
I. Techniques d'études des interactions protéine / protéine

Les protéines agissent rarement de façon isolée. La plupart d'entre elles réalisent leurs fonctions biologiques en interagissant avec d'autres protéines. Ces interactions correspondent à des contacts physiques entre les protéines qui ont lieu dans la cellule et sont appelées interactions protéine-protéine (PPI). Elles sont fortement impliquées dans la formation de structures macromoléculaires, dans la signalisation, dans la régulation et dans les différentes voies métaboliques.

Les signaux extra-cellulaires, par exemple, sont transmis à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de telles interactions. Ce processus, appelé transduction du signal, joue un rôle très important dans de nombreux processus biologiques, ainsi que dans plusieurs pathologies, dont le cancer.

I.1. Détection et caractérisation des interactions protéiques

Plusieurs techniques ont été développées pour étudier les interactions protéine-protéine, la plupart de ces dernières font appel aux gènes rapporteurs, ainsi nous allons introduire quelques généralités sur le gène rapporteur.

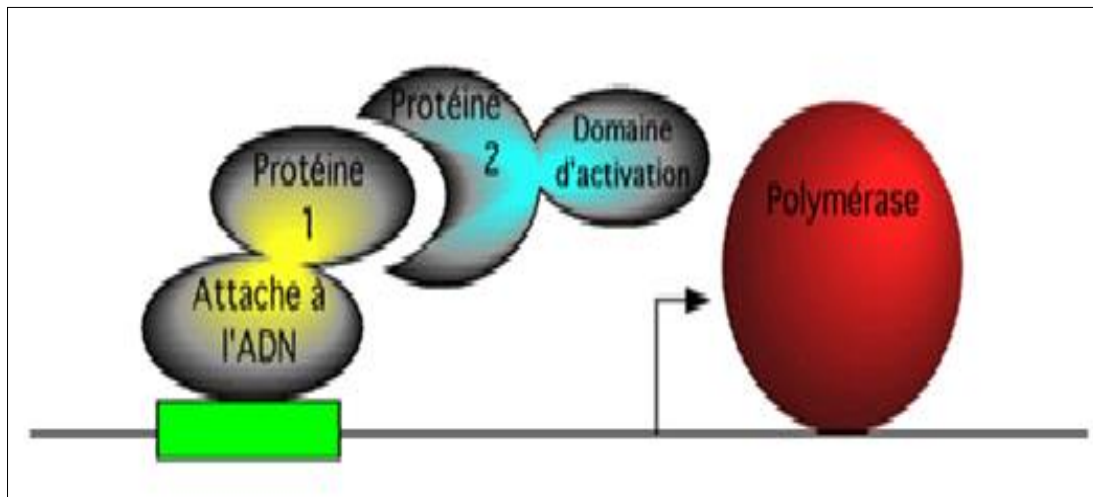
- Double hybride

Cette méthode ne permet de déterminer que des interactions binaires entre protéines. La méthode repose sur l'utilisation d'un facteur de transcription modulaire chez la levure, ayant un domaine d'activation de la transcription et un domaine de liaison à l'ADN (figure 1).

Pour évaluer l'interaction entre une protéine X (appelée appât) et une protéine Y (appelée cible), on commence par en faire des hybrides par génie génétique: un premier hybride entre la protéine appât et un domaine de fixation à l'ADN, et un second entre la protéine cible et un domaine d'activation de la transcription.

Construction des hybrides

La séquence codant la protéine 1 (l'appât) sera fusionnée à la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 clonée dans un plasmide La proie (protéine Y) correspondra soit à l'ADNc de la protéine dont on veut tester son interaction avec la protéine



X,
soit
une

banque d'ADNc si aucune expérience préliminaire n'a encore été réalisée. Sa séquence sera fusionnée avec le domaine d'activation de la transcription de Gal4 et seront clonés dans un plasmide. Le gène rapporteur, précédé du promoteur portant les sites de liaison de Gal 4 (répétés 6x), est inséré dans le génome de la levure. Parmi les sites de liaison de Gal4, l'UAS (*Upstream Activated Sequence*) de Gal1 est souvent utilisé. Les deux plasmides sont co-transformés dans la souche de levure appropriée présentant le gène rapporteur sous la dépendance d'une UAS de Gal4 et déficiente pour les gènes d'auxotrophie utilisés comme marqueurs de sélection.

Figure 1: Système de double hybride de la levure (Chen et Xu, 2003).

Un facteur de transcription est découpé en deux parties : un domaine de fixation sur l'ADN (BD ou *Binding Domain*) et un domaine d'activation (AD ou *Activation Domain*). Chaque protéine d'intérêt est couplée à l'un des domaines et si les deux protéines interagissent ensemble, le facteur de transcription devient actif et le gène rapporteur est transcrit.

Si les deux protéines entrent en contact et le gène rapporteur sera transcrit (Figure 2). L'hybride 1 va se lier au promoteur.

Si les protéines appât et cible ont réellement de l'affinité l'une pour l'autre, l'hybride 2 va entrer en contact avec l'hybride 1 et se trouver positionné au promoteur lui aussi, là où son domaine d'activation de la transcription (le facteur de transcription sera reconstitué) stimulera l'expression du gène rapporteur.

Le gène rapporteur GAL1-lacZ, qui encode pour la β -galactosidase, est alors transcrit. Cette enzyme transforme un substrat soluble et incolore X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) en un composé bleu insoluble. Le X-gal, est un dérivé du galactose, lié à un noyau indole. Il peut être hydrolysé par la β -galactosidase, produit du gène LacZ, en formant un composé bleu, ce qui permet de détecter la présence de cette enzyme (Plessis et Camonis, 1994).

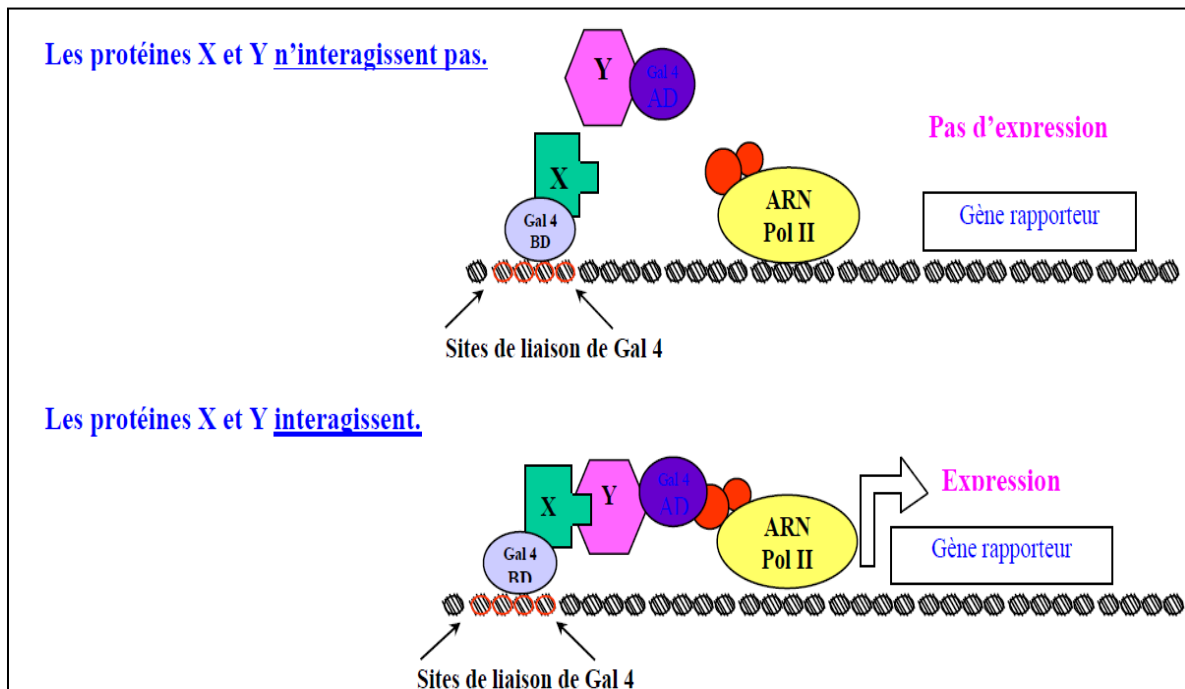


Figure 2: résultats de la méthode double hybride (Plessis et Camonis, 1994).

Cette technique étant utilisée *in vivo*, elle permet de détecter des interactions transitoires et instables. Cependant, le principal inconvénient de cette méthode concerne les taux importants de faux positifs (Figure 3) (interactions détectées expérimentalement mais qui n'existent pas) et de faux négatifs (interactions existantes qui n'ont pas été détectées par la méthode). Ces erreurs découlent en partie du fait que les interactions sont testées dans le noyau, or ce n'est pas le compartiment d'origine de beaucoup de protéines.

Avantages

- Signal facile à mettre en place (biologie moléculaire)
- Possibilité de faire des approches globales

Inconvénients

- L'interaction physique a lieu hors contexte
- Cette méthode donne de nombreux faux positifs.

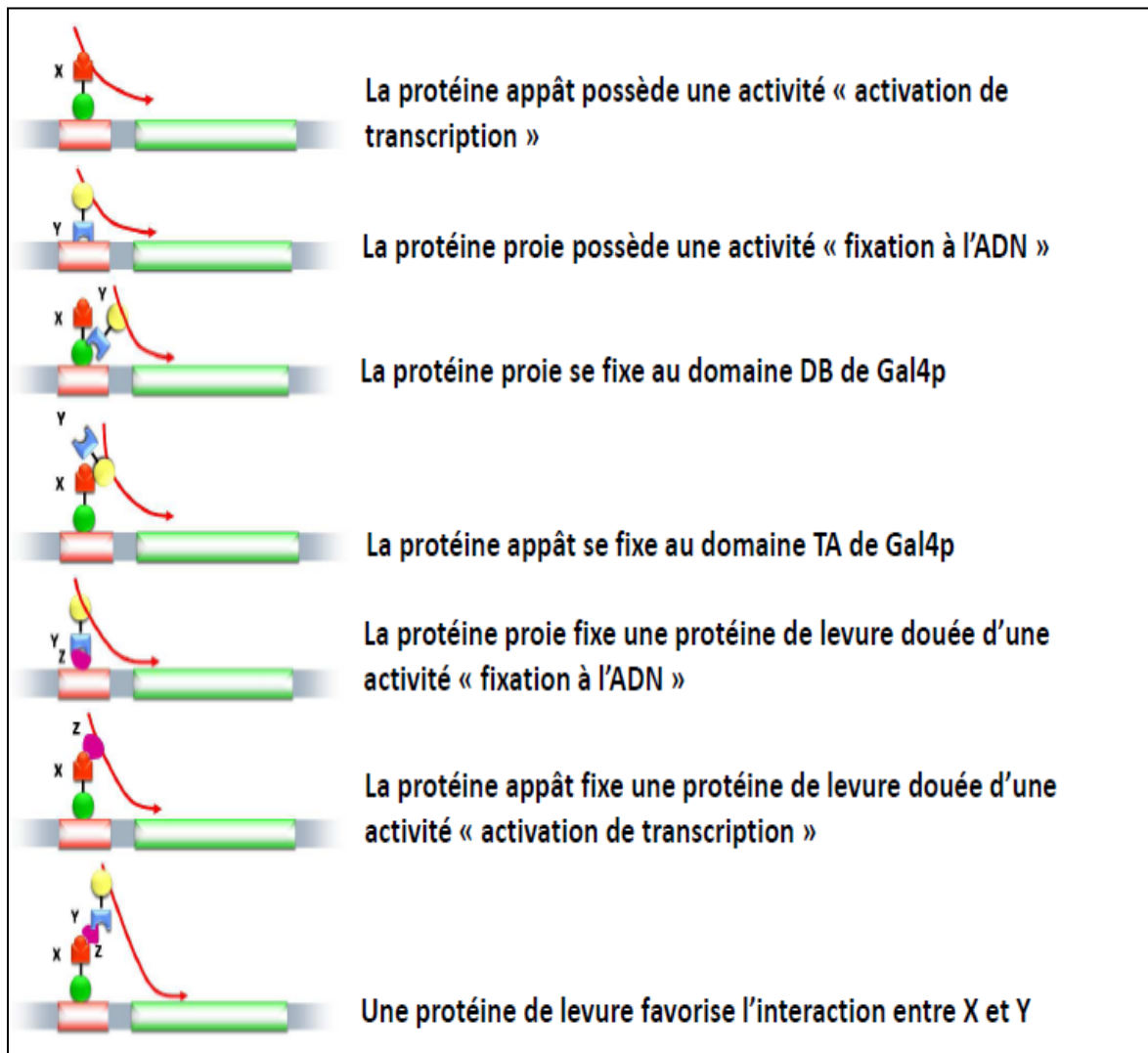


Figure 3 : Les faux positifs du système double hybride (Joung *et al.*, 2000).

b- Protein-fragment Complementation Assay (PCA)

Les systèmes de complémentation par fragments de protéine, PCA est une technique consistant à vérifier l'interaction protéine-protéine en couplant chacune des protéines d'intérêt avec une des sous-unités d'une protéine reportrice (luciférase ou autres). L'activité du rapporteur n'est restaurée que lors de l'association des deux protéines d'intérêt. Cela signifie que les deux protéines interagissent et ont permis aux 2 sous unités de la luciférase d'être suffisamment proche pour se compléter (Rossi *et al.*, 1997) (Figure 4).

Les stratégies de complémentation de fragment de protéine (parfois appelés rapporteurs split) se basent sur plusieurs protéines et enzymes, y compris la dihydrofolate reductase (DHFR), β -galactosidase, β -lactamase, protéine GFP et la luciférase. Cela ont été utilisées pour étudier les interactions protéine-protéine dans des cellules mammaliennes (Villalobos *et al.*, 2007 ; Hu et Kerppola, 2003).

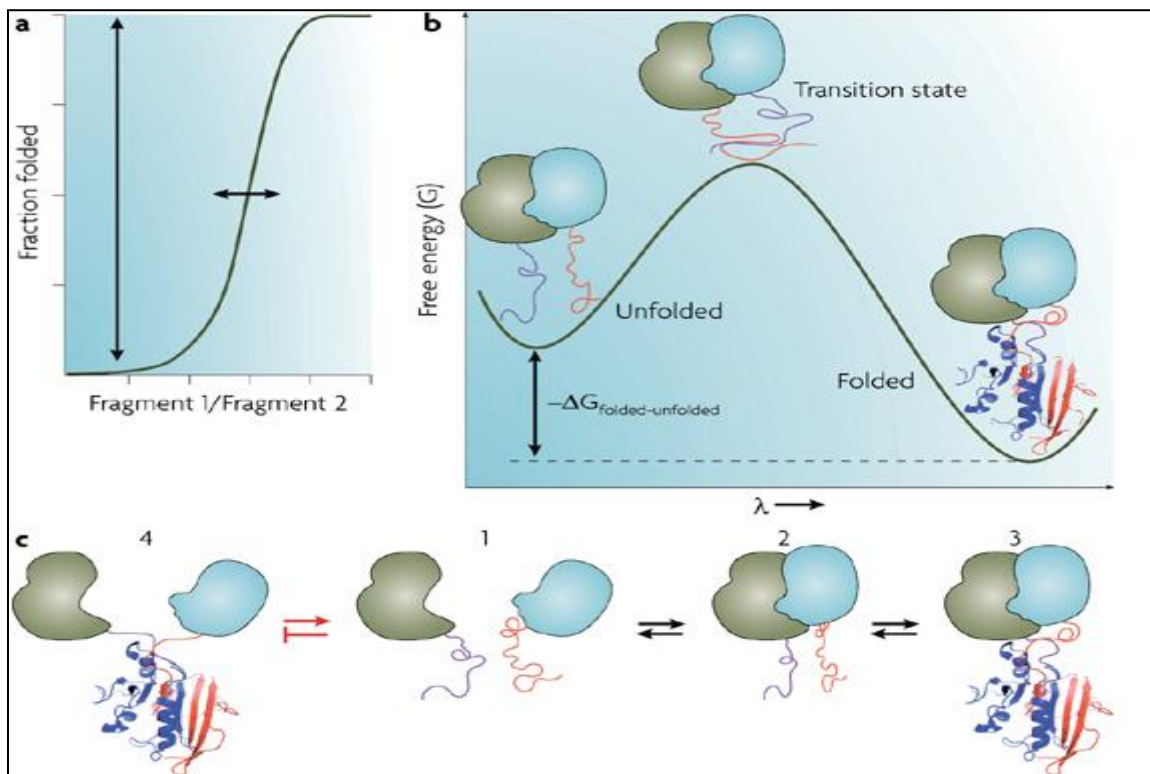


Figure 4. Principe de la PCA.

La détection des interactions peut ensuite se faire soit directement par fluorescence, par bioluminescence, par colorimétrie ou survie de la cellule, soit indirectement en passant par l'activation d'un gène rapporteur.

Exemple : Rapporteur de la β -Galactosidase (Figure 5)

L'association des polypeptides X et Y permet la liaison des fragments T25 et T18 et ainsi la restauration de l'activité du rapporteur qui activera la synthèse de l'APMc. Celle-ci se liera

à CAP (Catabolite Activator Protein) permettant ainsi l'expression du gène de la β -galactosidase (Figure 5) (Villalobos et *al.*, 2007).

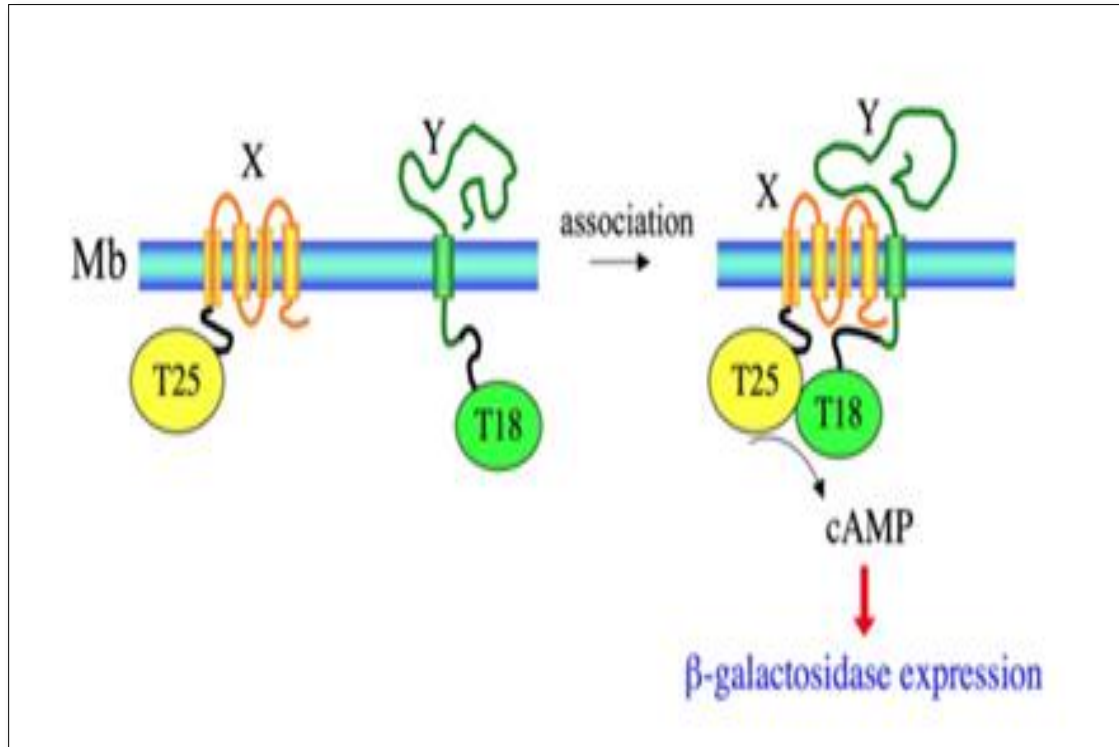


Figure 5: Expression du rapporteur de la β -galactosidase (Villalobos et *al.*, 2007).

Ce système a été perfectionné en rajoutant sur chacune des constructions des séquences de l'[intégrine](#) entre la protéine et la sous unité catalytique. L'intégrine, qui est une protéine [ligase](#), va faire une liaison covalente entre les 2 protéines et reformer la luciférase.

Cependant, toutes les protéines ne peuvent être utilisées comme rapporteuse, en effet, il faut qu'elles possèdent des domaines bien distincts qui soient solubles lorsqu'ils sont séparés l'un de l'autre.

c) Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

La FRET (*Forster Resonance Energy*) est une technique qui permet de détecter la proximité de deux molécules fluorescentes. La première, (dite le « donneur »), est excitée par une longueur d'onde λ_1 . Le donneur va libérer des photons de longueur d'onde λ_2 , qu'on peut détecter. Il peut aussi transférer par résonance une partie de son énergie d'excitation à la seconde molécule fluorescente (le « receveur ») qui libérera aussi des photons, mais à une

longueur d'onde qui lui est propre, λ_3 (Figure 6). Le donneur et le receveur doivent être séparés par 10-100 Angstroms (Å) pour qu'il y ait transfert d'énergie entre eux. Le spectre d'absorption de l'accepteur doit chevaucher le spectre d'émission du donneur ; et les orientations des dipôles du donneur et de l'accepteur doivent être parallèles (Villalobos et *al.*, 2007) (Figure 7).

La distance à laquelle le transfert est efficace à 50% est appelé distance de Förster et varie selon les agents fluorescents utilisés.

Une forme de FRET utilise des protéines fluorescentes comme donneur et accepteur ; cette approche permet d'utiliser la FRET dans un contexte *in vivo* (Trugnan et *al.*, 2004 ; Leudet et *al.*, 2007). On lui donne parfois le nom de BRET pour Bioluminescent Resonance Energy Transfer. Cette technique est utilisée dans les cellules vivantes en incitant celles-ci à produire des protéines de fusion avec des domaines naturellement fluorescents, comme la GFP et ces variantes que sont la ECFP ou la EYFP (De et *al.*, 2007 ; Villalobos et *al.*, 2007).

Selon qu'elle soit appliquée *in vitro* ou *in vivo*, la mesure du transfert de fluorescence par résonance peut se faire soit par méthode fluorimètre ou par microscope à fluorescence (Trugnan et *al.*, 2004).

La FRET permet une mesure d'interaction intra- et inter-moléculaires, suivre le changement conformationnel des protéines et le fonctionnement des molécules de signalisation cellulaire, l'étude de l'état de phosphorylation des protéines et l'étude de l'activité enzymatiques.

Avantage:

- Etude dynamique en temps réel.
- Applicable *in vivo* dans le système cellulaire original.
- Peut être couplé à un signal biologique.
- Applicable dans tous les compartiments cellulaires.

Par contre la création de protéines chimériques peut modifier les interactions et nécessite la surexpression des protéines testées.

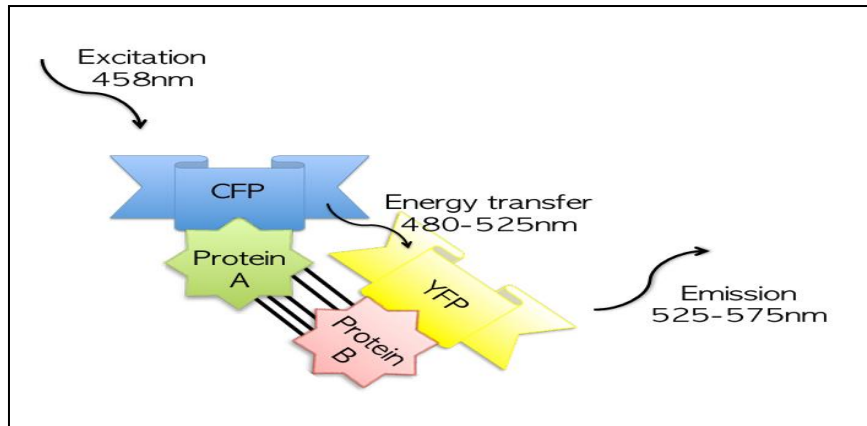


Figure 6: Révélation de l'interaction entre la protéine A et B par la FRET (Trugnan *et al.*, 2004).
 CFP : cyan fluorescent protein, YFP : yellow fluorescent protein.

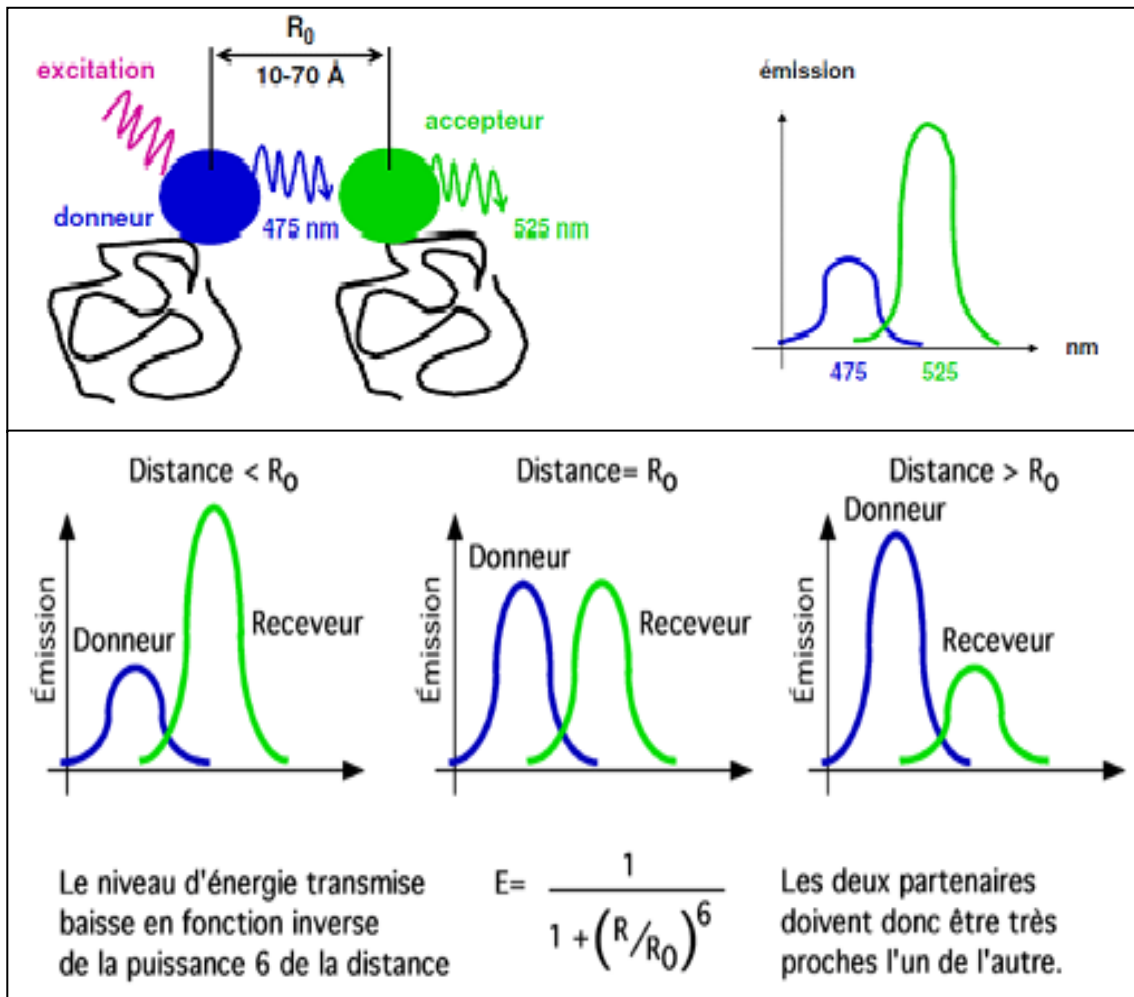


Figure 7: Les résultats obtenus de l'étude de l'interaction entre deux protéines par la FRET.

d) SPR (Surface plasmon resonance)

Le principe de fonctionnement de la SPR est d'enregistrer, en continue, à la surface d'une lamelle réactive (appelée « sensor chip »), la modification de résonance induite par toute interaction moléculaire. Cette modification est directement proportionnelle à la masse de molécule liée et à sa quantité fixée sur le chip (Zhao et *al.*, 2013).

Le système de mesure est composé de trois éléments :

-Le sensor chip : il comprend une lamelle de verre sur laquelle est déposée une fine pellicule d'or elle-même recouverte d'une couche de dextran carboxyméthylé sur lequel on couple de façon covalente la première molécule impliquée dans la réaction que l'on veut étudier.

Le couplage peut se faire par les groupements amines, par les sucres ou par les groupements thiols selon des procédés de chimie classique.

-La microplaque fluide : Elle contrôle l'injection (de 5 à 300 microlitres) et le débit (de 1 à 100 microlitres/min) des réactifs à la surface du sensor chip.

-L'unité optique : Une lumière polarisée est envoyée sur un prisme de verre, en contact direct avec la lamelle de verre du sensor chip. L'appareil mesure et enregistre les changements de l'indice de réfraction générés par un faisceau de lumière polarisée dirigée vers la face opposée de la feuille d'or lors du processus d'association et de dissociation de la protéine immobilisée A et de son ligand B. Les signaux obtenus, mesurés en unités arbitraires (unités de résonance ou RU) sont proportionnels à la masse de B absorbée à la surface (Figure 8).

Le graphe enregistré est appelé « sensogramme ». Il est composé de trois phases : phase d'adsorption, phase de désorption et phase de régénération (Villalobos et *al.*, 2007).

Cette technique est utilisée dans des détecteurs biologiques immunitaires. Elle permet une mesure directe en temps réel ne nécessitant pas de marquage du ligand.

L'inconvénient d'application de la méthode est que cette dernière nécessite une étape d'immobilisation et un phénomène de transport dans la matrice, d'où perturbation de l'équilibre.

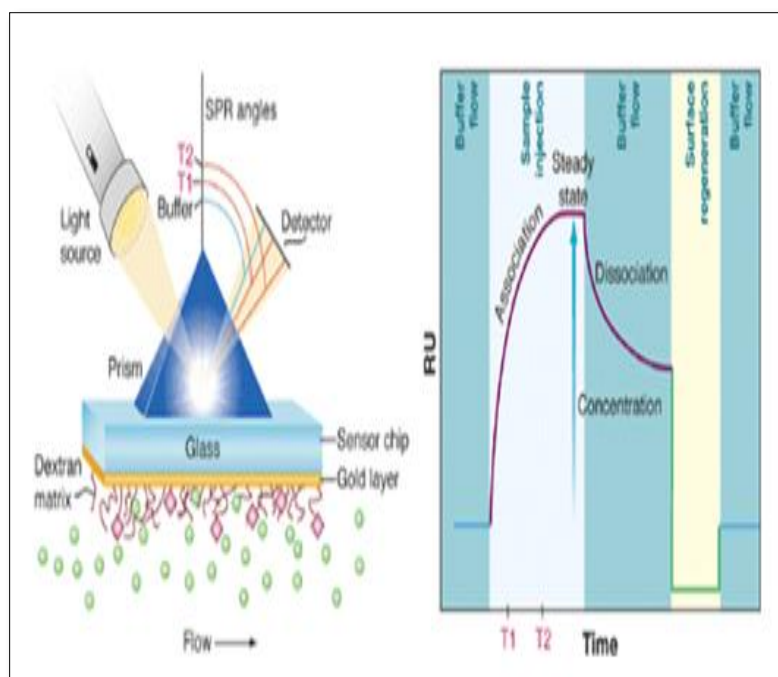


Figure 8: Le système de la SPR (Villalobos et al., 2007).

e) La calorimétrie isotherme à titration

La calorimétrie isotherme à titration, ITC (*Isothermal titration calorimetry*) est une technique quantitative, elle permet de mesurer les interactions de substance entre elles. Quand deux molécules se lient, il y a génération ou absorption de la chaleur. La mesure directe de cette chaleur (ΔH) nous donne les valeurs de constantes de liaison, la stœchiométrie de la réaction, la variation de l'énergie de Gibbs (ΔG) et la variation d'entropie qui peuvent être déterminées en utilisant la relation :

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \text{ (Pierce et al., 1999).}$$

Cette technique fournit ainsi un profil thermodynamique complet de l'interaction moléculaire dans une seule expérience. Ces données thermodynamiques, enthalpie (ΔH) et entropie (ΔS) serviront à identifier les forces qui interviennent dans la formation du complexe et le mécanisme d'action. En plus, la thermodynamique fournit des informations sur les changements de conformation et les types d'interaction : hydrogène, hydrophobe et interaction charge-charge. Cette information est utilisée pour décrire la fonction et le

mécanisme au niveau moléculaire (Pierce *et al.*, 1999; Jelesarov et Bosshard, 1999) (Figure 9).

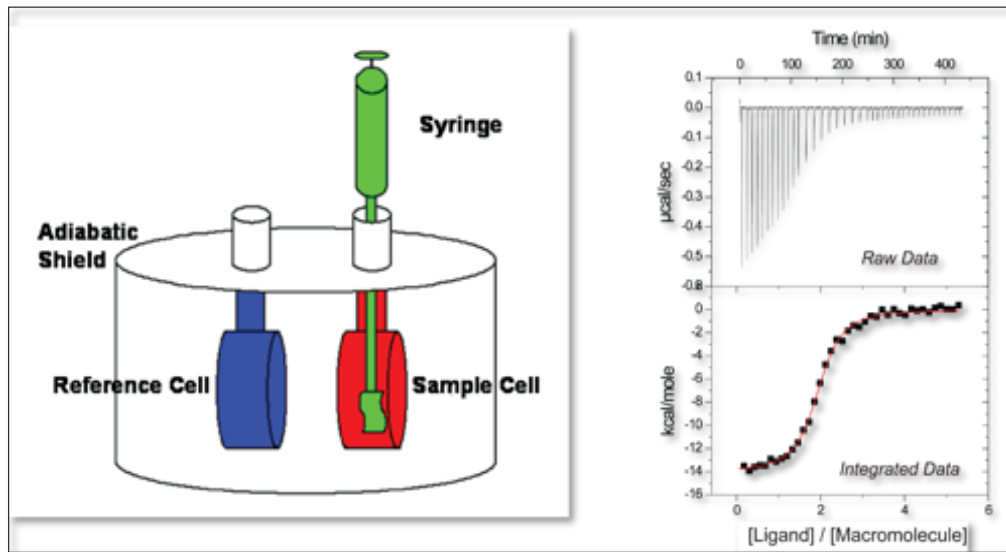


Figure 9: Le système ITC (Jelesarov et Bosshard, 1999).

L'ITC est composée de deux cellules identiques constituées par de matériaux chimiquement inertes présentant des propriétés d'une conductivité hautement efficace entourés par une enveloppe adiabatique.

Les mesures consistent à évaluer en fonction du temps la quantité d'énergie nécessaire pour maintenir des températures égales entre les cellules échantillon et référence. La différence d'énergie enregistrée par rapport à la cellule de référence est rapportée sur un thermogramme (Figure 9).

f) Ultracentrifugation analytique

L'ultracentrifugation analytique permet l'observation du comportement de macromolécules en solution. Cette technique permet de caractériser des interactions entre macromolécules biologiques (complexes protéine-protéine, complexes acides nucléiques-protéine, protéines oligomériques).

Les molécules sont soumises à une force centrifuge et leur sédimentation est directement mesurée pendant la centrifugation par un système optique, constitué d'une source lumineuse (lampe au xénon) et d'un monochromateur. La densité optique des échantillons est mesurée de 230 à 600 nm, en fonction de la distance radiale et à différents temps.

Les paramètres tels que la température, la vitesse et l'acquisition des données sont contrôlés par ordinateur. Deux types de mesures peuvent être entrepris: les mesures de la vitesse de sédimentation et celles de l'équilibre de sédimentation. Le premier type de mesure permet de déterminer un certain nombre des paramètres hydrodynamiques: coefficients de sédimentation, de diffusion et de friction. Le second type de mesures permet de déterminer la masse moléculaire des macromolécules et les constantes d'association-dissociation de complexes (Lebowitz *et al.*, 2002) (Figure 10).

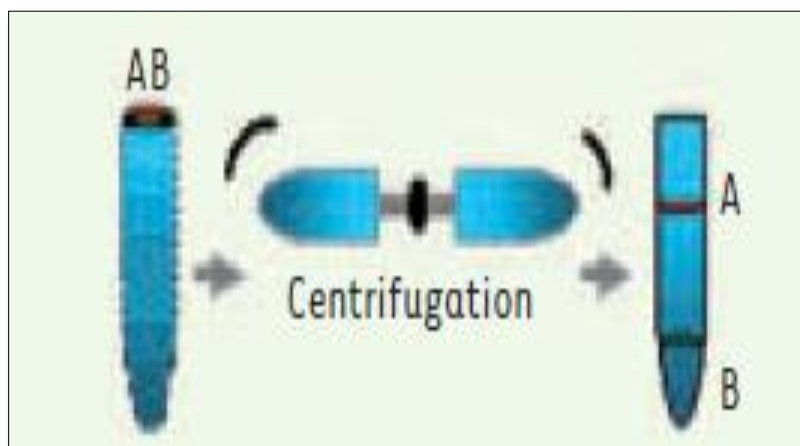


Figure 10: Ultracentrifugation ;

g) Co-immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation est la méthode principale d'étude des interactions protéiques puisqu'il est possible d'utiliser des protéines endogènes, marquées avec une étiquette (« tag ») et/ou surexprimées.

Cette technique repose sur le fait que lors de l'immunoprécipitation d'une protéine d'intérêt avec un anticorps spécifique, les protéines qui sont associées à la protéine d'intérêt par des interactions protéine-protéine sont également précipitées.

A partir d'un lysat cellulaire traité ou non, la protéine d'intérêt est immunoprécipitée avec un anticorps spécifique lié à des billes de protéine A ou G couplées à de la sépharose. Les conditions étant non dénaturantes, toutes les protéines interagissant avec la protéine d'intérêt vont être aussi précipitées.

Après lavages, les complexes protéiques sont dénaturés et les partenaires d'interaction sont analysés sur gel dénaturant d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) suivie du Western blot, spécifique de la protéine cible supposée (Figure 11) (Masters, 2004).

Les protéines partenaires de la protéine d'intérêt peuvent alors être identifiées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques.

Avantage :

- Facile à mettre en œuvre.
- Protéine appât native.
- L'affinité Ag/Ac est généralement très forte.
- Possibilité de faire des lavages à forte force ionique.

Inconvénients :

- Reconnaissance de l'épitope pas toujours possible.
- Difficile à mettre en œuvre pour les protéines membranaires.
- Protéine A ou protéine G sépharose selon l'origine de l'Ac.
- Présence de l'anticorps sur le gel SDS-PAGE.
- Si la quantité d'appât est trop faible, la quantité de complexe isolé sera insuffisante pour l'identification.
- Possibilité d'évaluer les contaminants non-spécifiques (protéome de la bille) par analyse protéomique quantitative (expérience réalisée avec anticorps spécifique versus expérience réalisée avec anticorps non spécifique).

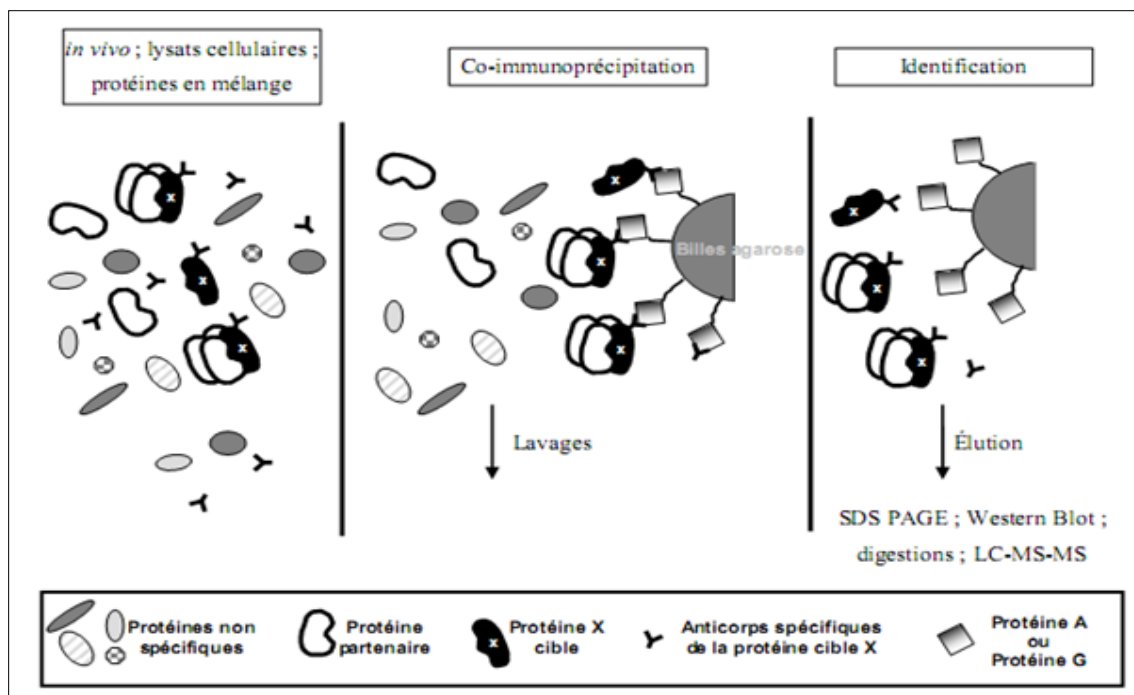


Figure 11: Co-immunoprécipitation ;

Le complexe protéine 1/protéine 2 présent dans le lysat cellulaire est hybridé avec l'anticorps anti-protéine 1 (Y) puis précipité par fixation de billes de sépharose (●) à l'anticorps anti-protéine 1. La présence de la protéine 2 liée à la protéine 1 est analysée par western blot.

h) Purification par affinité par l'intermédiaire d'étiquettes

La purification par affinité consiste à fixer sur un support la protéine cible par l'intermédiaire de son étiquette. On introduit à une des extrémités de la séquence codante de X une étiquette qui peut être reconnue par un anticorps commercial. Ainsi, si on utilise une étiquette portant l'épitope FLAG de Sigma, on utilisera un anticorps anti-FLAG pour récupérer le complexe X-Y; si on utilise une étiquette GST (*glutathione-S-transférase*) on se servira de glutathione-sepharose, sans anticorps, puisque la GST se lie spontanément à la glutathione (Figure 12). Si on utilise une étiquette de six histidines, on pourra utiliser des billes de sepharose Ni-NTA ;

Variantes :

- fixation préalable de la protéine de fusion sur la colonne de Glutathion sépharose
- autres étiquettes : 6His, Streptavidine, HaloTag,

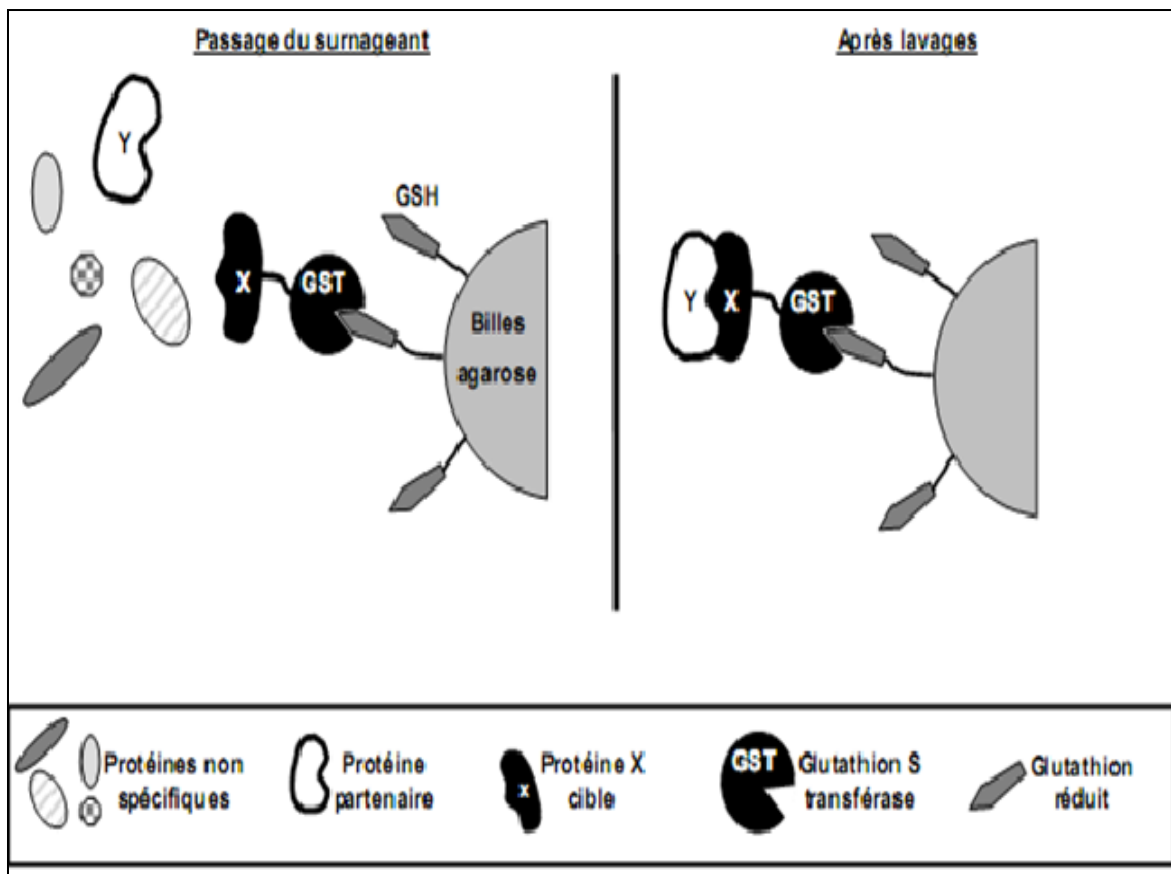


Figure 12: Représentation schématique du principe du GST-pulldown

Avantages :

-Simple et rapide à mettre en œuvre.

Inconvénients :

-Fait en dehors du contexte cellulaire.

-La protéine appât est une protéine recombinante.

-L'étiquette peut empêcher des interactions.

-L'étiquette peut favoriser des interactions.

-Il faut valider les interactions mises en évidence par une autre technique in vivo.

i) La technique TAP-TAG (*Tandem affinity purification by tag*).

Dans cette approche, ce sont les complexes présents dans la cellule d'intérêt qui sont extraits puis analysés. De ce fait, l'influence des modifications post-traductionnelles est prise

en compte. Cette technique permet de déterminer des complexes protéiques à l'échelle de cellules entières.

Méthode : 2 étapes de purification par affinité

Conditions d'élution douces.

Pas de surproduction de la protéine étiquetée.

- Etiquette TAP : Calmodulin Binding Peptide (5kDa)

Site de coupure par la protéase TEV

2 domaines de fixation aux IgG de la protéine A (20 kDa)

- Variante: étiquette SP: Calmodulin Binding Peptide (5kDa)

Site de coupure par la protéase TEV

3 répétitions de l'épitope Flag

Il s'agit de créer une protéine de fusion avec un morceau conçu à l'extrémité, le tag TAP qui consiste en 3 composés. Du peptide de liaison à la calmoduline (CBP) à l'extrémité N-terminal, suivi par un site de clivage de la protéase du virus du tabac (TEV protéase) et de la protéine A, qui se lie étroitement aux IgG. L'ordre relatif des modules de la balise est important parce que la protéine A doit être à l'extrémité de la protéine de fusion de sorte que l'ensemble du complexe peuvent être récupérées en utilisant une matrice IgG. La protéine d'intérêt et le tag TAP se lient d'abord à billes recouvertes d'IgG, le tag TAP sera décomposé par TEV protéase. Après deux colonnes d'affinité la protéine d'intérêt liée à ses partenaires est éluée par chélation du calcium utilisant l'EGTA (Figure 13).

Avantages:

- Simple et rapide à mettre en œuvre.
- Possibilité de faire des approches globales.
- Haut degrés de purification.
- Possibilité de rechercher des complexes mineurs.

Inconvénients :

- Difficile à mettre en œuvre pour les protéines membranaires.
- Difficile de faire des approches globales en dehors de la levure.

- La protéine appât est une protéine recombinante :
- L'étiquette peut empêcher des interactions.

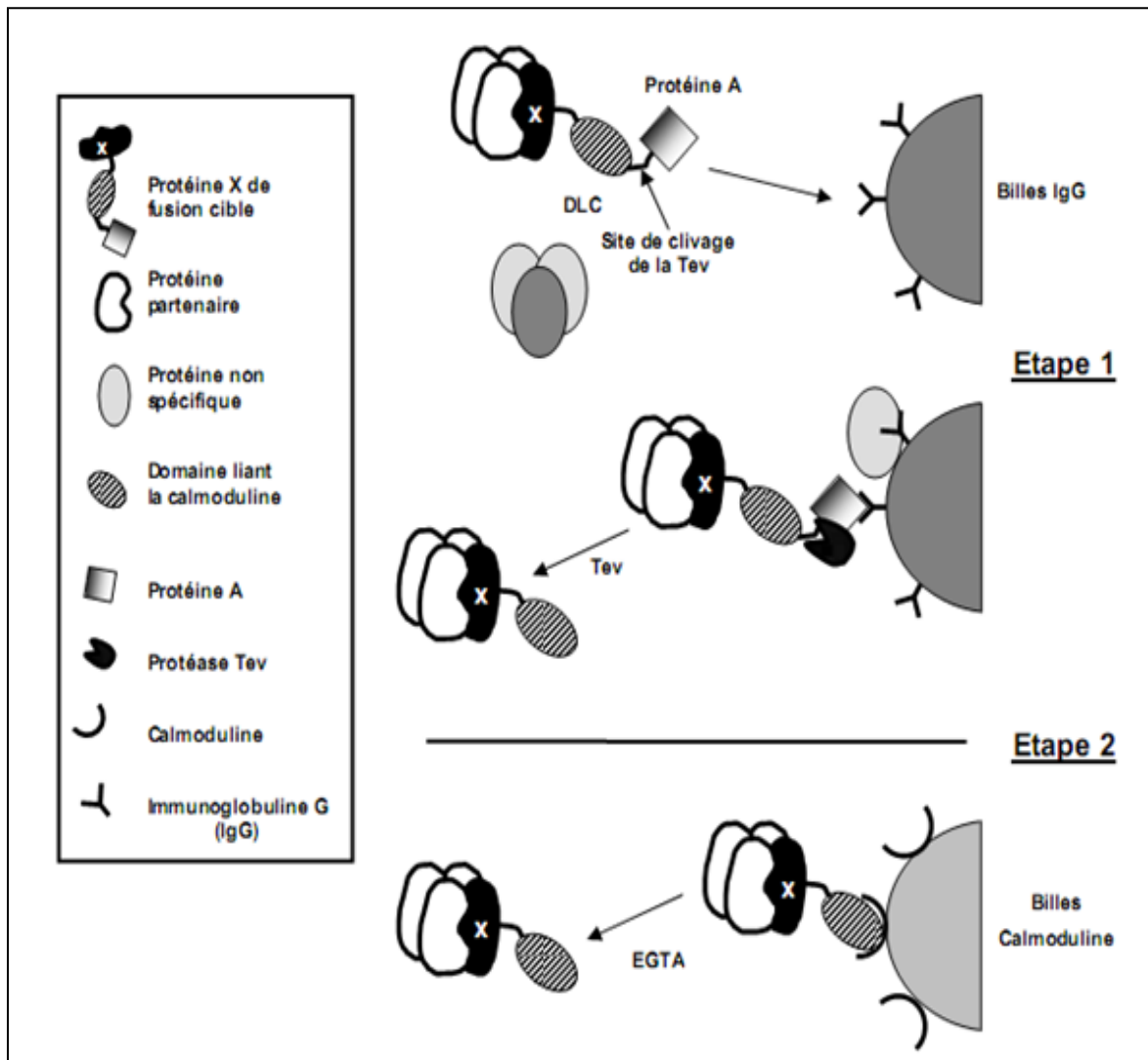


Figure 13: Principe de purification par affinité en tandem.

j) Le phage Display

La méthodologie du phage display, c'est à dire la présentation de peptides à la surface de phages filamenteux (Figure 14), est devenue un très puissant outil de synthèse combinatoire et de sélection des peptides. La présentation de peptides à la surface de phages filamenteux a été démontrée pour la première fois par Georges Smith en 1985, mais il a fallu attendre quelques années pour comprendre l'importance de ce puissant outil de sélection (Arap, 2005 ; Chin *et al.*, 2016).

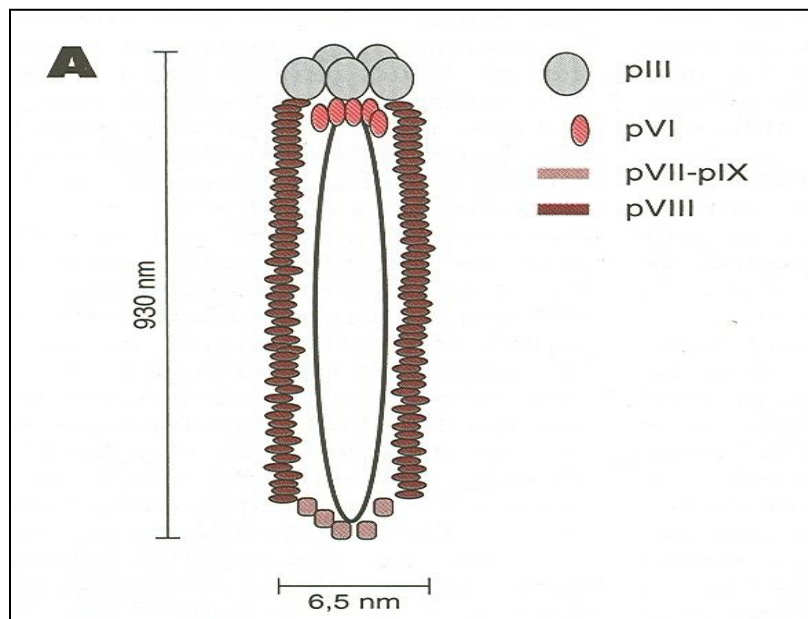


Figure 14: Représentation schématique du bactériophage filamenteux fd.

Le phage présente une longueur de 930 nm et un diamètre de 6,5 nm. Son ADN est logé à l'intérieur d'un cylindre flexible composé d'environ 2 700 monomères de protéine pVII. Une extrémité de la particule présente 5 copies des protéines pVII et pIX tandis que l'autre extrémité présente 5 copies des protéines pIII et pVI. Les protéines pIII exposées sur la tête du phage sont impliquées dans l'attachement aux pili de la bactérie hôte qui précède l'infection. Les protéines pVIII composent le manteau du phage.

Les phages filamenteux sont utilisés pour présenter à leur surface, en fusion avec le domaine amino-terminal de leurs protéines pIII ou pVIII, des molécules telles que des peptides aléatoires, des fragments d'anticorps (Fab, Fv, ou scFv single chain Fv) ou d'autres protéines. Les phages recombinants sont ensuite sélectionnés pour leur capacité de liaison à une cible (Figure 15) (Weichel *et al.*, 2008). Cette approche consiste à cloner le gène d'intérêt, en fusion avec un gène exprimant une protéine de la capsid du phage, dans un plasmide (phagémide) ou dans le génome du bactériophage. Lors de l'expression de la protéine de

fusion, les peptides ou les protéines d'intérêt sont alors présentés en surface de la capside. Le nombre de copies de ligand par phages peut aller de 1 à 2700. Des banques de peptides aléatoires ou de domaines de protéines, mutés ou non de façon aléatoire sur un ou plusieurs résidus, exposés à la surface des phages, sont ainsi obtenues. Ces banques sont sélectionnées sur des protéines cibles immobilisées sur microplaques

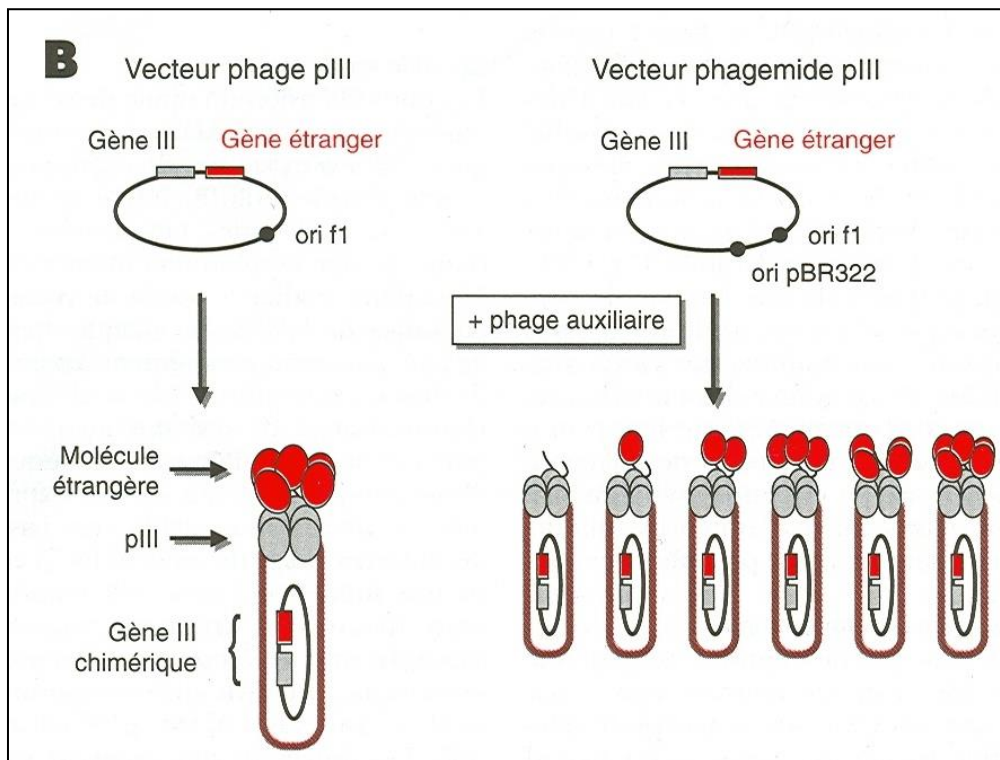


Figure 15: Exemple d'expression à la surface d'un vecteur phage ou d'un vecteur phagemide

Dans le cas d'une expression à la surface d'un vecteur phage pIII, toutes les protéines pIII du phage sont fusionnées à la molécule étrangère. Dans le cas d'une expression à la surface d'un vecteur phagemide pIII, la protéine pIII du phagemide fusionnée à la molécule étrangère et la protéine pIII sauvage codée par le phage auxiliaire sont exprimées dans la même cellule. Plusieurs combinaisons d'expression sont possibles et le nombre de molécules étrangères exprimées en surface est variable.

Après de nombreux lavages, les phages fixés sont élués puis isolés et amplifiés par infection de bactéries (Figure 16). Les phages amplifiés sont sélectionnés à nouveau sur la même cible. Après trois à six tours de sélection-amplification, l'ADN des phages sélectionnés est analysé pour donner la séquence protéique correspondante. Des pressions de sélection peuvent être

introduites à chaque tour ainsi qu'une diversité additionnelle par mutagenèse (Figure 17) (Georgieva et Konthur, 2011).

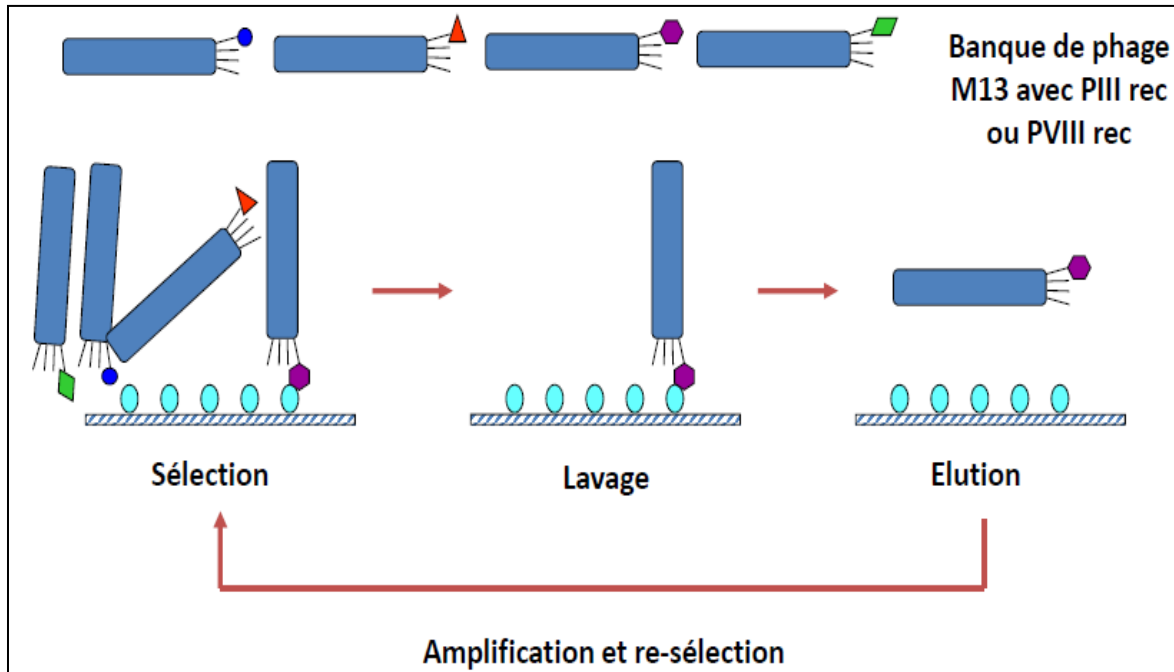


Figure 16: Le phage display Banque de phage M13 avec PIII rec ou PVIII rec (Georgieva et Konthur, 2011).

Avantages:

- Simple et rapide à mettre en œuvre.
- Très sensible (amplification).

Inconvénients:

L'inconvénient repose en la nature de virus non lytique. Ainsi, toutes les protéines avant d'être incorporées dans la capsid doivent être exportées dans le périplasme et traverser la membrane bactérienne.

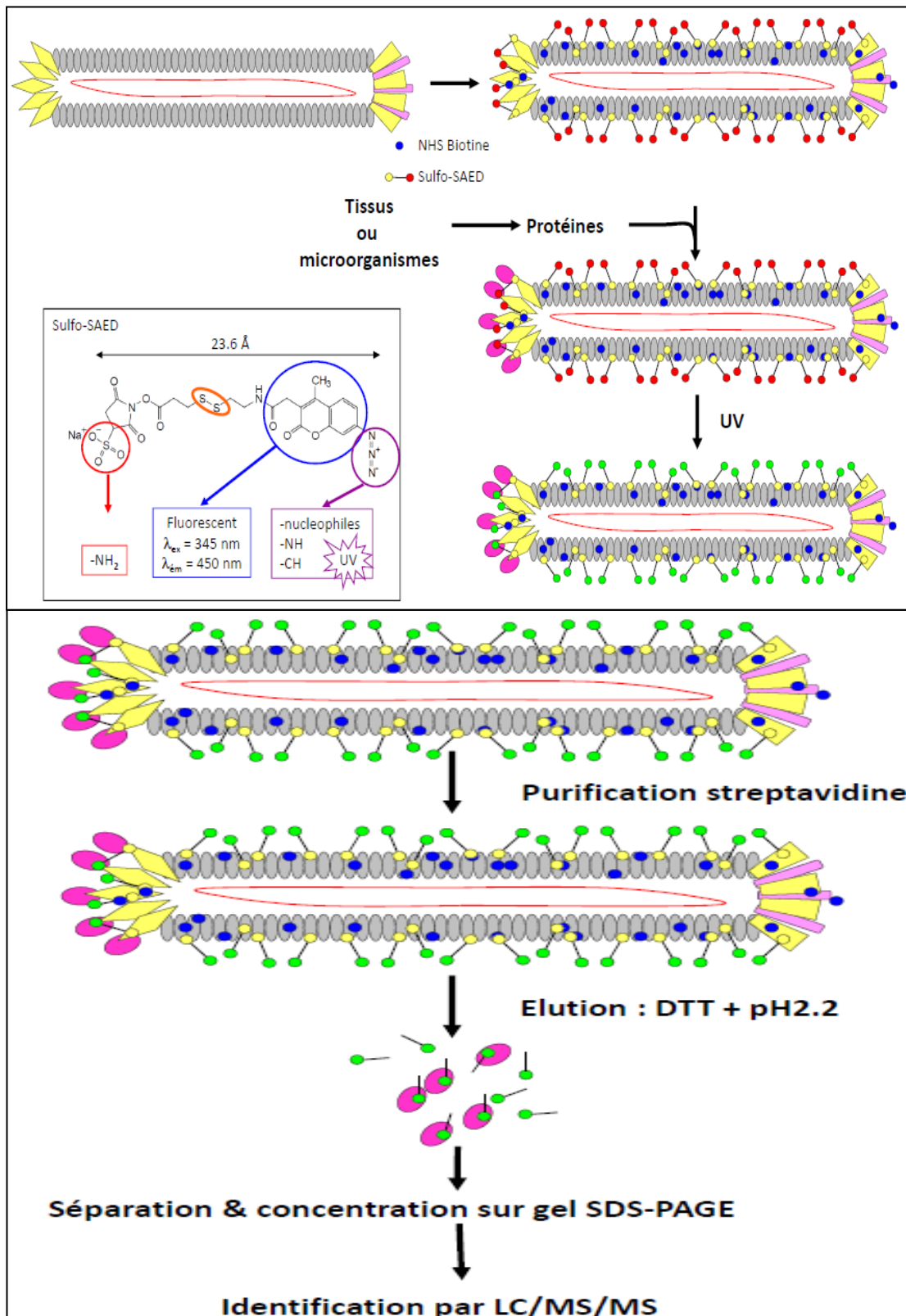


Figure 17: Les étapes de la méthode phage Display

k) Cristallographie

La détermination de la structure atomique d'un cristal s'effectue le plus souvent par diffraction des rayons X ou des neutrons, dont les longueurs d'onde sont de l'ordre des distances qui séparent les plans atomiques de la structure cristalline. La cristallographie des protéines par rayons-X permet d'étudier la conformation tridimensionnelle des protéines et de pouvoir ainsi mieux comprendre leurs mécanismes d'action et leurs liaisons avec d'autres molécules présentes dans la cellule. L'analyse des rayons X projetés sur les protéines cristallisées permet de reconstituer le complexe entre protéines (Figure 18).

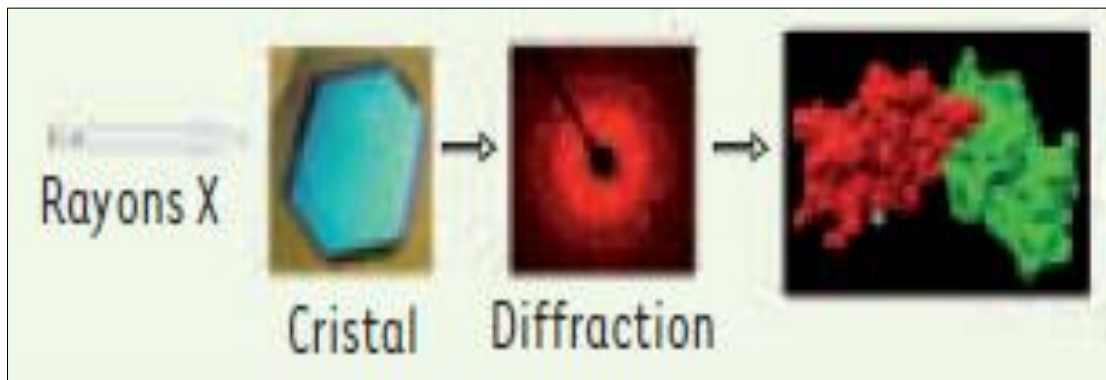


Figure 19 : Principe de la cristallographie.

Exemple : Interaction Smac-XIAP (*second mitochondria-derived activator of caspases-X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*).

Les protéines de la famille des IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) sont des inhibiteurs endogènes des caspases ; elles sont surexprimées dans de nombreux cancers, où elles contribuent aux mécanismes de résistance à l'apoptose observée dans les cellules cancéreuses (Bilim *et al.*, 2003). Les IAP possèdent un domaine à doigt de zinc, appelé Bir (*Baculovirus inhibitory repeat*), qui est le site d'interaction avec Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*), une protéine mitochondriale activatrice des caspases au cours de l'apoptose (Du *et al.*, 2000). Un tripeptide non naturel dérivé de Smac inhibe son interaction avec XIAP (*X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*)

(Figure 20.D). Ce type de peptides sensibilisent des cellules tumorales à l'apoptose induite par le facteur apoptotique TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) et stimulent l'activité antitumorale de ce facteur dans un modèle de xélogreffe intracrâniale de gliome (Fulda *et al.*, 2002). Des études cristallographiques ont montré que seuls quatre acides aminés de Smac se fixent sur le domaine Bir de XIAP (Figure 20.C) et sont essentiels pour bloquer ses effets anti-apoptotiques (Liu *et al.*, 2000). Là encore, la conformation de ces quatre acides aminés au sein du complexe IAP-Smac a servi de support pour la synthèse rationnelle d'une molécule chimique capable, en se fixant avec une haute affinité à IAP, de promouvoir l'activation des caspases, en synergie avec le TNF α et TRAIL, et d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses humaines. Enfin, en raison de son interférence avec la signalisation TNF α -NF κ B ce « mime chimique » de Smac pourrait conduire au développement d'agents thérapeutiques dans le cadre des pathologies de l'inflammation (Li *et al.*, 2004).

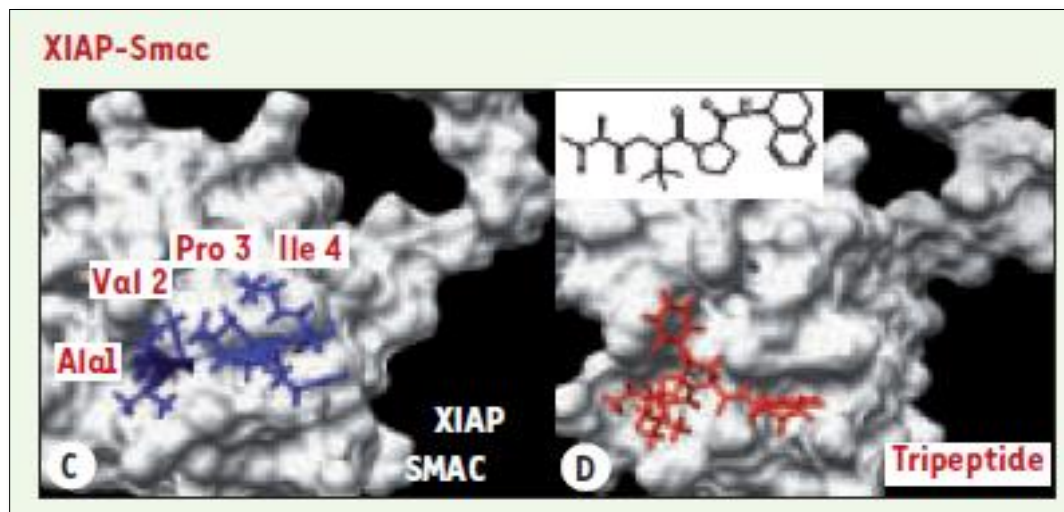


Figure 20: Interaction XIAP-Smac (Leudet *et al.*, 2007). **C.** La protéine Smac interagit avec XIAP via 4 résidus essentiels aminoterminaux, Ala₁, Val₂, Pro₃, Ile₄. **D.** Un tripeptide non naturel optimisé inhibe l'interaction avec une IC₅₀ de 5 nM.