Disponible sur: https://aileronrx.com/clinical-development/

67. Löfblom J, Feldwisch J, Tolmachev V, Carlsson J, Ståhl S, Frejd FY. Affibody molecules: Engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. FEBS Lett. 18 juin 2010;584(12):2670-80.

68. Xue X, Wang B, Du W, Zhang C, Song Y, Cai Y, et al. Generation of affibody molecules

specific for HPV16 E7 recognition. Oncotarget. 21 sept 2016;7(45):73995-4005.
69. Gestwicki J, Marinec P. Chemical Control Over Protein-Protein Interactions: Beyond Inhibitors. Comb Chem High Throughput Screen. 1 sept 2007;10(8):667-75.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2022/2023

Nom : BOUREL Prénom : Louisa

Titre de la thèse :

Les interactions protéine-protéine : de la druggabilité des interfaces d'interaction au ciblage thérapeutique

Mots-clés : interaction protéine-protéine, inhibiteurs d'IPP, druggabilité interface, criblage HTS, approche par fragment, peptidomimétiques, protéomimétiques

Résumé :
Les interactions protéine-protéine (IPP) sont impliquées dans tous les processus biologiques ainsi que leur régulation et peuvent contribuer au développement de nombreuses pathologies comme le cancer. Les caractéristiques de liaison d'une IPP sont très différentes de celles d'une cible classique enzyme-ligand. Les surfaces d'interaction sont beaucoup plus larges, plates et hydrophobes. Il y a la présence de *hotspots* qui sont des acides aminés qui contribuent de façon majeure à l'énergie libre de liaison entre les deux protéines et qui vont permettre le développement potentiel d'inhibiteurs. Cependant, toutes les IPP ne peuvent être ciblées. Il faut tout d'abord évaluer la druggabilité de l'interaction, qui va reposer sur la connaissance des structures des protéines et du complexe, la présence de cavités, le caractère hydrophobe, la taille de l'interface et la complémentarité entre les deux protéines. Si l'IPP est considérée comme *druggable*, différentes stratégies de ciblage thérapeutique peuvent être mises en place comme le criblage haut-débit, l'approche par fragment, le développement de peptidomimétiques ou encore de protéomimétiques. Le développement d'inhibiteur d'IPP constitue une classe thérapeutique attrayante qui va renforcer l'arsenal thérapeutique dans les prochaines années.

Membres du jury :

Président directeur de thèse :	**Professeur Nicolas LEBEGUE** Professeur de chimie thérapeutique, Faculté de Pharmacie, Lille, UFR3S
Assesseur :	**Docteur Thomas GUERRIER** Docteur en Pharmacie, Docteur en Sciences, Ingénieur de recherche, INFINITE U1286, Lille
Membre extérieur :	**Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET** Professeur de chimie thérapeutique, Faculté de Pharmacie, Caen