



**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2016

THESES 2016 TOU3 2009

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

BELKACEM BOURICHA Lina

**TRAITER LES GLIOBLASTOMES : EXEMPLE D'APPLICATION DE LA MODELISATION
MOLECULAIRE DANS LA RECHERCHE D'INHIBITEURS DE LA PROTEINE HIF-2**

Date de soutenance : le 20 Janvier 2016

Directeurs de thèse : Dr. COLLOC'H Nathalie, unité ISTCT, UMR 6301, Caen
Pr. SOPKOVA-DE OLIVEIRA SANTOS Jana, CERMN, Caen

JURY

Président :

Pr. VERHAEGHE Pierre, Professeur, faculté de Sciences Pharmaceutiques, Toulouse

1er assesseur :

Dr. DEMANGE Pascal, chercheur DR2 CNRS, IPBS, Toulouse

2ème assesseur :

Dr. BON Cécile, Maître de conférences, faculté de Sciences Pharmaceutiques, Toulouse

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} octobre 2015

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CHATELUT E	Pharmacologie	Mme BARRE A	Biologie
M. FAVRE G	Biochimie	Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
M. HOUIN G	Pharmacologie	Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. PARINI A	Physiologie	M. BENOIST H	Immunologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie	Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie	Mme COUDERC B	Biochimie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie	M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique	Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. SIÉ P	Hématologie	M. FABRE N	Pharmacognosie
M. VALENTIN A	Parasitologie	M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
		Mme MULLER-STAUMONT C	Toxicologie - Sémiologie
		Mme NEPVEU F	Chimie analytique
		M. SALLES B	Toxicologie
		M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
		M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
		Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
		M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. GESTAC P	Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie	Mme AUTHIER H	Parasitologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique	M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique	Mme BON C	Biophysique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie	M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F	Pharmacologie	Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
		M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C	Physiologie
		Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
		Mme COSTE A (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N	Biochimie
		Mme DERAËVE C	Chimie Thérapeutique
		Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
		Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A	Toxicologie
		Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC J	Biochimie
		Mme LEFEVRE L	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A	Biochimie
		M. MARTI G	Pharmacognosie
		Mme MIREY G (*)	Toxicologie
		Mme MONTFERRAN S	Biochimie
		M. OLICHON A	Biochimie
		M. PERE D	Pharmacognosie
		Mme PORTHE G	Immunologie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D	Hématologie
		Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N (**)	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

(**) Nomination au 1^{er} novembre 2015

A mes parents pour leur soutien sans limites,

A mes sœurs et mon petit frère toujours présents,

A mon mari pour ses encouragements sans faille.

Remerciements

A Jana Sopkova de Oliveira Santos et Nathalie Colloc'h,

Pour m'avoir encadrée patiemment tout au long de ce travail, pour m'avoir acceptée dans vos laboratoires respectifs (CERMN et ISTCT, UMR 6301) pour mon stage de Master 2. Merci pour le savoir que vous m'avez transmis et pour votre gentillesse et bienveillance.

A M. Pierre Verhaeghe, M. Pascal Demange et Mme. Cécile Bon,

Pour avoir acceptés de participer a ma thèse en tant que membres du jury. Je vous en suis très reconnaissante.

A toute l'équipe CERVOxy,

Pour m'avoir accueilli chaleureusement lors de mon stage de M2. Je vous remercie pour tous les bons conseils et les bons moments en votre compagnie.

A tous les membres du CERMN,

Pour m'avoir accueilli tout aussi chaleureusement lors de mon stage de M2. Merci pour les enseignements de Drug Design que j'ai reçu de la part des enseignants du CERMN. Je vous remercie aussi pour tous les bons gâteaux partagés ensemble et les bons moments.

A toute ma famille,

Pour les encouragements tout au long de mon cursus universitaire et pour votre présence dans les bons et les mauvais moments.

A Selma,

Pour ton amitié durant toutes ces années depuis le collège. On a réussi à devenir pharmaciennes ensemble !

A tous les enseignants de la Faculté de Pharmacie de Toulouse,

Pour tous les enseignements dispensés et qui m'ont permis d'en arriver là ou j'en suis.

A tous mes amis pharmaciens ou non rencontrés tout au long de ces années. Je vous souhaite à tous une très belle continuation professionnelle et personnelle.

Table des matières

Remerciements	6
Table des matières	7
Table des figures	10
Table des tableaux	11
Table des annexes	12
INTRODUCTION	13
I. Le défi des Glioblastomes multiformes	15
A. Définition.....	15
B. Historique	15
C. Hypothèse de l'origine des glioblastomes	16
D. Épidémiologie.....	17
1. Incidence et facteurs de risques	17
2. Pronostic	19
E. Clinique.....	19
F. Diagnostic	19
1. Imagerie	19
2. Histologie.....	21
G. Traitements actuels	21
1. Prise en charge initiale du glioblastome	21
2. Vers une personnalisation de la thérapeutique	23
3. Prise en charge des récurrences	23

H. Nouvelles thérapies	26
II. HIF-2 α comme cible thérapeutique	27
A. Introduction.....	27
B. Caractéristiques des protéines HIF.....	27
B. Implication de HIF-2 α dans les GBM.....	29
1. HIF-2 α dans les GBM.....	29
2. HIF-2 α et la β III-tubuline.....	29
3. HIF-2 α et les cellules souches gliomales	30
D. HIF-2 α comme cible thérapeutique	31
1. Structure de HIF- α	31
2. Cavité interne dans les domaines PAS-B de HIF-1 α et de HIF-2 α	33
3. Inhibition allostérique de HIF-2 α	34
III. Exemple d'application de la modélisation moléculaire dans la recherche d'inhibiteurs de HIF-2 α	38
A. Introduction.....	38
B. Généralités sur les méthodes de criblage.....	39
1. Conception de médicaments fondée sur la structure de la cible	40
2. Conception de médicaments fondée sur la structure des ligands	41
a. Approche pharmacophorique.....	41
b. Approche par similarité chimique	42
C. Matériels et méthodes	42

1. Docking	42
a. Structures cristallographiques.....	42
b. Préparation des protéines.....	43
c. Préparation des ligands	44
d. Préparation de la chimiothèque	45
e. Docking des ligands et de la chimiothèque	45
f. Classification.....	46
g. Propriétés ADME	47
2. Pharmacophore	49
C. Résultats et discussion	49
1. Description des interactions au sein des complexes	49
2. Docking	50
a. Mise au point du docking	50
b. Criblage de la chimiothèque par docking	57
c. Docking dans le domaine PAS-B de HIF-1 α	59
d. Propriétés et descripteurs ADME.....	62
3. Pharmacophore	64
D. Conclusion et perspectives.....	71
Bibliographie.....	74
ANNEXES	81

Table des figures

Figure 1 : Théorie de l'origine cellulaire des GBM.	16
Figure 2 : Représentation schématique de la théorie des CSC dans les Gliomes....	17
Figure 3 : Taux d'incidences selon le genre et les groupes d'âges (rapport statistique CBTRUS).....	18
Figure 4 : IRM d'un glioblastome	20
Figure 5 : Coupe histologique du GBM	21
Figure 6 : Schéma thérapeutique de la prise en charge initiale du GBM.....	22
Figure 7 : Devenir de HIF- α en normoxie et en hypoxie.	28
Figure 8 : Structure en domaines de HIF-1 α , HIF-2 α et ARNT.....	32
Figure 9 : Le domaine PAS-B de HIF-2 α en complexe avec le domaine PAS-B d'ARNT.....	33
Figure 10 : Cavités internes des domaines PAS B de HIF-1 α et HIF-2 α	34
Figure 11 : Composés chimiques cocrystallisés dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α	35
Figure 12 : Structure des composés 4 et 5 dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α	36
Figure 13 : Sélectivité de liaison, de la perturbation de l'hétérodimérisation et de l'activité du composé 5 (JN-128-022) vis-à-vis de HIF-2 α	37
Figure 14 : Les différentes formes du noyau imidazole de l'histidine.....	44
Figure 15 : Interactions entre le ligand JN-128-022 et la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α	50
Figure 16 : Ligands cocrystallisés dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α	51
Figure 17 : Répartition des cent molécules sélectionnées sur les 20 clusters	58

Figure 18 : Poses de docking de trois composés issus de la liste des 100 molécules ayant les meilleurs scores de fit.....	58
Figure 19 : Superposition du domaine PAS-B de HIF-1 α (4H6J) et celui de HIF-2 α avec son ligand JN-128-022 (4GHI)	61
Figure 20 : Volume d'exclusion de la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α avec le ligand JN-128-022 (4GHI).....	65
Figure 21 : Structure générale des composés de l'étude RSA.	66
Figure 22 : Les composés les plus actifs de l'étude de RSA	67
Figure 23 : A : Interaction nitrate/triazine B : Interaction nitro/imidazole	68
Figure 24 : Pharmacophore manuel	69

Table des tableaux

Tableau 1 : Médicaments principaux utilisés dans le traitement des GBM	25
Tableau 2 : Protéines utilisées et leur code PDB.....	43
Tableau 3 : Description des propriétés et descripteurs ADME et leurs valeurs recommandées.....	48
Tableau 4 : Résultats du docking des ligands avec l'apoprotéine	53
Tableau 5 : Résultats du docking des ligands avec la structure cristallographique du domaine PAS-B cocrystallisé avec le ligand JN-128-022.	55
Tableau 6 : Résultats du docking dans le domaine PAS-B de HIF-2 α rigide ou flexible	56
Tableau 7 : Résultats du docking dans le domaine PAS-B de HIF-1 α rigide ou flexible	59
Tableau 8 : Résultats du docking de 4GHI et du docking de 4H6J flexible.....	62

Tableau 9 : Propriétés et descripteurs ADME pour les 20 molécules sélectionnées pour des essais in-vitro.....	64
Tableau 10 : Matrices des distances (en Å) pour le pharmacophore manuel.....	70
Tableau 11 : Propriétés et descripteurs ADME de sr1758 et sr6130.....	71

Table des annexes

Annexe 1 : Interactions entre le ligand THS020 et la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α	81
Annexe 2 : Structures des composés sélectionnés par docking.....	82
Annexe 3 : Structure des composés sélectionnés par criblage du pharmacophore .	83

INTRODUCTION

Les glioblastomes multiformes (GBM) sont des tumeurs cérébrales malignes qui dérivent des cellules gliales du cerveau (cellules de soutien aux neurones). Ces tumeurs figurent parmi les tumeurs les plus agressives du système nerveux central. Leur incidence est de 3/100000 habitants et peuvent toucher toutes les tranches d'âge avec un pic d'incidence dans la tranche des 45-70 ans. Les glioblastomes se développent très rapidement (3 mois en moyenne) et malgré des traitements pouvant associer chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, la moyenne de survie reste faible (15 mois) ¹. Ce constat soulève la question de la nécessité de trouver de nouvelles alternatives thérapeutiques afin d'améliorer la survie des patients atteints de GBM.

Les GBM sont des tumeurs très hypoxiques (taux d'oxygène faibles dans la tumeur). L'hypoxie est une caractéristique importante impliquée dans la progression de nombreuses tumeurs solides et un facteur de mauvais pronostic quel que soit le schéma de traitement proposé ²⁻⁴. Les principaux régulateurs de l'hypoxie sont les protéines HIF (Hypoxia-inducible-factor).

La voie des facteurs de transcription HIF est une voie importante de signalisation impliquée dans l'équilibre de l'oxygène. Cette voie est activée lorsque les taux d'oxygène diminuent (hypoxie). Les protéines HIF sont également impliquées dans de nombreuses pathologies tumorales et sont souvent des facteurs de mauvais pronostics ^{4,5}. Une des isoformes, HIF-2 α , est particulièrement impliquée dans l'agressivité des tumeurs ⁴ en favorisant notamment la dédifférenciation cellulaire (formation de cellules souches tumorales) ⁶.

L'objectif de cette thèse est de vous présenter un exemple de recherche d'inhibiteurs de HIF-2 α par modélisation moléculaire afin de traiter les glioblastomes multiformes.

Pour cela, nous allons d'abord présenter les caractéristiques des GBM afin de démontrer la nécessité de développer de nouvelles thérapies dans le traitement des GBM. Puis nous allons décrire quelques caractéristiques des protéines HIF et montrer l'implication d'une des isoformes (HIF-2 α) dans les glioblastomes afin de comprendre l'intérêt de l'utiliser comme cible thérapeutique. Nous allons aussi nous intéresser à ses caractéristiques structurales, en particulier à l'existence d'un site allostérique au sein du domaine PAS-B de HIF-2 α , domaine d'hétérodimérisation, capable de lier des petites molécules qui perturbent son activité. Enfin nous allons présenter les résultats obtenus au sein de l'équipe CERVoxy (Nathalie Colloc'h, unité ISTCT, UMR 6301, Caen) en collaboration avec le CERMN (Jana Sopkova de Oliveira Santos) pour apporter quelques éléments de réponse à notre problématique.

I. Le défi des Glioblastomes multiformes

A. Définition

Les Glioblastomes multiformes (GBM) sont des tumeurs cérébrales malignes de grade IV qui dérivent des cellules gliales du cerveau (cellules de soutien des neurones). Les glioblastomes sont les plus agressifs des tumeurs gliales malignes et représentent 82% des cas de celles-ci⁷.

Les glioblastomes sont très invasifs. Ils infiltrent le parenchyme cérébral situé aux alentours de la tumeur mais restent confinés dans le système nerveux central et ne font jamais de métastases⁷. Histologiquement, ils sont caractérisés par une forte activité mitotique, prolifération vasculaire et nécrose. Les cellules des GBM ont des tailles et formes très variées d'où le nom glioblastome *multiforme* de ces tumeurs⁷.

B. Historique

Le GBM a pour la première fois été décrit par le Dr. Rudolf Virchow en 1863 comme étant une tumeur dont l'origine est la cellule gliale. Dans les années 1920, le Dr. Walter Dandy retire l'hémisphère entier de deux patients comateux atteints de GBM. Mais malgré cette intervention, les deux patients décèdent de leur maladie apportant ainsi la première preuve du caractère invasif des GBM⁸. En 1926 les docteurs Percival Bailey et Harvey Cushing sont les premiers à donner le nom de glioblastome multiforme à cette maladie. Dans leurs études ils ont observé qu'après résection partielle de tumeurs gliales les patients vivaient plus longtemps. Ils ont ainsi pu récolter un grand nombre de tumeurs gliales et de différencier plus de 13 types de tumeurs gliales. Ils ont aussi observés des pronostics divers associés aux différents types de gliomes⁸. Depuis, d'autres multiples études cliniques, moléculaires et génétiques ont permis de mieux caractériser et comprendre les GBM.

C. Hypothèse de l'origine des glioblastomes

La question de l'origine des GBM s'est maintes fois posée. On pense actuellement que ce sont les cellules souches cancéreuses (CSC) qui permettraient la genèse et aussi le maintien de la pathologie ⁹. Les CSC sont des cellules cancéreuses capables de se renouveler et de se différencier en diverses lignées cellulaires. Leur capacité à se différencier contribue à l'hétérogénéité et la complexité des tumeurs ⁹. Dans le cas des GBM elles sont nommées cellules souches gliomales (GSC). Ces GSC peuvent se former suite à des mutations oncogéniques de cellules souches neuronales, de progéniteurs de cellules gliales ou de cellules gliales (Figure 1) ¹⁰.

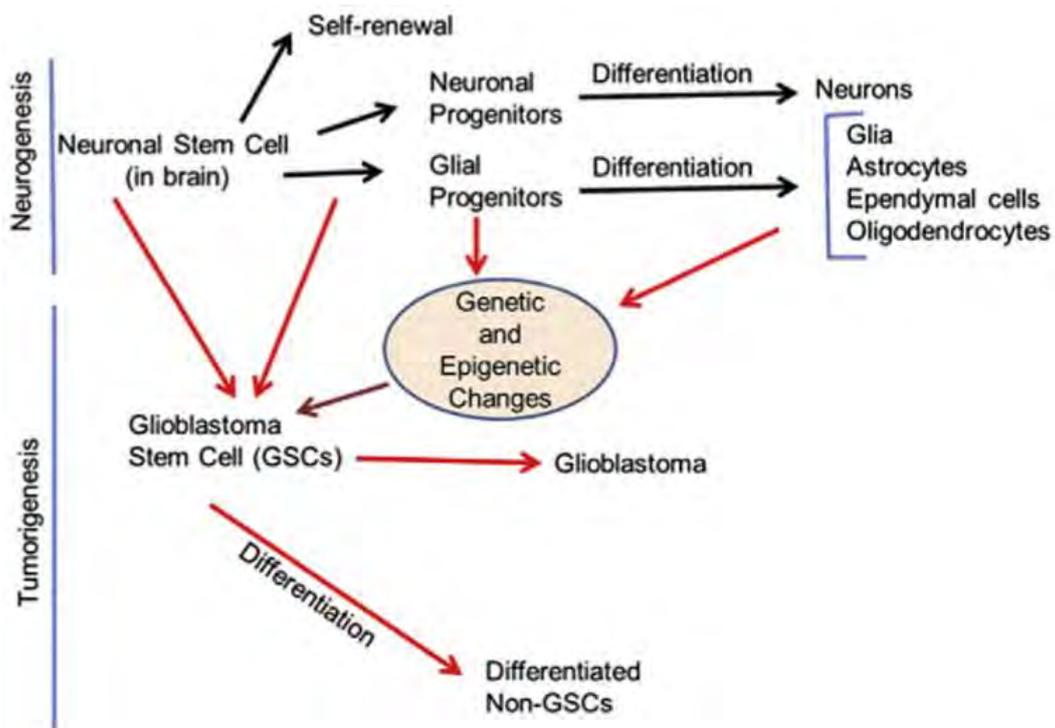


Figure 1 ¹⁰ : **Théorie de l'origine cellulaire des GBM** – Les GBM sont initiés à partir de la transformation des cellules souches neuronales en cellules souches gliales. De même les progéniteurs de cellules gliales et les cellules gliales peuvent elles-mêmes subir une transformation en GSC qui initierait les GBM.

Les CSC ont aussi la caractéristique d'être des cellules quiescentes dont le cycle cellulaire progresse lentement. Cet atout leur permet de survivre aux thérapies

anticancéreuses qui ciblent les cellules qui prolifèrent beaucoup et dont le cycle progresse rapidement ¹¹. De plus ces cellules sont aussi capables de se diviser de manière asymétrique, tout en conservant leur faculté à se renouveler, et peuvent ainsi donner naissance à des cellules filles plus différenciées et dont la prolifération est plus élevée. Cette capacité permet à la tumeur de se développer de nouveau et d'entraîner ainsi la récurrence de la maladie (Figure 2) ⁹. L'étude de Chen *et al.* a permis de mettre en évidence ces phénomènes dans les GBM puisqu'ils ont montré qu'une population de GSC provoque de nouveau la croissance de la tumeur après la chimiothérapie ¹².

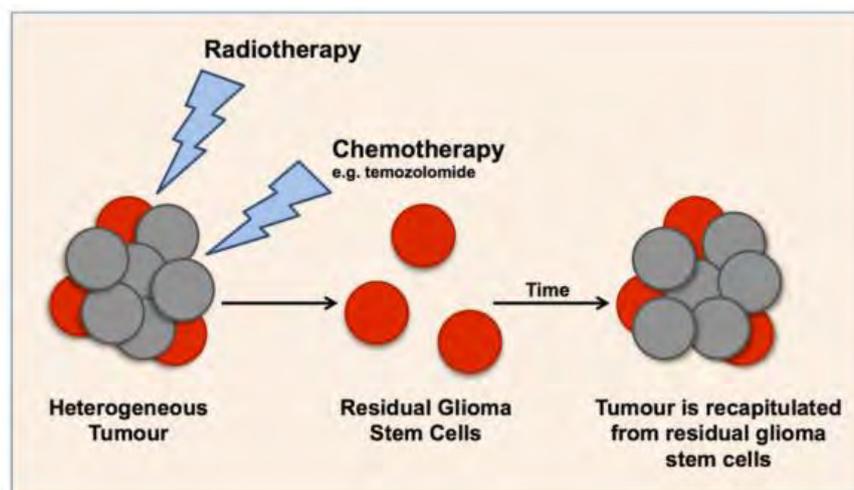


Figure 2 ⁹ : Représentation schématique de la théorie des CSC dans les gliomes

D. Épidémiologie

1. Incidence et facteurs de risques

Le nombre de nouveaux cas de GBM en Europe et aux États-Unis est de l'ordre de 2-3 par 100 000 habitants chaque année ^{1,13}. C'est le taux d'incidence enregistré le plus élevé parmi les tumeurs malignes du système nerveux central (SNC) ¹⁴. Cette pathologie peut toucher toutes les tranches d'âge mais il y a un pic d'incidence dans la tranche des 75-84 ans (Figure 3) ¹⁴. Celle-ci par contre n'est pas très commune

chez les enfants. En effet elle ne représente que 3% des tumeurs du cerveau et du SNC infantiles ¹⁴. On observe aussi une différence d'incidence selon le genre. Le taux d'incidence chez les hommes est 1,6 fois plus élevé que celui des femmes (Figure 3) ¹⁴.

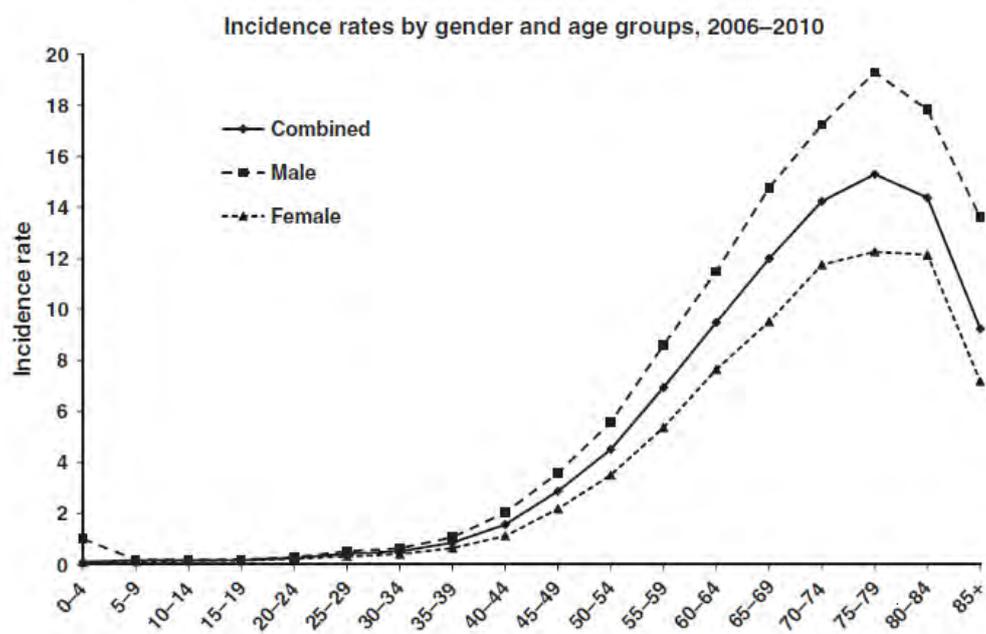


Figure 3 ¹⁴ : Taux d'incidence selon le genre et les groupes d'âges (rapport statistique CBTRUS).

Il y a eu beaucoup d'études sur les potentiels facteurs de risques potentiels des GBM sans beaucoup de résultats concluants. L'exposition aux fortes radiations ionisantes est actuellement le seul facteur de risque reconnu ¹³. Le cerveau étant l'organe de la tête qui absorbe le plus les champs de fréquence radio, de nombreuses études se sont penchées sur le lien entre les gliomes et l'utilisation fréquente des téléphones portables ¹³. Mais, la plupart des études, telles INTERPHONE menée par l'agence internationale de la recherche sur le cancer (IARC) ¹⁵ ou MOBI-KIDS ¹⁶ n'ont trouvé aucun lien.

En ce qui concerne les facteurs de protection, des études épidémiologiques ont montré que les allergies et les maladies atopiques permettent de réduire le risque de gliomes ¹³. Les raisons de ce lien ne sont actuellement pas clairement définies.

2. Pronostic

Les GBM sont des tumeurs qui se développent très rapidement (3 mois en moyenne) et malgré des traitements pouvant associer chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, la moyenne de survie reste faible (environ 15 mois). Le pronostic de cette pathologie est mauvais et seuls quelques patients survivent à long terme. En effet, le taux de survie aux Etats-Unis, d'après l'étude *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER), est de 35% à 1 an et de seulement 4,7% à 5 ans ¹⁴. L'étude EURO CARE en Europe a montré un taux de survie de 37% à 1 an et de 6,3% à 5 ans ¹⁷.

E. Clinique

Le tableau clinique des GBM dépend de la localisation de la tumeur et de l'augmentation progressive de la pression intracrânienne due à l'agrandissement de la tumeur. Les signes cliniques sont très variés et peuvent comprendre des céphalées, l'ataxie, des vertiges, des troubles visuels, des syncopes fréquentes, des convulsions, des pertes de mémoire et des changements de personnalité ^{1,18}. Ces symptômes très peu spécifiques des GBM conduisent souvent à des erreurs de diagnostic telles que des infections ou des pathologies vasculaires et immunologiques ¹.

F. Diagnostic

1. Imagerie

Lors de la suspicion de gliome, la technique d'imagerie de choix pour le confirmer est l'IRM ¹⁹. L'IRM réalisée avec différentes séquences T1, T2 et FLAIR et avec ou sans

prise de produit de contraste et va permettre de localiser la tumeur, de définir ses caractéristiques et de diagnostiquer ses éventuelles complications (hémorragies). Les GBM apparaissent en séquence T1, après injection de produit de contraste (gadolinium), comme une lésion avec une zone périphérique en hypersignal (prise de contraste) qui représente la rupture de la barrière hémato-encéphalique et une zone centrale en hyposignal qui représente la partie nécrotique de la tumeur (cela reflète une des caractéristiques principales des GBM qui est l'hypoxie). On peut voir aussi un hyposignal T1 ou un hypersignal T2 ou FLAIR qui correspond à un œdème autour de la lésion et une infiltration de cellules tumorales dans le parenchyme cérébral (Figure 4) ^{19,20}.

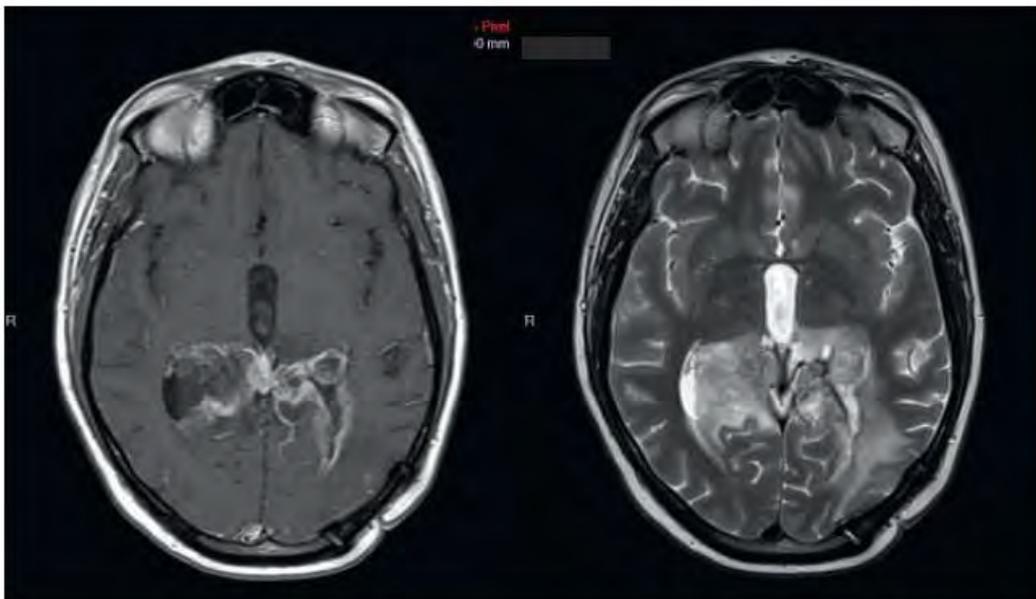


Figure 4 ¹⁹ : **IRM d'un glioblastome** - Patient de 40 ans avec une perte de vision comme symptôme inaugural. A gauche: T1 avec accumulation de produit de contraste et nécrose centrale. A droite: T2 avec œdème périlésionnel modéré.

L'imagerie IRM permet aussi de suivre l'évolution de la maladie après le traitement et aussi lors de récurrences. Néanmoins, l'imagerie à elle seule ne permet pas de donner un diagnostic définitif d'un GBM, il faut aussi le confirmer par un examen histologique

2. Histologie

L'histologie permet de classer et de déterminer le stade de la tumeur. Les gliomes sont classés en 4 grades, le grade IV correspondant au GBM. Elle permet aussi de déterminer les caractéristiques moléculaires de la tumeur ¹⁹. Celui-ci est réalisé soit par biopsie si la tumeur n'est pas opérable soit lors de la résection de la tumeur ¹⁹.

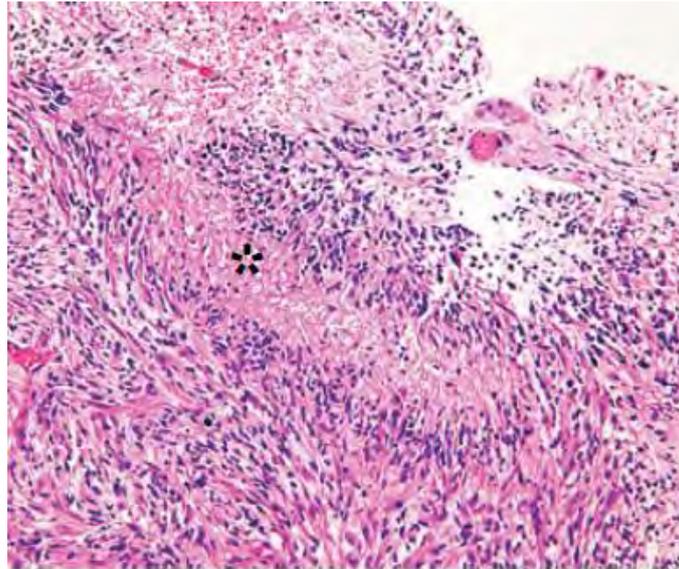


Figure 5 ¹⁸ : **Coupe histologique de GBM** – Le GBM est caractérisé par un pléomorphisme nucléaire, par une cellularité dense et une nécrose pseudo-palissadique (étoile).

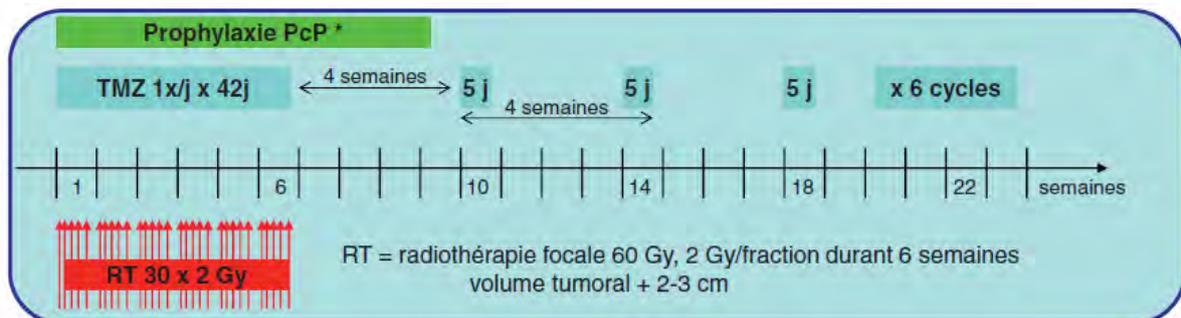
G. Traitements actuels

1. Prise en charge initiale du glioblastome

La chimiothérapie adjuvante d'un GBM est instaurée suite à la résection de la tumeur si celle-ci est opérable ou sinon suite à la biopsie diagnostique. Pendant longtemps, la radiothérapie était la seule thérapie adjuvante des patients atteints de GBM ⁹. Dans les années 1980, l'utilisation des nitroso-urée en association à la radiothérapie a permis d'apporter un bénéfice significatif dans la survie des patients ²¹. Dans les années 2000, le témozolomide (Temodal®, TMZ), dont la tolérance est meilleure, est commercialisé et prend la place des nitroso-urées dans le traitement de première

ligne des GBM. L'étude de Stupp *et al.*²² a montré que l'ajout de TMZ de façon concomitante et adjuvante (Figure 6) à la radiothérapie permet d'améliorer la survie de 12,1 mois à 14,6 mois. De plus, la proportion de survivants à 2 ans est passée de 10,9% à 27,2% et celle de survivants à 5 ans de 1,9% à 9,8%²³. C'est ce schéma thérapeutique qui est actuellement appliqué dans la prise en charge initiale des GBM (protocole de Stupp).

Lors de la résection chirurgicale de la tumeur, des implants de carmustine (Gliadel®, polymère biodégradable contenant 3,85% de carmustine) peuvent être placés dans la cavité de résection. Cette thérapeutique a montré une certaine efficacité dans le traitement des GBM nouvellement diagnostiqués²⁴ mais il est nécessaire de confirmer cette efficacité par d'autres études cliniques.



TMZ = témozolomide (Temodal®)¹
 concomitant: pendant la RT: 75 mg/m² par jour (y c. les week-ends), max. 49 jours, à jeun (boissons et snacks légers autorisés), p.o. 1-2 heures avant la RT ou l'après-midi des jours sans RT
 adjuvant: 200 mg/m² (premier cycle 150 mg/m²) par jour pendant 5 jours sur 6 cycles

* Prophylaxie de la pneumonie à *Pneumocystis jiroveci* recommandée pendant le traitement concomitant quotidien en continu de TMZ. Inhalations de pentamidine 1x/mois 300 mg ou triméthoprime/sulfaméthoxazole forte 3x/semaine. Alternative: surveillance de la numération absolue des lymphocytes avec instauration de la prophylaxie en cas de chutes des lymphocytes à <500/mm³ ou des CD4 <200/mm³.

¹ Prévention antiémétique: pendant la radiochimiothérapie avec TMZ à faibles doses, il suffit le plus souvent de donner un antiémétique simple, par ex. le métoclopramide ou le lopéramide (un inhibiteur du 5HT3 est recommandé pour les 2 premiers jours, par ex. ondansétron 4 mg, granisétron 1 mg)

Figure 6¹⁹ : Schéma thérapeutique de la prise en charge initiale d'un GBM

2. Vers une personnalisation de la thérapeutique

Le témozolomide est une prodrogue lipophile capable de passer la barrière hémato-encéphalique. Son métabolite, le MTIC (3-méthyl-(triazén-1-yl)imidazole-4-carboxamide), a des propriétés alkylantes et dépose des groupes méthyles sur les bases guanine de l'ADN. Il cause ainsi des dommages dans l'ADN qui vont entraîner l'arrêt du cycle de la cellule et son apoptose⁹. La MGMT (O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase) est une enzyme de réparation de l'ADN qui retire des groupes alkyles de la position O6 de la guanine. Elle permet donc de contrer l'effet des agents alkylants tel que le témozolomide et ainsi réduire leur effet délétères. Or l'expression de cette enzyme peut être soumise à un mécanisme épigénétique qui conduit à la méthylation du promoteur du gène codant pour la MGMT et entraîne ainsi une perte de l'expression de celle-ci et de son effet réparateur de l'ADN²⁵. L'état de méthylation de la MGMT pourrait donc être un marqueur de prédiction de l'efficacité de la chimiothérapie avec des agents alkylants. L'étude de Hegi *et al.*²⁵ a permis de valider cette hypothèse dans les GBM puisque les seuls patients qui ont eu un effet bénéfique du traitement de TMZ sont ceux dont le promoteur de la MGMT était méthylé. Les patients dont le promoteur n'est pas méthylé n'ont actuellement aucune alternative de traitement et ont donc de la même thérapeutique que les autres. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de traiter ce groupe de patients²⁶.

3. Prise en charge des récurrences

Malgré les progrès dans le traitement des GBM, tôt ou tard les patients développent des récurrences. Actuellement il n'existe aucun consensus sur le traitement de ceux-ci et les stratégies varient beaucoup. Certains patients bénéficient d'une deuxième chirurgie et d'une deuxième radiothérapie mais pour la majorité des patients le

traitement de choix des récurrences reste la chimiothérapie ²⁷. Le témozolomide ou la lomustine (nitroso-urée) associée à la procarbazine et la vincristine (schéma PCV) peuvent être envisagés en seconde ligne. Aucune des deux thérapeutiques n'est supérieure à l'autre (moyenne de survie d'environ 7 mois) si ce n'est que le témozolomide est mieux toléré ²⁸. D'autres molécules telles que la carmustine, les dérivés du platine ou l'irinotécan sont aussi utilisées ²⁷.

Une des caractéristiques des GBM récidivants est l'expression élevée du VEGF (vascular endothelial growth factor) qui promeut l'angiogenèse et la croissance de la tumeur. Le bévaccizumab (anticorps du VEGF) peut donc être envisagé pour le traitement des GBM récidivants. Deux études cliniques ont montré que la survie moyenne des patients traités par bévaccizumab associé à l'irinotécan est d'environ 7 à 9 mois ^{29,30}. Ce résultat est proche de celui obtenu pour le traitement au témozolomide ou au PCV. Néanmoins, le bévaccizumab dans les cas d'œdème pérítumoral, permet d'améliorer le confort des patients grâce à son activité proche de celles des corticostéroïdes (ils permettent de réduire l'œdème) ^{19,27}.

Témozolomide (Temodal®)	<p>Cytostatique alkylant oral, disponible à des doses de 5, 20, 100, 140, 180 et 250 mg.</p> <hr/> <p>Principaux effets indésirables: myélosuppression, en particulier thrombocytopénie et nausées.</p> <hr/> <p>Deux dosages standards: sous forme de monothérapie 150–200 mg/m² de surface corporelle par jour pendant 5 jours tous les 28 jours; en combinaison avec la radiothérapie 75 mg/m² de surface corporelle par jour pendant toute la durée de la radiothérapie (max. 49 jours).</p> <hr/> <p>Pour la prévention antiémétique, on recommande un inhibiteur du 5-HT-3 à faible dose, par ex. ondansétron (Zofran®) 4 mg ou granisétron (Kytril®) 1 mg. Dans le traitement de témozolomide faiblement dosé au cours de la radiothérapie, on peut habituellement remplacer au bout de 2–3 jours l’inhibiteur du 5-HT-3 par du métoclopramide (Primperan®, Paspertin®). Attention aux céphalées et à la constipation en tant qu’effets indésirables de l’inhibiteur du 5-HT-3.</p> <hr/> <p>La myélosuppression n’apparaît qu’à partir de la 3^e–4^e semaine de traitement, contrôles de la formule sanguine aux jours 21 et 28. L’administration en continu est aussi associée à une lymphopénie et un risque d’infections à germes opportunistes.</p>
Lomustine (CEENU®)	<p>Cytostatique oral, capsules à 40 mg. La dose individuelle sera arrondie vers le haut ou le bas en conséquence.</p> <hr/> <p>Principaux effets indésirables: myélosuppression, nausées, fibrose pulmonaire.</p> <hr/> <p>Doses standards 110–130 mg/m² de surface corporelle (pour la plupart des patients, la dose initiale recommandée est de 1 × 4 capsules (160 mg total), à augmenter si la tolérance le permet à 200 mg, toutes les 6–8 semaines.</p> <hr/> <p>Prophylaxie antiémétique avec un inhibiteur du 5-HT-3.</p>
Bévacizumab (Avastin®)	<p>Anticorps monoclonal à administrer par voie IV en 60–90 minutes.</p> <hr/> <p>Principaux effets indésirables: réactions allergiques, hypertension, protéinurie.</p> <hr/> <p>Dose standard 10 mg/kg de poids corporel toutes les 2 semaines, certains donnent cependant des doses plus faibles (par ex. 5 mg/kg de poids corporel) et avec des intervalles thérapeutiques plus longs (jusqu’à 4 semaines). Souvent aussi en combinaison avec une substance cytotoxique.</p> <hr/> <p>Pas de prémédication requise en cas de monothérapie.</p>

Tableau 1¹⁹ : Principaux médicaments utilisés dans le traitement des GBM – Quelques remarques

H. Nouvelles thérapies

Les traitements actuels ont permis d'améliorer la survie des patients atteints de GBM mais la moyenne de survie reste encore globalement faible (environ 15 mois) avec seulement 10% des patients qui survivent plus de 5 ans. Ce constat soulève la question de la nécessité de trouver de nouvelles alternatives thérapeutiques afin d'améliorer la survie des patients atteints de GBM.

Actuellement la recherche sur la thérapeutique des GBM s'est tournée essentiellement sur la thérapie ciblée ³¹. De nombreuses études ont été réalisées portant sur différentes molécules dirigées contre diverses cibles jouant des rôles importants dans la prolifération, la survie ou l'infiltration des GBM ³¹. Jusqu'à présent, les thérapies ciblées testées en clinique se sont avérées inefficaces pour le traitement des GBM. Cela peut s'expliquer par le manque actuel de compréhension des différents mécanismes cellulaire et moléculaire qui régissent les GBM.

La recherche actuelle s'est aussi beaucoup focalisée sur les GSC (cellules souches gliomales) ^{9,31}. Celles-ci sont non seulement impliquées dans la récurrence des GBM mais jouent aussi un rôle dans la résistance aux thérapies actuelles ⁹. Une des caractéristiques principale des GBM est l'hypoxie et celle-ci est, par le biais de la protéine HIF-2 α , impliquée dans la formation des GSC ⁶. HIF-2 α pourrait donc être une cible potentielle dans le traitement des GBM.

II. HIF-2 α comme cible thérapeutique

A. Introduction

Les GBM sont des tumeurs très hypoxiques (taux d'oxygène faibles dans la tumeur). L'hypoxie est une caractéristique impliquée dans la progression de nombreuses tumeurs solides et un facteur de mauvais pronostic quel que soit le schéma de traitement proposé²⁻⁴. Les principaux régulateurs de l'hypoxie sont les protéines HIF (Hypoxia-inducible-factor).

La voie des facteurs de transcription HIF est une voie importante de signalisation impliquée dans l'équilibre de l'oxygène. Cette voie est activée lorsque les taux d'oxygène diminuent (hypoxie). Les protéines HIF sont également impliquées dans de nombreuses pathologies tumorales et sont souvent des facteurs de mauvais pronostics^{4,5}.

B. Caractéristiques des protéines HIF

La protéine HIF est un hétérodimère constitué d'une sous-unité HIF- α et d'une sous-unité ARNT³². ARNT (aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator), aussi appelée HIF- β est présente de manière constitutive, par contre HIF- α est dépendante des concentrations d'oxygène. En conditions normales d'oxygène, HIF- α est hydroxylée d'une part au niveau de deux prolines du domaine ODD (oxygen dependant degradation domain) par des prolyl-hydroxylases (PHDs) et d'autre part au niveau d'une asparagine du domaine CTAD (domaine C-terminal de transactivation) par une asparagine hydroxylase appelé « Factor Inhibiting HIF » (FIH-1). L'action des PHDs aura pour conséquence la dégradation de HIF- α par le protéasome et FIH empêche le recrutement du co-activateur p300 inactivant ainsi la sous-unité HIF- α . L'activité de

ces deux enzymes dépend de l'oxygène et donc, dans des conditions d'hypoxie (taux d'oxygène plus faible), elles sont inactives ce qui permet la stabilisation de HIF- α (Figure 7) ³³. Celle-ci va donc se lier à ARNT pour former un hétérodimère qui induira ensuite l'expression d'une centaine de gènes ³⁴.

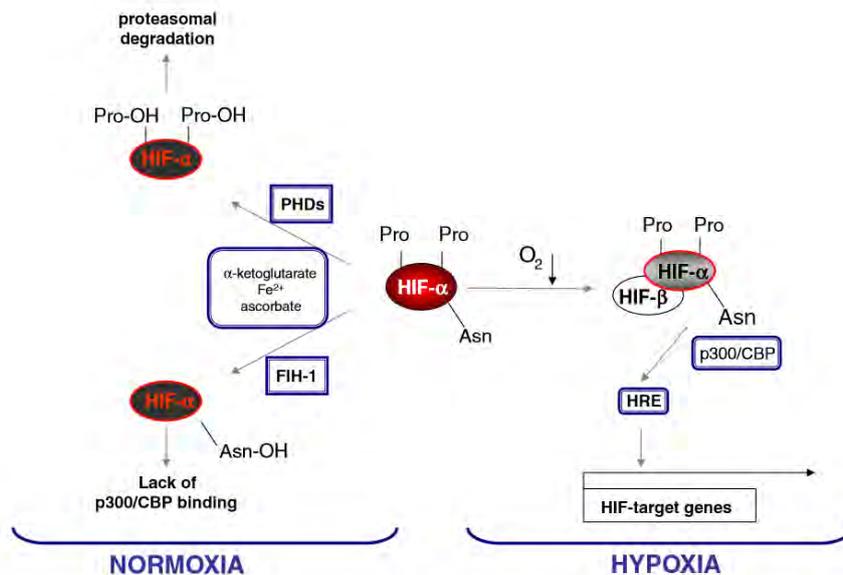


Figure 7 ³⁵ : **Devenir de HIF- α en normoxie et en hypoxie** - Lorsque l'oxygène est dans des taux normaux on est en normoxie tandis que lorsque le taux d'oxygène est faible on est en hypoxie.

Il existe trois isoformes de HIF- α . Les plus étudiées sont HIF-1 α et HIF-2 α . Les deux isoformes ont une forte similarité de séquence et sont impliquées dans de nombreuses fonctions communes. Néanmoins HIF-1 α et HIF-2 α ont également des activités très spécifiques et des gènes cibles spécifiques ³⁵. De plus HIF-1 α est plutôt impliquée dans la phase aiguë de l'hypoxie tandis que HIF-2 α est plutôt impliquée dans la phase chronique ³⁶. Plusieurs études ont montré que HIF-1 α et HIF-2 α sont surexprimées dans un certain nombre de tumeurs et que leur expression est liée à

un mauvais pronostic. HIF-2 α est associé, plus que HIF-1 α , à un phénotype tumoral agressif⁴.

C'est pour cela que nous allons nous intéresser à HIF-2 α par la suite et décrire le rôle qu'il joue dans les glioblastomes, son implication dans l'agressivité et la résistance aux thérapies afin de comprendre l'intérêt et l'importance de l'inhiber.

B. Implication de HIF-2 α dans les GBM

1. HIF-2 α dans les GBM

Diverses études ont montré l'implication de HIF-2 α dans l'agressivité de tumeurs comme le carcinome rénal à cellules claires, le cancer du poumon, les neuroblastomes⁴, le cancer de l'ovaire³⁷ et les gliomes^{38,39}. Dans les glioblastomes, la présence de HIF-2 α est également associée à une tumeur plus agressive et à une survie plus faible des patients³⁸⁻⁴⁰.

2. HIF-2 α et la β III-tubuline

Parmi les sous-unités β des microtubules, la β -tubuline de classe III (β III-t) est une isoforme de la sous-unité β des microtubules retrouvée majoritairement au niveau des neurones. Dans certaines tumeurs, dont les gliomes, celle-ci est exprimée de façon aberrante et est liée à des tumeurs malignes et plus agressives⁴¹ et à des phénomènes de chimiorésistance⁴². Histologiquement, la β III-t est exprimée de façon plus importante au niveau de cellules de glioblastomes situés dans des zones où la disponibilité de l'oxygène est faible montrant ainsi un lien entre l'expression de la β III-t et l'hypoxie^{37,41}. L'équipe CERVOxy de l'unité ISTCT a montré que HIF-2 α , mais pas HIF-1 α , est impliquée dans l'expression en condition hypoxique de la β III-t

dans les GBM ⁴³. Inhiber sélectivement HIF-2 α pourrait donc être d'un grand intérêt pour le traitement des GBM.

3. HIF-2 α et les cellules souches gliomales

Chez les patients atteints de GBM, la présence d'une sous-population de cellules souches gliomales (GSC) a récemment été identifiée comme responsable des phénomènes de résistance et du mauvais pronostic. En effet, la plupart des cellules de GBM sont éliminées par la thérapie antitumorale mais les GSC y échappent et permettent par la suite de reformer une nouvelle tumeur. C'est seulement lorsque ces GSC sont spécifiquement ciblés que la récurrence de la tumeur cesse ¹². Ces GSC sont donc des cibles thérapeutiques potentielles très intéressantes et les inhiber sélectivement permettrait de lutter contre la chimiorésistance des GBM.

Récemment l'hypoxie a été identifiée comme étant à l'origine d'une dédifférenciation de cellules de GBM en GSC ⁶. Dans ce contexte, HIF-2 α a été identifié comme étant le facteur principal capable de reprogrammer les cellules tumorales du GBM vers un phénotype de GSC ^{38,44}. D'autres études sur différents types de tumeurs confirment le rôle de HIF-2 α dans la formation des cellules souches cancéreuses ⁴⁵. Une thérapie anti-HIF-2 α pourrait donc permettre de cibler spécifiquement ces GSC et donc réduire la récurrence des tumeurs suite à la chimiothérapie des GBM.

L'ensemble de ces résultats indique que HIF-2 α serait une cible potentielle dans le traitement des glioblastomes. Son inhibition sélective permettrait de diminuer l'agressivité des glioblastomes et leur résistance aux thérapeutiques actuelles.

D. HIF-2 α comme cible thérapeutique

1. Structure de HIF- α

HIF-1 α et HIF-2 α sont organisées de la même manière. Chacune contient un domaine bHLH de liaison à l'ADN, deux domaines Per-ARNT-Sim (PAS), PAS-A et PAS-B, et deux domaines de transactivation N-TAD et C-TAD nécessaires pour l'expression des gènes cibles des deux isoformes (Figure 8) ³⁶. HIF- α doit se dimériser avec ARNT pour exercer sa fonction de facteur de transcription. Cette hétérodimérisation implique les domaines PAS-A et PAS-B des deux sous-unités. (Figure 8) ⁴⁶. Les domaines PAS sont des domaines très répandus dans la nature et sont retrouvés chez des bactéries, des plantes et des animaux. Ils sont très souvent impliqués dans les interactions protéine/protéine et participent à la signalisation lorsqu'il y a des changements dans l'apport de lumière, d'oxygène et divers autres produits dont la cellule a besoin pour vivre ⁴⁷. Actuellement on ne connaît les structures cristallographiques que de quelques fragments de HIF- α : le domaine PAS B de HIF-1 α ou celui de HIF-2 α en interaction avec ARNT ^{48,49}, un fragment du domaine CTAD de HIF-1 α en complexe avec FIH-1 ⁵⁰ et un fragment d'ODD de HIF-1 α ⁵¹. Très récemment, les structures cristallographiques des domaines bHLH, PAS-A et PAS-B de HIF-1 α ou HIF-2 α avec les mêmes domaines d'ARNT ont été déterminées ⁵², l'étude présentée ici a été effectuée avant notre étude, toutefois ces nouvelles structures ne remettent pas en cause nos travaux, les molécules testées restant inhibitrices.

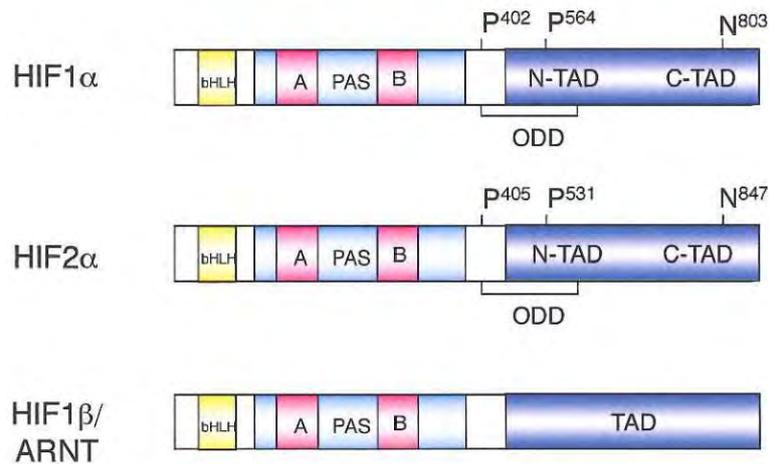


Figure 8 ⁵³: **Structure en domaines de HIF-1 α , HIF-2 α et ARNT** - Les deux domaines PAS-A et PAS-B sont impliqués dans l'hétérodimérisation des sous-unités HIF- α et ARNT.

Les domaines PAS de HIF- α interagissent avec les domaines PAS d'ARNT pour former un hétérodimère. Les structures des complexes du domaine PAS-B de HIF-1 α avec le domaine PAS-B d'ARNT (PDB 4H6J) ⁴⁸ et du domaine PAS-B de HIF-2 α avec le domaine PAS-B d'ARNT (PDB 3F1P) ⁴⁹ révèlent que le complexe interagit par l'intermédiaire des résidus situés sur la face exposée au solvant des feuilletts β . L'interaction recouvre une large surface de 2000 Å² et elle se fait par des liaisons ioniques et des liaisons hydrophobes (Figure 9).

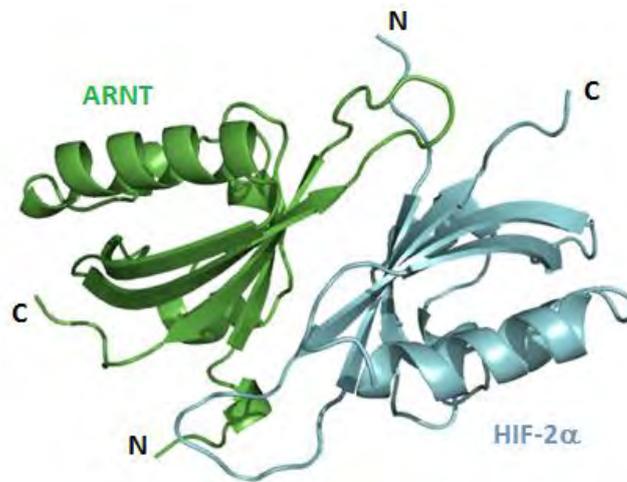


Figure 9 (figure réalisée avec le logiciel Pymol à partir du fichier PDB 3F1P) : Le domaine PAS-B de HIF-2 α en complexe avec le domaine PAS-B d'ARNT.

Des études par mutation avaient également confirmées que le domaine PAS-B de HIF-2 α se liait au domaine PAS-B d'ARNT par l'intermédiaire des résidus exposés au solvant des feuillets β ^{54,55}. Elles avaient aussi montré que des mutations dans cette zone non seulement perturbaient l'hétérodimérisation des sous-unités HIF-2 α et ARNT, mais aussi qu'elles diminuaient l'activité de HIF-2, révélant ainsi l'importance des feuillets β dans l'interaction entre les deux sous-unités.

2. Cavité interne dans les domaines PAS-B de HIF-1 α et de HIF-2 α

L'analyse des structures cristallographiques des domaines PAS-B de HIF-1 α et HIF-2 α a révélé l'existence d'une cavité interne dans chacune des isoformes. Celle-ci est délimitée d'un côté par des feuillets β et de l'autre par des hélices α . Malgré un degré élevé de similarité entre les séquences des domaines PAS-B de HIF-1 α et HIF-2 α , les cavités sont de forme et de taille différente. Seuls deux acides aminés diffèrent entre les deux : l'isoleucine 275 de HIF-1 α devient une alanine dans HIF-2 α et la valine 317 devient une leucine (Figure 10)^{48,49}. L'histidine 291 de HIF-1 α qui borde la cavité a également une position différente dans HIF-2 α . La cavité de HIF-2 α

contient 8 molécules d'eau tandis que celle de HIF-1 α en contient seulement 3. La cavité de HIF-1 α , calculé avec le logiciel CASTp⁵⁶, a un volume d'environ 100 Å³ alors que celle de HIF-2 α est trois fois plus grande, avec un volume d'environ 360 Å³ (Figure 10).

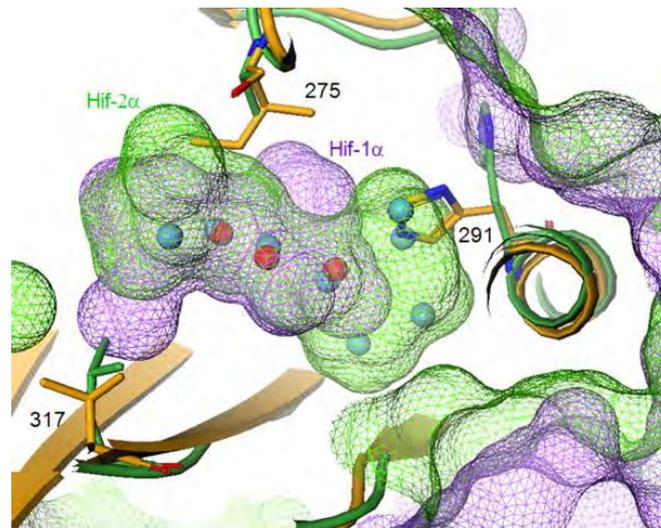


Figure 10⁴⁸ : Cavités internes des domaines PAS-B de HIF-1 α et HIF-2 α - HIF-1 α est représenté en en jaune, sa cavité en violet, HIF-2 α est représenté en vert et sa cavité en vert.

Les différences de forme et de taille de ces deux cavités permettent d'envisager de construire des inhibiteurs sélectifs de l'une ou l'autre des isoformes. Dans notre cas il s'agit surtout d'en trouver un qui inhiberait HIF-2 α sans avoir d'effet sur HIF-1 α .

3. Inhibition allostérique de HIF-2 α

L'étude de Scheueurmann *et al.* a montré que des petites molécules sont capables de se fixer dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α avec des affinités plus ou moins grandes⁴⁹. Un criblage à haut débit suivi par des séries multiples de pharmacomodulations réalisés par cette équipe ont abouti à la découverte de plusieurs composés capables de se lier dans cette cavité et ainsi de perturber la liaison du domaine PAS-B de HIF-2 α au domaine PAS-B d'ARNT (Figure 11)^{49,57-59}.

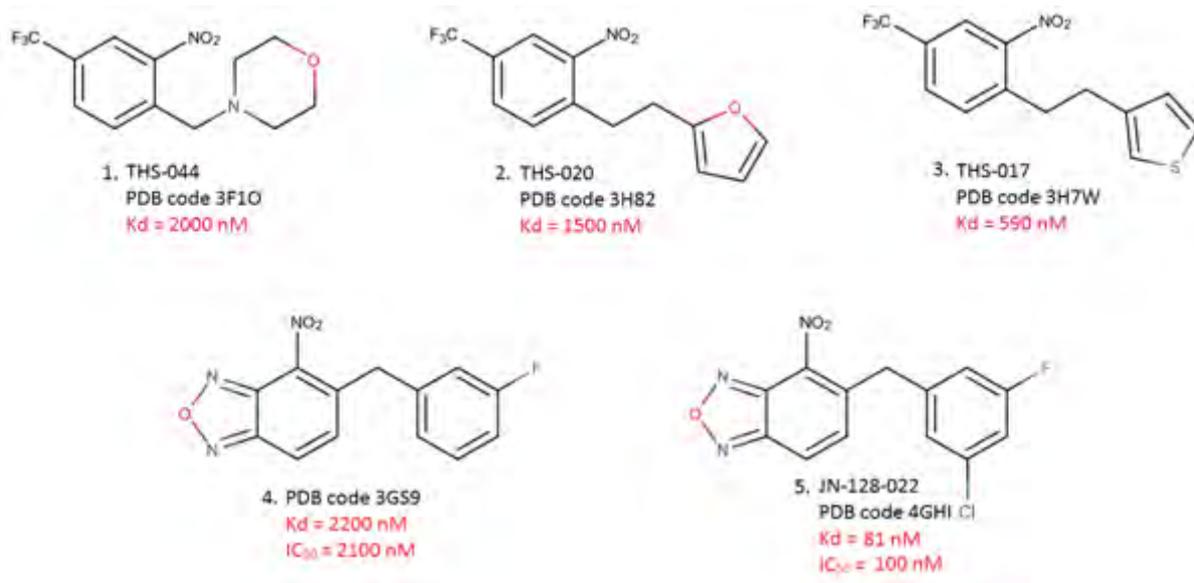


Figure 11 : Composés chimiques cocrystallisés dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α (avec le code PDB des structures).

Les composés 4 et 5 sont structurellement très proches puisqu'ils ne diffèrent que d'un chlore en méta (m-Cl) et pourtant l'activité du composé 4 (IC₅₀=2100 nM) est 21 fois plus faible que celle du composé 5 (IC₅₀=100 nM). Les structures cristallographiques de ces composés dans le domaine PAS-B de HIF-2 α ont permis de révéler que le fluor en position méta (m-F) du composé 4 est positionné vers l'hélice α . Pour le composé 5, le m-Cl est positionné de la même manière que le m-F du composé 4 à proximité de l'hélice α et ainsi le m-F du composé 5 se trouve donc de l'autre côté à proximité des feuilletts β (Figure 12). On a mentionné auparavant que l'interaction entre le domaine PAS-B de HIF-2 α et le domaine PAS-B de ARNT s'effectuait entre les feuilletts β de chacune des sous-unités. Le composé 5, avec son m-F proches des feuilletts β induit un changement de flexibilité du domaine PAS-B de HIF-2 α plus important que le composé 4 ce qui explique la différence d'activité ⁵⁸.

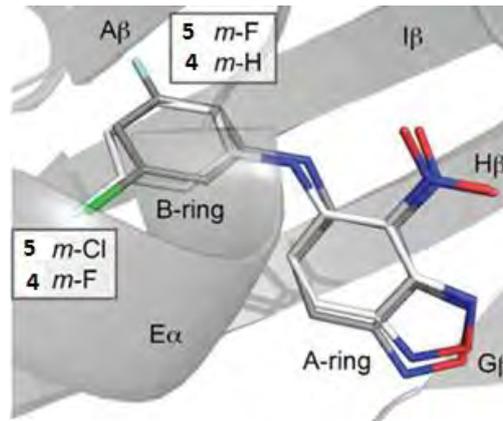


Figure 12 ⁵⁸ : **Position des composés 4 et 5 dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α** - Le m-Cl (en vert) du composé 5 occupe la même place que le m-F du composé 4 (en bleu pâle). Le m-F du composé 5 occupe la même place que celle d'un hydrogène du composé 4. Le m-Cl du composé 5 et le m-F du composé 4 sont à proximité de l'hélice α tandis que le m-F du composé 5 et l'hydrogène du composé 4 sont à proximité du feuillet β .

Pour élucider le mécanisme par lequel agit le composé 5 (JN-128-022), une co-immunoprécipitation a été réalisée en présence de concentrations croissantes de JN-128-022. Les résultats ont montré que le JN-128-022 perturbait l'hétérodimérisation de HIF-2 α à ARNT (Figure 13A) ⁵⁹.

Les tests de liaison par titration calorimétrique isotherme ont montré que le JN-128-022 se lie avec un Kd de 81 nM au domaine PAS-B de HIF-2 α . Sa liaison au HIF-1 α a également été testée de la même manière mais il s'avère que celui-ci ne s'y lie pas (Figure 13B). Ce premier résultat a montré une sélectivité probable du composé envers HIF-2 α qui a ensuite été vérifiée par co-immunoprécipitation et RT-PCR (Figure 13A et 13C) ⁵⁹.

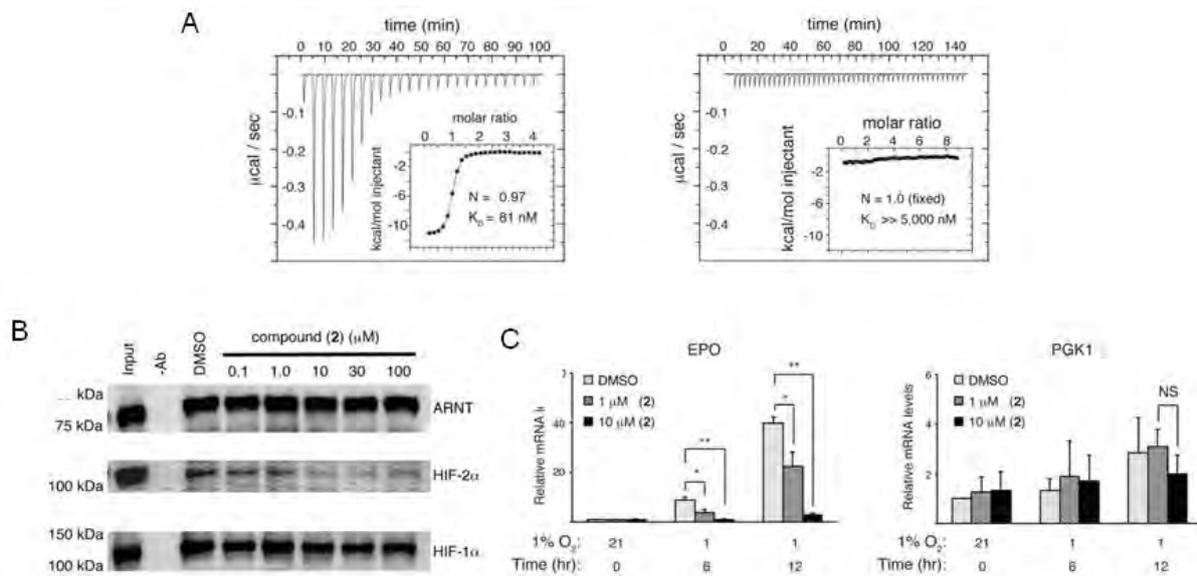


Figure 13⁵⁹ : Sélectivité de liaison, de la perturbation de l'hétérodimérisation et de l'activité du composé 5 (JN-128-022) vis-à-vis de HIF-2 α . (A) Titration calorimétrique isotherme : le JN-128-022 se lie au domaine PAS-B de HIF-2 α avec un Kd de 81 nM (à gauche) par contre il ne se lie pas au domaine PAS-B de HIF-1 α (à droite). (B) Co-immunoprécipitation : des extraits nucléaires de cellules en hypoxie Hep3B qui expriment ARNT, HIF-1 α et HIF-2 α ont été incubés en présence de concentrations croissantes de JN-128-022. L'analyse indique la quantité de HIF-1 α ou HIF-2 α ayant immunoprécipité en présence ou absence d'anticorps anti-ARNT. (C) RT-PCR : l'expression de l'EPO, marqueur de HIF-2 α , et celle de PGK1, marqueur de HIF-1 α , est étudiée dans des cellules Hep3B dans des conditions de normoxie (21% d'O₂) ou d'hypoxie (1% d'O₂) à différents temps.

Ces résultats concernant le composé 5 (JN-128-022) ont permis de proposer que la cavité interne du domaine PAS-B de HIF-2 α serait un site allostérique. En effet, la fixation de petites molécules dans celle-ci perturbe l'hétérodimérisation du complexe HIF-2 et inhibe son activité de facteur de transcription. La cavité de HIF-1 α doit être aussi capable de lier des petites molécules mais jusqu'à présent aucun ligand sélectif capable d'inhiber HIF-1 n'a été publié⁴⁸.

III. Exemple d'application de la modélisation moléculaire dans la recherche d'inhibiteurs de HIF-2 α

A. Introduction

Actuellement on ne connaît aucun ligand endogène des domaines PAS-B de HIF-2 α et HIF-1 α . Par contre, comme précisé à la fin du chapitre, Scheuermann *et al.* ont montré que des petites molécules de synthèse sont capables de se lier dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α avec des affinités plus ou moins grandes⁴⁹. Un criblage à haut débit suivi par des séries de pharmacomodulations ont abouti à plusieurs composés capables de se lier dans cette cavité et ainsi de perturber la liaison du domaine PAS-B de HIF-2 α au domaine PAS-B d'ARNT.^{49,57-59} Ces composés induisent un changement de la flexibilité du domaine, et notamment celle des feuillets β , et perturbent ainsi l'interaction de HIF-2 α avec ARNT. Cette cavité est donc une cavité allostérique puisque la fixation d'un ligand dans celle-ci perturbe l'hétérodimérisation du complexe. Comme cette hétérodimérisation est essentielle à son activité de facteur de transcription, la perturber inhibe donc l'activité de HIF-2.⁵⁹ De plus, ils ont montré que les ligands synthétisés de celle-ci étaient sélectifs *in vitro* vis-à-vis de HIF-2 α puisqu'ils ne se liaient pas à HIF-1 α .⁵⁹ Mais les affinités de ces composés (de 81 nM à 20000 nM) ne sont pas suffisantes pour être utilisées en thérapie.

L'objectif de ce chapitre est donc d'exposer notre démarche et nos résultats dans la recherche de nouvelles molécules par criblage virtuel qui seraient capables de se fixer dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α et dont l'affinité pourrait être plus élevée (après des pharmacomodulations) que celles des molécules déjà identifiés⁵⁹.

Ces molécules devraient être sélectives de HIF-2 α et donc elles devraient se lier avec une faible affinité à la cavité de HIF-1 α . Ces travaux ont été effectués au CERMN (Caen) avec le Pr. Jana Sopkova-de Oliveira Santos et dans l'équipe CERVOxy (Unité ISTCT, UMR 6301, Caen) avec le Dr. Nathalie Colloc'h.

Pour procéder, on a criblé virtuellement la chimiothèque du CERMN contenant 9788 composés en utilisant différentes techniques de modélisation moléculaire comme le docking et le pharmacophore afin de sélectionner les composés susceptibles de se lier spécifiquement à la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α et inhiber spécifiquement HIF-2. On a calculé et prédit ensuite les descripteurs et les propriétés ADME pour évaluer leur biodisponibilité. Les méthodes que nous avons utilisées ont déjà été décrites dans divers autres états et la chimiothèque du CERMN a déjà été criblée virtuellement auparavant^{60,61}.

B. Généralités sur les méthodes de criblage

Il existe plusieurs méthodes de criblage pour trouver un nouveau ligand vis-à-vis d'une cible. Une des méthodes les plus courantes est le criblage à haut débit qui permet de tester expérimentalement la liaison ou l'activité biologique d'un grand nombre de composés chimiques sur une cible. Mais cette technique est coûteuse lorsque le nombre de composés à tester est élevé. Un autre moyen permettant de diminuer le coût est de prédire l'affinité des composés *in silico* par criblage virtuel. Celui-ci est fondé sur des techniques de modélisation moléculaire. Ces techniques sont divisées en deux catégories :

- **La conception de médicaments fondée sur la structure des cibles (Structure-Based Drug Design)** : cette approche (docking) est utilisée lorsque la structure tridimensionnelle de la cible a été déterminée par

diffraction aux rayons X, par RMN ou par modélisation par homologie. Dans notre cas la structure cristallographique du domaine PAS-B de HIF-2 α a été résolue ⁴⁹.

- **La conception de médicaments fondée sur la structure des ligands (Ligand-Based Drug Design)** : cette approche est utilisée lorsqu'on connaît plusieurs des ligands de la cible. Les techniques les plus courantes sont celle du pharmacophore et celle de la similarité chimique.

Les criblages virtuels sont effectués sur des composés issus de diverses bases de données. La base de données qu'on a exploitée pour trouver un inhibiteur de HIF-2 α était la chimiothèque du CERMN. Cette chimiothèque académique est la plus importante en France et contient actuellement 9788 molécules chimiques.

1. Conception de médicaments fondée sur la structure de la cible

Le protocole de docking est la combinaison d'un algorithme qui positionne la molécule dans le site de la cible et d'une fonction de score. L'algorithme de docking va permettre de rechercher des conformations et orientations d'un ligand (« pose ») dans le site d'une protéine définie. La fonction de score va ensuite prédire l'affinité de l'interaction et classer les différentes poses entre elles. L'efficacité de cette recherche dépend des degrés de liberté (en termes de flexibilité) qu'on accorde à la protéine ou au ligand. L'idéal serait de permettre au ligand et à la protéine d'être flexibles mais cela reste actuellement très difficile à réaliser. L'approche la plus commune est de docker un ligand flexible sur une protéine rigide ⁶².

En ce qui concerne notre problématique, le criblage en utilisant la technique du docking nous a permis de positionner les composés de la chimiothèque dans la

cavité interne du domaine PAS-B de HIF-2 α . La fonction de score choisie nous a permis de classer les ligands par affinité de liaison prédite.

2. Conception de médicaments fondée sur la structure des ligands

a. Approche pharmacophorique

Un pharmacophore est défini par l'IUPAC comme « l'ensemble des fonctions stériques et électroniques nécessaires pour assurer l'interaction supramoléculaire optimale d'un ligand avec une cible biologique spécifique et pour provoquer (ou bloquer) une réponse biologique ». Il définit donc l'arrangement spatial de groupes fonctionnels qu'un composé chimique doit contenir afin de déclencher ou bloquer un effet biologique⁶³.

Pour générer un pharmacophore, plusieurs ligands actifs sont superposés de manière à ce qu'un maximum de caractéristiques chimiques se chevauche. Les ligands sont considérés comme des entités flexibles : pour chacun des ligands on génère de multiples conformations qui vont être intégrées dans la recherche du pharmacophore. Ce pharmacophore va servir ensuite de base pour cribler une base de données de structures chimiques des composés. Une fonction de fit permettra ensuite de classer les composés selon celui qui s'accorde le mieux avec le pharmacophore⁶³.

En ce qui concerne notre problématique, plusieurs petites molécules sont capables de se lier dans la cavité du domaine avec des affinités diverses. Celles-ci ont été utilisées comme base pour générer un premier pharmacophore qui nous a permis de cribler la chimiothèque du CERMN.

b. Approche par similarité chimique

L'approche par similarité chimique repose entièrement sur la structure chimique d'un composé actif. Cette méthode permet de comparer rapidement et de classer des composés chimiques selon leur similarité chimique⁶³.

C. Matériels et méthodes

1. Docking

a. Structures cristallographiques

Les structures cristallographiques utilisées dans cette étude sont toutes issues de la PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>). Pour le domaine PAS-B de la protéine HIF-2 α plusieurs structures cristallographiques sont disponibles dans la PDB, toutes résolues par l'équipe de Scheuermann et al.^{49,57-59} La différence entre ces structures est la présence ou non de ligands. Pour notre étude on a utilisé les structures cristallographiques du domaine sans ligand (apoprotéine) ou bien avec les cinq ligands décrits THS044, THS017, THS020, Composé 4 et JN-128-022. En ce qui concerne le domaine PAS-B de HIF-1 α , il n'existe qu'une seule structure cristallographique et elle a été réalisée par l'équipe de Cardoso et al.⁴⁸ en 2012 (Tableau 2).

Protéine (avec +/- ligand)	Code PDB	Résolution (Å)
Domaine PAS-B de HIF-2 α (apoprotéine)	3F1P	1,17
Domaine PAS-B de HIF-2 α avec THS044	3F1O	1,6
Domaine PAS-B de HIF-2 α avec THS017	3H7W	1,65
Domaine PAS-B de HIF-2 α avec THS020	3H82	1,5
Domaine PAS-B de HIF-2 α avec Composé 4	4GS9	1,72
Domaine PAS-B de HIF-2 α avec JN-128-022	4GHI	1,5
Domaine PAS-B de HIF-1 α (apoprotéine)	4H6J	1,52

Tableau 2 : Les structures de HIF-2 α et HIF-1 α et leur code PDB

b. Préparation des protéines

Nous avons dû réaliser différentes opérations sur les fichiers pdb des structures cristallographiques avant de pouvoir les utiliser pour le docking. D'abord nous avons vérifié l'état de protonation des résidus chargés au centre de la protéine (calculs des pKa des résidus en fonction de leur environnement) et aussi la tautomérie des résidus histidines. L'histidine peut être soit protonée sur les deux azotes du noyau imidazole (forme chargée) ou protonée sur un seul des azotes (forme neutre). Dans ce dernier cas, il existe une tautomérie entre les deux formes et le choix d'une des formes dépend de l'environnement du noyau (Figure 14). Ensuite, comme certains fichiers pdb sont dépourvus d'hydrogènes, il faut donc les rajouter. Certains résidus avaient plusieurs conformations de leurs chaînes latérales, on n'a retenu, dans ce cas, que la conformation majoritaire pour nos modèles.

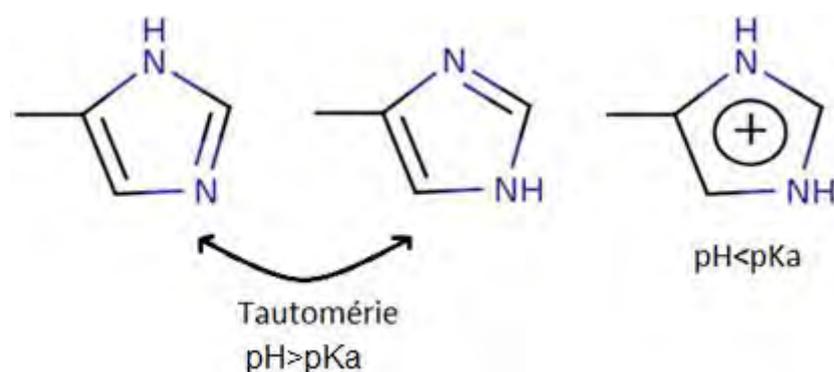


Figure 14 : Les différentes formes du noyau imidazole de l'histidine

Pour les états de protonation et la tautomérie, on a utilisé le logiciel PROPKA^{64,65} qui permet de prédire le pKa des acides aminés acides et basiques et aussi la forme tautomère de l'histidine au centre de la protéine par une méthode de calcul empirique basée sur les interactions intra-protéiques et les effets de désolvatation. Il permet aussi d'affiner le réseau de liaisons hydrogènes entre les différents résidus de la protéine et les molécules d'eau présentes dans la structure cristallographique. Le logiciel a prédit que les 2 histidines 248 et 293 de la cavité sont neutres avec un hydrogène sur l'azote δ_1 dans les deux cas. Pour rajouter les hydrogènes, le logiciel Discovery Studio (*Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Version 3.5, San Diego: Dassault Systèmes, 2015*) a été utilisé.

c. Préparation des ligands

Les ligands issus de la littérature^{49,57-59} ont été construits et minimisés avec le logiciel Discovery Studio. La minimisation nous a permis d'obtenir des molécules 3D dont la conformation spatiale était optimisée de manière à ce que l'énergie potentielle de la molécule soit la plus basse possible. Les ligands construits à partir de leur formule chimique ont une conformation très similaire aux ligands cocrystallisés avec le domaine PAS-B. Le champ de force utilisé était CHARMM. Pour notre minimisation, on a utilisé le même protocole pour toutes les molécules :

- 200 pas de Steepest Descent
- 200 pas de Conjugate Gradient
- 200 pas d'ABNR

Le Steepest Descent, le Conjugate Gradient et l'ABNR sont des algorithmes qui permettent de minimiser l'énergie et d'atteindre le minimum local d'énergie le plus proche.

d. Préparation de la chimiothèque

Pour préparer la librairie on a utilisé les applications de ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>) JChem et Cxcalc. On a d'abord utilisé l'outil Standardizer de JChem afin de rajouter les hydrogènes aux composés, de retirer les fragments qui ne font pas partie de la molécule (sels...), d'aromatiser les cycles et enfin de générer des structures 3D à partir des structures 2D. Puis on a utilisé l'application Cxcalc de MarvinBeans afin de prédire le pKa des atomes dans des molécules à pH 7,4 et vérifier la protonation des ligands.

Enfin, on a réutilisé l'outil standardizer afin de rajouter les hydrogènes retirés par Cxcalc en tenant compte de la protonation prédite par Cxcalc.

e. Docking des ligands et de la chimiothèque

Le docking des ligands et de la chimiothèque a été réalisé avec le logiciel GOLD^{66,67}. GOLD est un logiciel de docking qui utilise un algorithme génétique pour explorer l'espace de conformation d'un ligand et les orientations d'un ligand (appelé « pose ») dans le site d'une protéine définie. Il existe plusieurs fonctions de score sur GOLD :

- ChemPLP : c'est une fonction de score empirique qui associe des termes de complémentarité stérique entre le ligand et la protéine et des termes de

distance et d'angle pour les liaisons hydrogènes. ChemPLP est la fonction la plus performante de GOLD pour la prédiction de pose.

- Goldscore : c'est une fonction de score basée sur le champ de force et qui quantifie la somme de deux énergies : l'énergie d'interaction entre le ligand et la protéine (liaison hydrogène et liaison de van der Waals) et l'énergie interne du ligand (liaison de van der Waals et force de torsion).
- Chemscore : c'est une fonction de score empirique qui associe l'estimation de la modification de l'énergie libre totale lors de la liaison d'un ligand et des termes de choc stérique et de torsion interne du ligand.
- ASP : c'est une fonction de score qui se base sur l'analyse des structures ligands/protéines déjà existantes de la PDB. La fréquence des interactions entre les atomes des ligands et les atomes des protéines est récupérée et ensuite utilisée pour générer des potentiels statistiques.

Ces fonctions de score permettent de prédire l'affinité de l'interaction et de classer les différentes poses entre elles. Les scores sont exprimés sous forme de chiffre positif et plus celui-ci est élevé, meilleure est l'interaction entre le ligand et la protéine.

Dans certains de nos docking, on a rendu quelques résidus flexibles. Pour cela le logiciel dispose d'une librairie de rotamères pour chaque acide aminé. Celle-ci est une compilation des conformations les plus fréquemment observées des chaînes latérales des acides aminés dans des structures cristallographiques.

f. Classification

On a effectué la classification (clustering) avec le logiciel Canvas (version 1.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012). Avant de procéder au clustering, il faut

d'abord caractériser les structures par des fingerprints. Les fingerprints sont une suite de chiffres binaires (1 ou 0) qui permettent de décrire une structure chimique de manière simplifiée. Ils sont principalement utilisés en chémoinformatique pour comparer rapidement différentes molécules chimiques. Dans notre cas on a utilisé le MACCS fingerprint.

Pour le clustering à proprement dit, on a utilisé la technique des K-means avec comme paramètres 20 clusters au maximum, 100 runs et 200 pas par run.

g. Propriétés ADME

Les propriétés et descripteurs ADME ont été calculés avec le logiciel QikProp (version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013). Le logiciel calcule et prédit plusieurs propriétés dont celles qui nous intéressaient le plus avec leurs valeurs recommandées⁶⁸ (Tableau 3).

Propriété ou descripteur	Description	Valeurs recommandées
Poids Moléculaire (PM)	Poids moléculaire de la molécule (Da)	130 à 725
Volume	Volume total accessible au solvant en Å ³ obtenu en utilisant une sonde de 1,4 Å	500 à 2000
Log P	Prédiction du coefficient de partage octanol/eau	- 2 à 6,5
SNC	Prédiction de l'activité sur le système nerveux central	≥ 0
Log BB	Prédiction du coefficient de partage cerveau/sang	- 3 à 1,2
Absorption orale humaine (AOH)	Prédiction de l'absorption orale humaine	> 80 % très bonne < 25 % mauvaise
Aire de la surface polaire (PSA)	Aire de la surface Van der Waals des azotes et oxygènes polaires et des carbonyles (Å ²)	7 à 200
Règle de cinq de Lipinski	Pas plus de 5 donneurs de liaisons hydrogènes, pas plus de 10 accepteurs de liaisons hydrogènes, un poids moléculaire inférieur à 500, un log P inférieur à 5.	Au maximum une seule violation de ces règles

Tableau 3 : Description des propriétés et descripteurs ADME et leurs valeurs recommandées

2. Pharmacophore

Le pharmacophore a été construit avec l'application de création de pharmacophore manuel et celle de *Receptor Ligand Pharmacophore Generation* manuel de Discovery Studio.

C. Résultats et discussion

1. Description des interactions au sein des complexes

Parmi les ligands de Scheuermann *et al.*, cinq d'entre eux ont été cocrystallisés dans le domaine PAS-B de HIF-2 α . L'étude de leurs structures cristallographiques ne révèle aucune interaction forte entre les ligands et la cavité. Le THS017 (Kd = 590 nM) est le seul à en avoir une (Annexe 1). En effet il existe une liaison hydrogène entre l'oxygène du furane et l'hydroxyle de la tyrosine 307. Pour le ligand JN-128-022 (IC₅₀ = 100 nM), on suspecte une liaison pseudo-hydrogène entre le fluor du ligand et l'azote de la chaîne latérale de l'asparagine 341 du fait de l'orientation et la distance de 3,16 Å entre ces deux atomes (Figure 15). Ce type de liaison hydrogène n'a pas été beaucoup décrit dans les logiciels de docking et de pharmacophore. Le chlore du JN-128-022 semble positionné au sein d'une poche hydrophobe bordée par la phénylalanine 280, la méthionine 309, l'alanine 277 et le cycle aromatique de la tyrosine 281. On suspecte aussi une interaction du groupe nitro des cinq ligands avec l'histidine 248 puisque celui-ci est orienté, pour les cinq ligands, quasiment de la même manière vers le milieu du noyau imidazole de l'histidine.

Le manque d'interactions suffisamment connues et bien décrites entre les ligands et la cavité, révèlent les difficultés potentielles pour le criblage par docking et par pharmacophore de nouveaux ligands.

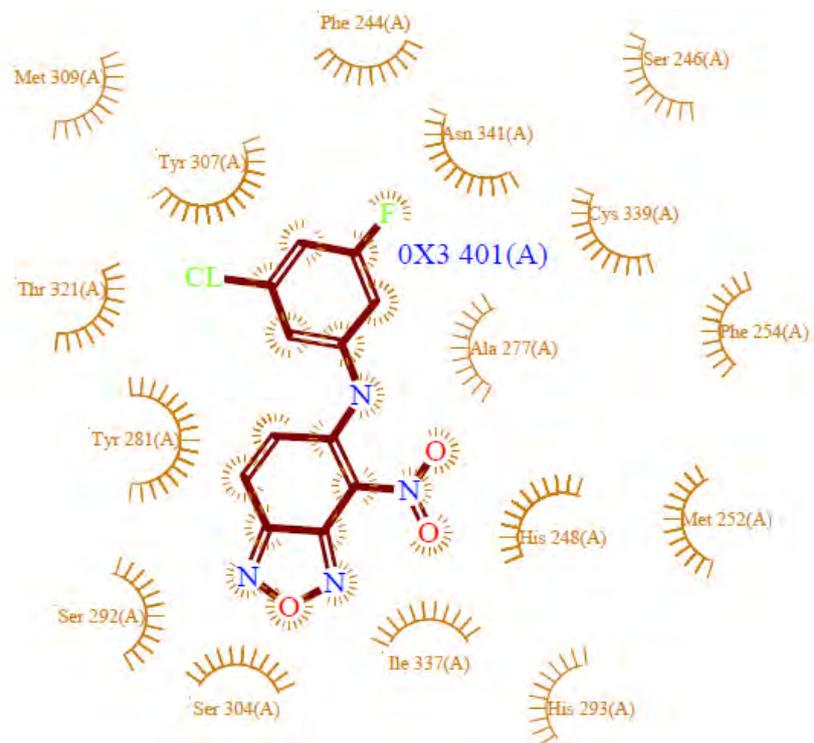


Figure 15 : Interactions entre le ligand JN-128-022 et les résidus bordant la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α

2. Docking

a. Mise au point du docking

On a commencé tout d'abord notre recherche de ligands en utilisant la technique du docking avec le logiciel GOLD v5.2. Pour cela plusieurs étapes préliminaires ont été réalisées avant de procéder au criblage de la chimiothèque.

En premier, on a réalisé une mise au point de la procédure de docking en utilisant, dans notre cas, des ligands déjà connus du domaine PAS-B de HIF-2 α . En se basant sur les travaux de Scheuermann *et al.*^{49,57-59}, les cinq ligands cocrystallisés dans le domaine PAS-B de HIF-2 α (Figure 16) ont été utilisés comme jeu d'apprentissage. Cela nous a permis, au-delà de simplement évaluer la capacité du docking à prédire des affinités, d'évaluer surtout la capacité de celui-ci à prédire la position correcte des ligands dans la cavité interne du domaine PAS-B de HIF-2 α .

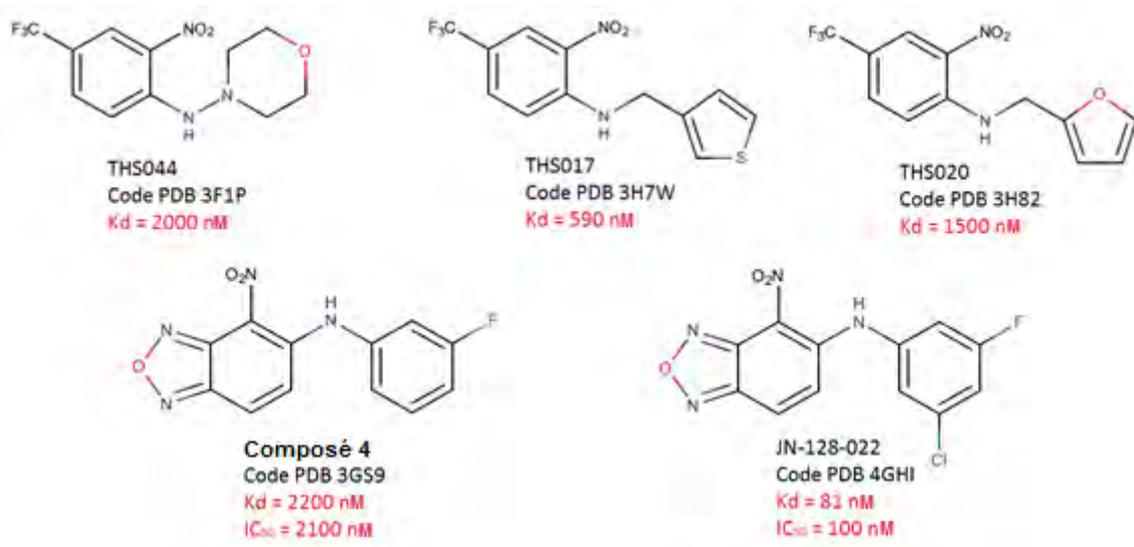


Figure 16 : Ligands cocrystallisés dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α

On a réalisé plusieurs calculs de docking avec les ligands de la littérature afin d'évaluer les différentes fonctions de score proposées dans GOLD (Goldscore, Chemscore, ChemPLP, ASP) et déterminer laquelle est la plus adaptée à nos composés. Pour ce faire, on a tout d'abord effectué le docking dans la structure cristallographique de l'apoprotéine (domaine PAS-B sans ligand de code PDB 3F1P). Notre premier critère de sélection des fonctions de score était leur capacité à prédire les positions correctes des molécules dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α . Pour cela on a calculé le RMSD (Root-mean-square deviation) entre la pose de docking et la structure cristallographique pour chaque ligand. Les résultats de ce calcul ont été très peu satisfaisants. On considère généralement qu'une structure est bien dockée lorsque le RMSD est autour de 1 Å. Or, parmi nos valeurs, un seul ligand répond à cette règle (Tableau 4) et toutes les autres tournent autour de 2 à 3 Å. Le deuxième critère de sélection des fonctions de score était leur capacité à attribuer des scores qui reflètent plus ou moins l'ordre des affinités expérimentales des ligands pour la cavité de HIF-2 α . Les scores obtenus pour ces ligands et pour toutes les fonctions de scores étaient en général assez loin des affinités

expérimentales observées pour les ligands. Les scores les plus élevés étaient obtenus avec la fonction Goldscore mais ceux-ci n'étaient pas suffisamment dispersés. En effet, le score le plus élevé est de 37,30 tandis que le plus faible était de 31,21. Si on veut tenir compte des affinités expérimentales qui vont de 81 nM à 2200 nM de ces ligands, il serait idéal d'avoir des valeurs de scores un peu plus dispersés. De plus, le ligand possédant la meilleure affinité (81 nM) n'avait pas le meilleur score avec la plupart des fonctions de score.

DOCKING Apoprotéine						
Nom du Composé	Pose	Goldscore		Pose	Chemscore	
		Score	RMSD (Å)		Score	RMSD (Å)
THS044	3	31,26	2,4384	2	10,52	2,4474
	5	31,24	2,3861	3	8,56	2,4313
	2	31,21	2,5323	1	8,08	2,206
THS017	7	35,49	3,3873	2	17,67	2,7515
	10	34,33	3,3919	1	16,04	2,6148
	2	34,27	3,1763	3	15,42	2,4001
THS020	2	36,33	3,1891	2	20,03	2,8908
	10	33,52	3,235	1	18,97	2,5452
	5	33,31	2,703	3	17,97	2,6621
Composé 4	2	34,09	2,1306	2	19,31	2,2668
	1	33,98	2,0871	1	15,82	2,4125
	3	33,20	2,0563	3	12,90	1,9711
JN-128-022	3	37,30	2,6319	1	16,76	2,641
	2	35,83	2,6302	2	15,16	2,5514
	1	35,09	2,5185	3	14,91	2,4425

DOCKING Apoprotéine						
Nom du Composé	Pose	ASP		Pose	ChemPLP	
		Score	RMSD (Å)		Score	RMSD (Å)
THS044	1	18,85	2,6588	3	7,22	2,4826
	3	17,61	2,4965	1	7,19	2,4628
	2	16,40	2,3633	2	7,07	2,4854
THS017	3	25,60	2,5889	7	12,61	2,7393
	2	24,39	2,541	5	11,46	2,7828
	1	23,99	2,6395	4	11,39	2,7954
THS020	3	29,24	2,9166	3	10,16	2,7598
	1	28,35	2,9495	1	9,64	2,7623
	2	27,95	2,9275	2	8,93	2,7483
Composé 4	2	18,48	3,0781	2	16,06	2,181
	6	18,44	2,8594	1	15,09	2,218
	4	17,54	2,8497	3	13,31	2,2961
JN-128-022	3	15,05	2,4007	2	2,84	2,0096
	2	14,50	2,2928	4	1,57	2,0615
	1	14,10	2,3014	3	1,06	0,8772

Tableau 4 : Résultats du docking des ligands avec l'apoprotéine – Résultats des trois meilleures poses pour chaque fonction de score (Goldscore, Chemscore, ASP, ChemPLP). RMSD<1 Å en gras

En regard de ces résultats très peu concluants, on a décidé de refaire le même test mais cette fois-ci avec la structure cristallographique du domaine PAS-B cocrystallisé avec le ligand JN-128-022 (code PDB 4GHI). On a choisi cette structure car le JN-128-022 est le ligand qui a la meilleure affinité pour la cavité du domaine PAS-B de

HIF-2 α . Les résultats obtenus dans ce deuxième docking sont bien meilleurs qu'avec l'apoptotéine et c'est la fonction ChemPLP qui a donné les meilleurs résultats (Tableau 5). Les différentes fonctions ont permis cette fois-ci de prédire la position correcte d'un ou plusieurs ligands. La fonction ChemPLP a prédit la position correcte de 4 ligands sur cinq dans le site (Tableau 5). Les scores de fit sont également plus élevés qu'avec l'apoptotéine. Les valeurs de score de fit avec ChemPLP étaient les plus dispersées (la plus faible est de 51,60 et la plus élevée de 65,08) et suivaient l'ordre d'affinité expérimentales : le composé JN-128-022 ($K_d = 81$ nM) ayant les meilleurs scores et le composé THS044 ($K_d = 2000$ nM) ayant les moins bons scores.

Le THS017 est le seul dont la position a été mal prédite par la fonction de score ChemPLP puisque ses RMSDs tournent autour de 2 Å. Pour tenter de comprendre la raison on a comparé les domaines PAS-B en complexe avec les deux ligands THS017 et JN-128-022 (3H7W et le 4GHI) mais aucune différence majeure dans les orientations des chaînes latérales dans la cavité n'a été repérée. On a donc décidé de docker le THS017 dans le domaine PAS-B en complexe avec lui-même (3H7W). Le score de fit obtenu était de 66,20 et RMSD obtenu était de 0,41 Å. Ces deux résultats indiquent que la procédure de docking arrivait à positionner le ligand correctement dans le site. Nous n'avons donc pas réussi à comprendre pourquoi le docking de THS017 dans le domaine en complexe avec le ligand JN-128-022 ne donnait pas de bons résultats.

DOCKING Protéine avec JN-128-022						
Nom du Composé	Pose	Goldscore		Pose	Chemscore	
		Score	RMSD (Å)		Score	RMSD (Å)
THS044	3	53,24	0,7647	3	22,91	0,3949
	2	52,85	0,653	1	22,62	0,5697
	1	52,64	0,7618	2	22,44	0,4539
THS017	5	57,16	3,3564	3	29,38	2,7244
	8	56,98	3,3369	5	29,33	2,4579
	9	56,72	1,3796	1	29,08	3,1608
THS020	2	55,73	0,9834	8	27,78	2,9643
	5	54,32	0,825	4	27,65	0,7089
	4	53,94	1,8109	3	27,20	2,4865
Composé 4	3	52,04	2,364	1	33,86	2,7264
	1	51,90	2,1408	2	33,76	2,7319
	2	51,81	2,2986	3	33,52	2,7387
JN-128-022	1	57,06	0,3185	10	33,07	4,0186
	3	56,79	0,1547	4	32,97	2,7426
	2	56,70	0,5988	3	32,94	2,6843

DOCKING Protéine avec JN-128-022						
Nom du Composé	Pose	ASP		Pose	ChemPLP	
		Score	RMSD (Å)		Score	RMSD (Å)
THS044	2	37,95	2,5373	1	52,02	0,5215
	3	37,11	2,5625	3	51,90	0,4795
	1	36,28	2,5488	2	51,60	0,5131
THS017	9	37,78	1,7337	3	62,49	2,3849
	5	37,62	1,0358	4	62,13	2,3158
	4	37,60	1,6183	2	61,43	2,422
THS020	10	40,14	1,5456	4	62,65	0,7259
	4	40,09	0,8496	3	61,51	0,7482
	1	40,01	3,2488	1	60,22	0,896
Composé 4	1	37,74	1,8379	2	61,59	0,7389
	4	36,94	1,7745	3	60,85	0,831
	3	36,48	1,7453	1	60,04	0,8169
JN-128-022	3	41,36	0,554	2	65,08	0,2691
	4	40,32	0,3752	3	64,69	0,3843
	7	40,23	0,5844	4	64,69	0,2754

Tableau 5 : Résultats du docking des ligands avec la structure cristallographique du domaine PAS-B cocrystallisé avec le ligand JN-128-022– Résultats des trois meilleures poses pour chaque fonction de score (Goldscore, Chemscore, ASP, ChemPLP).

Pour comprendre les différences de résultats entre le docking dans l'apoprotéine et dans la protéine avec le ligand JN-128-022, on a comparé les deux structures et observé les positions des différentes chaînes latérales qui tapissent la cavité. On a constaté que la méthionine 252 n'est pas positionnée de la même manière dans les

deux domaines ce qui pourrait donc expliquer la différence de résultats. Pour le vérifier on a effectué un docking des ligands dans l'apoprotéine (en utilisant la fonction de score ChemPLP) mais cette fois-ci avec une Met 252 flexible. Les scores de fit obtenus étaient nettement supérieurs par rapport à ceux obtenus avec la protéine rigide et se rapprochaient beaucoup de ceux obtenus avec la protéine en complexe avec le ligand JN-128-022 (Tableau 6). La position des ligands était elle aussi mieux prédite avec l'apoprotéine partiellement flexible puisque 3 ligands sur cinq avaient un RMSD inférieur à 1 Å contrairement au docking avec la protéine rigide où aucun n'en avait (Tableau 6). De ce fait, on en conclut que la conformation de la Met 252 dans le site de l'apoprotéine gênait le positionnement correct du ligand. Cela permet d'expliquer la différence de résultats entre le docking effectué dans l'apoprotéine (3F1P) et celui effectué dans la protéine en complexe avec le ligand JN-128-022 (4GHI). Néanmoins cela n'explique pas entièrement les différences observées puisque les scores obtenus avec l'apoprotéine partiellement flexible restent toujours inférieurs à ceux obtenus avec la protéine complexée (4GHI). Les différences obtenues pourraient être expliquées par l'ajustement du site protéique au ligand qui provoque certes de faibles changements dans le site mais qui influencent la valeur de score de fit.

Protéine	THS044		THS017		THS020		Compo 4		JN-128-022	
	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD
3F1P flexible	36,83	0,428	43,46	2,0825	46,66	1,8646	51,34	0,6473	50,29	0,5458
3F1P rigide	7,22	2,4826	12,61	2,7393	10,16	2,7598	16,06	2,181	2,84	2,0096
4GHI rigide	52,02	0,5215	62,49	2,3849	62,65	0,7259	61,59	0,7389	65,08	0,2691

Tableau 6 : Résultats du docking dans le domaine PAS-B de HIF-2 α rigide ou flexible – Score et RMSD de la meilleure solution de chaque docking. Seuls le résidu MET 252 est flexible dans l'apoprotéine flexible.

En vue de tous ces résultats on a retenu la fonction ChemPLP et la protéine 4GHI pour cribler la chimiothèque du CERMN.

b.Criblage de la chimiothèque par docking

La chimiothèque du CERMN a donc été criblée avec le logiciel GOLD en utilisant la protéine 4GHI rigide et la fonction de score ChemPLP. Les paramètres par défaut ont été appliqués et le site de liaison a été défini comme englobant tous les résidus qui se trouvent dans un rayon de 10 Å du carbone ζ de la phénylalanine 254. Sur les 9877 molécules dockées, on a sélectionné les 100 molécules ayant obtenus les meilleurs scores de fit. Celles- ci avaient toutes un score de fit plus élevé que le meilleur obtenu avec les ligands déjà identifiés. En effet, le score maximal était de 81,95 et le minimal était de 66,84 parmi les 100 meilleurs molécules retenues tandis que pour les ligands déjà identifiés le meilleur score était de 65,08. Afin de limiter le nombre de molécules à tester ultérieurement, ces molécules ont ensuite été classées selon leur similarité chimique (« clustering ») par Canvas (Schrödinger) en 19 familles différentes et un singleton (Figure 17). Pour chaque famille une molécule représentative a été sélectionnée après observation des structures dockées dans la protéine et en prenant compte de différents critères comme le nombre de liaisons hydrogène établies avec la protéine, le π -stacking avec l'histidine 248 (Figure 18). Au final, 20 molécules ont été sélectionnées pour être testés in-vitro (Annexe 2).

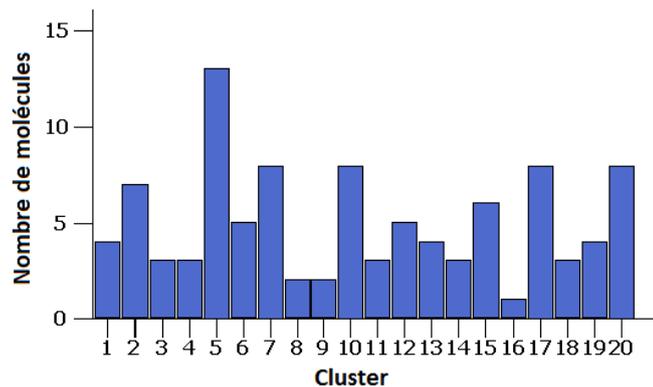


Figure 17 : Répartition des cent molécules sélectionnées sur les 20 clusters

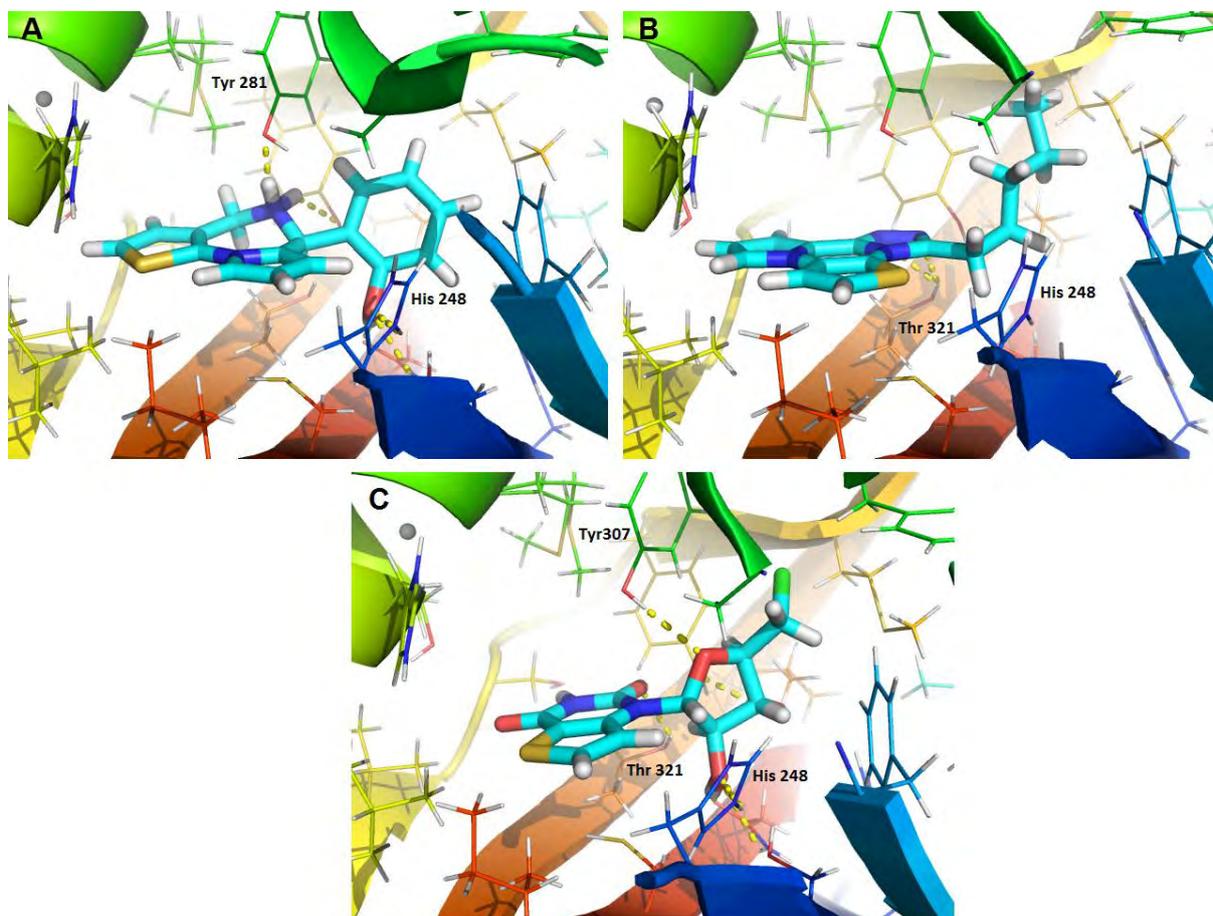


Figure 18 : Poses de docking de trois composés issus de la liste des 100 molécules ayant les meilleurs scores de fit - A : mr8800 : celui-ci forme 4 liaisons hydrogènes (deux avec Asn 341, une avec Tyr 307 et une avec Tyr281) et un π -stacking avec l'His 248. B : sr5971 : deux azotes du composé sont susceptibles de former une liaison hydrogène avec Thr 321 et un π -stacking est formé avec l'His 248. C : celui-ci forme 4 liaisons hydrogènes (deux avec Asn 341, une avec Tyr 307 et une avec Thr 321) et un π -stacking avec l'His 248.

c. Docking dans le domaine PAS-B de HIF-1 α

Outre le fait d'obtenir des molécules capable d'inhiber HIF-2 en se fixant dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α , notre objectif était aussi d'obtenir des molécules sélectives de HIF-2 α . Pour cela, on disposait de la structure cristallographique du domaine PAS-B de HIF-1 α (code PDB 4H6J) ce qui permettait de docker nos molécules dans la cavité interne de ce domaine.

On a d'abord commencé par docker les ligands déjà connus du domaine PAS-B de HIF-2 α dans la cavité de HIF-1 α . Le premier docking a été effectué sur le domaine rigide et les scores négatifs suggèrent que les ligands ne se fixent pas dans la cavité (Tableau 7). Ces résultats sont cohérents avec les données de l'équipe de Scheuermann et *al.* En effet, ils ont montré que ces ligands étaient spécifiques du domaine PAS-B de HIF-2 α .

DOCKING 4H6J (HIF-1 α)										
	THS044		THS017		THS020		Compo 4		JN-128-022	
Protéine	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD
4H6J rigide	-78,19	-	-42,16	-	-41,75	-	-55,46	-	-71,81	-
4H6J flexible	27,29	2,1734	45,37	1,7967	47,24	1,1472	34,71	2,8243	30,27	2,7148

Tableau 7 : Résultats du docking dans le domaine PAS-B de HIF-1 α rigide ou flexible – Score et RMSD de la meilleure solution de chaque docking. Il n'y a pas de RMSD lorsque le score est négatif car théoriquement la structure ne se fixe pas à la protéine. Seuls les résidus Met 250, Ile 275 et His 291 sont flexibles dans la protéine 4H6J flexible.

Ces résultats étaient obtenus avec un domaine PAS-B rigide de l'apoprotéine dont la cavité ne contenait aucun ligand et on ne pouvait donc pas prédire la position qu'allaient prendre les acides aminés qui tapissent la cavité lors de la présence d'un ligand. La rigidité de la protéine lors du docking ne nous permettait donc pas d'observer les phénomènes d'ajustement des résidus en présence de ligands. Les scores de fit négatifs obtenus sont donc potentiellement exagérés et ne sont, en

réalité, peut-être pas négatifs. Pour pallier à ce problème, il a fallu prendre en compte la flexibilité de la protéine. Cependant, les logiciels de docking actuels ne peuvent permettre à la protéine d'être entièrement flexible, il fallait donc choisir quelques résidus de la cavité qui pouvaient influencer l'interaction du ligand avec celle-ci. En superposant les structures cristallographiques des domaines PAS-B de HIF-1 α (4H6J) et de HIF-2 α avec son ligand JN-128-022 (4GHI), on constate que les chaînes latérales de résidus méthionine 250 et histidine 291 de HIF-1 α ont des positions différentes par rapport à la Met 252 et la His 293 de HIF-2 α et que l'isoleucine 275 de HIF-1 α occupe une place plus importante que l'alanine 277 de HIF-2 α . Dans la superposition des deux structures, ces trois résidus Met 250, His 291 et Ile 275 de HIF-1 α sont positionnés dans la cavité de HIF-2 α (Figure 19). On a donc permis à ces trois résidus d'être flexibles pour le deuxième docking dans la protéine 4H6J. Les scores de fit de ce deuxième docking, sont nettement supérieurs à ceux du premier (Tableau 7). Le score le plus élevé obtenu avec la protéine rigide était de -41,75 tandis que le plus élevé obtenu avec la protéine flexible est de 47,24. Permettre à ces trois résidus d'être flexibles a donc un impact très important sur le score.

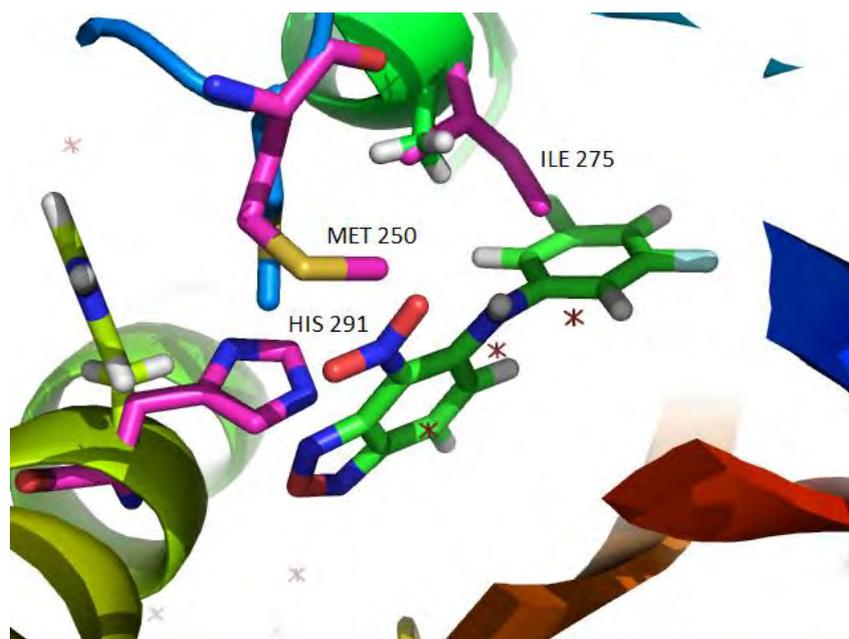


Figure 19 : Superposition du domaine PAS-B de HIF-1 α (4H6J) et celui de HIF-2 α avec son ligand JN-128-022 (4GHI) – En rose les résidus méthionine 250, isoleucine 275 et histidine 291 du domaine PAS-B de HIF-1 α . En bleu, vert et jaune respectivement, les résidus méthionine 252, alanine 277 et histidine 293 du domaine PAS-B de HIF-2 α . Cette figure a été réalisée avec PYMOL.

Ces résultats complexifient l'interprétation du docking dans le domaine PAS-B de HIF-1 α . Le logiciel arrive à docker les ligands dans la cavité de HIF-1 α avec trois résidus flexibles et à leur attribuer des scores, certes plus faibles que pour le docking dans HIF-2 α mais assez significatifs pour considérer de manière incorrecte qu'ils pourraient se lier à HIF-1 α . Donc si on crible la chimiothèque en utilisant le domaine PAS-B de HIF-1 α , on aura beaucoup de mal à discriminer ceux qui interagissent avec celui-ci de ceux qui n'interagissent pas. Prédire la sélectivité des composés semble donc quasi impossible avec cette méthode. On a quand même criblé la chimiothèque en utilisant le domaine PAS-B de HIF-1 α partiellement flexible. Les scores de fit pour les 20 composés sélectionnés précédemment allaient de 14,59 à 59,48 (Tableau 8). Certains de ces scores sont plus élevés que ceux obtenus dans le docking des cinq ligands de la littérature dans le domaine PAS-B de HIF-2 α (4GHI)

partiellement flexible d'autres sont moins élevés. Il semble très difficile de prédire la sélectivité des composés avec ce docking.

Molécule	Score dans domaine PAS-B de HIF-2 α (4GHI)	Score dans domaine PAS-B de HIF-1 α flexible (4H6J)
sr6236	72,3744	15,0765
sr6066	69,0735	34,3181
mr19463	67,1016	35,2343
mr19812	66,9673	35,7717
sr6004	69,3255	36,4413
sr1418	68,7433	36,4413
mr23235	72,692	36,4444
sr1289	69,4143	37,3403
sr1147	67,1283	38,3535
mr23296	71,8704	40,6679
mr8800	70,0924	44,3494
sr4978	69,3391	47,2649
mr19829	70,1112	47,5804
mr19866	68,2455	47,8344
mr16793	68,2218	48,657
sr1061	67,2638	49,741
sr3595	67,2275	50,7008
sr1782	81,9546	53,5871
sr5971	68,7152	59,4805
HM705	68,6879	14,5912

Tableau 8 : Résultats du docking de 4GHI et du docking de 4H6J flexible.

d. Propriétés et descripteurs ADME

Pour mieux caractériser les 20 composés sélectionnés de la chimiothèque avec la procédure de docking, on a effectué le calcul des prédictions des propriétés et des descripteurs ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation et Elimination) avec le logiciel QikProp (Tableau 9). La majorité des composés n'ont aucune valeur en dehors de l'intervalle des valeurs recommandées (cet intervalle représente des propriétés et des descripteurs observés chez 95% des molécules actives connues). Toutes les molécules respectent la règle de cinq de Lipinski et les autres valeurs comme le volume, l'aire de la surface polaire (PSA, Table 9), le logBB et le

pourcentage d'absorption orale (AOH, Table 9) sont toutes dans l'intervalle de valeurs recommandées.

Seules quelques valeurs de l'activité sur le système nerveux central (SNC) sont hors de l'intervalle recommandé. Les molécules avec des valeurs négatives sont potentiellement inactives sur le SNC tandis que les positives sont actives sur celui-ci. Dans notre cas, on cherche un inhibiteur de HIF-2 qui agirait sur les glioblastomes. Les glioblastomes sont des tumeurs situés dans le cerveau et accéder à celles-ci nécessite un passage par la barrière hémato-encéphalique. De ce fait, il est préférable que les molécules sélectionnées aient une activité sur le SNC positive et une valeur de logBB acceptable. Trois molécules avaient des valeurs d'activité négatives sur le SNC, on les a donc retirés de la liste des 20 molécules à tester *in vitro*. De ce fait il ne reste, à ce stade, plus que 17 molécules dans cette liste.

N° Molécule	ADME						
	PM	Volume (Å ³)	LogP	SNC	LogBB	AOH (%)	PSA
sr1782	292,38	1019,73	3,857	1	0,176	100	35,509
mr23235	323,412	1010,54	4,341	2	0,302	100	37,492
sr6236	318,731	818,823	0,207	-1	-0,81	67,755	124,714
mr23296	318,436	1032,46	2,947	1	0,43	100	45,762
mr19829	289,395	960,294	3,681	2	0,557	100	28,63
mr8800	282,359	850,203	3,134	2	0,592	100	32,779
sr1289	299,756	928,44	3,963	0	-0,246	100	59,947
sr4978	273,331	910,651	2,208	1	-0,312	82,133	69,505
sr6006	295,358	911,792	4,569	1	0,368	100	32,093
sr6066	285,403	935,411	3,235	1	0,37	100	26,15
sr1418	281,31	944,579	4,292	0	-0,111	100	43,04
sr5971	284,378	927,321	4,489	0	-0,002	100	32,012
mr19866	275,368	891,919	2,898	1	0,253	96,754	39,765
mr16793	262,394	1010,2	2,294	1	0,274	93,689	30,66
sr1061	288,736	887,978	2,906	0	-0,009	100	59,307
sr3595	278,328	883,299	3,494	0	-0,17	100	48,619
sr1147	299,713	890,747	2,325	-2	-1,093	74,501	105,007
mr19463	336,792	956,568	3,856	0	-0,223	100	61,075
mr19812	309,41	1034,33	3,393	1	0,423	100	26,467
HM705	306,364	1052,44	3,439	-1	-0,807	100	99,508

Tableau 9 : Propriétés et descripteurs ADME pour les 20 molécules sélectionnées pour des essais in-vitro – Il est à noter que le volume calculé pour les molécules paraît supérieur à celui de la cavité dans lesquelles elles se fixent (360 Å³). En effet la méthode de calcul des volumes n'est pas la même : pour la cavité on a calculé son volume moléculaire et pour les molécules on a calculé leur volume accessible au solvant. Le volume accessible au solvant (délimité par le bord de la sonde de rayon 1,4 Å) est moins élevé que le volume moléculaire (délimité par le rayon de la sonde). Les trois molécules retirées de la liste sont surlignées en gris.

3. Pharmacophore

Pour cribler la chimiothèque du CERMN, nous avons aussi utilisé, en parallèle de la technique de docking, la technique du pharmacophore. Comme on disposait des structures cristallographiques des cinq ligands cocrystallisé avec la protéine, nous nous sommes basés sur celles-ci pour construire notre pharmacophore.

Nous avons d'abord commencé par générer des pharmacophores grâce à l'application *Receptor Ligand Pharmacophore Generation* (RLPG) de Discovery Studio (DS). Celle-ci permet de générer des pharmacophores conformes aux interactions qui existent entre le ligand et son site de fixation dans la protéine. Cela a été réalisé pour chacun des cinq ligands cocrystallisé dans le domaine PAS-B de HIF-2 α mais le logiciel n'a généré aucun pharmacophore quel que soit le ligand. Ceci nous confirme qu'il n'existe aucune interaction forte entre les ligands et la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α . Même si cette application ne nous a pas permis de développer un pharmacophore, celle-ci nous a quand même permis de récupérer un volume d'exclusion qu'on peut utiliser pour un pharmacophore généré manuellement. Le volume d'exclusion permet de réduire, lors d'un criblage, le nombre de composés qui «*fittent*» un pharmacophore mais qui sont trop gros pour permettre une interaction avec le site d'une protéine. Ce volume est constitué d'une multitude de sphères où chacune représente l'emplacement et le volume d'un acide aminé qui tapisse le site (Figure 20).

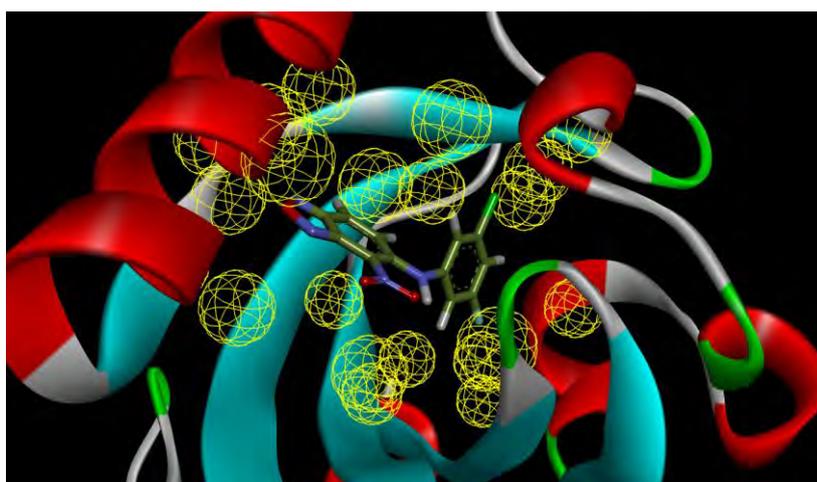


Figure 20 : Volume d'exclusion de la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α avec le ligand JN-128-022 (4GHI) – Le volume d'exclusion est représenté par des sphères jaunes.

Comme il n'était pas possible de générer un pharmacophore automatiquement avec l'application RLPG de DS, on a donc décidé de générer un pharmacophore manuellement. Pour cela, il fallait analyser l'étude de relation structure-activité (RSA) réalisée pour la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α ⁵⁸ et en déduire des hypothèses sur les motifs potentiels du pharmacophore. Toutes les molécules de cette étude RSA ont deux cycles reliés par une amine secondaire de chaîne plus ou moins longue (linker). Le premier cycle est un benzoxadiazole substitué par un groupe nitro (-NO₂) et le deuxième est un benzène mono ou disubstitué. Comme l'ensemble des composés étaient bicycliques on a donc décidé de conserver cette caractéristique pour notre pharmacophore en introduisant deux motifs aromatiques à la place du benzoxadiazole et à la place du cycle benzénique substitué (Figure 21). Les composés les plus actifs étaient ceux dont le linker était composé d'une chaîne possédant seulement un azote. La distance qui sépare les deux motifs aromatiques équivaut à celle d'un linker constitué d'une amine secondaire.

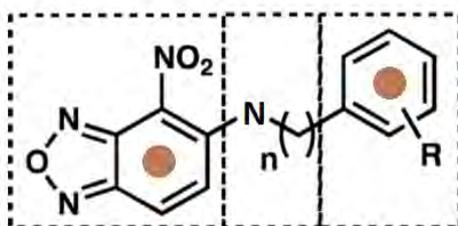


Figure 21 : Structure générale des composés de l'étude RSA – Les cercles marron représentent la position des motifs aromatiques retenus pour le pharmacophore manuel. La distance entre les deux motifs équivaut à celle du linker où n est égal à 0. *Figure modifiée à partir de celle de la référence 56.*

En ce qui concerne le cycle benzénique, les substitutions communes chez les composés les plus actifs étaient un groupement -Cl ou -CF₃ en position méta. Ces deux groupements peuvent être assimilés à des groupements hydrophobes (Figure 22). De plus, l'observation de la structure cristallographique du complexe PAS-B

avec le ligand JN-128-022 (composé issu de cette RSA), permet de mettre en évidence que le groupement -Cl en méta de ce composé interagit avec une poche hydrophobe de la protéine. On peut donc supposer que les groupes -Cl et -CF₃ des autres composés actifs interagissent de manière similaire au -Cl du JN-128-022 avec la poche hydrophobe de la protéine. Pour notre pharmacophore manuel on a donc rajouté un motif hydrophobe à la place du substituant hydrophobe en méta.

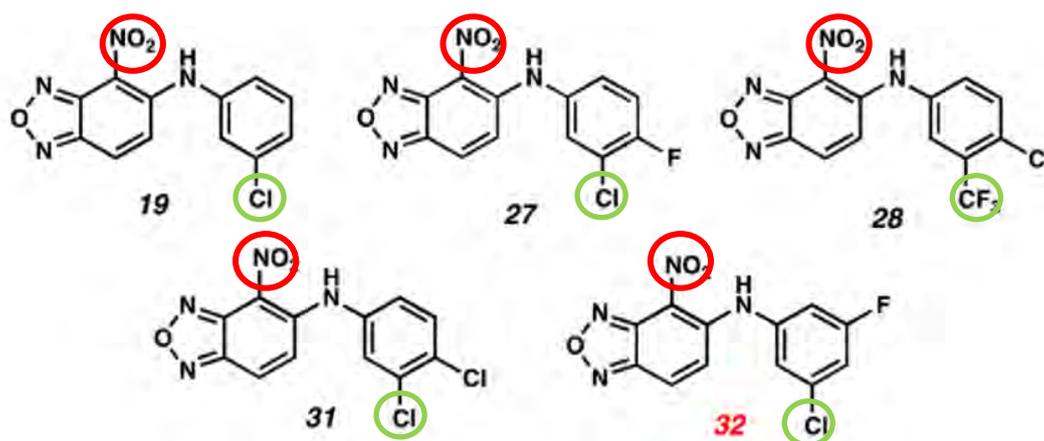


Figure 22 : Les composés les plus actifs de l'étude de RSA - Le composé 32 est le JN-128-022. Les cercles verts représentent le motif hydrophobe et les cercles rouges le motif accepteur de liaison hydrogène retenus pour le pharmacophore manuel. *Figure modifiée à partir de celle de la référence 56.*

Dans les structures cristallographiques des cinq complexes avec les ligands THS044, THS017, THS020, le Composé 4 et le JN-128-022, le groupement -NO₂ est positionné dans tous les cas perpendiculairement au noyau imidazole de l'histidine 248 avec un des oxygènes pointé vers le centroïde de l'acide aminé. Cette particularité commune indique qu'il pourrait vraisemblablement exister une interaction spécifique entre le groupe nitro et le noyau imidazole de l'histidine 248. Le nitro est un groupement qui est globalement chargé négativement (existence d'une charge partielle négative répartie entre les deux oxygènes) tandis que le noyau imidazole est aromatique. C'est pour cela que nous avons envisagé une potentielle interaction anion- π entre les deux groupements. Ce type d'interaction, bien moins connu que

l'interaction cation- π , a été décrit dans diverses études théoriques et expérimentales.⁶⁹ Une des plus étudiées, l'interaction entre la triazine et le nitrate semble similaire à celle de l'interaction observée pour nos composés (Figure 23A). En effet, la distance entre l'oxygène du groupe nitro et le centroïde de l'histidine est de 3,46 Å pour le composé JN-128-022 (Figure 23B) et est cohérente avec les distances observées dans l'interaction triazine/nitrate. Celles-ci, d'après des données cristallographiques, sont comprises entre 3,01 Å et 3,52 Å⁷⁰.

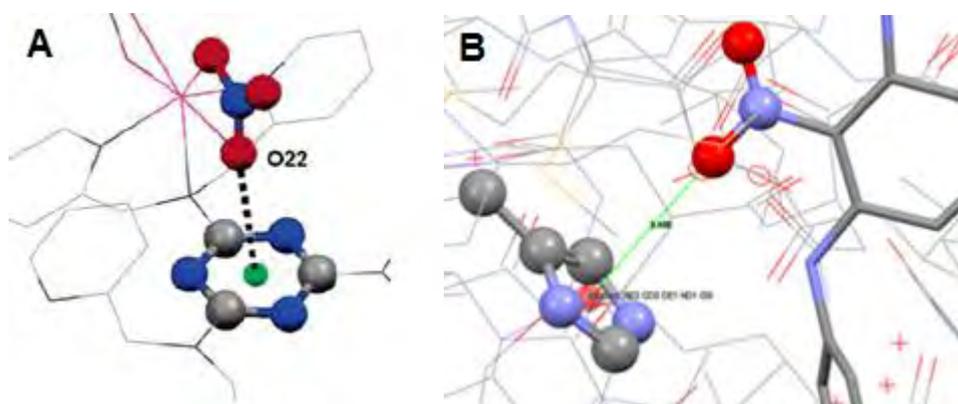


Figure 23 : A : Interaction nitrate/triazine – La distance entre l'oxygène et le centroïde de la triazine est de 3.01 Å. *Figure obtenue dans la référence 69.* **B : Interaction nitro/imidazole** – La distance entre l'oxygène et le centroïde de l'imidazole est de 3.46 Å. *Figure réalisée avec le logiciel MERCURY.*

Tous ces arguments confortent notre hypothèse d'une interaction de type anion- π mais celle-ci présente néanmoins des défaillances. L'interaction anion- π a été jusqu'à présent décrite seulement pour des cycles aromatiques π -déficients comme la triazine. Or ce n'est pas le cas du noyau imidazole de l'histidine. Toutefois, l'histidine présente la particularité d'avoir un pKa proche de 7. Cela signifie que dans les milieux physiologiques à pH 7,4, le noyau imidazole peut exister autant sous sa forme de cation (forme protonée acide : imidazolium) que sous sa forme neutre (non protonée basique : imidazole). Dans sa forme cationique, l'aromaticité du cycle est conservée et la charge positive est délocalisée entre les azotes du cycle imidazolium. Dans ce cas, on pourrait donc envisager la possibilité, pour l'imidazolium, d'une

structure π -électronique « positivée » pouvant expliquer une potentielle interaction anion- π entre le groupe nitro et l'histidine. Bien évidemment cela n'est qu'hypothétique et nécessite des études qui permettent d'affirmer ou d'infirmer le modèle qu'on propose.

En ce qui concerne notre pharmacophore manuel, il n'existe pas de motif actuellement capable de représenter l'interaction anion- π qu'on suspecte entre le groupe nitro et le noyau imidazole de l'histidine 248. Le groupement NO_2 retrouvé sur les cinq ligands est aussi un groupement accepteur de liaison hydrogène, on a donc décidé de mettre à sa place un motif accepteur de liaison hydrogène (Figure 22).

Après avoir identifié les différents motifs, on a construit notre pharmacophore manuel avec le logiciel Discovery Studio (Accelrys, San Diego, Californie, Etats-Unis) en se basant sur la structure cristallographique du JN-128-022. Le pharmacophore final contenait deux motifs aromatiques, un motif hydrophobe, un motif accepteur de liaison hydrogène et le volume d'exclusion obtenu précédemment avec l'application RLPG de Discovery Studio (Figure 24 et Tableau 10).

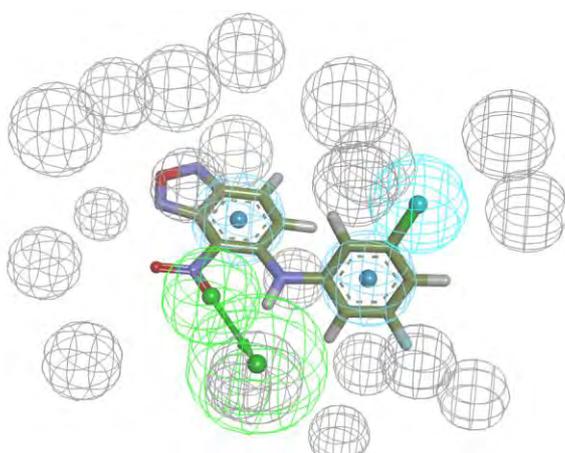


Figure 24 : Pharmacophore manuel – Aligné sur le JN-128-022. Les sphères vertes représentent l'accepteur de liaison hydrogène et sa projection, les sphères bleues foncées les motifs aromatiques, la sphère bleu turquoise le motif hydrophobe et les sphères grises le volume d'exclusion.

	Noyau aromatique 1 (NA1)	Noyau aromatique 2 (NA2)	Centre hydrophobe (CH)	Centre Accepteur de liaison hydrogène (ALH)	Projection du centre Accepteur de liaison hydrogène (PALH)
NA1					
NA2	5,0				
CH	6,4	3,0			
ALH	3,6	5,2	7,2		
PALH	6,1	5,1	7,3	3,0	

Tableau 10 : Matrices des distances (en Å) pour le pharmacophore manuel

Ce pharmacophore a été ensuite utilisé pour cribler la chimiothèque du CERMN. En se basant sur le même principe qu'avec la procédure de docking, on a sélectionné à partir des 9788 composés criblés les 100 molécules ayant obtenues les meilleurs valeurs de fit. Un composé parmi ces 100 meilleurs était aussi classé parmi les 100 meilleures molécules dans le criblage par docking. En effet, le composé sr1758 était classé 29^{ème} dans la liste des 100 meilleurs fit du pharmacophore et 44^{ème} dans celle du docking. Un autre composé, le sr6130 était lui aussi bien classé dans le docking. Son classement (126^{ème}) était certes au-dessus du centième rang mais ce seuil de 100 meilleures molécules ayant le score le plus élevé est une limite que nous avons nous-mêmes fixé afin de limiter le nombre de molécules à étudier. Dépasser ce seuil n'a aucune implication à part d'augmenter le nombre de molécules à étudier. De plus, ce composé avait un score de 66 ce qui est supérieur au meilleur score obtenu avec les ligands de la littérature.

Les résultats ADME, pour ces deux molécules sont tous dans l'intervalle de valeurs recommandées (Tableau 11). La molécule sr1758 a un logP légèrement supérieur à cinq et enfreint donc une des règles de Lipinski. Mais cela reste relativement acceptable puisqu'on tolère au maximum une violation de ces règles.

N° Molécule	PM	Volume (Å ³)	LogP	SNC	LogBB	AOH (%)	PSA
sr1758	352,82	1108,22	5,14	0	-0,097	100	58,317
sr6130	336,79	971,195	3,71	0	-0,238	100	63,269

Tableau 11 : Propriétés et descripteurs ADME de sr1758 et sr6130

Ces deux molécules étaient suffisamment bien classées dans les deux criblages. De ce fait on a décidé de retenir ces deux molécules (Annexe 3), en plus des 17 retenues auparavant, pour les tests *in vitro*. On a donc au final 19 molécules à tester.

D. Conclusion et perspectives

HIF-2 α est surexprimée dans divers cancers, dont les GBM, et son expression est liée à un mauvais pronostic. De plus, elle est associée à un phénotype tumoral agressif. L'inhiber pourrait donc être une thérapeutique potentielle des GBM. Dans ce but, nous nous sommes intéressés au domaine PAS-B de HIF-2 α . En effet ce domaine est essentiel à l'hétérodimérisation de HIF-2 α avec ARNT et perturber cette hétérodimérisation permet d'inhiber l'activité de HIF-2. Le domaine PAS-B de HIF-2 α contient en son centre une cavité allostérique. Scheuermann *et al.* avaient trouvé des petites molécules capable de se lier dans cette cavité^{49,57-59} et ils ont montré que la liaison de petites molécules dans cette cavité perturbe l'hétérodimérisation et inhibe l'activité de HIF-2. Cependant l'affinité de leurs composés n'était pas suffisante pour être utilisée en thérapeutique. Il y a donc intérêt de chercher d'autres molécules avec des affinités plus importantes. Pour ce faire, nous avons utilisé des approches de criblage *in silico* (docking et pharmacophore sur la chimiothèque du CERMN) dans les structures cristallographiques du domaine PAS-B de HIF-2 α seul ou en complexe avec cinq ligands différents afin de faire la mise au point de nos procédures de criblage.

Pour la procédure de docking, nous avons observé une différence de résultat entre l'utilisation de l'apoprotéine et l'utilisation de la protéine complexée avec le ligand JN-128-022 ⁵⁹. En effet, le docking effectué avec la protéine complexée donnait des résultats de score de fit meilleurs et mieux représentatifs de l'ordre d'affinité des ligands. De plus il prédisait mieux la position correcte des ligands dans la cavité. Il a fallu donner plus de flexibilité aux résidus dont la conformation était différente entre l'apoprotéine et la protéine complexée au ligand pour que les résultats obtenus dans le docking effectué avec l'apoprotéine soient meilleurs (meilleurs scores de fit et meilleur positionnement correcte des ligands) et se rapprochent de ceux de la protéine complexée. Cette observation ne fait que confirmer les observations d'autres études ⁷¹ quant à l'importance de la prise en compte de la flexibilité de la protéine dans la procédure de docking. Nous avons donc criblé la chimiothèque du CERMN en utilisant la protéine complexée au ligand JN-128-022, et avons au final sélectionné 20 molécules à tester potentiellement *in vitro*. On cherchait à trouver des molécules thérapeutiques potentielles du GBM, or ces tumeurs sont des tumeurs du cerveau. Il fallait donc que nos produits agissent sur le cerveau. Pour cela nous avons utilisé un outil de prédiction des propriétés et descripteurs ADME afin de prédire l'activité sur le système nerveux central (SNC) des 20 molécules. Trois d'entre elles étaient inactives sur le SNC, on les a donc retirés de la liste pour les tests.

Pour le pharmacophore, nous avons eu beaucoup de difficultés à le construire. En effet, il n'existe pas d'interaction forte entre les ligands déjà identifiés et la cavité du domaine PAS-B hormis la liaison hydrogène entre le THS020 et la Tyr 307. On ne pouvait que supposer des interactions potentielles entre les ligands et la cavité et à partir de cela construire un pharmacophore manuellement. On a criblé la

chimiothèque du CERMN en utilisant ce pharmacophore et en raison du taux confiance faible qu'on accordait à celui-ci on a décidé de ne conserver que les molécules dont le classement final dans la procédure de docking et le score de fit étaient acceptables. Deux molécules correspondaient à ces critères, on les a donc rajoutés à la liste des molécules à tester après avoir vérifié qu'elles étaient bien actives sur le SNC.

A la suite de cette étude, de nouveaux composés ont été décrits qui se lient eux aussi dans la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α ⁷². Ces nouveaux composés pourraient permettre si nécessaire d'affiner le pharmacophore construit dans notre étude.

A la suite de cette étude, on aimerait effectuer de la dynamique moléculaire afin de mieux comprendre les interactions entre les ligands et la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α afin d'affiner et améliorer nos criblages. Et enfin il faudra confirmer les résultats des criblages en testant les composés sélectionnés sur des modèles cellulaires de GBM.

Bibliographie

- (1) Urbańska, K.; Sokołowska, J.; Szmidt, M.; Sysa, P. Glioblastoma Multiforme - an Overview. *Contemp. Oncol. (Poznan, Poland)* **2014**, *18* (5), 307–312.
- (2) Corroyer-Dulmont, A.; Pérès, E. A.; Petit, E.; Durand, L.; Marteau, L.; Toutain, J.; Divoux, D.; Roussel, S.; MacKenzie, E. T.; Barré, L.; et al. Noninvasive Assessment of Hypoxia with 3-[18F]-Fluoro-1-(2-Nitro-1-Imidazolyl)-2-Propanol ([18F]-FMISO): A PET Study in Two Experimental Models of Human Glioma. *Biol. Chem.* **2013**, *394* (4), 529–539.
- (3) Corroyer-Dulmont, A.; Pérès, E. A.; Petit, E.; Guillamo, J.-S.; Varoqueaux, N.; Roussel, S.; Toutain, J.; Divoux, D.; MacKenzie, E. T.; Delamare, J.; et al. Detection of Glioblastoma Response to Temozolomide Combined with Bevacizumab Based on μ MRI and μ PET Imaging Reveals [18F]-Fluoro-L-Thymidine as an Early and Robust Predictive Marker for Treatment Efficacy. *Neuro. Oncol.* **2013**, *15* (1), 41–56.
- (4) Qing, G.; Simon, M. C. Hypoxia Inducible Factor-2 α : A Critical Mediator of Aggressive Tumor Phenotypes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2009**, *19* (1), 60–66.
- (5) Semenza, G. L. HIF-1 and Human Disease: One Highly Involved Factor. *Genes & Dev.* **2000**, *14* (16), 1983–1991.
- (6) Seidel, S.; Garvalov, B. K.; Wirta, V.; von Stechow, L.; Schänzer, A.; Meletis, K.; Wolter, M.; Sommerlad, D.; Henze, A.-T.; Nistér, M.; et al. A Hypoxic Niche Regulates Glioblastoma Stem Cells through Hypoxia Inducible Factor 2 Alpha. *Brain* **2010**, *133* (Pt 4), 983–995.
- (7) Omuro, A.; DeAngelis, L. M. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA* **2013**, *310* (17), 1842–1850.
- (8) Agnihotri, S.; Burrell, K. E.; Wolf, A.; Jalali, S.; Hawkins, C.; Rutka, J. T.; Zadeh, G. Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **2013**, *61* (1), 25–41.
- (9) Seymour, T.; Nowak, A.; Kakulas, F. Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 159.
- (10) Safa, A. R.; Saadatzadeh, M. R.; Cohen-Gadol, A. A.; Pollok, K. E.; Bijangi-Vishehsaraei, K. Glioblastoma Stem Cells (GSCs) Epigenetic Plasticity and Interconversion between Differentiated Non-GSCs and GSCs. *Genes Dis.* **2015**, *2* (2), 152–163.
- (11) Moore, N.; Lyle, S. Quiescent, Slow-Cycling Stem Cell Populations in Cancer: A Review of the Evidence and Discussion of Significance. *J. Oncol.* **2011**, *2011*.

- (12) Chen, J.; Li, Y.; Yu, T.-S.; McKay, R. M.; Burns, D. K.; Kernie, S. G.; Parada, L. F. A Restricted Cell Population Propagates Glioblastoma Growth after Chemotherapy. *Nature* **2012**, *488* (7412), 522–526.
- (13) Ostrom, Q. T.; Bauchet, L.; Davis, F. G.; Deltour, I.; Fisher, J. L.; Langer, C. E.; Pekmezci, M.; Schwartzbaum, J. A.; Turner, M. C.; Walsh, K. M.; et al. The Epidemiology of Glioma in Adults: A “State of the Science” Review. *Neuro. Oncol.* **2014**, *16* (7), 896–913.
- (14) Thakkar, J. P.; Dolecek, T. A.; Horbinski, C.; Ostrom, Q. T.; Lightner, D. D.; Barnholtz-Sloan, J. S.; Villano, J. L. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2014**, *23* (10), 1985–1996.
- (15) The INTERPHONE Study Group. Brain Tumour Risk in Relation to Mobile Telephone Use: Results of the INTERPHONE International Case-Control Study. *Int. J. Epidemiol.* **2010**, *39* (3), 675–694.
- (16) Aydin, D.; Feychting, M.; Schüz, J.; Tynes, T.; Andersen, T. V.; Schmidt, L. S.; Poulsen, A. H.; Johansen, C.; Prochazka, M.; Lannering, B.; et al. Mobile Phone Use and Brain Tumors in Children and Adolescents: A Multicenter Case-Control Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **2011**, *103* (16), 1264–1276.
- (17) Visser, O.; Ardanaz, E.; Botta, L.; Sant, M.; Tavilla, A.; Minicozzi, P. Survival of Adults with Primary Malignant Brain Tumours in Europe; Results of the EURO CARE-5 Study. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51* (15), 2231–2241.
- (18) Wen, P. Y. Malignant Gliomas in Adults. *NEJM* **2008**, *36*, 99–120.
- (19) Stupp R, Hottinger A, Hegi ME, W. M. Diagnostic et Traitement Des Gliomes. *Forum Med Suisse* **2013**, *13* (22), 421–426.
- (20) Martin-Duverneuil, N.; Guillevin, R.; Chiras, J. [Imaging of Gliomas]. *Cancer Radiother.* **2008**, *12* (6-7), 669–675.
- (21) Walker, M. D.; Green, S. B.; Byar, D. P.; Alexander Jr., E.; Alexander, E.; Batzdorf, U.; Brooks, W. H.; Hunt, W. E.; MacCarty, C. S.; Mahaley, M. S.; et al. Randomized Comparisons of Radiotherapy and Nitrosoureas for the Treatment of Malignant Glioma After Surgery. *N. Engl. J. Med.* **1980**, *303* (23), 1323–1329.
- (22) Roger Stupp, M.D., Warren P. Mason, M.D., Martin J. van den Bent, M.D., Michael Weller, M.D., Barbara Fisher, M.D., Martin J.B. Taphoorn, M.D., Karl Belanger, M.D., Alba A. Brandes, M.D., Christine Marosi, M.D., Ulrich Bogdahn, M.D., Jürgen Curschmann, M., M. D. for the E. O. for R. and T. of C. B. T. and R. G. and the N. C. I. of C. C. T. G. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, No. 352, 987–996.

- (23) Stupp, R.; Hegi, M. E.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Taphoorn, M. J. B.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; et al. Effects of Radiotherapy with Concomitant and Adjuvant Temozolomide versus Radiotherapy Alone on Survival in Glioblastoma in a Randomised Phase III Study: 5-Year Analysis of the EORTC-NCIC Trial. *Lancet. Oncol.* **2009**, *10* (5), 459–466.
- (24) Xing, W.; Shao, C.; Qi, Z.; Yang, C.; Wang, Z. The Role of Gliadel Wafers in the Treatment of Newly Diagnosed GBM: A Meta-Analysis. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 3341–3348.
- (25) Hegi, M. E.; Diserens, A.-C.; Gorlia, T.; Hamou, M.-F.; de Tribolet, N.; Weller, M.; Kros, J. M.; Hainfellner, J. a; Mason, W.; Mariani, L.; et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352* (10), 997–1003.
- (26) Raizer, J. J.; Giglio, P.; Hu, J.; Groves, M.; Merrell, R.; Conrad, C.; Phuphanich, S.; Puduvalli, V. K.; Lohin, M.; Paleologos, N.; et al. A Phase II Study of Bevacizumab and Erlotinib after Radiation and Temozolomide in MGMT Unmethylated GBM Patients. *J. Neurooncol.* **2015**, 1–8.
- (27) Preusser, M.; de Ribaupierre, S.; Wöhrer, A.; Erridge, S. C.; Hegi, M.; Weller, M.; Stupp, R. Current Concepts and Management of Glioblastoma. *Ann. Neurol.* **2011**, *70* (1), 9–21.
- (28) Brada, M.; Stenning, S.; Gabe, R.; Thompson, L. C.; Levy, D.; Rampling, R.; Erridge, S.; Saran, F.; Gattamaneni, R.; Hopkins, K.; et al. Temozolomide versus Procarbazine, Lomustine, and Vincristine in Recurrent High-Grade Glioma. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28* (30), 4601–4608.
- (29) Kreisl, T. N.; Kim, L.; Moore, K.; Duic, P.; Royce, C.; Stroud, I.; Garren, N.; Mackey, M.; Butman, J. A.; Camphausen, K.; et al. Phase II Trial of Single-Agent Bevacizumab Followed by Bevacizumab plus Irinotecan at Tumor Progression in Recurrent Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27* (5), 740–745.
- (30) Friedman, H. S.; Prados, M. D.; Wen, P. Y.; Mikkelsen, T.; Schiff, D.; Abrey, L. E.; Yung, W. K. A.; Paleologos, N.; Nicholas, M. K.; Jensen, R.; et al. Bevacizumab Alone and in Combination with Irinotecan in Recurrent Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27* (28), 4733–4740.
- (31) Xu, Y.-Y.; Gao, P.; Sun, Y.; Duan, Y.-R. Development of Targeted Therapies in Treatment of Glioblastoma. *Cancer Biol. Med.* **2015**, *12* (3), 223–237.
- (32) Wang, G. L.; Semenza, G. L. Purification and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor 1. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (3), 1230–1237.
- (33) Dann, C. E.; Bruick, R. K. Dioxygenases as O₂-Dependent Regulators of the Hypoxic Response Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338* (1), 639–647.

- (34) Schödel, J.; Oikonomopoulos, S.; Ragoussis, J.; Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J.; Mole, D. R. High-Resolution Genome-Wide Mapping of HIF-Binding Sites by ChIP-Seq. *Blood* **2011**, *117* (23), e207–e217.
- (35) Loboda, A.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. HIF-1 versus HIF-2--Is One More Important than the Other? *Vascul. Pharmacol.* **2012**, *56* (5-6), 245–251.
- (36) Koh, M. Y.; Powis, G. Passing the Baton: The HIF Switch. *Trends Biochem. Sci.* **2012**, *37* (9), 364–372.
- (37) Raspaglio, G.; Petrillo, M.; Martinelli, E.; Li Puma, D. D.; Mariani, M.; De Donato, M.; Filippetti, F.; Mozzetti, S.; Prislei, S.; Zannoni, G. F.; et al. Sox9 and Hif-2 α Regulate TUBB3 Gene Expression and Affect Ovarian Cancer Aggressiveness. *Gene* **2014**, *542* (2), 173–181.
- (38) Li, Z.; Bao, S.; Wu, Q.; Wang, H.; Eyler, C.; Sathornsumetee, S.; Shi, Q.; Cao, Y.; Lathia, J.; McLendon, R. E.; et al. Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell* **2009**, *15* (6), 501–513.
- (39) Pietras, A.; Katz, A. M.; Ekström, E. J.; Wee, B.; Halliday, J. J.; Pitter, K. L.; Werbeck, J. L.; Amankulor, N. M.; Huse, J. T.; Holland, E. C. Osteopontin-CD44 Signaling in the Glioma Perivascular Niche Enhances Cancer Stem Cell Phenotypes and Promotes Aggressive Tumor Growth. *Cell Stem Cell* **2014**, *14* (3), 357–369.
- (40) Koh, M. Y.; Lemos, R.; Liu, X.; Powis, G. The Hypoxia-Associated Factor Switches Cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -Dependent Signaling Promoting Stem Cell Characteristics, Aggressive Tumor Growth and Invasion. *Cancer Res.* **2011**, *71* (11), 4015–4027.
- (41) Katsetos, C. D.; Dráberová, E.; Legido, A.; Dumontet, C.; Dráber, P. Tubulin Targets in the Pathobiology and Therapy of Glioblastoma Multiforme. I. Class III B-Tubulin. *J. Cell. Physiol.* **2009**, *221* (3), 505–513.
- (42) Kavallaris, M. Microtubules and Resistance to Tubulin-Binding Agents. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10* (3), 194–204.
- (43) Bordji, K.; Grandval, A.; Cuhna-Alves, L.; Lechapt-Zalcman, E.; Bernaudin, M. Hypoxia-Inducible Factor-2 α (HIF-2 α), but Not HIF-1 α , Is Essential for Hypoxic Induction of Class III B-Tubulin Expression in Human Glioblastoma Cells. *FEBS J.* **2014**, *281* (23), 5220–5236.
- (44) Heddleston, J. M.; Li, Z.; McLendon, R. E.; Hjelmeland, A. B.; Rich, J. N. The Hypoxic Microenvironment Maintains Glioblastoma Stem Cells and Promotes Reprogramming towards a Cancer Stem Cell Phenotype. *Cell Cycle* **2014**, *8* (20), 3274–3284.
- (45) Keith, B.; Simon, M. C. Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer. *Cell* **2007**, *129* (3), 465–472.

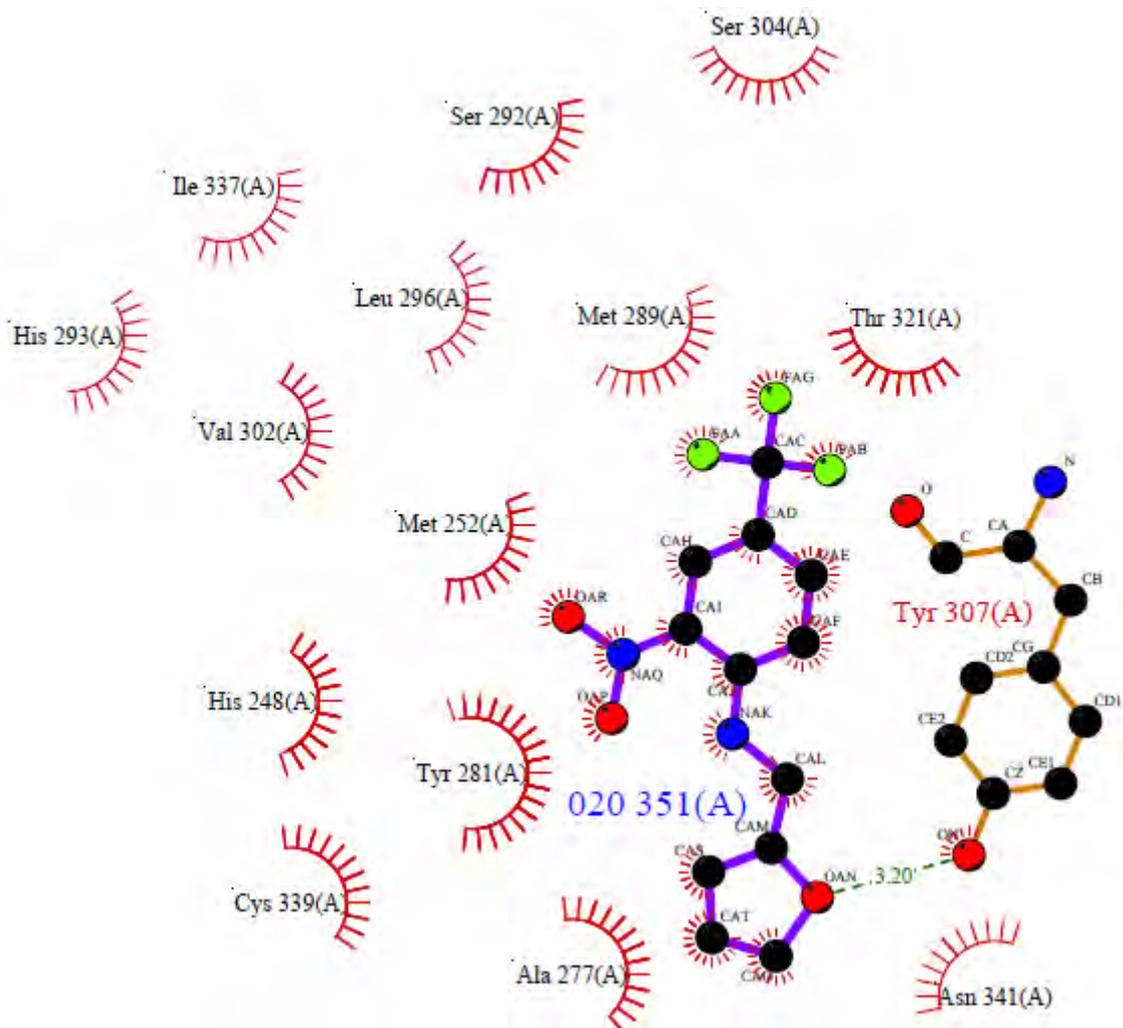
- (46) Yang, J.; Zhang, L.; Erbel, P. J. A.; Gardner, K. H.; Ding, K.; Garcia, J. A.; Bruick, R. K. Functions of the Per/ARNT/Sim Domains of the Hypoxia-Inducible Factor. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (43), 36047–36054.
- (47) Taylor, B. L.; Zhulin, I. B. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63* (2), 479–506.
- (48) Cardoso, R.; Love, R.; Nilsson, C. L.; Bergqvist, S.; Nowlin, D.; Yan, J.; Liu, K. K.-C.; Zhu, J.; Chen, P.; Deng, Y.-L.; et al. Identification of Cys255 in HIF-1 α as a Novel Site for Development of Covalent Inhibitors of HIF-1 α /ARNT PasB Domain Protein-Protein Interaction. *Protein Sci.* **2012**, *21* (12), 1885–1896.
- (49) Scheuermann, T. H.; Tomchick, D. R.; Machius, M.; Guo, Y.; Bruick, R. K.; Gardner, K. H. Artificial Ligand Binding within the HIF2 α PAS-B Domain of the HIF2 Transcription Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (2), 450–455.
- (50) Elkins, J. M.; Hewitson, K. S.; McNeill, L. a.; Seibel, J. F.; Schlemminger, I.; Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J.; Schofield, C. J. Structure of Factor-Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Reveals Mechanism of Oxidative Modification of HIF-1 α . *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (3), 1802–1806.
- (51) Buckley, D. L.; Van Molle, I.; Gareiss, P. C.; Tae, H. S.; Michel, J.; Noblin, D. J.; Jorgensen, W. L.; Ciulli, A.; Crews, C. M. Targeting the von Hippel-Lindau E3 Ubiquitin Ligase Using Small Molecules to Disrupt the VHL/HIF-1 α Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (10), 4465–4468.
- (52) Wu, D.; Potluri, N.; Lu, J.; Kim, Y.; Rastinejad, F. Structural Integration in Hypoxia-Inducible Factors. *Nature* **2015**, *524* (7565), 303–308.
- (53) Keith, B.; Johnson, R. S.; Simon, M. C. HIF1 α and HIF2 α : Sibling Rivalry in Hypoxic Tumour Growth and Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *12* (1), 9–22.
- (54) Erbel, P. J. A.; Card, P. B.; Karakuzu, O.; Bruick, R. K.; Gardner, K. H. Structural Basis for PAS Domain Heterodimerization in the Basic Helix--Loop--Helix-PAS Transcription Factor Hypoxia-Inducible Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (26), 15504–15509.
- (55) Card, P. B.; Erbel, P. J. A.; Gardner, K. H. Structural Basis of ARNT PAS-B Dimerization: Use of a Common Beta-Sheet Interface for Hetero- and Homodimerization. *J. Mol. Biol.* **2005**, *353* (3), 664–677.
- (56) Binkowski, T. A. CASTp: Computed Atlas of Surface Topography of Proteins. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (13), 3352–3355.
- (57) Key, J.; Scheuermann, T. H.; Anderson, P. C.; Daggett, V.; Gardner, K. H. Principles of Ligand Binding within a Completely Buried Cavity in HIF2 α PAS-B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (48), 17647–17654.

- (58) Rogers, J. L.; Bayeh, L.; Scheuermann, T. H.; Longgood, J.; Key, J.; Naidoo, J.; Melito, L.; Shokri, C.; Frantz, D. E.; Bruick, R. K.; et al. Development of Inhibitors of the PAS-B Domain of the HIF-2 α Transcription Factor. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (4), 1739–1747.
- (59) Scheuermann, T. H.; Li, Q.; Ma, H.-W.; Key, J.; Zhang, L.; Chen, R.; Garcia, J. A.; Naidoo, J.; Longgood, J.; Frantz, D. E.; et al. Allosteric Inhibition of Hypoxia Inducible Factor-2 with Small Molecules. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9* (4), 271–276.
- (60) Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Lesnard, A.; Agondanou, J. H.; Dupont, N.; Godard, A. M.; Stiebing, S.; Rochais, C.; Fabis, F.; Dallemagne, P.; Bureau, R.; et al. Virtual Screening Discovery of New Acetylcholinesterase Inhibitors Issued from CERMN Chemical Library. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50* (3), 422–428.
- (61) Lepailleur, A.; Freret, T.; Lemaître, S.; Boulouard, M.; Dauphin, F.; Hirschberger, A.; Dulin, F.; Lesnard, A.; Bureau, R.; Rault, S. Dual Histamine H3R/serotonin 5-HT4R Ligands with Antiamnesic Properties: Pharmacophore-Based Virtual Screening and Polypharmacology. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (6), 1773–1784.
- (62) Sousa, S. F.; Fernandes, P. a; Ramos, M. J. Protein Ligand Docking: Current Status and Future Challenges. *Bioinformatics* **2006**, *26* (February), 15–26.
- (63) Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66* (1), 334–395.
- (64) Søndergaard, C. R.; Olsson, M. H. M.; Rostkowski, M.; Jensen, J. H. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of P K a Values. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (7), 2284–2295.
- (65) Olsson, M. H. M.; Søndergaard, C. R.; Rostkowski, M.; Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical P K a Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (2), 525–537.
- (66) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular Recognition of Receptor Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245* (1), 43–53.
- (67) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267* (3), 727–748.
- (68) Jorgensen, W. L. The Many Roles of Computation in Drug Discovery. *Science* **2004**, *303* (5665), 1813–1818.
- (69) Zaccheddu, M.; Filippi, C.; Buda, F. Anion-Pi and Pi-Pi Cooperative Interactions Regulating the Self-Assembly of Nitrate-Triazine-Triazine Complexes. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (7), 1627–1632.

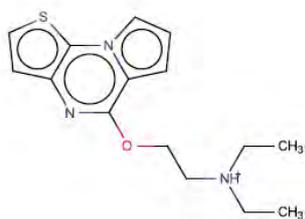
- (70) Maheswari, P. U.; Modec, B.; Pevec, A.; Kozlevcar, B.; Massera, C.; Gamez, P.; Reedijk, J. Crystallographic Evidence of Nitrate- π Interactions Involving the Electron-Deficient 1,3,5-Triazine Ring. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (17), 6637–6645.
- (71) Sinko, W.; Lindert, S.; McCammon, J. A. Accounting for Receptor Flexibility and Enhanced Sampling Methods in Computer-Aided Drug Design. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81* (1), 41–49.
- (72) Scheuermann, T. H.; Stroud, D.; Sleet, C. E.; Bayeh, L.; Shokri, C.; Wang, H.; Caldwell, C. G.; Longgood, J.; MacMillan, J. B.; Bruick, R. K.; et al. Isoform-Selective and Stereoselective Inhibition of Hypoxia Inducible Factor-2. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (15), 5930–5941.

ANNEXES

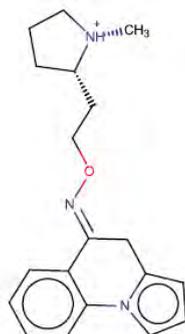
Annexe 1 : Interactions entre le ligand THS020 et la cavité du domaine PAS-B de HIF-2 α



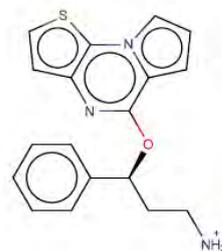
Annexe 2 : Structures des composés sélectionnés par docking



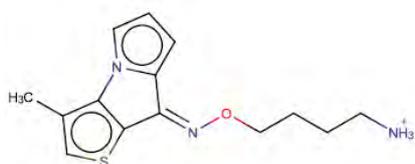
Mr19829



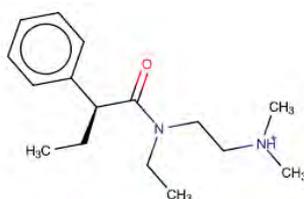
Mr19812



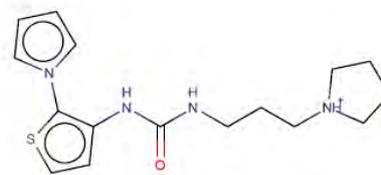
M23235



M19866



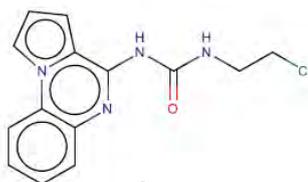
Mr16793



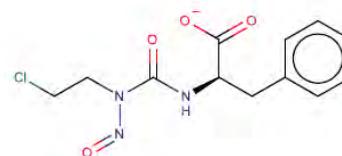
Mr23296



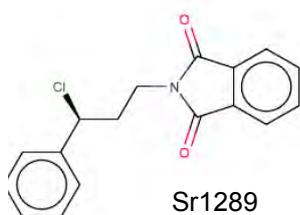
Mr19463



Sr1061



Sr1147



Sr1289



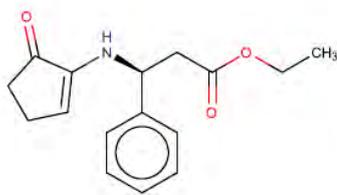
Sr1418



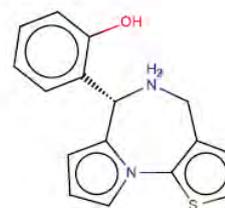
Sr1782



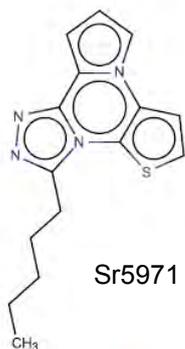
Sr3595



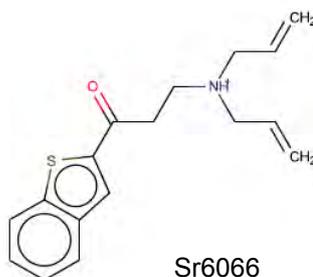
Sr4978



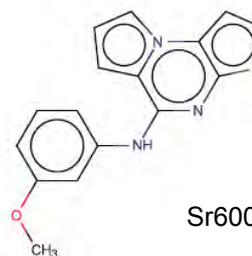
Mr8800



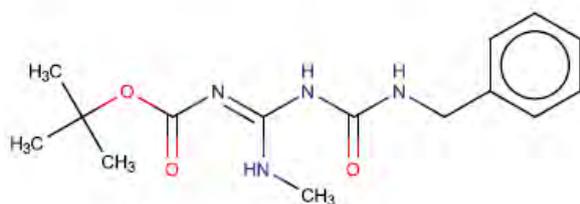
Sr5971



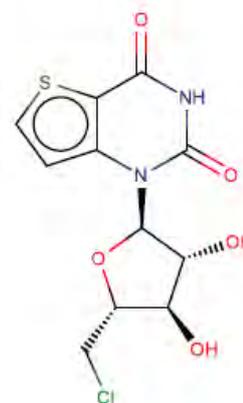
Sr6066



Sr6004



HM705

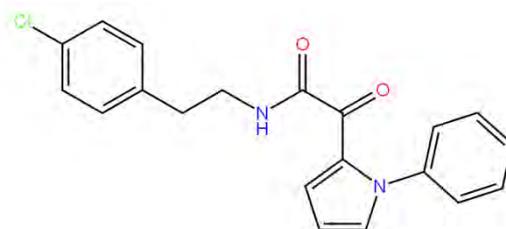


Sr6236

Annexe 3 : Structure des composés sélectionnés par criblage du pharmacophore



sr6130



sr1758

Treating Glioblastoma multiform : an example of molecular modelisation application to find an HIF-2 α inhibitor

Glioblastoma multiform (GBM) are very aggressive brain tumors with poor survival (mean survival of 15 months) despite treatment associating surgery, radiotherapy and chemotherapy. Hypoxia (low levels of oxygen), the hallmark of GBM, is one of the causes of its aggressiveness and resistance to therapies. The HIF (Hypoxia inducible factor) proteins are the principal regulators of hypoxia and hence play also a major role in tumor aggressiveness. The HIF proteins are heterodimers with a HIF- α subunit and an ARNT subunit also called HIF- β . There are three isoforms of HIF- α of whom HIF-1 α and HIF-2 α are the most studied. HIF-2 α is associated, more than HIF-1 α , with aggressive tumor phenotype. Therefore inhibiting HIF-2 α might be a potential therapeutic treatment of GBM. There is within the HIF-2 α PAS-B domain an allosteric cavity where small molecules are able to bind leading to a disruption of the heterodimerization of HIF-2 α and ARNT and thus inhibiting HIF-2 activity. These molecules are selective of HIF-2 α but their affinities are too low to be used in targeted therapies. Therefore it is necessary to find new molecules with higher affinities. In order to do this, we performed *in silico* screening approaches (docking and pharmacophore on the CERMN chemical library) using the crystal structures of the HIF-2 α PAS-B domain alone or bound with five different ligands to adjust the procedure. After evaluating their ADME properties and descriptors, we selected at the end 19 molecules for *in vitro* validation.

RESUME

Les glioblastomes multiformes (GBM) sont des tumeurs cérébrales très agressives et dont la moyenne de survie n'est que de 15 mois malgré une thérapeutique associant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. L'hypoxie, caractéristique principale des GBM, est une des causes de cette agressivité et de la résistance aux thérapies. Les protéines HIF (Hypoxia-inducible-factor), régulateurs principaux de l'hypoxie, jouent donc un rôle important dans l'agressivité de ces tumeurs. Les protéines HIF sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité HIF- α et d'une sous-unité ARNT, aussi appelé HIF- β . Il existe 3 isoformes de HIF- α dont HIF-1 α et HIF-2 α sont les plus étudiées. HIF-2 α est associé, plus que HIF-1 α , à un phénotype tumoral agressif. Inhiber sélectivement HIF-2 α semble donc une perspective intéressante pour traiter les GBM. Il existe dans le domaine PAS-B de HIF-2 α , une cavité allostérique où la fixation de petites molécules est capable de perturber l'hétérodimérisation de HIF-2 α à ARNT et donc capable d'inhiber l'activité de HIF-2. Ces molécules sont sélectives de HIF-2 α mais pas suffisamment affines pour pouvoir être utilisées en thérapie ciblée. Il fallait donc trouver d'autres nouvelles molécules avec des affinités meilleures. Pour ce faire, nous avons utilisé des approches de criblage *in silico* (docking et pharmacophore sur la chimiothèque du CERMN) et nous avons utilisé les structures cristallographiques du domaine PAS-B de HIF-2 α seul ou en complexe avec cinq ligands différents afin de faire la mise au point des procédures de criblage. Au final, après une évaluation de leurs propriétés et descripteurs ADME, nous avons sélectionnés 19 molécules à tester *in vitro*.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative :

Pharmacie

MOTS-CLES : Glioblastome, traitements, hypoxie, HIF-2 α , modélisation moléculaire

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR :

UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
31062 TOULOUSE cedex 09 - France

Directeurs de thèse : Dr. COLLOC'H Nathalie, unité ISTCT, UMR 6301, Caen
Pr. SOPKOVA-DE OLIVEIRA SANTOS Jana, CERMN, Caen