



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

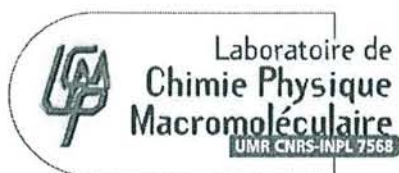
LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



U.F.R. S.T.M.P

Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire
UMR 7568 ENSIC-INPL 54001 Nancy

THESE

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I

Ecole doctorale Lorraine de Chimie et Physique Moléculaires (S.E.S.A.M.E.S)

Mention Chimie et Physico-Chimie Moléculaires

Formation doctorale

Chimie et Physico-Chimie Moléculaires et Théoriques

par

Angélique PHAN CHAN DU



ANALYSE STRUCTURALE D'EPITOPES PEPTIDIQUES ET PSEUDOPEPTIDIQUES

APPLICATION A L'ETUDE DES INTERACTIONS ANTIGENE-ANTICORPS

Soutenance publique le 10 novembre 2000

Membres du jury:

Président du jury:

Professeur Bernard VITOUX

Rapporteurs:

Professeur Françoise VOVELLE

Docteur André AUMELAS

Examineurs:

Docteur Sylviane MULLER

Docteur Marie-Christine PETIT

Docteur Manh Thông CUNG

*A mes parents
A ma famille
Aux personnes qui ont contribué à ce que je suis*

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire UMR-CNRS 7568 de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy, dans le groupe Biostructures.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Cung Manh Thông, Directeur de recherches CNRS et directeur de cette thèse, pour m'avoir accueillie dans son groupe et pour son soutien. Je lui adresse toute ma gratitude pour l'attention qu'il a portée à mon travail malgré ses très nombreuses charges et je lui sais gré d'avoir su diriger cette thèse en me laissant toute liberté au cours de mes recherches.

J'aimerais remercier tout particulièrement Mademoiselle Petit Marie-Christine qui a encadré ce travail au cours de ces trois années de thèse et au cours de mon DEA. Je tiens à la remercier pour les précieux conseils et encouragements qu'elle a su me prodiguer tout le long, avec sa gentillesse et sa grande disponibilité.

Je témoigne toute ma gratitude à Madame le Professeur Françoise Vovelle ainsi qu'à Monsieur André Aumelas, Directeur de recherches CNRS, qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie vivement Madame Sylviane Muller, Directeur de Recherche au CNRS pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et pour les nombreuses discussions toujours très enrichissantes dont elle m'a fait bénéficier. Je la remercie d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur le professeur Bernard Vitoux pour avoir volontiers accepté de faire partie du jury.

A Monsieur Michel Marraud, directeur de recherches CNRS, j'adresse un remerciement particulier pour ses précieux encouragements et ses conseils toujours très pertinents.

J'associe à ces remerciements le Docteur David Limal et Monsieur Vincent Semetey pour la réalisation des analogues de la gp41 du VIH-1, ainsi que toutes les personnes de l'IBMC (et notamment Hayet) qui ont effectué les tests immunologiques. J'aimerais également remercier monsieur Jean-Marie Grosse pour son assistance informatique et sa disponibilité immédiate. Sans lui, aucun des calculs présentés dans ce rapport n'aurait pu avoir lieu.

Je ne saurais oublier les membres actuels et anciens du laboratoire pour la convivialité qui y a régné au cours de ces quatre années.

Enfin, je voudrais remercier tous ceux, qui de près ou de loin, d'une façon ou d'une autre, m'ont aidé à l'élaboration de cette thèse, et plus particulièrement Xavier, qui a supporté mes fréquentes interrogations tout au long de ces trois années.

RESUME

Les peptides, agents naturels intervenant dans de nombreux processus biologiques, présentent un intérêt thérapeutique important. L'introduction de liaisons pseudopeptidiques dans des peptides antigéniques est devenue, au cours de ces dernières années, une stratégie des plus intéressantes afin d'améliorer leurs caractéristiques physico-chimiques propres et leur aptitude à interagir avec les effecteurs du système immunitaire.

Nous nous sommes intéressés à l'étude conformationnelle de peptides antigéniques, seuls ou en interaction avec des anticorps, par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et modélisation moléculaire (MM). Trois thèmes ont été abordés. Le premier concerne l'étude de la région 600-612 de la glycoprotéine gp41 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). La comparaison des propriétés conformationnelles du peptide correspondant à la séquence naturelle et de plusieurs analogues a permis d'expliquer les variations d'activité antigénique observées pour ces molécules. Parallèlement à cette étude, nous avons recherché à nous rapprocher de la géométrie de l'antigène peptidique en interaction avec un anticorps. Deux sujets ont été abordés dans cette optique : l'étude du fragment C-terminal de l'histone H3 et de ses analogues rétro-inverso, en interaction avec un anticorps monoclonal dirigé contre la séquence naturelle, et l'analyse du rôle fonctionnel et structural de la phosphorylation d'une tyrosine d'un fragment peptidique de la sous-unité β du récepteur de l'acétylcholine (RACH) impliqué dans une maladie auto-immune : la myasthénie. Pour ce faire, dans ces deux dernières études, nous avons utilisé la méthode du transfert des NOE.

Les résultats présentés dans cette thèse illustrent l'apport de la spectroscopie RMN et de la modélisation moléculaire dans la détermination de structures tridimensionnelles et notamment l'étude des relations structure/conformation/fonction.

ABSTRACT

The development of peptide-based drugs is strongly impaired by the high susceptibility of peptides to proteolysis, which limits their therapeutic use. For many years, intensive work has been focused on the synthesis of peptide analogues in looking for mimics with enhanced activity and biological half-lives. Modifications introduced in peptides, such as modifications of peptide bond or introduction of modified residues, provide pseudopeptides or pseudomimetics with a higher metabolic stability.

We report conformational studies of antigenic peptides, free or bound to antibodies, by nuclear magnetic resonance (NMR) and molecular modelling (MM). The aim was to determine a structure-conformation-activity relationship and to resolve the structure of peptides bound to an antibody. Mainly, three topics have been developed.

The first concerns the study of the 600-612 region of the human immunodeficiency virus (HIV) gp41 glycoprotein. Comparison of several pseudopeptide structures with the natural sequence allowed us to explain variations of antigenic activity observed for these molecules.

Then, we have considered the interactions between an antibody and an antigen. The 3D geometry of this system has been investigated for two specific cases. The C-terminal fragment of the H3 histone and its retro-inverso analogues, in interaction with a monoclonal antibody directed against the parent sequence has been considered. Finally, the functional and structural role of tyrosine residue phosphorylation for a fragment corresponding to the receptor of the acetylcholine (AChR) β -subunit has been analysed. In these last two studies, the TR-NOESY method was used with success.

The presented results illustrate the effectiveness of NMR spectroscopy and molecular modelling in the determination of 3D models and in the study of structure-conformation-activity relationship.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	
------------------------------	--

INTRODUCTION GÉNÉRALE	
-----------------------------	--

CHAPITRE I

GENERALITES.....	I-1
------------------	-----

I.1. STRUCTURE DES PEPTIDES	I-1
-----------------------------------	-----

I.1.1. Conformation du squelette peptidique	I-3
---	-----

I.1.2. Conformation des chaînes latérales	I-3
---	-----

I.1.3. Les motifs conformationnels	I-3
--	-----

a. Conformère C ₅	I-3
------------------------------------	-----

b. Coudes ou repliements.....	I-4
-------------------------------	-----

i. Repliement γ	I-4
------------------------------	-----

ii. Repliement β	I-5
------------------------------	-----

iii. Repliement α	I-7
--------------------------------	-----

iv. Repliement Asx	I-8
--------------------------	-----

c. Structures secondaires.....	I-8
--------------------------------	-----

d. Les liaisons disulfures	I-10
----------------------------------	------

I.2. LES PSEUDOPEPTIDES	I-11
-------------------------------	------

I.2.1. La modification rétro-inverso ψ [NHCO]	I-13
--	------

I.2.2. Les acides β -aminés.....	I-16
--	------

I.2.3. Les cyclisations	I-17
-------------------------------	------

I.3. LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	I-19
--	------

I.3.1. Paramètres RMN liés à la conformation	I-19
--	------

a. Le déplacement chimique δ	I-19
---	------

b. Les constantes de couplage vicinal 3J	I-20
---	------

c. L'effet Overhauser nucléaire (NOE)	I-21
---	------

I.3.2. La RMN appliquée à l'étude des biomolécules	I-22
--	------

a. RMN à deux dimensions.....	I-22
-------------------------------	------

b. Interaction antigène/anticorps.....	I-23
--	------

i. Filtrage dynamique	I-23
-----------------------------	------

ii. Expérience NOESY transféré (TR-NOE).....	I-24
--	------

I.4. LA MODELISATION MOLECULAIRE	I-27
--	------

I.4.1. Description physique	I-28
-----------------------------------	------

I.4.2. Représentation de la fonction d'énergie potentielle	I-29
--	------

I.4.3. Modélisation moléculaire à partir contraintes RMN.....	I-30
---	------

a. Données RMN utilisées dans les calculs de modélisation moléculaire	I-30
---	------

i. Données quantitatives	I-30
ii. Données qualitatives	I-32
b. Les différentes méthodes de géométrie de distances (DG)	I-33

CHAPITRE II

<i>ETUDE STRUCTURALE DE PEPTIDES DE LA GP41 DU VIH-1</i>	<i>I-1</i>
--	------------

II.1. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE ACQUISE (VIH).....	II-3
--	-------------

II.2. INFECTION PAR LE VIH.....	II-9
--	-------------

II.3. DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PAR LE VIH.....	II-11
--	--------------

<i>II.3.1. Détection indirecte</i>	<i>II-12</i>
--	--------------

<i>II.3.2. Détection directe</i>	<i>II-14</i>
--	--------------

a. Détection de l'antigène.....	II-14
---------------------------------	-------

b. Isolement du virus	II-15
-----------------------------	-------

c. PCR.....	II-15
-------------	-------

II.4. CHOIX DU FRAGMENT 600-612 DE LA GLYCOPROTEINE GP41 COMME SONDE ANTIGENIQUE	II-16
---	--------------

II.5. ETUDES DES ACTIVITES ANTIGENIQUES DES DIFFERENTS ANALOGUES.....	II-17
--	--------------

<i>II.5.1. Activité antigénique des analogues rétro-inverso</i>	<i>II-18</i>
---	--------------

<i>II.5.2. Activité antigénique des analogues réduits</i>	<i>II-19</i>
---	--------------

a. Réactivité de l'anticorps monoclonal 11B3	II-20
--	-------

b. Reconnaissance antigénique des analogues réduits par les anticorps des sérums des patients.....	II-21
--	-------

<i>II.5.3. Activité antigénique des analogues comportant des acides aminés β.....</i>	<i>II-22</i>
--	--------------

a. Réactivité de l'anticorps monoclonal 11B3	II-22
--	-------

b. Activité antigénique des analogues peptidiques β -aminés vis-à-vis des anticorps des sérums des patients.....	II-23
--	-------

c. Réactivité des anticorps anti-parent.....	II-25
--	-------

II.6. ETUDES STRUCTURALES PAR RMN ET MODELISATION MOLECULAIRE DE L'EPITOPE MAJEUR 600-612 DE GP41 ET DE SES ANALOGUES	II-27
--	--------------

<i>II.6.1. Etude préalable</i>	<i>II-27</i>
--------------------------------------	--------------

<i>II.6.2. Protocole utilisé pour l'étude des différents analogues.....</i>	<i>II-32</i>
---	--------------

a. RMN	II-32
--------------	-------

b. Modélisation moléculaire	II-33
-----------------------------------	-------

<i>II.6.3. Etude du peptide parent.....</i>	<i>II-35</i>
---	--------------

a. Résultats des mesures de RMN	II-35
---------------------------------------	-------

b. Résultats de modélisation moléculaire	II-39
--	-------

c. Discussion.....	II-42
--------------------	-------

<i>II.6.4. Etude de l'analogue rétro-inverso du peptide 600-612 de la gp41.....</i>	<i>II-43</i>
---	--------------

a. Résultats des mesures de RMN	II-44
---------------------------------------	-------

b. Résultats de modélisation moléculaire	II-47
--	-------

c. Discussion	II-50
<i>II.6.5. Etude des lactames</i>	<i>II-53</i>
a. Résultats des mesures de RMN	II-55
b. Résultats de modélisation moléculaire	II-63
c. Discussion	II-67
<i>II.6.6. Etude des analogues comportant des acides β-aminés</i>	<i>II-71</i>
a. Etude de l'analogue HSer ₆	II-71
i. Résultats des mesures de RMN	II-72
ii. Résultats de modélisation moléculaire	II-74
iii. Discussion.....	II-76
b. Etude de l'analogue HCys ₅	II-78
i. Résultats des mesures de RMN	II-78
ii. Résultats de modélisation moléculaire	II-81
iii. Discussion.....	II-83
<i>II.6.7. Résumé de l'étude conformationnelle</i>	<i>II-85</i>
<i>II.6.8. Conclusion et perspectives</i>	<i>II-88</i>

CHAPITRE III

ANALYSE STRUCTURALE DE PEPTIDES ACTIFS EN PRESENCE D'ANTICORPS MONOCLONAUX..... III-1

III.1. ETUDE DES INTERACTIONS ANTIGENE/ANTICORPS DANS LE CAS DE PEPTIDES MODIFIESIII-3

<i>III.1.1. Présentation</i>	<i>III-5</i>
<i>III.1.2. Analyse conformationnelle des peptides dans leur état lié à l'anticorps</i>	<i>III-7</i>
a. Protocole utilisé pour l'étude des différents analogues	III-7
i. RMN	III-7
ii. Modélisation moléculaire	III-8
b. Résultats des mesures de RMN	III-9
c. Résultats des calculs de modélisation moléculaire	III-16
i. Structure des peptides L.....	III-19
ii. Structure des peptides RI.....	III-20
iii. Comparaison des peptides L et des peptides RI	III-22
d. Conclusion	III-26

III.2. ETUDE DES INTERACTIONS ANTIGENE/ANTICORPS DANS LE CAS D'UNE MALADIE AUTO-IMMUNE: LA MYASTHENIE.....III-26

<i>III.2.1. Protocole utilisé pour l'étude des peptides</i>	<i>III-31</i>
a. RMN	III-31
b. Modélisation moléculaire	III-32
<i>III.2.2. Etude du peptide non phosphorylé.....</i>	<i>III-34</i>
a. Résultats de RMN	III-34
b. Résultats de modélisation moléculaire	III-43
<i>III.2.3. Etude du peptide phosphorylé.....</i>	<i>III-48</i>

a. Résultats de RMN	III-48
b. Résultats de modélisation moléculaire	III-52
III.2.4. Comparaison entre les structures adoptées par le peptide phosphorylé et le peptide non phosphorylé en présence de l'anticorps mAb148.....	III-56
III.2.5. Conclusions	III-59

CONCLUSION GENERALE

ANNEXE A

MODELISATION MOLECULAIRE

A-1. REPRESENTATION DE LA FONCTION D'ENERGIE POTENTIELLE	A-1
a. Description.....	A-1
b. Problèmes liés à l'évaluation des interactions non liées	A-4
c. Prise en compte du solvant.....	A-7
(1). Solvant implicite	A-7
(2). Solvant explicite.....	A-8
A-2. MECANIQUE MOLECULAIRE	A-8
a. Steepest descent.....	A-9
b. Conjugate gradient.....	A-9
c. Newton-Raphston	A-10
d. Quasi Newton-Raphston.....	A-11
A-3. DYNAMIQUE MOLECULAIRE	A-11
a. Algorithmes d'intégration.....	A-12
(1). Algorithme de Verlet:	A-12
(2). Algorithme Leap-Frog	A-13
b. Contrôle des contraintes internes	A-13
c. Contrôle des paramètres physiques	A-13
(1). Rééchelonnement direct des trajectoires atomiques ("direct velocity scaling").....	A-14
(2). Thermostat de Berendsen.....	A-14
(3). Thermostat de Nosé-Hoover	A-15
d. Introduction de données expérimentales.....	A-15
A-4. LES DIFFERENTES METHODES DE GEOMETRIE DE DISTANCES (DG).....	A-16
a. Méthode de la matrice métrique (utilisant les coordonnées cartésiennes).....	A-16
b. Méthode de la fonction cible (utilisant des coordonnées internes).....	A-18
c. Méthode du recuit simulé	A-19
d. Méthode dépendante du temps	A-19

ANNEXE B

PARTIE EXPERIMENTALE

B-1. TEST ELISA.....B-1

- a. Test ELISA indirect obtenu avec les sérums des patientsB-1
- b. Test ELISA en présence de l'anticorps monoclonal anti-gp41B-2
- c. Test ELISA phase anticorpsB-2
- d. Test ELISA en présence des anticorps monoclonaux anti-parent.....B-3
- e. Tests complémentaires en présence de sérums de patients pour les analogues réduits
.....B-3
- f. Tests complémentaires en présence de sérums de patients pour les analogues substitués
avec des acides β -aminés.....B-7

B-2. TABLEAUX DES DEPLACEMENTS CHIMIQUESB-11

- a. Peptide 600-612 N-acétylé.....B-11
- b. Analogue rétro-inverso du peptide 600-612 N-acétylé amideB-13
- c. Analogue Ddap du peptide 600-612 N-acétyléB-14
- d. Analogue DapD du peptide 600-612 N-acétyléB-15
- e. Analogue DDab du peptide 600-612 N-acétyléB-16
- f. Analogue DabD du peptide 600-612 N-acétyléB-17
- g. Analogue Edap du peptide 600-612 N-acétylé.....B-18
- h. Analogue DapE du peptide 600-612 N-acétylé.....B-19
- i. Analogue EDab du peptide 600-612 N-acétylé.....B-20
- j. Analogue HSer₆ du peptide 600-612 N-acétyléB-21
- k. Analogue HCys₅ du peptide 600-612 N-acétylé.....B-20

B-3. EFFETS DE TEMPERATUREB-23

B-4. MODELISATION MOLECULAIREB-25

- a. Caractéristiques angulaires des différents modèles obtenus pour chacun des peptides
étudiésB-25
- b. Comparaison entre les distances interprotoniques expérimentales (RMN) et calculées
dans les structures moyennes issues de la MDB-29

ANNEXE C

THEORIE DU TR-NOE

LISTE DES ABREVIATIONS

Å	Angström
Ac	Acétyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AZT	zidovudine
COSY	Correlation Spectroscopy
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	dithiothréitol
ddC	zalcitabine
ddI	didanosine
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Energy minimisation: minimisation d'énergie
gp	Glycoprotéine
Ig	Immunoglobuline
IFA	Test d'Immunofluorescence indirecte
mAb	anticorps monoclonal
mARN	ARN messenger
LTR	Long Terminal Repeat
MD	Molecular Dynamics: dynamique moléculaire
MIR	Main Immunogenic Region
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
RAC _h	Récepteur musculaire nicotinique de l'acétylcholine
RI	Rétro-inverso
RIPA	Test de RadioImmunoPrécipitation
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rmsd	Root mean Square Deviation: Déviation des moindres carrés
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
TMPS	Sel de triméthysilyl-3-propionate 2,2,3,3-d ₄ de sodium
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy: Spectre de corrélation totale
TR-NOE	Effet Overhauser Nucléaire transféré
Tween	Polyoxyéthène Sorbitan Monolaurate
VDW	Interaction de van Der Waals
VIC _β	Very Immunogenic Cytoplasmic Epitope β
VIH	Virus de l'Immunodéficience Acquise
WB	Western Blot

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

La recherche de nouvelles familles de médicaments, le développement de nouvelles stratégies vaccinales ou d'immunomodulation constituent un secteur important de l'activité de nombreux laboratoires pharmaceutiques.

Les études structurales ne participaient, jusqu'à un passé récent, que dans une infime mesure à l'élaboration de telles stratégies. Cependant, les évolutions remarquables des techniques physico-chimiques et biophysiques ont facilité l'étude des relations structure/activité et permis d'aiguiller la recherche expérimentale en évitant les nombreux tâtonnements.

Les peptides et les protéines font l'objet de nombreuses études structurales puisqu'ils sont impliqués dans tous les processus fondamentaux, cellulaires ou organiques. Pour ne citer que quelques exemples, ils interviennent dans les catalyses enzymatiques, la défense immunitaire, la génération et la transmission de l'influx nerveux, le transport de petites molécules ou d'ions.

La connaissance de la structure tridimensionnelle de ces molécules constitue une base indispensable à la compréhension de leur mécanisme d'action et parfois à la prédiction de leurs propriétés fonctionnelles. L'étude du réarrangement spatial des résidus clés des sites actifs assure la conception rationnelle de molécules plus ou moins actives.

Les protéines présentent souvent différents domaines structurés qui peuvent se comporter comme des entités structurales indépendantes, intervenant dans des processus biologiques définis. L'identification de ces régions actives à partir de fragments de protéines recombinantes ou de peptides de synthèse constitue la première tâche essentielle des biologistes.

Ces fragments peptidiques se lient souvent aux récepteurs avec une plus faible affinité qu'avec la protéine native, car ils sont plus flexibles. Cependant, leur activité atteste qu'une partie de ces molécules peuvent adopter la même conformation que dans la protéine mère. L'étude conformationnelle de ces molécules pourrait être d'un grand recours à la

compréhension de leur mode de liaison aux récepteurs et constitue ainsi une approche à la compréhension des processus biologiques.

En immunologie, l'utilisation de peptides correspondant à des épitopes viraux, bactériens ou tumoraux pour induire les réactions de défense, est une stratégie prometteuse dans le développement des vaccins synthétiques. Ils entrent également dans l'élaboration des kits de diagnostic en tant que sondes pour la détection des anticorps chez les patients. Cependant, la faible résistance de ces peptides à la protéolyse dans les fluides biologiques, leur mauvaise diffusion à travers les systèmes membranaires ainsi que leur faible sélectivité vis à vis de la cible souhaitée, due à une trop grande flexibilité conformationnelle, demeurent des facteurs limitant leur utilisation thérapeutique. Il est probable qu'une diminution de la sensibilité des peptides aux protéases peut augmenter considérablement leur immunogénicité. De nombreux analogues pseudopeptidiques, composés dans lesquels une ou plusieurs liaisons amides sont modifiées chimiquement, ont été proposées dans ce but.

En effet, ils peuvent fournir, dans certains cas, une spécificité plus grande vis-à-vis du récepteur et une meilleure résistance aux attaques protéolytiques. Ils présentent donc un intérêt thérapeutique non négligeable et leur synthèse, dans le but de concevoir des médicaments superactifs spécifiques, a fait l'objet d'intenses recherches en pharmacologie.

Depuis quelques années, des analogues ont été développés pour améliorer leur activité, leur spécificité et leur stabilité vis-à-vis des protéases. Il est généralement admis que l'activité des biomolécules dépend de leur structure tridimensionnelle. Dans le but de rechercher une relation structure/activité, un grand nombre d'études structurales ont été effectuées, tant sur des peptides naturels que sur des analogues pseudopeptidiques.

A côté des techniques de cristallographie par rayons X, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) occupe une place de plus en plus importante pour la détermination de la structure tridimensionnelle de ces agencements polypeptidiques.

Cette méthode est utilisée en étroite association avec la modélisation moléculaire, qui permet de combler dans une certaine mesure le manque de données fournies par la RMN.

La construction d'un modèle 3D non équivoque, sur la base d'informations expérimentales fournies par la RMN, requiert l'utilisation de méthodes de géométrie de distance, de minimisation d'énergie et de dynamique moléculaire.

Dans le cadre de cette thèse, cette démarche a été appliquée à l'analyse conformationnelle de peptides et de pseudopeptides, seuls ou en interaction avec des partenaires biologiques.

Après avoir résumé dans un premier chapitre les bases structurales des peptides et énoncé brièvement les différentes méthodologies utilisées au cours de notre travail, à savoir la RMN et la modélisation moléculaire, deux études seront présentées dans ce mémoire.

La première, décrite dans le chapitre II, est consacrée à l'étude comparative de la structure à l'état libre (en solution dans le DMSO) d'un fragment peptidique et de plusieurs analogues pseudopeptidiques faisant intervenir des modifications de la nature chimique du squelette peptidique ou des chaînes latérales. Ce peptide, qui est utilisé dans les trousseaux de diagnostic commerciales, correspond au fragment immunodominant 600-612 de la glycoprotéine gp41 du VIH et se distingue par la présence d'un pont disulfure.

L'existence d'une relation structure/activité est étudiée à partir de la comparaison des conformations adoptées par les peptides présentant une activité biologique et par ceux qui en sont dépourvus.

Dans le chapitre III, nous présenterons l'étude de la reconnaissance moléculaire antigène/anticorps.

La connaissance de la géométrie locale du site d'interaction entre l'anticorps et son ligand est fondamentale pour mieux appréhender le mode de reconnaissance spécifique de l'antigène par l'anticorps, qu'il soit une macromolécule ou des peptides modifiés chimiquement. Cette connaissance est également essentielle pour comprendre les mécanismes pathologiques des maladies auto-immunes et permettre par là-même d'explorer et de développer des approches thérapeutiques efficaces.

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressés à ces deux aspects des interactions antigène/anticorps.

La première partie de ce chapitre porte sur l'étude des propriétés conformationnelles comparées du peptide IkGERA et de ses analogues pseudopeptidiques correspondant à une modification rétro-inverso, en présence d'un anticorps monoclonal. La séquence C-terminale IRGERA, correspondant à l'épitope majeur de l'histone H3, est un bon modèle pour la recherche de la relation structure/activité de ces analogues.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'étude de peptides mimant une partie du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (RACH) et comportant une tyrosine phosphorylée. La destruction du RACH par les anticorps produit une maladie auto-immune, la myasthénie (*myasthenia gravis*).

Il a été montré que la phosphorylation des tyrosines affectait de nombreuses fonctions de RACH. En effet, certains anticorps anti-RACH, dirigés spécifiquement contre les sites de

phosphorylation de la sous-unité β , inhibent l'ouverture du canal ionique pour le transfert de l'influx nerveux, ce qui tendrait à prouver que ces sites sont capables de contrôler ce canal.

Dans le but de déterminer le rôle fonctionnel et structural de la β Tyr 367, une étude a été menée sur le fragment peptidique (GTDEYFIRKPPSG) du RACH humain, phosphorylé et non phosphorylé, à l'état libre dans le DMSO, et en interaction avec l'anticorps mAb 148.

Enfin, après la conclusion, nous présenterons dans trois annexes les principaux rappels consacrés aux stratégies de modélisation moléculaire, à la théorie du TR-NOE et les données expérimentales issues de l'étude du fragment VIH.

CHAPITRE I

GENERALITES

*CONFORMATION, PSEUDOPEPTIDES, RMN
ET MODELISATION MOLECULAIRE DES
PEPTIDES ET PROTEINES*

CHAPITRE I GENERALITES

Dans une première partie, nous rappellerons brièvement les notions structurales relatives aux peptides. Nous aborderons ensuite les modifications pseudopeptidiques, et plus particulièrement la modification rétro-inverso ψ [NHCO] et la substitution par des acides β -aminés. L'utilisation des cyclisations pour stabiliser une structure repliée spécifique sera également abordée. Les implications structurales concernant ces trois modifications seront discutées.

Une partie sera ensuite plus spécifiquement développée sur les principes de la résonance magnétique nucléaire et de la modélisation moléculaire sous les contraintes géométriques issues de la RMN.

I.1. STRUCTURE DES PEPTIDES

Les peptides résultent de l'enchaînement d'acides aminés, la liaison se faisant par le couplage des groupes amines et carboxyles (formation de liaisons amides).

Ils possèdent des propriétés spécifiques qui dépendent de la nature des fonctions chimiques qui les caractérisent, mais également de leurs agencements conformationnels dans l'espace. Ces propriétés conditionnent leurs rôles biologiques extrêmement diversifiés.

C'est pourquoi, pour comprendre leur fonction biologique, il faut être capable de déduire ou de prédire leur structure tridimensionnelle.

I.1.1. Conformation du squelette peptidique

La conformation du squelette peptidique est caractérisée par trois angles rotationnels ϕ , ψ , et ω . Ces angles sont définis comme des angles de torsion autour des liaisons N-C $^{\alpha}$, C $^{\alpha}$ -CO, et CO-N respectivement (Figure I-1).

Par convention,¹ les angles ϕ et ψ varient de -180° à 180° , et les valeurs $\phi = \psi = 180^{\circ}$ correspondent à une chaîne peptidique étirée.

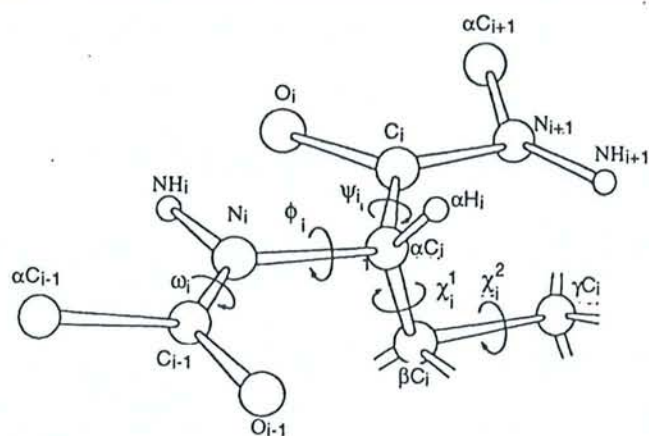


Figure I-1. Définition des angles rotationnels d'une unité peptidique utilisant la nomenclature standard définie par la commission IUPAC-IUB¹ pour les atomes et les angles de torsion.

En raison du caractère partiellement double de la liaison amide, l'angle ω ne prend que des valeurs proches de $\omega = 0^\circ$, correspondant à la disposition *cis* de l'enchaînement peptidique, et de $\omega = \pm 180^\circ$, correspondant à la disposition *trans* (Figure I-2).

Lorsque le peptide est constitué d'acides aminés classiques, la différence d'enthalpie libre entre les deux configurations *cis/trans* ($\Delta G_0 > 4 \text{ kcal.mol}^{-1}$) est telle que l'enchaînement est totalement *trans*. Par contre, lorsqu'intervient un résidu proline ou des acides N-substitués, la différence d'enthalpie libre entre les deux configurations diminue, et il peut exister un équilibre entre les dispositions *cis* et *trans*.

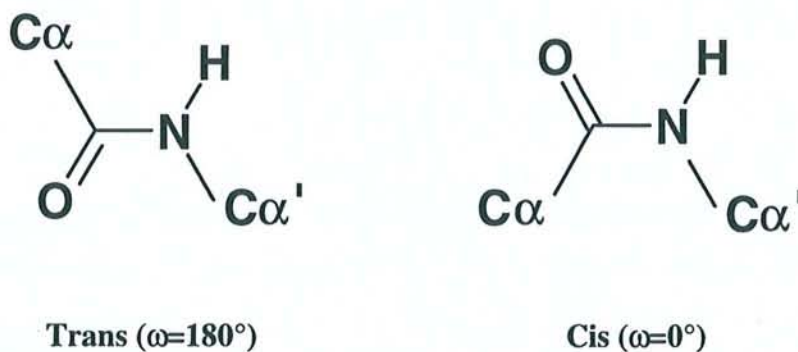


Figure I-2. Représentation des deux dispositions *trans* et *cis* de l'enchaînement peptidique.

I.1.2. Conformation des chaînes latérales

Les chaînes latérales adoptent des conformations diverses résultant des rotations autour des liaisons simples. Leur conformation est décrite par les angles de rotations $\chi_1, \chi_2, \chi_3 \dots$ autour des liaisons $C^\alpha-C^\beta, C^\beta-C^\gamma, C^\gamma-C^\delta$ respectivement.

Tous ces angles varient par convention de -180° à 180° .

Le plus souvent, ces rotations interviennent autour de la liaison C-C qui adoptent trois conformations privilégiées (rotamères $t = 180^\circ, g^+ = 60^\circ$ et $g^- = -60^\circ$).

I.1.3. Les motifs conformationnels

En théorie, une chaîne moléculaire peut adopter une variété infinie de conformations du squelette, chacune correspondant à un ensemble unique de valeurs pour les différents angles de rotation du squelette. Cependant, beaucoup de ces conformations hypothétiques peuvent être exclues en considérant les recouvrements stériques défavorables.

Ainsi, les encombrements stériques entre atomes de résidus voisins le long de la chaîne peptidique réduisent de manière importante le domaine conformationnel permis.

D'autres facteurs, tels que les interactions entre atomes non liés, les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes, la formation de liaison covalente (ponts disulfure) ou les ponts salins interviennent. Ceux-ci sont suffisamment forts et spécifiques pour guider la molécule vers une conformation hautement préférentielle, thermodynamiquement stable.

Grâce à l'analyse conformationnelle des peptides et des protéines par des expériences de RMN, spectroscopie infrarouge, dichroïsme circulaire et diffraction des rayons X, différents motifs conformationnels ont été mis en évidence. Nous rappellerons brièvement les principales structures repliées dans le cas des peptides.

a. Conformère C_5

La structure C_5 est la structure la plus simple, stabilisée par une liaison hydrogène de type $i \rightarrow i$, fermant un cycle à 5 atomes.

Elle est caractéristique d'une chaîne étendue et a été principalement observée dans des petits peptides (Figure I-3).

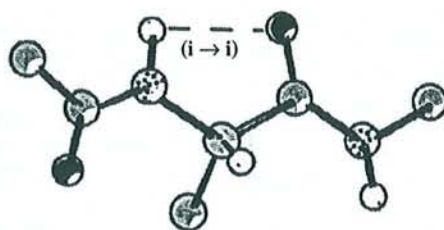


Figure I-3. Représentation de la structure étirée C_5 stabilisée par une interaction $i \rightarrow i$.

b. Coudes ou repliements

Les coudes ou repliements sont des motifs structuraux qui dans les peptides de petite taille (< 5 à 6 résidus), sont le seul mode de structuration de la molécule. Ils sont le plus souvent le motif que reconnaissent les protéines (anticorps, récepteurs).^{2,3}

On distingue différents types de repliements:

i. Repliement γ

Le repliement γ est défini par trois résidus, avec formation d'une liaison hydrogène entre le groupement carbonyle CO_i et le groupement NH_{i+2} , fermant un cycle à 7 atomes.^{4,5}

Les repliements γ sont divisés en deux classes: on distingue les repliements classique et inverse.⁶⁻⁸ La chaîne latérale du résidu médian peut se trouver soit en position équatoriale (repliement inverse) ($\phi = -75^\circ$, $\psi = 50^\circ$) soit en position axiale (repliement γ) ($\phi = 75^\circ$, $\psi = -50^\circ$) (Figure I-4). La conformation équatoriale est généralement la plus stable.^{5,8,9}

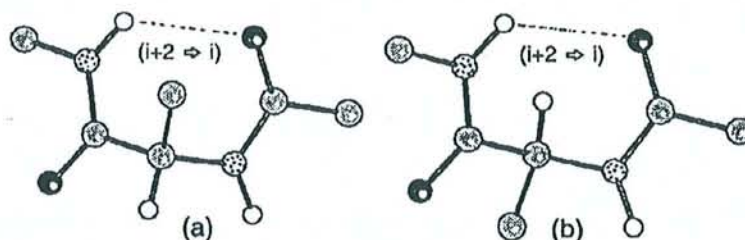


Figure I-4. Représentation des deux formes du repliement γ caractérisé par une liaison hydrogène de type $i+2 \rightarrow i$.

(a): forme axiale; (b): forme équatoriale.

ii. Repliement β

Le repliement ou coude β (β -turn) est constitué de quatre résidus et caractérisé par une liaison hydrogène intramoléculaire, de type $i+3 \rightarrow i$, fermant un cycle à 10 atomes (Figure I-5).

L'appellation repliement β a été étendue par la suite à toute forme repliée "en épingle à cheveux", qu'elle soit ou non le siège d'une liaison hydrogène intramoléculaire, à condition que les atomes de carbone C^α des résidus i et $i+3$ ne soient pas séparés de plus de $7\text{\AA}$ et que ses constituants ne soient pas impliqués dans une hélice.

Il existe plusieurs familles de repliements β , classées et caractérisées par les valeurs des angles (ϕ_{i+1}, ψ_{i+1}) et (ϕ_{i+2}, ψ_{i+2}) (Tableau I-1).¹⁰

11 types de repliements ont été observés dans les protéines. Par exemple, les deux types I et II diffèrent par l'orientation de la liaison peptidique centrale. Le type N' est l'image miroir du type N (N représentant le type de coude suivant la nomenclature du Tableau I-1).

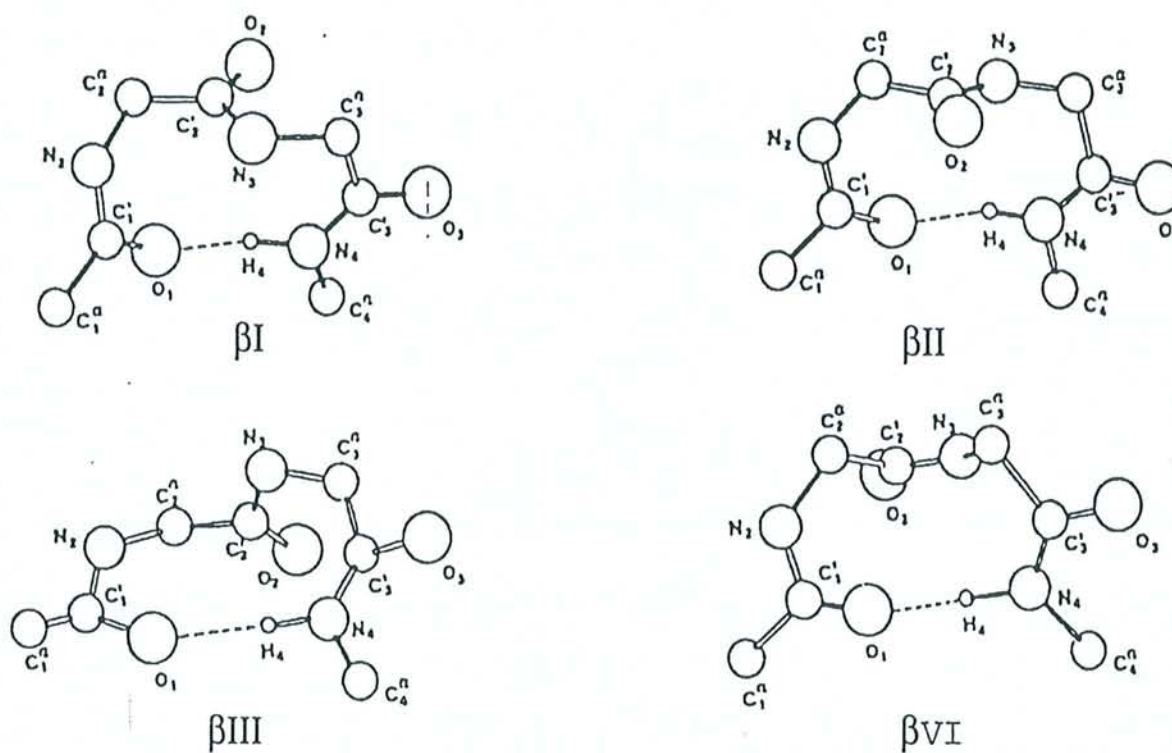


Figure I-5. Représentation des modes de repliement de type β les plus courants dans les peptides et les protéines et caractérisés par une liaison hydrogène de type $i+3 \rightarrow i$.¹¹

Coudes	Résidu i+1		Résidu i+2	
	ϕ	ψ	ϕ	ψ
βI	-60	-30	-90	0
$\beta I'$	60	30	90	0
βII	-60	120	80	0
$\beta II'$	60	-120	-80	0
βIII	-60	-30	-60	-30
$\beta III'$	60	30	60	30
βV	-60	80	80	-80
$\beta VIII$	-60	-30	-120	120
$\beta VIII'$	60	30	120	-120
$\beta VIa1$	-60	120	-90	0
$\beta VIa2$	-120	120	-60	0
βVIb	-135	135	-75	160
βIV	Coudes exclus de toutes les autres catégories			

Tableau I-1. Valeurs caractéristiques des coudes β .

Les coudes βVI comprennent une proline de conformation cis ou un acide N-substitué en position (i+2).¹²

iii. Repliement α

Le repliement α concerne 5 résidus et est stabilisé par une liaison hydrogène intramoléculaire, de type $i+4 \rightarrow i$, fermant un cycle à 13 atomes.

Cette conformation a été rencontrée dans des peptides biologiquement actifs et des depsipeptides.^{13,14} Plusieurs types de repliements α ont été caractérisés. Lorsqu'un tel motif se répète, on obtient la forme hélicoïdale α .

iv. Repliement Asx

Le repliement Asx est observé quand une liaison hydrogène s'établit entre l'hydrogène amide de la chaîne peptidique en position $i+2$ et le carbonyl CO^γ de la chaîne latérale d'un résidu aspartique ou asparagine en position i (Figure I-6).^{15,16}

Ce motif structural a été initialement observé dans des structures cristallines de protéines.¹⁷ On a ainsi pu recenser une cinquantaine de repliements Asx, dans les structures cristallines de 13 protéines.¹⁸ Avec des peptides modèles, il a été montré que cette interaction Asx renforce la formation de repliement β .¹⁹

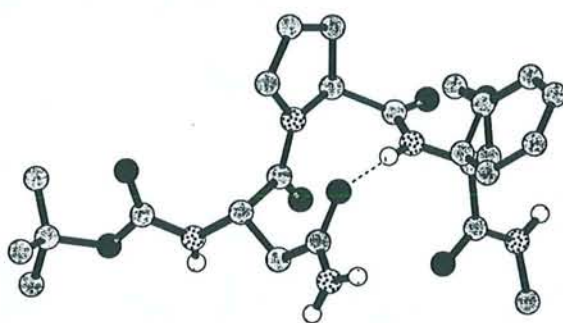


Figure I-6. Repliement Asx dans la structure cristalline du peptide *Boc-Asn-Pro-Ser(Bzl)-NHMe*.

c. Structures secondaires

Les hélices et les feuillets (Figure I-7) sont des structures de première importance dans les protéines globulaires. La stabilité de ces conformations est le résultat de l'établissement d'un réseau de liaisons hydrogène répétitives.

Leurs caractéristiques angulaires sont présentées dans le tableau I-2:

Structure	ϕ	ψ	Résidus / tour
Hélice α_L	57	47	3.6
Hélice α_R	-57	-47	3.6
Hélice 3_{10}	-49	-26	3.0
Feuillet β parallèle	-119	113	-
Feuillet β antiparallèle	-139	135	-

Tableau I-2. Caractéristiques angulaires des hélices α et des feuillets β .

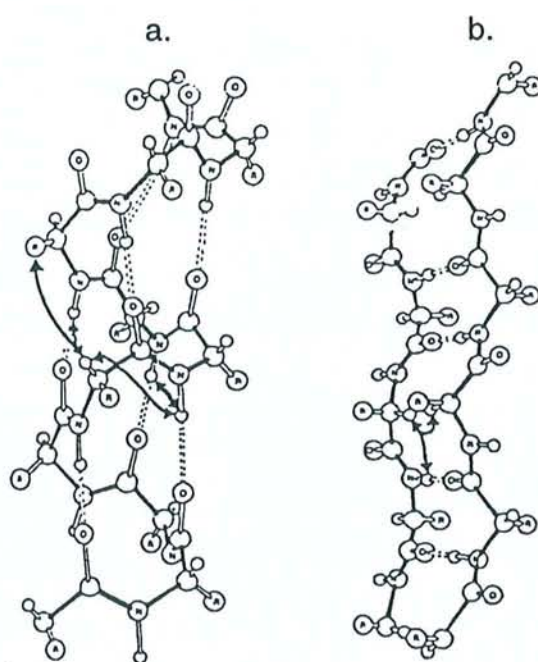


Figure I-7. Exemples de représentation des structures secondaires.

(a): hélice α ; (b): feuillets β .²⁰

L'hélice 3_{10} , formée par la répétition des repliements β_{III} , est une structure assez rare dans les protéines; elle présente trois résidus par tour. Elle a été proposée par Taylor en 1941.²¹

C'est cependant une structure assez fréquente dans les peptides trop courts pour adopter la structure hélicoïdale α , ou contenant des résidus Aib (acide amino butyrique).²²

En général, une hélice 3_{10} est petite et irrégulière (3 à 4 résidus) et se situe à l'extrémité N- ou C-terminale d'une hélice α .²³

d. Les liaisons disulfures

Les ponts disulfure, formés après oxydation par la liaison covalente des chaînes latérales de deux résidus cystéines, sont présents dans de nombreux peptides et protéines. Ces liens servent à restreindre le nombre possible d'arrangements tridimensionnels que ces molécules peuvent adopter. Richardson²⁴ a identifié différentes catégories de ponts disulfure, caractérisées par leurs angles internes χ , en particulier les angles χ_2 , χ_3 et χ_2' (figure I-8).

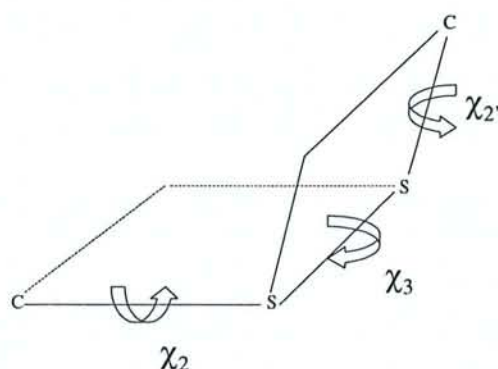


Figure I-8. Représentation des angles internes χ caractérisant la liaison disulfure.

Suivant le signe de l'angle χ_3 , on distingue deux groupes: les ponts à pas gauche ($\chi_3 = -90^\circ$) et à pas droit ($\chi_3 = 90^\circ$), qui sont représentés en égale proportion. Les angles χ_2 n'ont pas de configuration privilégiée. Les angles χ_1 peuvent adopter 3 valeurs ($+60^\circ$, -60° et 180°), avec une préférence dans la position où $\chi_1 = -60^\circ$. On peut ainsi déterminer 4 grandes classes de ponts disulfure, basées sur les signes de ces angles (Tableau I-3).

Type de liaison disulfure	χ_2	χ_3	χ_2'	$dC^\alpha-C^{\alpha'}$
<i>Left handed spiral</i>	-	-	-	$\sim 6\text{\AA}$
<i>Right handed hook</i>	+	+	-	$\sim 5\text{\AA}$
<i>Right handed spiral</i>	+	+	+	$\sim 6\text{\AA}$
<i>Short right handed hook</i>	-	+	-	$\sim 4-4.5\text{\AA}$

Tableau I-3. Caractéristiques angulaires et dénomination des ponts disulfures.

Presque toutes les configurations à pas gauche se trouvent dans la configuration *left handed spiral* ($\chi_1 = \chi_1' = -60^\circ$; $\chi_2 = \chi_2' = \chi_3 = -90^\circ$). La majorité des configurations à pas droit se trouvent dans la configuration *right handed hook* ($\chi_1 = \chi_1' = -60^\circ$; $\chi_2 = 120^\circ$; $\chi_2' = -50^\circ$; $\chi_3 = 90^\circ$).

I.2. LES PSEUDOPEPTIDES

Les peptides et protéines sont impliqués dans un grand nombre de processus fondamentaux. Ils interviennent notamment dans les catalyses enzymatiques, la défense immunitaire, la génération et la transmission de l'influx nerveux, le stockage et le transport de petites molécules ou d'ions. De nombreux peptides, biologiquement actifs, isolés et caractérisés au cours des trente dernières années, présentent un intérêt thérapeutique potentiel.

Leur préparation, dans le but de concevoir des médicaments superactifs spécifiques, non toxiques et à durée d'action accrue, a fait l'objet d'intenses recherches en pharmacologie.^{25,26} Ainsi, l'insuline, utilisée pour le traitement du diabète, est un des exemples les plus connus de médicaments peptidiques commercialisés.

En immunologie, l'utilisation de peptides correspondant à des épitopes viraux, bactériens ou tumoraux, pour induire les réactions de défense est une stratégie prometteuse dans le développement des vaccins synthétiques. Ils entrent également dans l'élaboration de kits de diagnostic destinés à la détection d'anticorps chez les patients. Cependant, la faible résistance de ces peptides à la protéolyse dans les fluides biologiques, leur mauvaise diffusion à travers les systèmes membranaires ainsi que leur faible sélectivité vis à vis de la cible souhaitée, due à une trop grande flexibilité conformationnelle, demeurent des facteurs limitants.^{25,27} Pour remédier à ces problèmes et développer des analogues plus actifs, plus spécifiques et à durée de vie accrue, de nombreuses approches ont été proposées. Par exemple, les cyclisations ont été envisagées pour mimer plus précisément la région correspondante dans la protéine parente, ou l'introduction d'acides aminés non naturels, comme les acides aminés β ou N-méthylés. Des modifications de la nature chimique du squelette et plus particulièrement de la liaison peptidique, apparaissent également comme des stratégies intéressantes pour améliorer les caractéristiques physico-chimiques des peptides antigéniques. En effet, les atomes d'hydrogène et d'oxygène de la liaison peptidique peuvent, de la même manière que dans les protéines, être impliqués dans des liaisons hydrogène intramoléculaires et induire la structuration de la molécule.²⁸

Tout en respectant l'orientation et la nature des chaînes latérales, responsables en grande partie de la reconnaissance moléculaire des peptides, ces modifications ont conduit à l'obtention de molécules présentant une meilleure résistance vis-à-vis de nombreuses protéases, une structuration accrue ainsi qu'un meilleur franchissement des barrières biologiques.

Ces synthèses ont largement bénéficié des techniques de synthèse peptidique en phase solide. Elles ont connu un nouvel essor avec le développement de la chimie combinatoire, qui permet la synthèse simultanée d'un grand nombre de composés.

Afin de faciliter la compréhension des modifications pseudopeptidiques introduites dans la séquence primaire des molécules, la nomenclature décrite par Spatola est couramment utilisée.²⁹ Par exemple, une modification pseudopeptidique introduite entre deux résidus sera écrite $X_{aa}\Psi[A]X_{bb}$, où A représente le groupe substitué au groupe amide entre les deux acides aminés X_{aa} et X_{bb} .

Des exemples de modifications sont présentés sur la figure I-9.

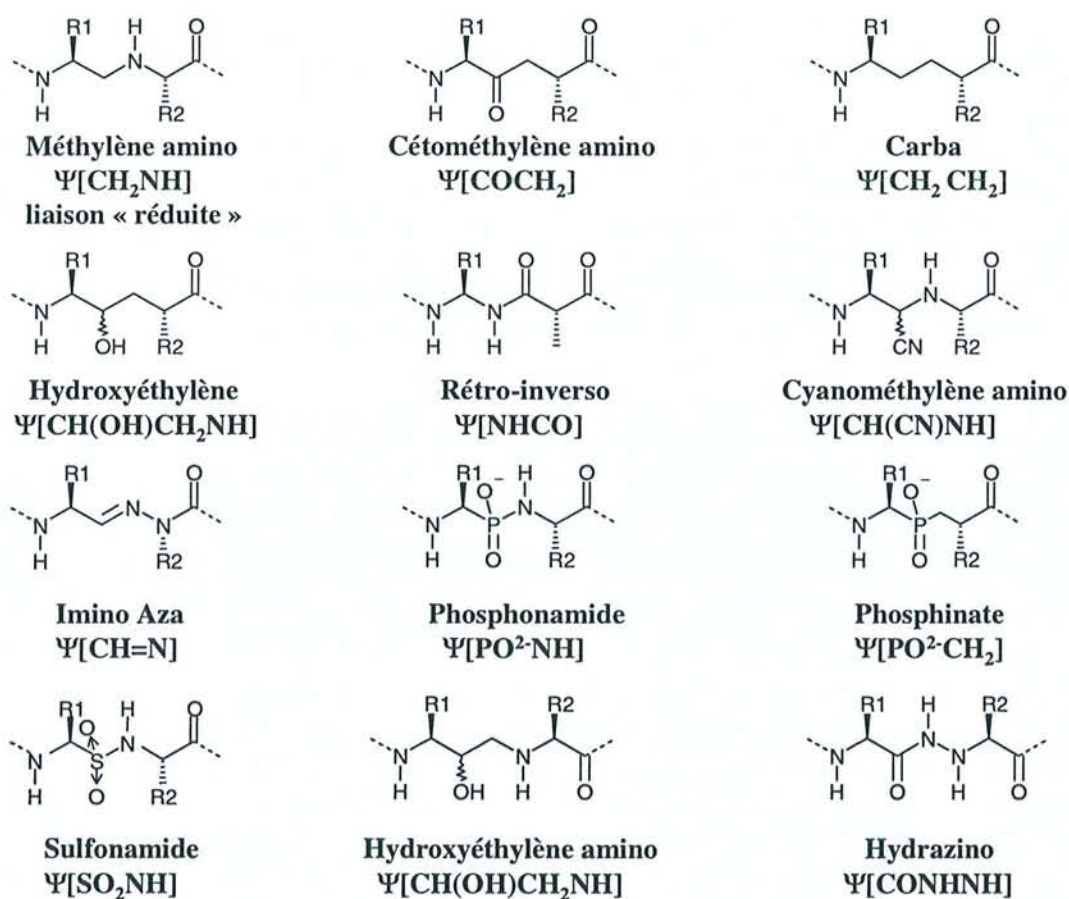


Figure I-9. Exemples de liaisons pseudopeptidiques.

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la modification rétro-inverso $\Psi[\text{NHCO}]$ et à la substitution par des acides β -aminés. Les implications structurales concernant ces deux modifications seront discutées. Une partie sera plus

spécifiquement développée sur les caractéristiques conformationnelles induites par différentes cyclisations sur des peptides linéaires.

I.2.1. La modification rétro-inverso ψ [NHCO]

La modification rétro-inverso ψ [NHCO] est certainement, parmi toutes les modifications pseudopeptidiques, l'une des plus anciennes et des plus utilisées. L'introduction de cette modification peut être envisagée sur une liaison peptidique, on parle alors d'analogue partiellement rétro-inverso ou sur la totalité du peptide, ce qui conduit à un analogue entièrement rétro-inverso.

Un analogue entièrement rétro-inverso d'un peptide naturel est obtenu en inversant à la fois la chiralité de chaque carbone $C^\alpha H$ et la direction de la propagation de la chaîne peptidique. On admet généralement que sous l'influence de cette modification, l'orientation spatiale des chaînes latérales actives est conservée par rapport à celle du peptide parent. En superposant les chaînes latérales du peptide naturel et de l'analogue rétro-inverso, on observe l'inversion de toutes les liaisons peptidiques (Figure I-10). Afin de parfaire le mimétisme, l'extrémité N-terminale peut être remplacée par le dérivé *gem-diaminoalkyle*, et l'extrémité C-terminale par un dérivé malonique. Pour éviter des problèmes de charges ioniques et afin de simplifier les synthèses, il est possible de bloquer les extrémités, par l'utilisation d'une résine de type amide et par acétylation de l'extrémité N-terminale.

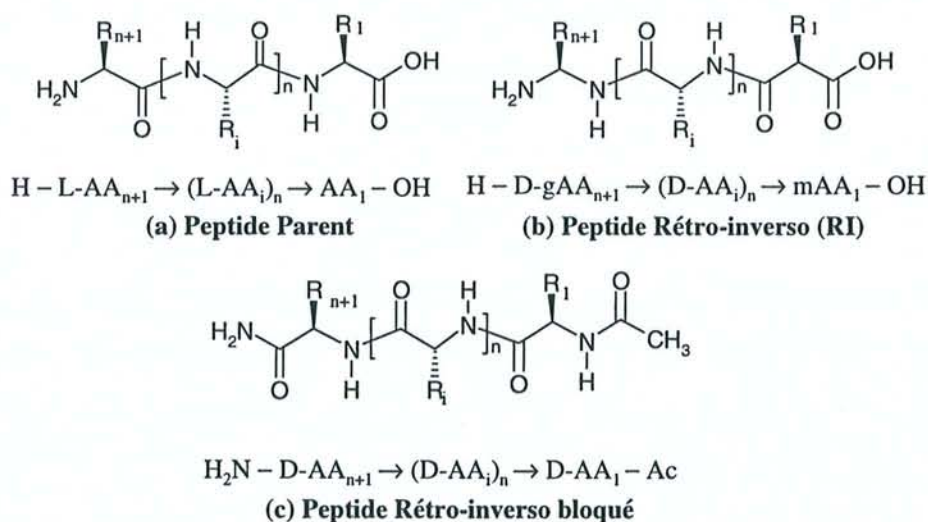


Figure I-10. (a) Peptide parent; (b) Peptide rétro-inverso; (c) Peptide rétro-inverso bloqué.

La modification rétro-inverso a été mentionnée pour la première fois en 1969 par Shemyakin et coll.³⁰ et a été développée par la suite par de nombreuses équipes.

Les méthodologies de synthèse ainsi que les implications biologiques et structurales des composés rétro-inverso ont été notamment détaillées dans une revue de Chorev et Goodman,³¹ et plus récemment dans une revue de Fletcher et Campbell.³²

En immunologie, plusieurs applications intéressantes de l'approche rétro-inverso ont été décrites dans la littérature à partir de 1994.

Guichard et al.³³ ont montré que les peptides rétro-inverso, qui présentent des demi-vies 100 fois supérieures au peptide parent étaient immunogènes, c'est-à-dire capables d'induire la production d'anticorps spécifiques chez un animal immunisé. Ces anticorps étaient également capables de reconnaître efficacement la protéine parente.

Parallèlement, un groupe américain publiait des résultats similaires en utilisant un petit peptide synthétique de 13 acides aminés, analogue d'une région de la protéine de surface CD4.³⁴ Les lymphocytes CD4⁺ sont impliqués dans la pathologie de l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), modèle animal de la sclérose en plaques.

Il a été montré que des anticorps monoclonaux anti-CD4 inhibaient le développement de l'EAE chez les rongeurs. Dans le cadre de cette étude, des effets thérapeutiques similaires ont été obtenus en utilisant un analogue cyclique entièrement rétro-inverso d'une région en boucle de la protéine CD4. Les auteurs ont décelé, à l'aide d'anticorps, que le peptide rétro-inverso générait une surface équivalente à celle du peptide parent, et surtout que l'analogue avait un effet inhibiteur sur le développement de l'EAE.

En 1996, la même équipe montrait qu'un peptide cyclique rétro-inverso correspondant à une région du récepteur des immunoglobulines E (IgE), pouvait inhiber l'interaction entre l'IgE et ce même récepteur.³⁵ Ce type d'étude permet par la même de développer des composés permettant le contrôle des maladies allergènes médiées par des IgE.

En 1995, Verdoliva et coll.³⁶ ont observé que la capacité plus ou moins grande des anticorps à reconnaître de manière croisée des analogues différents, c'est-à-dire des structures différentes, semblait être un phénomène général. Un modèle de reconnaissance a ainsi été proposé, basé sur l'hypothèse que les différents peptides adoptent une conformation particulière lors de la liaison à l'anticorps, ce qui permet à ce dernier de les reconnaître de la même manière.

Cela a été confirmé par une étude structurale réalisée sur l'épitope majeur du virus de la fièvre aphteuse (Foot and Mouth Disease Virus, FMDV). Outre la reconnaissance de l'analogue rétro-inverso de cet épitope par des anticorps antiviral provenant d'animaux immunisés ou

infectés, des études ont montré que l'analogue rétro-inverso induit, chez des cobayes immunisés, une réponse neutralisante (avec des titres très élevés) et protectrice contre l'infection virale.^{37,38}

Contrairement à Carver et coll.³⁹, qui ont étudié ces peptides en solution dans le TFE et ont suggéré que les deux composés adoptaient une structure en hélice α , droite pour la séquence naturelle et gauche pour le dérivé rétro-inverso, Petit et coll.⁴⁰ ont étudié ces mêmes peptides en solution aqueuse et ont montré que l'analogue rétro-inverso RI est beaucoup plus structuré que le parent dans sa partie C-terminale. En particulier, le squelette peptidique des deux composés a pu être superposé sur le segment 156-159 qui serait la partie reconnue par les anticorps anti-VP1, ce qui expliquerait en partie les propriétés de réactivité croisée de ces composés. La structuration plus importante de la portion 145-154 du peptide RI en coudes β (alors qu'elle est très flexible avec le peptide parent) serait probablement la cause de son immunogénicité accrue.

Une étude⁴¹ réalisée sur un fragment du VIH et son analogue rétro-inverso a démontré l'impact du solvant sur la structure secondaire. Les auteurs ont prouvé que les conformations du peptide parent étaient conservées aussi bien dans des environnements polaires que non polaires, alors qu'elles étaient plus dépendantes du solvant concernant son analogue rétro-inverso. Ces résultats montrent que les conformations de ce dernier, présent sous forme d'hélices α dans le milieu polaire, sont partiellement déstabilisées dans un environnement micellaire: le peptide adopte alors une structure plus étendue. Ces comportements conformationnels différents dans des solvants polaires et non polaires pourraient expliquer les différences observées au niveau de l'activité de ces peptides. Par exemple, des tests immunochimiques réalisés sur ce peptide rétro-inverso sur la prolifération des lymphocytes (résultats non publiés) ont montré des activités plus faibles que celles du peptide parent. Les auteurs suggèrent que ces différences pourraient être attribuées à l'influence des groupes C- et N-terminaux. On a par exemple observé que certains peptides rétro-inverso^{42,43} synthétisés sans tenir compte des parties N- et C-terminales présentaient des différences d'activité conséquente par rapport à leurs parents. Si ces groupes s'avèrent cruciaux pour l'activité biologique, le concept RI s'avèrerait inefficace.

L'approche rétro-inverso comporte certaines limitations. En pratique, une telle modification n'est applicable avec succès que dans certains cas. La conservation topologique absolue des

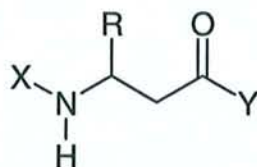
chaînes latérales des acides aminés D par rapport aux acides aminés L demeure essentielle. Depuis l'origine, ceci n'est pas vérifié dans toutes les modifications rétro-inverso.⁴⁴

Lorsque la conformation du peptide biologiquement actif requiert des éléments structuraux critiques, le concept RI cause des perturbations incompatibles avec une activité biologique. Cela est d'autant plus vrai lorsque certaines liaisons peptidiques sont impliquées, leur inversion entraîne nécessairement des modifications structurales. Wermuth et coll.⁴⁵ ont réalisé une étude conformationnelle systématique sur des peptides cycliques comportant le motif RGD; tous les analogues rétro-inverso montraient des activités plus faibles par rapport aux composés parent, à l'exception d'un seul cas. Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'en sus de l'orientation des chaînes latérales, la direction de certaines liaisons amide dans la séquence RGD est cruciale pour une liaison optimale sur le récepteur. Cette hypothèse a été confirmée par une étude réalisée par Dal Pozzo et coll.⁴⁶ sur des peptides linéaires comportant le motif RGD.

L'approche rétro-inverso apparaît comme une démarche originale dans le cadre de la reconnaissance antigénique. Cependant, les études structurales entreprises jusqu'à présent ne permettent pas de définir sans ambiguïtés les caractéristiques générales expliquant la meilleure réactivité des rétro-inverso.

I.2.2. Les acides β -aminés

Les acides β -aminés, bien que moins abondants que les acides α -aminés, sont des composants de plusieurs peptides naturels.⁴⁷



La présence d'un groupement CH_2 supplémentaire dans le squelette de ces molécules était supposée augmenter la liberté conformationnelle du résidu présent dans un enchaînement peptidique donné, et par-là même, donner lieu à des structures moins ordonnées que dans le cas des acides α aminés.

Or les β -peptides, composés exclusivement d'acides β -aminés, adoptent en solution des conformations spécifiques intéressantes, beaucoup plus stables que celles de leurs analogues α -aminés. Des peptides cycliques ou linéaires comportant des acides β -aminés peuvent adopter des conformations en repliement β , en hélice ou en feuillet.^{48,49} D'autre part, leur stabilité biologique suggère que des composés de ce type, comportant des chaînes latérales spécifiques attachées au squelette peptidique et ayant la géométrie adéquate, sont capables de se lier à des récepteurs reconnaissant des enchaînements α . Ces propriétés, combinées à leur stabilité vis-à-vis des protéases, suggèrent que les β -peptides pourraient être de bons candidats pour la conception de médicaments.

Un certain nombre de β -peptides pourraient être immunogènes et il serait intéressant de pouvoir étudier comment une protéine globulaire telle qu'un anticorps réagirait du point de vue de la reconnaissance immunitaire vis-à-vis d'un β -peptide.

I.2.3. Les cyclisations

Les ponts disulfure, formés par la liaison covalente des chaînes latérales de deux résidus cystéines après oxydation, sont présents dans de nombreux peptides et protéines. Ces liens servent à restreindre le nombre possible d'arrangements tridimensionnels que ces molécules peuvent adopter.

L'activité biologique est très souvent liée à cette restriction conformationnelle dans les peptides naturels. La liaison disulfure naturelle est certes essentielle, mais sa modification par une liaison pouvant induire le même type de structures secondaires peut conserver son activité. Dans le cas de peptides antimicrobiens situés dans la partie C-terminale de l'espèce *Rana*,⁵⁰ la réduction du pont disulfure entraîne une perte totale de l'activité, alors que le remplacement des cystéines par des sérines conserve l'activité. Les auteurs ont montré que la liaison disulfure stabilisait l'induction d'une structure en hélice α , mais que sa présence pour l'activité dépendait de la structure primaire du peptide concerné. L'un des peptides linéaires contenant une sérine possède la même structure en hélice α et conserve ainsi l'activité. Son analogue, ayant l'autre cystéine remplacée, ne conserve pas l'activité car incapable d'induire une hélice α . Ces différences peuvent s'expliquer par le caractère hydrophile, stabilisant l'hélice, plus ou moins important entre la sérine et la cystéine. Ces résultats peuvent ainsi conduire à la possibilité de développer d'autres peptides actifs sans la présence de liaison disulfure, souvent difficile à synthétiser.

Dans d'autres cas, l'introduction d'une contrainte structurale peut permettre de conserver, voire même d'augmenter l'activité biologique d'un peptide.^{26,51} La cyclisation de peptides linéaires a été appliquée avec succès dans le cas par exemple de α -melanotropine (α -MSH) et des enképhalines.

La cyclisation par liaison disulfure ou l'introduction de chaînes latérales liées de façon covalente, telles que les ponts lactames par exemple, conduit à une augmentation et une stabilisation de structures secondaires comme l'hélice α .⁵²⁻⁵⁹

Le pont lactame possède les avantages d'une synthèse relativement aisée par les techniques de synthèse en phase solide, une bonne résistance à la protéolyse,^{54,57} et une insensibilité aux conditions rédox dans les milieux biologiques.

Cependant, un fort degré de structuration n'implique pas forcément une bonne activité biologique. C'est le cas par exemple de modèles peptidiques d'un domaine N-terminal conservé de l'apolipoprotéine E, qui accroissent la liaison du "Low-density lipoprotein" (LDL) via un récepteur autre que le récepteur du LDL.⁶⁰ Les ponts lactames ont été utilisés pour stabiliser des structures secondaires spécifiques. Dans cette étude, il ressort que le peptide le moins structuré (avec une interruption de l'hélice α) est celui qui possède la meilleure activité, en raison de l'existence d'une boucle charnière capable d'adopter différentes conformations. Cette dernière apparaît comme essentielle pour moduler les interactions entre l'apolipoprotéine E et ses différents récepteurs.

D'autre part, la taille des cycles mis en jeu peut jouer un rôle prépondérant dans la réactivité. Par exemple, un cycle trop petit peut ne pas permettre un positionnement correct de la molécule dans le récepteur pour une interaction optimale. Cela a été observé pour des analogues cycliques de la mélanotropine: des cycles de 23 à 24 atomes montraient une activité biologique prolongée⁶¹ mais des systèmes plus petits (de 20 à 22 atomes) ne montraient plus la même activité.

Toutes les approches de modifications ne sont pas toujours compatibles avec une activité biologique. Une grande majorité de modifications conduit à des composés inactifs ou très faiblement actifs, et cela varie énormément en fonction des fragments peptidiques considérés. Une étude systématique des propriétés conformationnelles pourrait aider à mieux appréhender les implications structurales mises en jeu.

I.3. LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Le principe de la résonance magnétique nucléaire repose sur l'interaction entre un champ magnétique extérieur fixé et le moment magnétique d'un noyau atomique. Pour les peptides et protéines, le noyau sera ^1H , ^{13}C ou ^{15}N .

Dans ce champ magnétique imposé et homogène, les moments magnétiques de spin non nul ont un mouvement de précession que l'on peut détecter et dont la fréquence est caractéristique du noyau observé.

Le développement considérable des techniques de la RMN au cours de ces dernières années en a fait un outil efficace de détermination des structures tridimensionnelles de protéines et de molécules biologiques en solution, par exemple des protéines, seules ou en interaction avec un ligand.^{62,63}

Le développement des méthodes d'expression permet maintenant d'avoir accès à un enrichissement isotopique en ^{13}C et en ^{15}N , et donc à la résolution de structures de protéines de masse moléculaire de plus en plus élevées (jusqu'à 30 kDa), et ce, par le biais des méthodes multidimensionnelles hétéronucléaires.^{64,65} Au-delà d'un poids moléculaire de 30 kDa, on pourra aussi marquer sélectivement un certain type de résidus (Lys, Leu, ...), ce qui peut permettre d'obtenir des informations sur les interactions entre les différents partenaires.

I.3.1. Paramètres RMN liés à la conformation

Les expériences de RMN apportent différents types d'informations, nécessaires à la construction d'un modèle moléculaire, que nous rappellerons brièvement.

hydrogène intramoléculaires, ce qui entraîne une plus forte variation du déplacement chimique des protons amides solvatés.

Dans un milieu aprotique dipolaire comme le DMSO, une variation $\Delta\delta/\Delta T$ inférieure à -3.10^{-3} ppm/K caractérise une liaison hydrogène intramoléculaire et le proton amide responsable est dit protégé du solvant.^{66,67}

b. Les constantes de couplage vicinal 3J

Le couplage spin-spin est un phénomène important en RMN.

Il provient de l'existence d'une interaction directe entre les noyaux, indépendante du champ magnétique externe. Le couplage de protons séparés par trois liaisons dépend de la position relative dans l'espace des deux noyaux. Dans le cas de l'éthane, Karplus a montré que la constante de couplage vicinal 3J est reliée à l'angle dièdre θ , formé par les deux plans définis par chacun des protons et par la liaison centrale C-C, par la relation empirique:⁶⁸

$$^3J(\text{Hz}) = A \cos^2 \theta - 0.28 \text{ avec } A = 8.5 \text{ pour } 0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ$$
$$\text{et } A = 9.5 \text{ pour } 90^\circ \geq \theta \geq 180^\circ$$

Pour chaque type de liaison chimique, une relation de type Karplus spécifique a été étalonnée de façon semi-empirique à partir de molécules modèles pour tenir compte des variations de la géométrie des liaisons, de l'électronégativité et de l'orientation des substituants portés par les atomes de carbone.

Dans le cas de la liaison amide, plusieurs relations ont été proposées.⁶⁹⁻⁷¹

La dépendance conformationnelle de la constante de couplage J_{NH}^α pour les résidus C^α substitués est représentée sur la figure I-11.

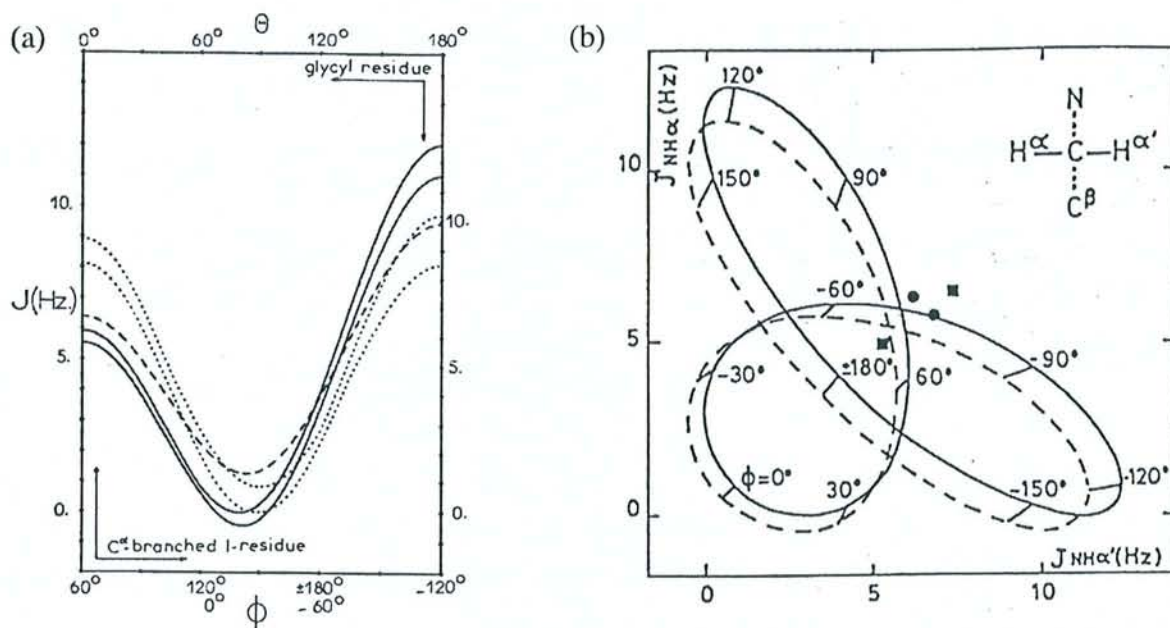


Figure I-11. (a) Dépendance conformationnelle de la constante de couplage J_{NH}^{α} pour les résidus C^{α} substitués, en trait pointillé,⁶⁹ en trait plein⁷⁰ et en tirets.⁷¹
 (b) Relation entre les constantes de couplage J_{NH}^{α} et $J_{NH}^{\alpha'}$ en fonction de l'angle ϕ dans le cas de la glycine.⁷²

c. L'effet Overhauser nucléaire (NOE)

Lorsqu'il existe un couplage dipolaire (à travers l'espace) entre deux spins, l'irradiation de l'un des spins par un champ magnétique se répercute sur le second entraînant une modification de son aimantation. Ce mécanisme de relaxation croisée donne alors lieu à l'effet Overhauser nucléaire. L'intensité de cet effet dépend de la distance r entre deux noyaux (proportionnelle à r^{-6}). De ce fait, il ne se détecte qu'entre protons spatialement proches, c'est-à-dire séparés de moins de 5 Å.

Lorsque l'on s'est assuré que les conditions expérimentales ne correspondent pas au phénomène de diffusion de spin, les distances interprotoniques peuvent être estimées en comparant l'intensité des corrélations croisées V_{ij} à l'intensité V_{ref} d'un pic croisé de référence, correspondant à deux protons dont la distance est connue.

La distance de référence est souvent la distance entre deux protons géminaux (1.78 Å) ou entre les protons H^{δ} et H^{ϵ} (2.48 Å) du cycle aromatique de la tyrosine.

L'analyse conjointe des NOE et des constantes de couplage 3J permet de caractériser les structures secondaires des peptides et des protéines ainsi que les états rotationnels de la liaison

C^α - C^β de leur chaîne latérale. Les distances interprotoniques et les angles dièdres ainsi calculés constituent un ensemble de contraintes qui seront introduites dans le champ de forces des programmes de modélisation moléculaire.

I.3.2. La RMN appliquée à l'étude des biomolécules

Dès que le spectre protonique devient complexe, l'élucidation de la structure des macromolécules d'intérêt biologique nécessite l'utilisation des techniques de RMN à deux dimensions.

a. RMN à deux dimensions

Une expérience à deux dimensions est constituée par l'enregistrement d'une série de spectres à une dimension utilisant une séquence RMN composée de plusieurs périodes:⁷³

- (i) une période de préparation des noyaux (retour à l'équilibre)
- (ii) une période d'excitation du système à l'aide d'une impulsion
- (iii) un temps t_1 d'incrémentación
- (iv) un temps de mélange
- (v) enfin une période d'acquisition du signal pendant un temps t_2

On obtient ainsi un signal qui est fonction des deux temps d'évolution t_1 et t_2 , dont la double transformée de Fourier permet d'obtenir un ensemble de plusieurs spectres dans les deux dimensions exprimées en fréquence (Hz). Dans les expériences homonucléaires, la diagonale de ce spectre 2D correspond au spectre à une dimension classique. Hors diagonale apparaissent des taches de corrélation caractéristiques du type de transfert choisi.

Par exemple, dans l'étude des molécules biologiques, quatre expériences 2D sont couramment utilisées:

- TOCSY (total correlation spectroscopy) ou HOHAHA (homonuclear Hartmann Hahn),^{74,75} qui permet l'identification du système complet d'un résidu acide aminé donné.
- COSY et COSY DQF (correlation spectroscopy),⁷⁶ qui permettent de mettre en évidence des protons couplés.

- NOESY (nuclear Overhauser effect spectroscopy)^{77,78} qui permet de mettre en évidence d'éventuelles corrélations dipolaires entre deux protons dont la distance, à travers l'espace, est inférieure ou égale à 5Å.
- ROESY (rotating frame NOE spectroscopy), utilisée pour déterminer d'éventuelles corrélations dipolaires inférieure ou égale à 3Å, pour les molécules de faible masse.^{79,80}

b. Interaction antigène/anticorps

Du fait de leur taille relativement importante, il est difficile d'examiner les complexes antigène/ anticorps par les techniques de RMN "classiques".

Par des techniques indirectes comme le filtrage dynamique⁸¹ et le transfert des effets Overhauser nucléaires (NOESY transféré),^{82,83} il est cependant possible d'obtenir des renseignements d'ordre structural sur la conformation de l'antigène au contact de l'anticorps.

i. Filtrage dynamique

Les signaux RMN d'un anticorps (~150 kDa) sont très élargis du fait du faible temps T_2 , tandis que ceux de l'antigène (~1 kDa) sont fins.

Le filtrage dynamique consiste à tirer partie de cette différence de largeur de pics pour distinguer les parties de la molécule qui ne sont pas en contact direct avec le site de liaison à l'anticorps et qui conservent ainsi un certain degré de mobilité, de ceux qui sont immobilisés dans le site de liaison. La figure I-12 illustre ce phénomène.

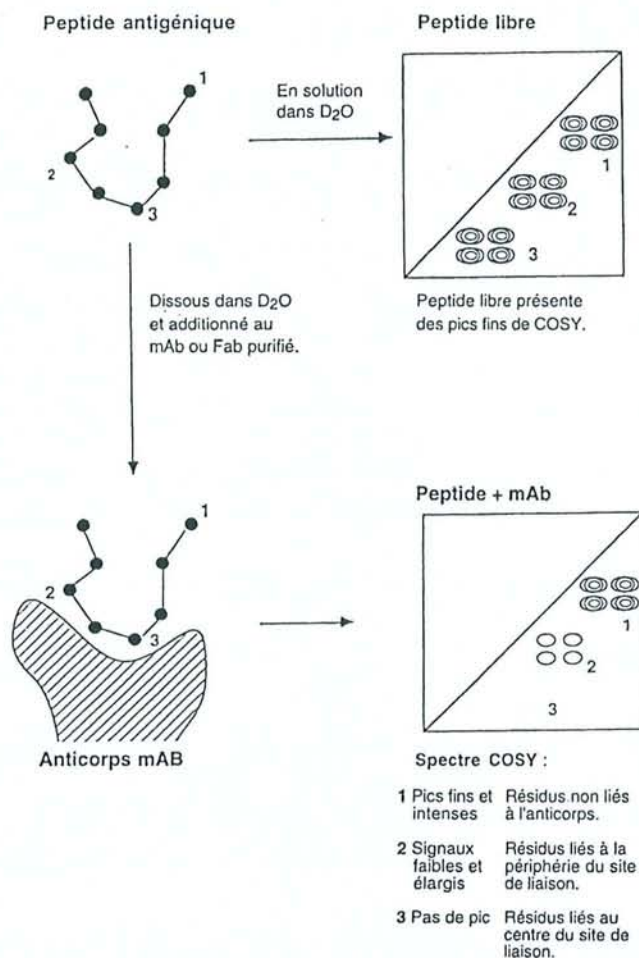


Figure I-12. Représentation schématique des expériences COSY et COSY avec filtrage dynamique.⁸⁴

ii. Expérience NOESY transféré (TR-NOE)

L'expérience de NOE transféré est un exemple particulier de l'expérience NOESY « classique » réalisée lorsque les molécules de ligand sont en solution et en échange entre l'état libre et l'état lié à une protéine. L'échange rapide entre ces deux états est à l'origine d'un transfert d'information provenant d'une relaxation croisée entre deux noyaux du ligand lié vers les deux même noyaux du ligand libre.



Le phénomène de NOE transféré, en particulier concernant les TR-NOE intermoléculaires, a été mentionné pour la première fois par Balaram et Bothner-By^{85,86} en 1972 sur l'interaction d'hormones peptidiques avec la neurophysine II.

En 1979, Albrand et coll.⁸⁷ proposent d'appliquer cette technique à l'étude des conformations des ligands liés aux protéines. La théorie sur le transfert des NOE a été ensuite développée par Clore et Gronenborn^{82,83}. Depuis, l'expérience de NOE transféré a trouvé de nombreuses applications⁸⁸ et ses capacités, de même que ses limites, ont été détaillées dans une revue de Campbell et Sykes.⁸⁹

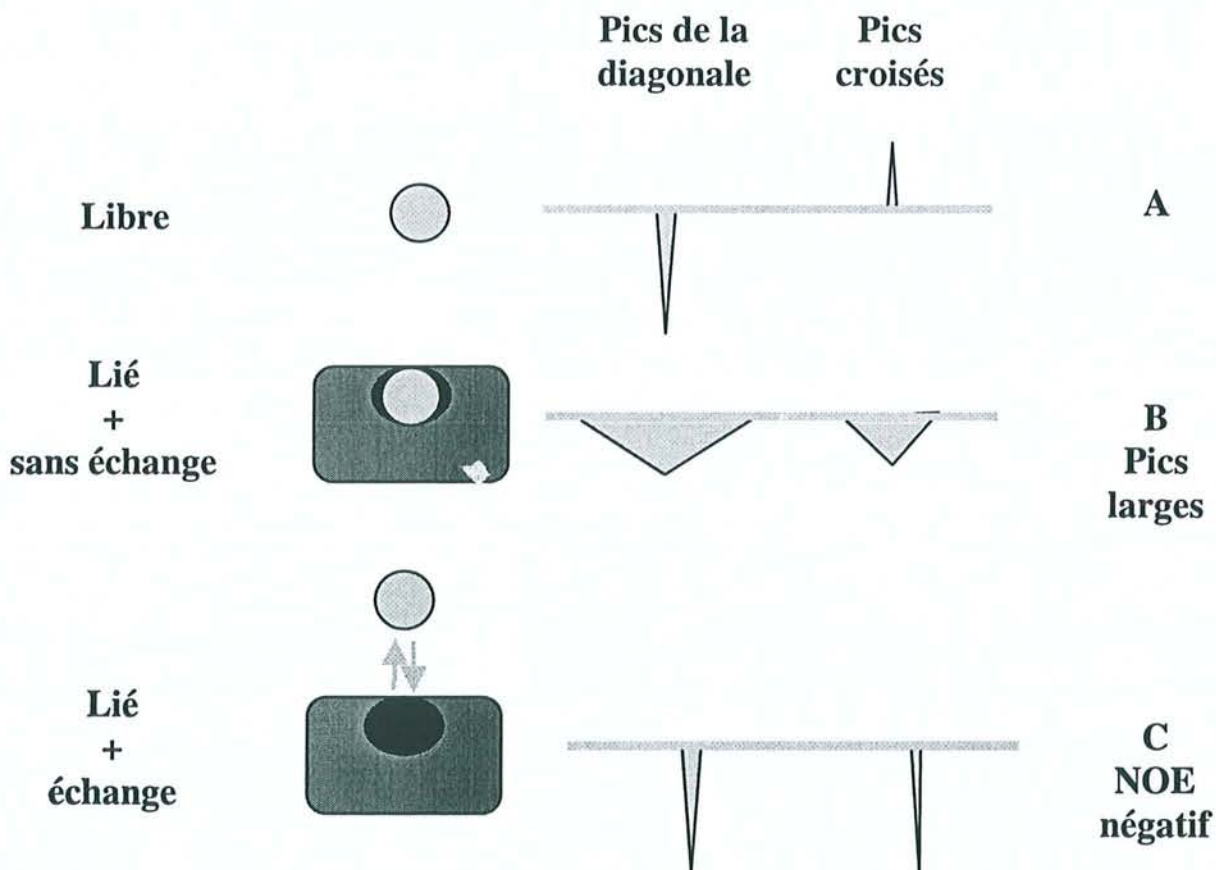


Figure I-13. Phénomène du NOE transféré

Dans une expérience NOESY, un peptide antigénique de masse relativement faible présente en solution des effets Overhauser Nucléaire (NOE) nuls ou faiblement positifs du fait de sa valeur $\omega\tau_c$ proche de l'unité, lorsqu'il est à l'état libre (figure I-13-A).

Lorsque le ligand se lie étroitement à la protéine, il adopte le temps de corrélation de la protéine, l'effet NOE devient négatif et peut atteindre une amplitude deux fois plus importante. Cependant, les signaux RMN du ligand lié subissent un élargissement proportionnel à $1/\pi T_2$ très important, ce qui rend les signaux pratiquement indétectables (Figure I-13-B).

Dans un système en échange, on peut détecter sur les signaux RMN de la forme libre des informations concernant la structure liée du ligand au sein du récepteur. Le transfert d'aimantation se traduit par des effets NOE négatifs et intenses. Les signaux observés sont visibles et relativement fins puisque l'on observe les résonances du peptide sous sa forme libre (Figure I-13-C).

En pratique, la technique du NOE transféré consiste à choisir des conditions expérimentales adéquates telles que les formes libre et liée du ligand s'échangent rapidement dans l'échelle de temps des déplacements chimiques, mais suffisamment lentement dans l'échelle de temps qui régit l'établissement de l'aimantation des noyaux. Selon les constantes cinétiques de fixation de l'antigène à l'anticorps, cela correspond à un excès plus ou moins important du ligand par rapport à l'anticorps. Dans ces conditions, la partie du ligand reconnue par l'anticorps adopte le même temps de relaxation T_2 propre à l'anticorps et donne naissance à des effets NOE négatifs assez intenses. Par exemple, pour une protéine de masse moléculaire 180000 et pour un temps de mélange de 200ms, on constate que l'intensité du NOE transféré commence par croître lorsque la proportion [ligand]/[protéine] croît, puis décroît très rapidement lorsque la population du complexe ligand-protéine se situe au-dessous d'une valeur critique qui dépend des constantes cinétiques de formation/dissociation du complexe (Figure I-14).

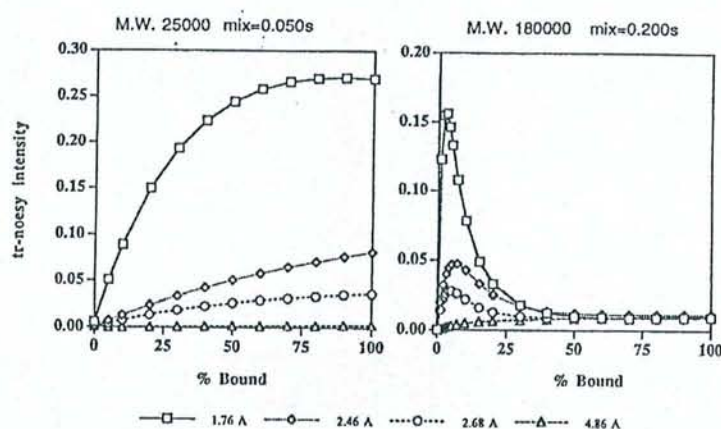


Figure I-14. Courbe des intensités NOE en fonction du pourcentage du complexe ligand-protéine pour deux temps de mélange, pour deux tailles du complexe et pour différentes distances internucléaires. ⁸⁹

Les équations théoriques essentielles qui permettent la meilleure exploitation expérimentale de la technique TR-NOESY sont développées en annexe C.

I.4. LA MODELISATION MOLECULAIRE

La modélisation moléculaire est une méthode relativement ancienne qui a connu un développement spectaculaire grâce aux améliorations des capacités informatiques.

Elle est ainsi devenue partie intégrante du registre des méthodes d'analyse structurale, au même titre que la spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire et la diffraction des rayons X.

Son but est entre autre de déterminer l'ensemble des structures tridimensionnelles de molécules biologiquement actives, compatibles avec les données de RMN ou de RX. Cette technique est particulièrement utile lorsqu'il s'agit de rationaliser la conception de nouvelles molécules à visée thérapeutique (*drug design*), de développer de nouveaux matériaux ou encore d'étudier la réactivité moléculaire.

I.4.1. Description physique

La description la plus complète d'un système atomique est définie par l'équation de Schrödinger :

$$H\Phi(R, r) = E\Phi(R, r) \quad (1)$$

Où H définit l'hamiltonien du système

Φ la fonction d'onde

E l'énergie du système.

En général, Φ est une fonction dépendant des coordonnées et du noyau (R) et des électrons (r).

Etant donné que les électrons sont 1800 fois plus légers que les noyaux et par conséquent, plus rapides (approximation de Born-Oppenheimer), l'équation précédente peut se décomposer en deux équations :

- l'une décrivant le mouvement moyen des électrons pour une position fixe des noyaux

$$H\Phi(r; R) = E\Phi(r; R) \quad (2.1)$$

- l'autre celui des noyaux,

$$H\Phi(R) = E\Phi(R) \quad (2.2)$$

où $E(R)$ est l'énergie potentielle du système considéré.

Cette dernière équation peut être résolue par des calculs *Ab Initio* (Gaussian,⁹⁰ Turbomole,⁹¹ etc ...) pour des petits systèmes ou par des *calculs semi-empiriques* (MNDO,⁹² MOPAC,⁹³ AMPAC,⁹¹ etc ...).

Résoudre l'équation (2.2) est primordial si l'on s'intéresse à la résolution de structure ou à l'étude de la dynamique d'une molécule.

En principe, l'énergie potentielle $E(R)$ peut être obtenue en résolvant l'équation (2.1) mais cela demande un tel nombre de calculs que dans le cas général, on utilise une approximation empirique de cette surface d'énergie potentielle appelée aussi *champ de force*.

Comme les noyaux ont une taille relativement importante par rapport à celle des électrons, on peut considérer que les mouvements quantiques sont très faibles, et l'équation (2.2) peut alors être remplacée par l'équation du mouvement de Newton :

$$\frac{dV}{dR} = m \frac{d^2 R}{dt^2}$$

qui est à la base de la *dynamique moléculaire*.

I.4.2. Représentation de la surface d'énergie potentielle

Le champ de force est la représentation empirique de la surface d'énergie potentielle et contient tous les paramètres nécessaires aux calculs:

- La forme mathématique des équations mettant en jeu les coordonnées utilisées (longueur de liaison, angles de valence et angles dièdres) et les atomes non liés (termes électrostatiques et de van der Waals).
- Les paramètres expérimentaux utilisés pour reproduire correctement la structure covalente d'une molécule.⁹⁴

Ces valeurs sont collectées à partir des résultats expérimentaux obtenus par spectroscopie infrarouge, diffraction des rayons X, diffraction des neutrons ou à partir de calculs quantiques ou semi-empiriques.

Le champ de force se décompose en plusieurs termes:

$$V(r) = V_{\text{(covalent)}} + V_{\text{(non covalent)}}$$

$$\text{Où } V_{\text{(covalent)}} = V_d + V_\theta + V_\phi + V_\chi + V_{\text{déformation}}$$

$$V_{\text{(non covalent)}} = V_{\text{VDW}} + V_{\text{élec.}} + V_{\text{HB}}$$

Comme on l'a vu, chaque champ de force est caractérisé par son jeu de paramètres.

Ils ont ensuite été testés et affinés sur différents systèmes. Cela implique que chaque jeu de paramètres est adapté aux types de molécules pour lesquels il a été ajusté.

Certains champs de force sont plus particulièrement destinés aux petites molécules organiques comme MM2⁹¹ ou organo-métalliques comme ECFE.⁹⁵

D'autres s'adaptent mieux aux macromolécules biologiques comme ECEPP⁹⁶, AMBER⁹⁷, GROMOS⁹⁸ CHARMM⁹⁹ ou CVFF.⁹⁵

Certains champs de force sont plus généralistes: TRIPOS¹⁰⁰ ou CFF91.¹⁰¹

I.4.3. Modélisation moléculaire à partir des contraintes de RMN

Le développement considérable des techniques de RMN au cours des dernières années en a fait un outil efficace dans la détermination des structures tridimensionnelles des molécules biologiques.

Cependant, les données obtenues par cette technique ne sont pas suffisantes à elles seules pour déterminer directement la structure tridimensionnelle.

A partir des données expérimentales, qui seront converties en termes structuraux: distances interprotoniques et angles dièdres, on élabore un modèle qui doit être raffiné, sachant que les conformations stables sont celles de plus faible énergie.

La construction d'un modèle 3D non équivoque, sur la base d'informations structurales, requiert l'utilisation de méthodes de "géométries de distance", de minimisation d'énergie et de dynamique moléculaire.

a. Données RMN utilisées dans les calculs de modélisation moléculaire

Les paramètres structuraux recueillis sont les intensités des pics NOE, obtenues à partir des cartes NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy) et les couplages vicinaux 3J mesurés sur une carte 1D et une carte COSY (Correlated Spectroscopy).

i. Données quantitatives

Données issues des spectres NOESY

L'intensité NOE est proportionnelle à la relaxation croisée σ_{ij} . Dans le cas d'une paire de spins isolés et si on laisse le système évoluer pendant un temps court (temps de mélange), la vitesse de relaxation croisée est reliée à la distance interprotonique r_{ij} comme suit:

$$\sigma_{ij} \approx f(\tau_c) \frac{1}{r_{ij}^6}$$

A partir d'une distance de référence, comme vu précédemment, on peut obtenir une estimation de la distance r_{ij} .

$$r_{ij} = r_{\text{ref}} \left(\frac{\eta_{\text{ref}}}{\eta_{ij}} \right)^{\frac{1}{6}} \text{ où } \eta \text{ représente l'intensité des pics NOE}$$

Cependant, en raison de l'imprécision des mesures des intensités NOE, il est fréquent de répartir les données selon des intervalles de valeurs permises, par exemple:

NOE fort	1.8 Å —> 2.8 Å
NOE moyen	2.8 Å —> 3.8 Å
NOE faible	3.8 Å —> 5.5 Å

Ces imprécisions sont généralement dues à différents phénomènes parasites apparaissant lors de l'acquisition du signal ou lors du traitement des données. Par exemple pour des temps de mélange trop longs, l'apparition du phénomène de diffusion de spin dans les expériences NOESY peut conduire à une sous-estimation des distances interprotoniques et à l'apparition de signaux incohérents ou parasites, artefacts... D'autre part, en tenant compte des signaux NOE partiellement superposés, on n'obtient qu'une estimation approximative de leurs intensités et donc des distances déduites qui peuvent également être une source d'erreur dans les calculs de modélisation. De plus, l'absence d'attribution stéréospécifique des protons du groupement méthylène et du cycle aromatique de certaines chaînes latérales peut également conduire à des incertitudes sur les distances non négligeables, de l'ordre de 1 Å.

La conversion de l'intensité des signaux observés en distances interprotoniques exige *à priori* la connaissance du temps de corrélation τ_c des spins impliqués. Selon la théorie de Lipari et Szabo,¹⁰² le temps de corrélation effectif de la molécule comporte deux termes distincts: le temps de corrélation rotationnel τ_R et le temps de corrélation interne τ_i . Il est cependant clair que différentes parties de la molécule peuvent participer au mouvement collectif avec des fréquences diverses. Leurs temps de corrélation seront en toute rigueur différents. L'attribution d'un seul temps de corrélation pour l'ensemble des signaux observés afin d'évaluer les intensités des pics NOE et les distances correspondantes peut, là encore, mener à des résultats erronés.

Données COSY

Les expériences COSY permettent de mesurer les constantes de couplage 3J entre protons séparés par 3 liaisons, et ensuite d'accéder aux angles rotationnels ϕ et χ grâce à la relation empirique de Karplus.

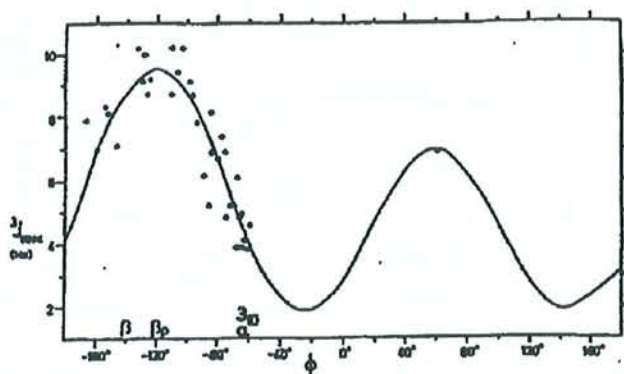


Figure I-15. Courbe de variation de la constante de couplage $^3J_{HN-H}^{\alpha}$ en fonction de l'angle ϕ (d'après Wuthrich).

La figure I-15 montre qu'il existe une indétermination de la valeur des angles dièdres pour certaines valeurs de 3J . A l'exception des résidus Pro et Gly, on dispose à chaque fois d'au moins deux valeurs possibles pour l'angle ϕ (dont la somme est égale à 240°). Par ailleurs, pour chaque mesure de la constante de couplage vicinale 3J correspondante au résidu glycine, on aboutit à quatre valeurs de l'angle ϕ .

L'analyse des valeurs permises pour les angles ϕ dans différentes protéines connues montre que, à l'exception des résidus Asn, Asp et Gly, tous les acides aminés tendent à adopter des valeurs négatives concentrées dans une région variant de -30° à -180° .²⁴

Par conséquent, les valeurs des angles sont généralement données selon des intervalles de valeurs possibles.

ii. Données qualitatives

Coefficients thermiques

L'étude des variations du déplacement chimique des protons NH en fonction de la température nous renseigne sur l'accessibilité au solvant de ces protons. Une variation faible traduit l'implication de ces protons dans des liaisons hydrogène intramoléculaire, ou leur enfouissement au sein de la molécule.

Echange des protons amides

Les expériences d'échange des protons amides avec les protons deutérés du solvant peuvent indiquer l'engagement des protons dans des liaisons hydrogène intramoléculaire si l'échange est lent.

Il est cependant très difficile de convertir ces observations qualitatives en contraintes "géométriques". Elles fournissent alors des informations qualitatives sur l'existence d'éléments de structures secondaires.

b. Les différentes méthodes de géométrie de distances (DG)

Une fois les contraintes géométriques introduites sous forme de termes énergétiques supplémentaires, on peut passer à des calculs de dynamique moléculaire. Pour cela, il est nécessaire de disposer d'un jeu de coordonnées spatiales initiales.

Les méthodes de géométrie de distances, développées à l'origine par Crippen et coll.^{103,104} à partir de la théorie mathématique de Blumenthal,¹⁰⁵ permettent de générer un grand nombre de structures initiales respectant les contraintes de RMN, et ceci avec un temps de calcul modéré.

Ces différentes méthodes sont développées en annexe A.

BIBLIOGRAPHIE

1. IUPAC-IUB commission on Biochemical Nomenclature. *Biochemistry* **2**, 3471-3479 (1970).
2. Stanfield, R. L., Fieser, T. M., Lerner, R. A. & Wilson, I. A. Crystal structures of an antibody bound to a peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 Å. *Science* **248**, 712-719 (1990).
3. Wien, M. W., Filman, D. J., Stura, E. A., Guillot, S., Delpeyroux, F., Crainic, R. & Hogle, J. Structure of the complex between the Fab fragment neutralizing antibody for type 1 poliovirus and its viral epitope. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 232-243 (1995).
4. Cung, M. T., Marraud, M. & Néel, J. Etude expérimentale de la conformation de molécules dipeptidiques. Comparaison avec les prévisions théoriques. *Ann. Chim.* **7**, 183-209 (1972).
5. Milner-White, E. J. Situations of gamma-turns in proteins. Their relation to alpha-helices, beta-sheets and ligand binding sites. *J. Mol. Biol.* **216**, 385-397 (1990).
6. Bystrov, V. F., Portnova, S. L., Tsetlin, V. I., Ivanov, V. T. & Ochinnikov, Y. A. Conformational studies of peptide systems. The rotational states of NH-NH fragment of Alanine dipeptides by nuclear magnetic resonance. *Tetrahedron* **25**, 493-515 (1969).
7. Nemethy, G. & Printz, M. P. Stereochemical requirements for the existence of hydrogen bonds in beta-bends. *Macromolecules* **5**, 755-758 (1972).
8. Rose, G. D., Gierasch, L. M. & Smith, J. A. Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **37**, 1-109 (1985).
9. Milner-White, E. J., Ross, B. M., Ismail, R., Belhadj-Mostefa, K. & Poet, R. One type of gamma turn, rather than the other, gives rise to chain reversal in proteins. *J. Mol. Biol.* **204**, 777-782 (1988).
10. Nemethy, G. & Scheraga, H. A. Stereochemical requirements for the existence of hydrogen bonds in beta-bends. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 320-327 (1980).
11. Venkatachalam, C. M. Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptides units. *Biopolymers* **6**, 1425-1436 (1968).
12. Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. A revised set of potentials for beta turn formations in proteins. *Protein Science* **3**, 2207-2216 (1994).

13. Smith, G. D., Duax, W. L., Langs, D. A., De Titta, G. T., Edmonds, W. L., Rohrer, D. C. & Weeks, C. M. The crystal and molecular structure of the triclinic and monoclinic forms of valinomycin, $C_{54}H_{90}N_6O_{18}$. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 7242-7247 (1975).
14. Pletnev, V. Z., Galitskii, N. M., Ivanov, V. T. & Ovchinnikov, Y. A. The crystal and molecular structure of *cyclo*-[-(D-Val-Hyi-Val-D-Hyi)₃-] (*meso*-Valinomycin, $C_{60}H_{102}N_6O_{18}$). *Biopolymers* **18**, 2145-2166 (1979).
15. Baker, E. N. & Hubbard, R. E. Hydrogen bonding in globular proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **44**, 97-179 (1984).
16. Abbadi, A., Mcharfi, M., Aubry, A., Prélumat, S., Boussard, G. & Marraud, M. Involvement of side functions in peptide structures: The Asx turn. Occurrence and conformational aspects. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2729-2735 (1991).
17. Rees, D. C., Lewis, M. & Lipscomb, W. N. Refined crystal structure of carboxypeptidases A at 1.54Å resolution. *J. Mol. Biol.* **167**, 367-387 (1983).
18. Aubry, A., Abbadi, A., Boussard, G. & Marraud, M. Asx-turn conformation in the crystal structures of two tripeptides related to the sequence code for N-glycosylation. *New J. Chem.* **11**, 739-744 (1987).
19. Pichon-Pesme, V., Aubry, A., Abbadi, A., Boussard, G. & Marraud, M. Crystal molecular structures of two tripeptides related to the sequence coding N-glycosylation. *Int. J. Pept. Protein Res.* **32**, 175-182 (1988).
20. Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. Protein structure determination in solution by two-dimensional and three-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chem.* **62**, 2-15 (1990).
21. Taylor, H. S. Large molecules through atomic spectacles. *Proc. Am. Phil. Soc.* **85**, 1-12 (1941).
22. Toniolo, C. & Benedetti, E. Structures of polypeptides from alpha-amino acids disubstituted at the alpha-carbon. *Macromolecules* **34**, 4004-4009 (1991).
23. Karpen, M. E., de Haseth, P. L. & Neet, K. E. Differences in the amino acid distributions of 3(10)-helices and alpha-helices. *Protein Science* **1**, 1333-1342 (1992).
24. Richardson, J. S. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* **34**, 167-339 (1981).
25. Fauchère, J.-L. & Thuriéau, C. Evaluation of the stability of peptides and pseudo-peptides as a tool in peptide drug design. *Adv. Drug. Res.* **23**, 127-159 (1992).

26. Dutta, A. S. Design and therapeutic potential of peptides. *Adv. Drug. Res.* **21**, 145-286 (1991).
27. Giannis, A. & Kolter, T. Peptidomimetics for receptor-ligands-discovery, development and medical perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1244-1267 (1993).
28. Shulz, G. E. & Schirmer, R. H. *Principe of protein structure* (ed. Cantor, C., Ed.) (, Springer, New York, 1979).
29. Spatola, A. F. *Chemistry and biochemistry of amino-acids, peptides and proteins* (ed. Weinstein, B.) (Marcel Dekker, Inc., New York, 1983).
30. Shemyakin, M. M., Ovchinnikov, A. & Ivanov, V. T. Topochemical investigations on peptide systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **8**, 492-499 (1969).
31. Chorev, M. & Goodman, M. Recent developments in retro peptides and proteins: an ongoing topochemical exploration. *Trends Biotechnol.* **13**, 438-445 (1995).
32. Fletcher, M. D. & Campbell, M. M. Partially modified retro-inverso peptides : development, synthesis, and conformational behavior. *Chem. Rev.* **98**, 763-795 (1998).
33. Guichard, G., Benkirane, N., Zeder-Lutz, G., Van Regenmortel, M. H. V., Briand, J.-P. & Muller, S. Antigenic mimicry of natural L-peptides with retro-inverso peptidomimetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 9765-9769 (1994).
34. Jameson, B. A., Mc Donnell, J. M., Marini, J. C. & Korngold, R. A rationally designed CD4 analogue inhibits experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* **368**, 744-746 (1994).
35. Mc Donnell, J. M., Fushman, D., Cahill, S. M., Sutton, B. J. & Cowburn, D. J. Solution structures of FcεRI α-Chain mimics: a β-hairpin peptide and its retroenantiomer. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5321-5328 (1997).
36. Verdoliva, A., Ruvo, M., Cassani, G. & Fassina, G. Topological mimicry of cross-reacting enantiomeric peptide antigens. *J. Biol. Chem.* **270**, 30422-30427 (1995).
37. Briand, J.-P., Guichard, G., Dumortier, H. & Muller, S. Retro-inverso peptidomimetics as new immunological probes. *J. Biol. Chem.* **270**, 20686-20691 (1995).
38. Muller, S., Guichard, G., Benkirane, N., Brown, F., Van Regenmortel, M. H. V. & Briand, J.-P. Enhanced immunogenicity and cross-reactivity of retro-inverso peptidomimetics of the major antigenic site of foot-and-mouth diseases virus. *Pept. Res.* **8**, 138-144 (1995).
39. Carver, J. A., Esposito, G., Viglino, P., Fogolari, F., Guichard, G., Briand, J.-P., Van Regenmortel, M. H. V., Brown, F. & Mascagni, P. Structural comparison between retro-inverso and parent peptides : molecular basis for the biological activity of a

- retro-inverso analogue of the immunodominant fragment of VP1 coat protein from foot-and-mouth disease virus. *Biopolymers* **41**, 569-590 (1997).
40. Petit, M.-C., Benkirane, N., Guichard, G., Phan-Chan-Du, A., Marraud, M., Cung, M. T., Briand, J.-P. & Muller, S. Solution structure of a retro-inverso peptide analogue mimicking the foot-and-mouth virus major antigenic site. Structural basis for its antigenic cross-reactivity with the parent peptide. *J. Biol. Chem.* **274**, 3686-3692 (1999).
 41. Higgins, K. A., Bicknell, W., Keah, H. H. & Hearn, M. T. W. Comparison of the solution conformations of a human immunodeficiency virus peptidomimetic and its retro-inverso isomer using ^1H NMR spectroscopy. *J. Pept. Res.* **50**, 421-435 (1997).
 42. Benkirane, N., Guichard, G., Van Regenmortel, M. H. V., Briand, J.-P. & Muller, S. Cross-reactivity of antibodies to retro-inverso peptidomimetics with the parent protein histone H3 and chromatin core particle : specificity and kinetic rate-constant measurements. *J. Biol. Chem.* **270**, 11921-11926 (1995).
 43. Johnson, W. D., Law, H. D. & Studer, R. O. Synthesis and properties of 1-deamino-, O-decarboxy- and 1-deamino-9-decarboxy-bradykinin. *Experientia* **25**, 573-578 (1969).
 44. Fredinger, R. M. & Veber, D. F. Peptides and their rétro-enantiomers are topologically non identical. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 6129-6131 (1979).
 45. Wermuth, J., Goodman, L., Jonczyk, A. & Kessler, H. Stereomerism and biological activity of the selective and superactive $\alpha_v\beta_3$ integrin inhibitor cyclo(-RGDfV-) and its retro-inverso peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1328-1335 (1997).
 46. Dal Pozzo, A., Fagnoni, M., Bergonzi, R., Vanini, L., de Castiglione, R., Aglio, C. & Colli, C. Synthesis and anti-aggregatory activity of linear retro-inverso RGD peptides. *J. Pept. Res.* **55**, 447-454 (2000).
 47. Nicolaou, K. C., Dai, W. M. & Guy, R. K. Chemie und biologie von taxol. *Angew. Chem.* **106**, 38-69 (1994).
 48. Seebach, D. & Matthews, J. L. Beta-peptides : a surprise at every turn. *Chem. Commun.*, 2015-2022 (1997).
 49. DeGrado, W. F., Schneider, J. P. & Hamuro, Y. The twists and turns of beta-peptides. *J. Pept. Res.* **54**, 206-217 (1999).
 50. Lee, K.-H., Hong, S.-Y., Oh, J.-E., Lee, B.-J. & Choi, B.-S. Antimicrobial activity and conformation of Gaegurin-6 amide and its analogs. *Peptides* **19**, 1653-1658 (1998).

51. Fauchère, J.-L. Elements for the rational design of peptide drugs. *Adv. Drug. Res.* **15**, 29-69 (1986).
52. Marqusee, S. & Baldwin, R. L. Helix stabilization by Glu⁻...Lys⁺ salt bridges in short peptides of de novo design. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **84**, 8898-8902 (1987).
53. Oas, T. G. & Kim, P. S. A peptide model of a protein folding intermediate. *Nature* **336**, 42-48 (1988).
54. Felix, A. M., Wang, C.-T., Heiner, E. P. & Fournier, A. Synthetis, biological activity and conformational analysis of cyclic GRF analogs. *Int. J. Prot. Pept. Res.* **31**, 231-238 (1988).
55. Ruan, F., Chen, Y. & Hopkins, P. B. Metal ion enhanced helicity in synthetic peptides containing unnatural, metal-ligating residues. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9403-9404 (1990).
56. Ghadiri, M. R. & Fernholtz, A. K. Peptide architecture : design of a stable α -helical metallopeptides via a novel exchange-inert Ru^{III} complex. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9633-9635 (1990).
57. Ösapay, G. & Taylor, J. W. Multicyclic polypeptide model compounds. 2. Synthetis and conformational properties of a highly α -helical uncosapeptide constrained by three side-chain to side-chain lactam bridges. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6966-6973 (1992).
58. Jackson, D. Y., King, D. S., Chmielewski, J., Singh, S. & Schultz, P. G. General approach to the synthesis of short α -helical peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9391-9392 (1991).
59. Luo, P.-Z., Braddock, D. T., Subramanian, R. M., Meredith, S. C. & Lynn, D. Structural and thermodynamic characterization of a bioactive peptide model of Apolipoprotein E : Side-chain lactam bridges to constrain the conformation. *Biochemistry* **33**, 12367-12377 (1994).
60. Benzinguer, T. L. S., Braddock, D. T., Dominguez, S. R., Burkoth, T. S., Miller-Auer, H., Subramanian, R. M., Fless, G. M., Jones, D. N. M., Lynn, D. G. & Meredith, S. C. Structure-function relationships in side chain-lactam cross-linked peptide models of a conserved N-terminal domain of Apolipoprotein E. *Biochemistry* **37**, 13222-13229 (1998).

61. Al-Obeidi, F., Fastucci, A. M. L., Hadley, M. E. & Hruby, V. J. Potent et prolonged acting cyclic lactam analogues of alpha-melanotropin : design based on molecular dynamics. *J. Med. Chem.* **32**, 2555-2561 (1989).
62. Roberts, G. C. K. *NMR of macromolecules : a practical approach* (, Oxford, UK, 1993).
63. Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer III, A. G. & Skelton, N. J. *Protein NMR spectroscopy* (, San Diego, USA, 1996).
64. Ernst, R. R., Bodenhausen, G. & Wokaun, A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions* (, Oxford, UK, 1989).
65. Wuthrich, K. *NMR of proteins and nucleic acids* (, New York, USA, 1986).
66. Ohnishi, M. & Urry, D. W. Temperature dependence of amide proton chemical shifts : the secondary structures of gramicidin S and valinomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 194-202 (1969).
67. Llinas, M., Klein, M. P. & Neilands, J. B. Solution conformation of ferrichrome, a microbial iron transport cyclohexapeptide, as deduced by high resolution proton magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* **52**, 399-414 (1970).
68. Karplus, N. M. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. Chem. Phys.* **30**, 11-15 (1959).
69. Bystrov, V. F., Portnova, S. L., Tsetlin, V. I., Ivanov, V. T. & Ovchinnikov, Y. A. Conformational studies of peptide systems. The rotational states of NH-NH fragment of Alanine dipeptides by nuclear magnetic resonance. *Tetrahedron* **25**, 493-515 (1969).
70. Cung, M. T., Marraud, M. & Néel, J. Experimental calibration of a Karplus relationship in order to study the conformations of peptides by Nuclear Magnetic Resonance. *Macromolecules* **7**, 606-613 (1974).
71. Ramachandran, G. N., Chandrasekaran, R. & Kopple, K. D. Variation of the NH-C α H coupling constant with dihedral angle in the NMR spectra of peptides. *Biopolymers* **10**, 2113-2131 (1971).
72. Tsikaris, V., Detsikas, E., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Vatzaki, E., Tzartos, S. J., Marraud, M. & Cung, M. T. Conformational requirements for molecular recognition of acetylcholine receptor main immunogenic region (MIR) analogues by monoclonal anti-MIR antibody: A two-dimensional nuclear magnetic resonance and molecular dynamics approach. *Biopolymers* **33**, 1123-1134 (1993).

73. Kessler, H., Gehrke, M. & Griesinger, C. Two dimensional NMR spectroscopy : background and overview of the experiments. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**, 490-536 (1988).
74. Braunschweiler, L. & Ernst, R. R. Coherence transfert by isotropic mixing : application to proton corelation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **53**, 521-528 (1983).
75. Bax, A. & Davis, D. G. MLEV-17 based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Res.* **65**, 355-360 (1985).
76. Aue, W. P., Bartholdi, E. & Ernst, R. R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* **64**, 2229-2237 (1976).
77. Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. & Ernst, R. R. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **71**, 4546-4553 (1979).
78. Macura, S. & Ernst, R. R. Elucidation of cross relaxation in liquids by two-dimensional NMR spectroscopy. *Mol. Phys.* **41**, 95-117 (1980).
79. Bothner-By, A. A., Stephens, R. L., Lee, J., Warren, C. D. & Jeanloz, R. W. Structure determination of a tetrasaccharide: transient nuclear overhauser effects in the rotating frame. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 811-813 (1984).
80. Bax, A. & Davis, D. G. Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *J. Magn. Res.* **63**, 207-213 (1985).
81. Weiss, M. A., Eliason, J. L. & States, D. J. Dynamic filtering by two-dimensional ^1H NMR with application to phage λ repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6019-6023 (1984).
82. Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. Theory and applications of the transferred nuclear Overhauser effect on the study of the conformations of small ligands bound to proteins. *J. Magn. Reson.* **48**, 402-417 (1982).
83. Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. Theory of the time dependent transferred nuclear Overhauser effect : applications to structural analysis of ligand-protein complexes in solution. *J. Magn. Reson.* **53**, 423-442 (1983).
84. Cheetam, J. C., Redfield, C., Griest, R. E., Raleigh, D. P., Dobson, C. M. & Rees, A. R. *Methods in Enzymology* (ed. Lagone, J. J.) (, San Diego, USA, 1991).
85. Balaram, P., Bothner-By, A. A. & Dadok, J. Negative nuclear Overhauser effects as probes of macromolecular structure. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 4015-4017 (1972).

86. Balaram, P., Bothner-By, A. A. & Breslow, E. Localization of tyrosine at the binding site of neurophysin II by negative nuclear Overhauser effects. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 4017-4018 (1972).
87. Albrand, J. P., Birdsall, B., Feeney, J., Roberts, G. C. K. & Burgen, A. S. V. The use of transferred nuclear overhauser effects in the study of the conformations of small molecules bound to proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **1**, 37-41 (1979).
88. Ni, F. Recent developments in transferred NOE methods. *Prog. Nucl. Mag. Reson. Spectrosc.* **26**, 517-606 (1994).
89. Campbell, A. P. & Sykes, B. D. Theoretical evaluation of the two-dimensional transferred Nuclear Overhauser Effect. *J. Magn. Reson.* **93**, 77-92 (1991).
90. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scusera, M. A., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Zakrzewski, Montgomery, J. A., Statmann, R. E., Burant, J. C., Dapprich, S. & Millam, J. M. *Gaussian 98 (revision A.1)* (, Pittsburg, PA, 1998).
91. Schleyer, P. V. R. *Encyclopedia of Computational chemistry* (eds. Wiley, J. & Sons) (, New York, NY, 1995).
92. Dewar, M. J. Some recent developments in quantum organic chemistry. *Ciba found. symp.* **53**, 107-129 (1978).
93. Stewart, J. J. MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **4**, 1-105 (1990).
94. Burkert, U. & Allinger, N. L. *Molecular Mechanics* (, Washington, D.C., 1982).
95. Biosym Inc. User Guide, part 1. *San Diego, SA* (1992).
96. Momany, F. A., Mc Guire, R. F., Burgess, A. W. & Sheraga, H. A. Energy parameters in polypeptides. VII. Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interactions, hydrogen bond interactions, and intrinsic torsional potentials for the naturally occurring amino acids. *J. Phys. Chem.* **79**, 2361-2374 (1975).
97. Weiner, S. J., Kollman, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S. J. & Weiner, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765-784 (1984).
98. Van Gunsteren, W. F. & Berendsen, H. J. C. *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual* (, 1987).
99. Brooks, B. C., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D., Swaminathan, S. & Karplus, M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimisation, and dynamics calculations. *J. Comp. Chem.* **4**, 187-217 (1983).

-
100. Clark, M., Cramer, R. D. & Van Opdenbosch, N. Validation of the general purpose Tripos 5.2 forcefield. *J. Comp. Chem.* **10**, 982-1012 (1989).
 101. Dinur, U. & Hagler, A. T. *Review of Computational Chemistry* (eds. Lipkowitz, K. B. & Boyd, D. B.) (, VCH, New York, USA, 1991).
 102. Lipari, G. & Szabo, A. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules.I. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546-4559 (1982).
 103. Havel, T. F. An evaluation of computational strategies for use in the determination of protein structure from distances constraints obtained by nuclear magnetic resonance. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **56**, 43-78 (1991).
 104. Crippen, G. M. A novel approach to calculation of conformation: distance geometry. *J. Comput. Phys.* **24**, 96-107 (1977).
 105. Blumenthal, L. M. *Theory and Applications of distance Geometry* (, Chelsea, Bronx, New York, 1970).

CHAPITRE II

ETUDE STRUCTURALE DE PEPTIDES CORRESPONDANT A LA BOUCLE 603-609 DE LA GLYCOPROTEINE GP41 DE L'ENVELOPPE DU VIH-1

CHAPITRE II ETUDE STRUCTURALE DE PEPTIDES DE LA GP41 DE HIV-1

Depuis l'identification du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) dans les pays développés au début des années 80, l'épidémie a provoqué la mort de 11.7 millions de personnes, dont 4 millions de femmes et 2.7 millions d'enfants. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 5.8 millions de personnes ont été infectées en 1999 par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), agent pathologique du SIDA, et 33.6 millions de personnes vivent actuellement avec cette maladie. En 1983, un premier virus, VIH-1 a été découvert à l'Institut Pasteur de Paris,¹ puis en 1986, un second virus, nommé VIH-2 a été identifié.² Bien que VIH-1 et VIH-2 apparaissent comme similaires dans leur structure virale, leurs modes de transmission et leurs conséquences, ils diffèrent de par leur position géographique d'infection. Le VIH-2 est présent majoritairement en Afrique de l'Ouest et ne concerne que 1% des personnes séropositives.

Le SIDA est caractérisé par une détérioration graduelle des fonctions immunitaires. Au cours du développement de l'infection, les lymphocytes CD4⁺, cellules spécifiques du système immunitaire, sont détruits et leur nombre diminue progressivement. Le diagnostic clinique du SIDA est officiellement caractérisé par un nombre de lymphocytes CD4⁺ inférieur à 200 par microlitre de sang. Cette déficience rend les patients particulièrement vulnérables aux infections opportunistes qui s'installent, suite à l'affaiblissement du système immunitaire.

Trois modes de contamination sont possibles : la transmission par voie sanguine (par échange de seringues et injections intraveineuses), par voie sexuelle et la transmission mère-enfant: au cours de la grossesse, au moment de l'accouchement et lors de l'allaitement. Le tableau II-1 recense les statistiques par région sur les cas de SIDA enregistrés en Décembre 1999.

Statistiques et caractéristiques de l'épidémie de VIH/SIDA par région, décembre 1999

Région	Début de l'épidémie	Adultes et enfants vivant avec le VIH/SIDA	Nouveaux cas d'infection à VIH chez les adultes et les enfants	Taux de prévalence chez les adultes*	Pourcentage de femmes parmi les adultes séropositifs	Principaux modes de transmission# chez les adultes vivant avec le VIH/SIDA
Afrique subsaharienne	fin années 70 - début années 80	23,3 millions	3,8 millions	8,0%	55%	Hétéro
Afrique du Nord et Moyen-Orient	fin années 80	220 000	19 000	0,13%	20%	ID, Hétéro
Asie du Sud et du Sud-Est	fin années 80	6 millions	1,3 million	0,69%	30%	Hétéro
Asie de l'Est et Pacifique	fin années 80	530 000	120 000	0,068%	15%	ID, Hétéro Homo
Amérique latine	fin années 70 - début années 80	1,3 million	150 000	0,57%	20%	Homo, ID, Hétéro
Caraïbes	fin années 70 - début années 80	360 000	57 000	1,96%	35%	Hétéro, Homo
Europe orientale et Asie centrale	début années 90	360 000	95 000	0,14%	20%	ID, Homo
Europe occidentale	fin années 70 - début années 80	520 000	30 000	0,25%	20%	Homo, ID
Amérique du Nord	fin années 70 - début années 80	920 000	44 000	0,56%	20%	Homo, ID, Hétéro
Australie et Nouvelle Zélande	fin années 70 - début années 80	12 000	500	0,1%	10%	Homo, ID
TOTAL		33,6 millions	5,6 millions	1,1%	46%	

* Proportion d'adultes (âgés de 15 à 49 ans) vivant avec le VIH/SIDA en 1999, d'après les statistiques démographiques de 1998.

Hétéro : transmission hétérosexuelle ; homo : transmission entre hommes homosexuels ; ID : transmission par l'injection de drogue.

Tableau II-1. *Statistiques et caractéristiques de l'épidémie du VIH/SIDA par région, Décembre 1999 (D'après ONUSIDA/OMS Programme Commun des Nations Unies sur le VIH/ SIDA).*

L'énorme différence entre les pourcentages de personnes infectées dans les pays industrialisés et dans les pays en voie de développement, particulièrement entre l'Afrique (environ 70% des cas) et le reste du monde, semble s'amplifier. Dans toutes les régions, les efforts effectués pour une meilleure information et les nombreuses campagnes de prévention peuvent faire reculer l'expansion de la maladie.

Cependant, la mondialisation des échanges humains entraîne le déplacement et la dissémination des foyers d'infections du VIH. Le diagnostic de cette maladie est donc extrêmement important afin d'éviter sa transmission involontaire et permet de proposer aux personnes atteintes des traitements adaptés.

II.1. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE ACQUISE (VIH)

LE VIH est un rétrovirus de classe D, appartenant à la classe des lentivirus. Son virion a une taille de 100 à 140 nm de diamètre. Il est enveloppé d'une bicouche lipidique qui comporte les glycoprotéines virales (visibles sous forme de spicules au microscope électronique), responsables de l'entrée du virus dans les cellules cibles. A l'intérieur de cette enveloppe, les protéines virales (dont la transcriptase inverse et l'enzyme intégrase) forment un noyau de forme conique. Le matériel génétique du virus est présent sous forme de deux brins d'ARN identiques constitués d'environ 9800 paires de bases, convertis au cours de l'infection en ADN proviral qui sera ensuite intégré dans l'ADN génomique de la cellule hôte dans les ultimes phases précoces du cycle viral. (figure II-1)

Une revue de Turner et Summers³ résume les informations structurales disponibles à l'heure actuelle et relatives aux composantes du virus VIH. Elle établit également les différentes relations structure/ fonction connues.

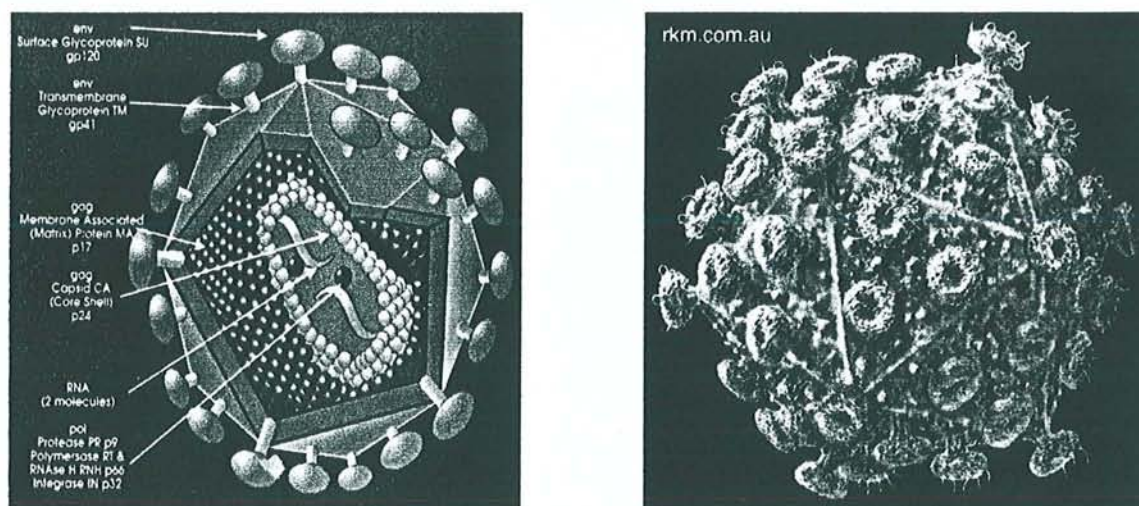


Figure II-1. Représentation de la structure du VIH-1 (tirée du site AVERT; <http://www.avert.org>, Illustration par Russel Kightley media).

L'enveloppe du VIH-1 est composée de deux sous-unités associées de façon non covalente, les glycoprotéines gp120 et gp41, résultant du clivage protéolytique de la glycoprotéine précurseur gp160.^{4,5} La glycoprotéine gp120 permet au virus de reconnaître la cellule à infecter (notamment les lymphocytes CD4⁺) et joue donc un rôle important dans le tropisme viral.⁶ Des analyses de séquence de la glycoprotéine gp120 de différentes souches de VIH-1

ont permis de montrer la division de la protéine en 5 domaines conservés (notés C₁ à C₅) et de 5 domaines hypervariables (notés V₁ à V₅).⁷

La glycoprotéine gp41 (Figure II-2), quant à elle, est une glycoprotéine transmembranaire qui permet la fusion des membranes virale et cellulaire:⁸ première étape au relargage du génome viral dans la nouvelle cellule hôte. Elle est constituée d'une extrémité N-terminale hydrophobe permettant la fusion membranaire, d'une hélice amphipatique impliquée dans l'oligomérisation de la protéine, d'une boucle formée par un pont disulfure (qui est un épitope important), d'une séquence d'ancrage à la membrane et d'une extrémité C-terminale cytoplasmique de 150 résidus dont la fonction reste encore mal définie. La molécule possède également 5 sites de N-glycosylation.

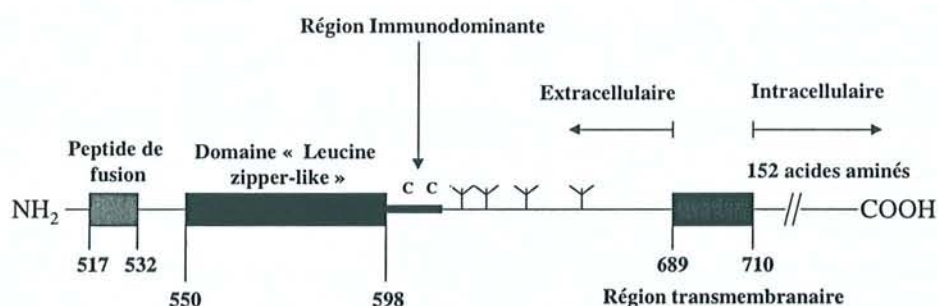


Figure II-2. Structure de la glycoprotéine gp41¹⁵

La structure de la glycoprotéine gp41 entière n'a pu être résolue à l'état natif mais différentes données structurales ont pu être obtenues à partir de domaines isolés, de fragments peptidiques ou de mutants. Les structures tridimensionnelles de peptides correspondant à des sous-domaines de la glycoprotéine du VIH ont été résolues par cristallographie.⁹⁻¹¹ D'autre part, la structure de la région 27-149 du VIS (virus de l'immunodéficience simien), dépourvue de la partie fusogénique et comprenant les mutations C86A et C92A, a été résolue par RMN.¹²⁻¹⁴

Cette région appelée ectodomaine (e-gp41) est la région la plus conservée de la glycoprotéine gp41, puisqu'il existe 50-60% d'identité entre les souches HIV-1 et VIS (Figure II-3).

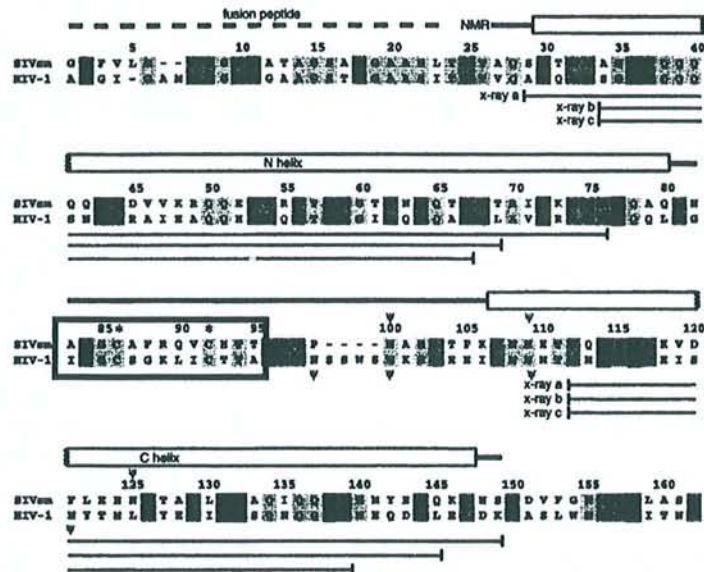


Figure II-3. Structure secondaire de e-gp41 du VIS, et alignement des séquences du VIH-1 et de VIS.¹³

Le domaine de e-gp41 du VIS forme un trimère symétrique (Figure II-4) dans lequel chaque unité est constituée d'une hélice de 50 résidus en partie N-terminale (résidus 30-80) et d'une hélice de 40 résidus en partie C-terminale (résidus 107 à 147), connectées entre elles par une boucle de 26 résidus (résidus 81 à 106) qui ne présente aucune des caractéristiques d'une structure secondaire régulière. Cette boucle est cependant ordonnée et présente de nombreuses corrélations non séquentielles.

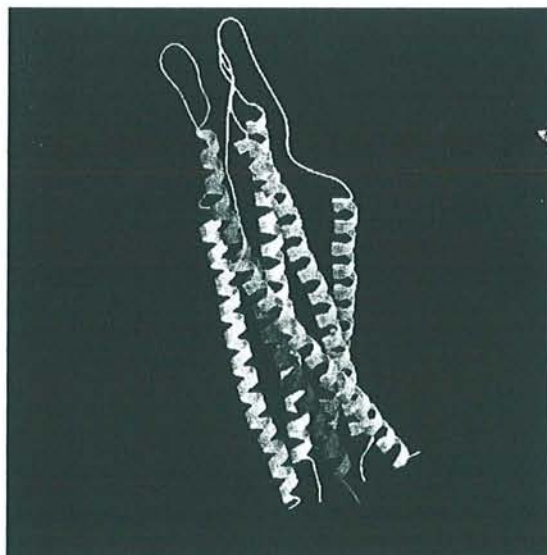


Figure II-4. Représentation de la structure de e-gp41 du VIS (PDB code 2EZO)

Les gènes du virus sont répartis dans les deux brins d'ARN et sont encadrés par deux séquences non-codantes ("*Long terminal Repeat*" ou LTR). Trois catégories de gènes ont été dénombrées: les gènes structuraux *gag*, *pol*, *env*, les gènes régulateurs *tat*, *rev* et *nef*, et des gènes accessoires qui incluent *vif*, *vpr*, *vpu*, *vpt* et *tev/ntv*.

Le gène *gag* code une très grosse protéine qui est clivée pour former les protéines du corps viral, *pol* qui code la transcriptase inverse et *env* la glycoprotéine gp160 de l'enveloppe virale. (Figure II-5) Ces gènes sont indispensables pour la fabrication de virus infectieux. L'enzyme transcriptase inverse est l'élément clé du cycle de reproduction du VIH en permettant la transcription de l'ARN en ADN avant son intégration dans le génome de la cellule hôte. Les médicaments antiviraux actuels (AZT, ddI, ddC) jouent sur l'interférence avec cette enzyme à ce stade de la vie du virus.

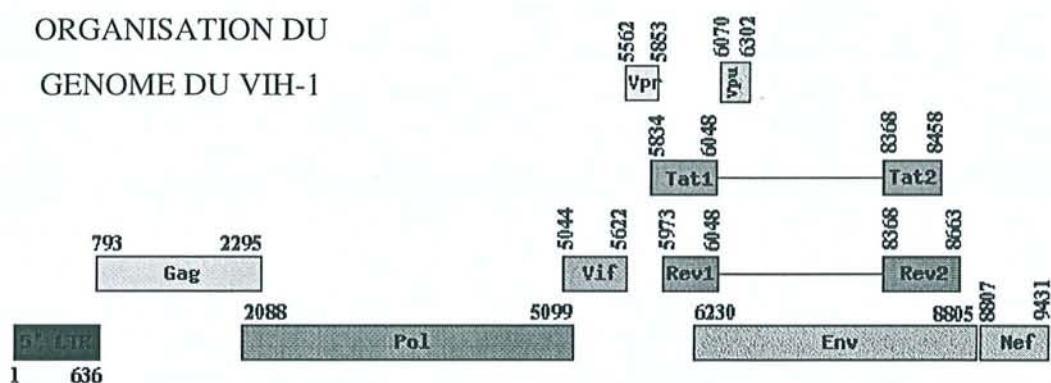


Figure II-5. Organisation du génome du VIH-1.

La durée de vie du virus à l'extérieur d'une cellule hôte est courte car inférieure à six heures.¹⁶⁻¹⁸ Pour cette raison, le virus doit pénétrer le plus rapidement possible dans un autre lymphocyte T CD4⁺. L'entrée du virus se fait par l'intermédiaire du récepteur CD4 qui a une très forte affinité vis-à-vis de la glycoprotéine gp120 ($K_a \approx 10^{-10}$ M). Après sa fixation, la glycoprotéine gp120 change de conformation, ce qui rend accessible une partie de gp41, impliquée dans la fusion des membranes du virus et de la cellule hôte.¹⁹

Cette forte affinité explique en partie la disparition des cellules T CD4⁺ chez les patients infectés par le VIH. En effet, les cellules T infectées présentent à leur surface la glycoprotéine gp120 qui interagit ensuite avec le récepteur CD4 des cellules T non infectées formant ainsi une syncytia^(a). Ces syncytias sont considérées comme un corps étranger par le système immunitaire qui les détruit ensuite naturellement à l'aide d'anticorps. On a découvert rapidement de manière expérimentale, que le CD4 est incapable à lui seul d'assurer l'entrée du

^(a) Les cellules infectées peuvent fusionner avec d'autres cellules non infectées, formant un ballon géant appelé syncytia: c'est la mort des cellules non infectées.

virus.²⁰ C'est ainsi par exemple, que le VIH est incapable d'infecter une cellule non humaine même si on l'a modifiée pour qu'elle exprime le CD4 à sa surface.

Au cours de ces dernières années, deux corécepteurs majeurs CXCR-4 (fusine)⁶ et CCR-5²¹ ont été identifiés respectivement pour les deux souches de virus. L'implication de neuf autres récepteurs de chimiokines a été démontrée aussi lors du processus d'entrée du virus.²²⁻²⁵ Les chimiokines sont des molécules synthétisées par l'organisme et étroitement impliquées dans les processus inflammatoires et les mécanismes immunitaires. Le changement de conformation de CD4, couplé au changement de conformation des glycoprotéines gp41/gp120, permettrait le rapprochement des membranes du virus (ou de la cellule infectée dans le cas d'une syncytia) et de la cellule portant à sa surface le CD4. Il y aurait alors interaction entre le corécepteur et une portion de la glycoprotéine gp120 connue pour être responsable du tropisme des souches virales, ce qui stabiliserait l'ensemble et rendrait possible la fusion des deux membranes lors d'une étape ultérieure. Il a été d'ailleurs récemment montré que le complexe gp120/CD4 interagit directement avec le corécepteur CXCR-4.²⁶ Il est aussi probable qu'il y ait un contact direct entre une boucle extra-cellulaire du corécepteur CCR-5 et l'interface du CD4.²⁷ On a en effet montré que les deux premiers domaines de CD4 inhibent la fixation des chimiokines^(b) MIP1- α et MIP1- β sur CCR-5, alors qu'un CD4 soluble complet ne le fait pas (le contact aurait lieu suite au changement de conformation du CD4, au cours duquel cette interface doit se trouver exposée). Le mimétisme structural de la glycoprotéine gp120 avec les chimiokines conduit en outre à l'activation simultanée des protéines G, des canaux à sodium et de la phosphorylation de certains résidus tyrosine de la cellule T CD4⁺.²⁸ Le mécanisme de fusion des membranes est assuré par l'extrémité N-terminale riche en glycine de la glycoprotéine gp41.²⁹ Une fois entré dans la cellule, le virus utilise alors une partie de la machinerie cellulaire afin d'assurer sa réplication intracellulaire. Dès que les membranes fusionnent, le cœur viral, contenant l'ARN, les protéines et les enzymes, est introduit dans la cellule infectée. La transcriptase inverse convertit l'ARN en ADN et ce dernier migre vers le cœur de la cellule, où il est intégré à l'ADN de l'hôte grâce à une enzyme intégrase. Une fois intégré dans le génome de la cellule cible, l'ADN du VIH est appelé provirus et est dupliqué avec les gènes de la cellule chaque fois que cette dernière se divise. Pour que le provirus puisse se répliquer, des ARN messagers (mARNs) doivent être fabriqués. Ce processus est appelé transcription et est facilité par des enzymes cellulaires (notamment l'ARN polymérase II). Les gènes viraux peuvent en partie contrôler ce processus (par exemple, *tat* code pour une protéine qui accélère le processus de transcription en se liant et en

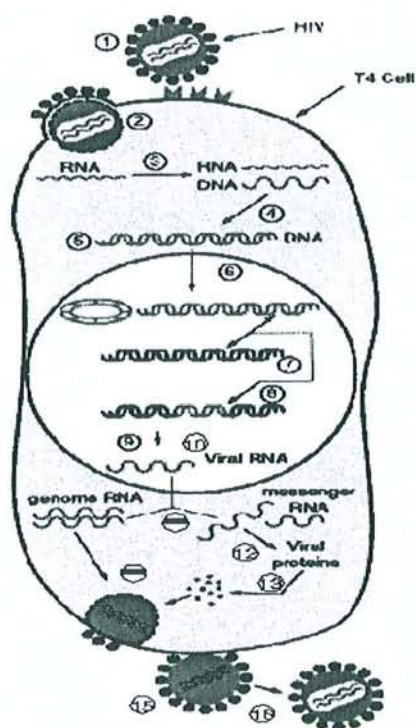
^(b) Les chimiokines sont des molécules synthétisées par l'organisme et étroitement impliquées dans les processus inflammatoires et les mécanismes immunitaires.

stabilisant une partie du nouvel ARN proviral). D'autres facteurs peuvent initier la transcription. Les cytokines (protéines du système immunitaire impliquées dans la régulation du système immunitaire sécrétées en grande quantité durant l'infection) peuvent aider à activer le VIH.

Les mARNs sont amenés depuis le noyau de la cellule où se situe le matériel génétique vers le cytoplasme. Il y a ensuite traduction des mARNs en protéines virales et enzymes. En l'absence de la protéine virale *rev*, les mARNs produisent essentiellement des protéines de régulation. Sa présence permet la mise en place des protéines issues des gènes structuraux et des enzymes.

Le cœur viral se rassemble près de la membrane de la cellule hôte, tandis que les protéines de l'enveloppe virale s'agrègent à l'intérieur de la membrane. Une particule virale immature se forme et est exportée hors de la cellule. Elle devient infectieuse grâce à l'action d'une protéase et elle peut à nouveau infecter une autre cellule.

Les caractéristiques générales du cycle de réplication du virus sont résumées sur la figure II-6:



1. Fixation
2. Fusion virale
- 3, 4. Transcription inverse
5. Synthèse du second brin
6. Migration vers le noyau
7. Intégration
8. Période de latence
9. Phase précoce de transcription
10. Phase tardive de transcription
11. Traduction
12. Synthèse des protéines
13. Glycosylation
14. Assemblage
15. Bourgeonnement
16. Particules matures

Figure II-6. Représentation du cycle de réplication du VIH (Tiré du site *The Body, an aids and HIV information resource*; <http://www.thebody.com/viaid>).

II.2. INFECTION PAR LE VIH

Au cours de l'infection, le VIH développe plusieurs stratégies qui lui permettent d'échapper à la vigilance du système immunitaire de l'hôte, notamment par une grande variabilité antigénique ainsi qu'une faible immunogénicité.³⁰ La variabilité antigénique est principalement due à un taux de mutation du virus important, engendré par des variations sur une région de la glycoprotéine gp120 appelée boucle V3. Au cours de la propagation du virus, différentes souches virales vont apparaître par mutation chez une personne infectée. Les souches vont différer de manière importante dans leur capacité à détruire plusieurs types de cellules et dans leur taux de réplication. Des souches de VIH chez des patients en phase terminale sont généralement plus virulentes et infectent davantage de types de cellules que des souches obtenues précédemment chez les mêmes patients.

Ces nouveaux sous-types antigéniques échappent à la protection immunitaire de l'hôte, qui est dirigée contre la première souche infectante. Par conséquent, le VIH présent chez les sujets contaminés se distingue par une population génétiquement hétérogène. Le SIDA se développe

alors que le système immunitaire, débordé, ne peut plus faire face, entraînant la destruction des cellules hôtes indispensables à la réponse immunitaire.

La faible immunogénicité^(c) du virus est pour sa part due à son tropisme.^(d) Les cellules hôtes du VIH, les lymphocytes CD4⁺ jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire. En effet, elles sont impliquées dans la destruction des cellules qui exposent à leur surface des motifs étrangers. Elles stimulent aussi la réponse humorale en apportant leur concours aux lymphocytes B, précurseurs des plasmocytes, qui produisent les anticorps (Figure II-7).

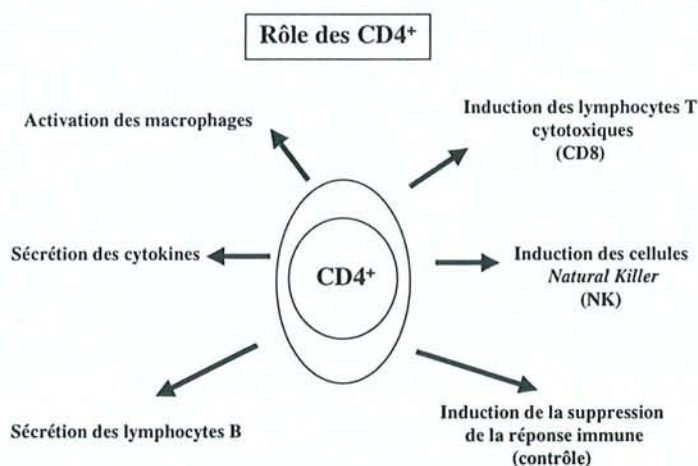


Figure II-7. Rôle des CD4⁺.

La destruction de ces lymphocytes équivaut donc à court-circuiter la réponse immunitaire, aussi bien sur le plan humoral que cellulaire. De plus, la formation de syncytia vient accentuer ce phénomène.

Le VIH infecte non seulement les cellules dont l'organisme a besoin pour se défendre, mais s'est adapté aussi à une reconnaissance immunologique particulière en s'introduisant dans l'intimité des interactions moléculaires. Il entraîne des anomalies de fonction des cellules infectées. Le champ du déficit immunitaire est donc très étendu et va bien au-delà des CD4 même si celles-ci ont un rôle central dans le fonctionnement du système immunitaire.

^(c) Capacité d'induire la production d'anticorps spécifique chez une personne immunisée.

^(d) préférence de certaines souches virales pour un certain type de cellules.

II.3. DIAGNOSTIC DE L'INFECTION PAR LE VIH

Le diagnostic d'une infection virale peut être réalisé par la détection d'anticorps spécifiques dirigés contre le virus ainsi que par la mise en évidence de particules virales ou de matériel génétique d'origine virale dans les fluides biologiques (sang, salive...). Ce diagnostic requiert des tests très performants qui puissent accréditer rapidement et de manière certaine la séropositivité ou la séronégativité d'un patient vis-à-vis du virus.

Les critères de performances sont donc la sensibilité (et la précocité), la spécificité mais aussi la reproductibilité, la rapidité et le faible coût. La sensibilité exprime la capacité de détection d'un taux minimum d'anticorps ou d'antigène. La spécificité fait référence à la détection d'anticorps dirigés exclusivement contre un virus donné, d'antigènes spécifiques de ce virus ou de matériel génétique propre à celui-ci.

Lors du dépistage du SIDA, les organismes de Santé recommandent de respecter l'algorithme de test suivant (figure II-8),³¹ qui fait appel à des méthodes de détection indirecte (ELISA, Western Blot...) et directe (PCR, culture...).

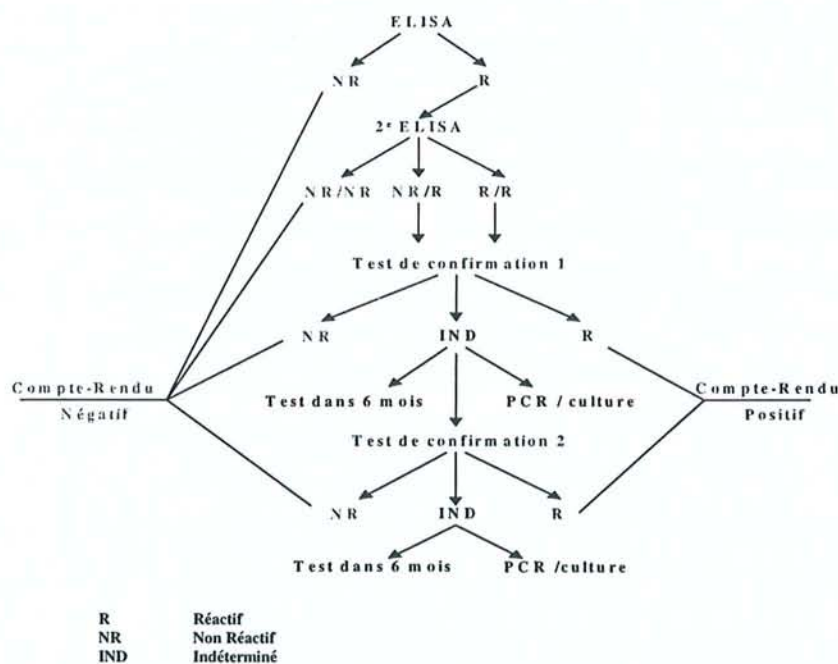


Figure II-8. Algorithme de diagnostic du VIH.

II.3.1. Détection indirecte

Les méthodes de détection indirecte (basées sur la mise en évidence de la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre le VIH, figure II-9) sont utilisées en routine dans les centres de transfusion et dans les hôpitaux. Les tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), rapides et d'utilisation aisée, sont les plus courants. Ils font appel à différents principes: indirect, compétitif ou sandwich. Ils utilisent un support solide sur lequel différentes formes d'antigènes du VIH sont adsorbées. Des spécimens à tester ainsi que des conjugués sont incubés ou simultanément (test compétitif) ou séquentiellement (test indirect) avec les antigènes adsorbés. Les anticorps anti-VIH entrent en compétition avec les conjugués pour les antigènes immobilisés (test compétitif) ou sont fixés par ces antigènes, formant des complexes antigène/anticorps, qui sont ensuite fixés par les conjugués (test indirect).

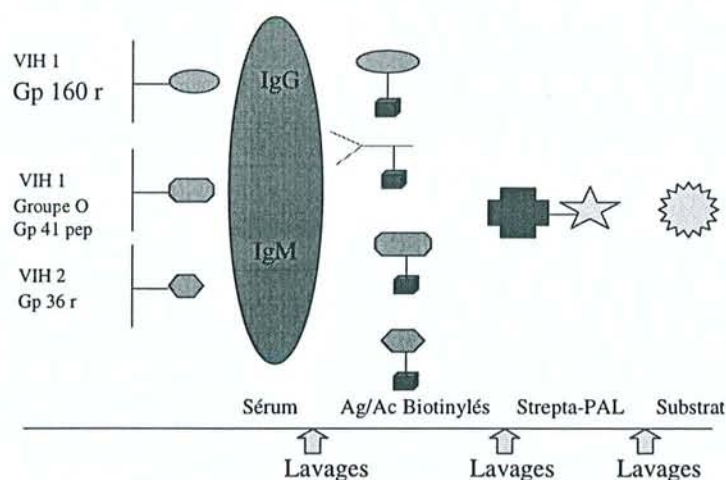


Figure II-9. Test de diagnostic du VIH de 3^e génération

Ils sont détectés grâce à la mesure de l'intensité (absorbance) de la coloration formée après addition du substrat approprié. Cette intensité est inversement (test compétitif) ou directement (test indirect) proportionnelle à la concentration des anticorps VIH dans l'échantillon à tester. Un échantillon est considéré comme réactif aux anticorps VIH si son absorbance est au-dessous (compétitif) ou au-dessus (direct) d'une certaine valeur. La fluorescence est également utilisée comme indice de détection. Ces tests ne sont cependant pas suffisamment fiables à eux seuls. Des tests de confirmation sont souvent nécessaires (test d'immunoempreinte Western Blot (WB), test d'Immunofluorescence indirecte IFA (ImmunoFluorescence Assay), test de radioimmunoprécipitation RIPA

(RadioImmunoPrecipitation Assay)). Ces tests sont toutefois très onéreux et de manipulation moins aisée que les tests ELISA.

Les tests ELISA possèdent un haut degré de sensibilité alors que les tests de confirmation ont une très haute spécificité. Ces deux types de tests doivent être réalisés en parallèle pour permettre d'obtenir des résultats d'une grande précision et d'une grande fiabilité, car aucun d'entre eux ne possède les qualités extrêmes requises pour le diagnostic du VIH.

Les sociétés de diagnostic ont donc effectué de gros efforts pour améliorer les tests ELISA, afin de diminuer au maximum les faux-positifs et surtout les faux-négatifs, et ainsi réduire les tests de confirmation. Les tests de première génération utilisaient des fragments du VIH ou des constituants de la capsid du virus par exemple comme antigène adsorbé sur les plaques de titration. L'introduction de peptides synthétiques ou de protéines recombinantes dans les tests de seconde génération a permis de diminuer les faux positifs, d'augmenter la sensibilité et de détecter plus rapidement les taux de séroconversion, c'est-à-dire la séropositivité d'un patient lors de la période de primo-infection (La période de primo-infection est caractérisée par les signes cliniques consécutifs à la contamination mais qui sont non-spécifiques d'une infection au VIH). Les tests de troisième génération se distinguent simplement des précédents par un mode de révélation plus spécifique, capable de détecter la majorité des immunoglobulines dirigées contre les antigènes présents dans les tests.

La plupart des tests commerciaux détectent les anticorps IgG, bien que les IgM constituent le premier groupe d'anticorps présents dans l'organisme en réponse à une infection virale. La détection d'IgG comprend donc certaines limitations puisqu'elle ne permet pas de mettre en évidence les cas de séroconversion débutante (présence d'IgM sans la présence encore des IgG: Figure II-10), ou de distinguer les anticorps de la mère de ceux de l'enfant, chez les nouveaux-nés. Afin de contourner ce problème et détecter simultanément IgG et IgM, la révélation des tests de troisième génération s'effectue par l'intermédiaire d'antigènes biotinylés qui se fixent spécifiquement sur le complexe antigène/anticorps préalablement formé suivi de l'addition de streptavidine couplée à la peroxydase. Dans le cas des enfants infectés, la détection des IgA a été développée en parallèle et donne de bons résultats.

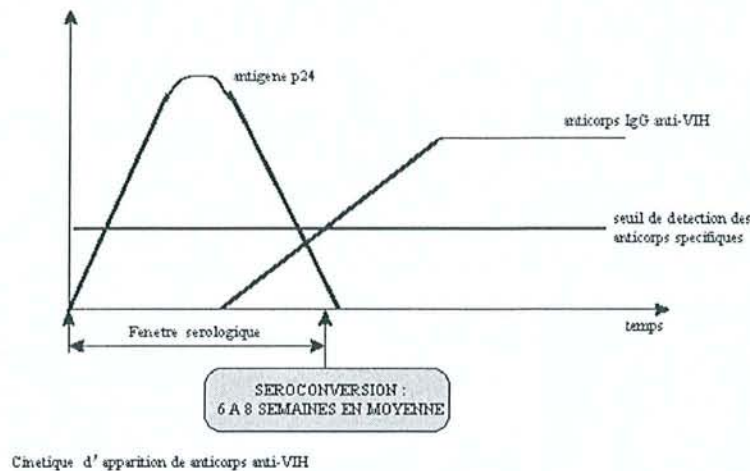


Figure II-10. Cinétique d'apparition des anticorps spécifiques anti-VIH.

II.3.2. Détection directe

a. Détection de l'antigène

La détection des antigènes du VIH s'effectue couramment par des tests ELISA, par adsorption d'anticorps monoclonaux spécifiques d'un antigène du virus (Figure II-11). Cette stratégie est particulièrement intéressante dans le cas d'antigènes présents dans les sérums des patients mais insuffisamment immunogènes *in vivo* pour induire une quantité d'anticorps suffisante. Ce test est moins sensible que les précédents dans la mesure où l'antigène peut être soumis à un phénomène de compétition entre les anticorps présents dans le sérum et les anticorps issus du test. Ce phénomène conduit fatalement à une baisse de la quantité d'antigène détectée.

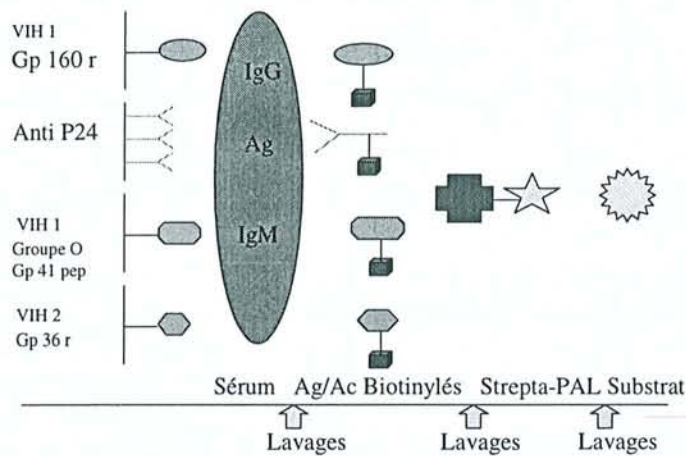


Figure II-11. Test de diagnostic du VIH de 4^e génération avec détection de l'antigène p24 par un anticorps monoclonal adsorbé sur la plaque de titration.

b. Isolement du virus

L'isolement du virus à partir des lymphocytes totaux isolés du sang circulant ou des ganglions a été étendu aux monocytes et macrophages. Cette technique est longue, difficile et coûteuse. Il est possible désormais de séparer les lymphocytes T4 des autres cellules, et de les mettre seuls en culture. Cette modification des techniques permet un meilleur isolement de ce virus toujours présent chez les séropositifs, mais quelquefois difficile à mettre en évidence.

c. PCR

La technique PCR (Polymerase Chain Reaction) est basée sur l'amplification d'une partie du génome viral. Après extraction de l'ADN du matériel biologique à analyser, il est possible de produire un grand nombre de copies de la région du génome du VIH étudiée en utilisant comme amorces les parties les plus conservées de plusieurs gènes. La technique PCR peut amplifier plus d'un million de copies d'ADN en une heure, à partir de 10 microlitres de sang. La sensibilité de cette technique en fait aussi ses limites, et elle est pratiquée uniquement dans les laboratoires de quelques grands centres hospitaliers ou de recherche.

Une PCR reste cependant encore onéreuse et impose des conditions très rigoureuses de travail, ce qui limite son utilisation à des laboratoires très spécialisés.

II.4. CHOIX DU FRAGMENT 600-612 DE LA GLYCOPROTEINE GP41 COMME SONDE ANTIGENIQUE

Lors de la conception d'un test ELISA, deux points sont particulièrement importants à prendre en compte: d'une part, la région antigénique sélectionnée doit posséder une bonne immunogénicité dans le virus afin qu'elle induise *in vivo* un fort taux d'anticorps lors de la réponse antivirale, ainsi qu'une très bonne antigénicité afin de réagir très fortement avec les anticorps spécifiques; d'autre part, elle doit correspondre à une région très conservée entre les différentes souches du virus. Si ce n'est pas le cas, il est nécessaire de les détecter en présence de différents épitopes.³²

Les premières études sérologiques réalisées sur des individus infectés par le VIH-1 ont révélé que les constituants de l'enveloppe, les glycoprotéines gp41 et gp120 sont hautement immunogènes.³³ La recherche de séquences potentiellement antigéniques, d'après le profil d'hydrophobicité de la protéine gp41, préconisé par les programmes de prédiction de séquences antigéniques, a permis de sélectionner une région localisée vers l'extrémité N-terminale.³⁴ Afin de déterminer plus précisément le constituant antigénique reconnu par les anticorps, une série de peptides relatifs à cette séquence a été testée à l'aide de sérums de patients infectés par le VIH-1. Ces expériences ont montré que la séquence 598-609 était fortement antigénique. Une séquence minimale de 7 acides aminés contenant 2 résidus cystéines s'est révélée comme un épitope essentiel dans la reconnaissance immunitaire. Le remplacement d'une de ces cystéines par une sérine affecte considérablement la reconnaissance, ce qui a permis de mettre en évidence la présence d'un pont disulfure responsable de l'essentiel de l'activité antigénique.^{35,36} Cette région de gp41 apparaît comme extrêmement conservée parmi les différentes souches du VIH-1.³⁷⁻⁴² Un simple test ELISA permet ainsi la détection et la distinction de différentes souches de VIH-1. Il est également possible de distinguer à l'aide de cet épitope les patients séropositifs infectés par le VIH-1 ou le VIH-2,⁴³ dans la mesure où l'homologie globale de séquences de protéines transmembranaires entre VIH-1 et VIH-2 n'est en fait que de 44%.⁴⁴

L'épitope 600-609 constitue ainsi une séquence antigénique minimale et importante pour le diagnostic des infections par VIH-1 et VIH-2.

Dans le cadre de notre étude, cette séquence minimale a été étendue au fragment 600-612 en y adjoignant des résidus supplémentaires de part et d'autre de la boucle. (Figure II-12)

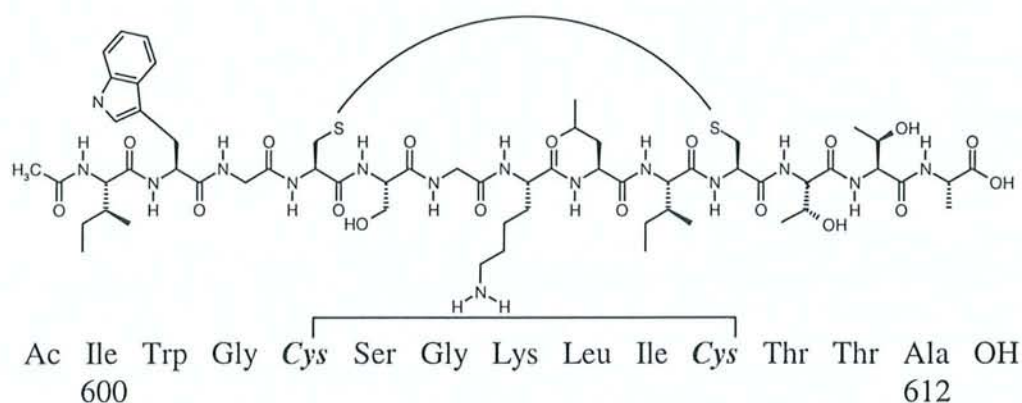


Figure II-12. Représentation de la séquence 600-612 de la glycoprotéine gp41 du VIH-1.

II.5. ETUDES DES ACTIVITES ANTIGENIQUES DES DIFFERENTS ANALOGUES

Dans le but d'étudier les effets de certaines modifications sur la reconnaissance antigénique du peptide cyclique 600-612 par des anticorps, différents analogues ont été synthétisés. Leur activité antigénique a été évaluée par des tests ELISA (Les modes opératoires sont décrits en Annexe B). Ces différentes expériences ont été réalisées à l'IBMC, au sein des équipes de Jean-Paul Briand et de Sylviane Muller.

Trois types de modifications ont été envisagés. La nomenclature utilisée est résumée sur la figure II-13.

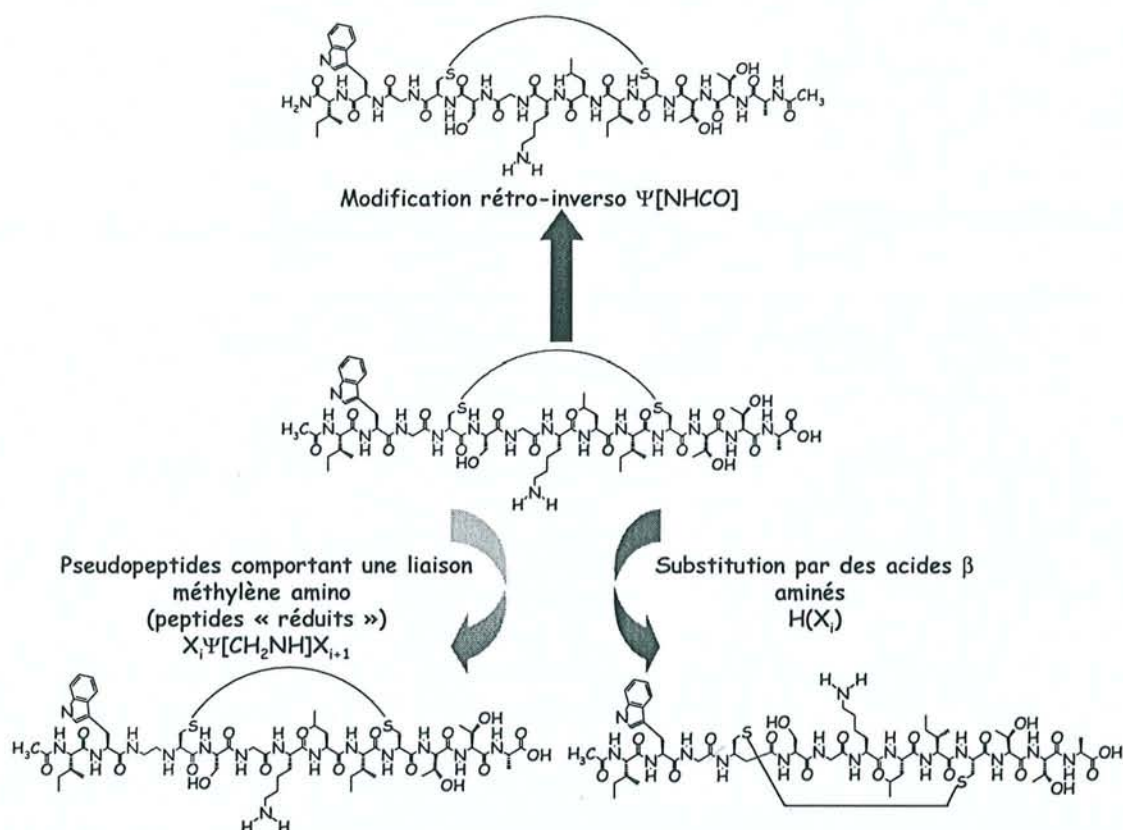


Figure II-13. Schéma des différents analogues étudiés.

II.5.1. Activité antigénique des analogues rétro-inverso

La synthèse peptidique du composé a conduit à deux diastéréoisomères. Le produit élué le plus rapidement en HPLC a été appelé RI1 et le second RI2. L'activité antigénique de ces deux composés a été évaluée dans un premier temps par un test ELISA indirect. Les résultats de ces tests (Tableau II-2) indiquent sans ambiguïté l'absence de reconnaissance antigénique des analogues rétro-inverso par les anticorps présents dans les sérums des patients.

Un second test, appelé "phase anticorps" a également été réalisé. Dans ce test, un anticorps monoclonal reconnaissant le fragment 600-612 (dans notre cas, il s'agit de l'anticorps 11B3, dirigé contre la glycoprotéine gp41 entière), est immobilisé sur une plaque de titration et réagit avec les peptides libres en solution qui sont additionnés dans une étape ultérieure. La détection des peptides reconnus par l'anticorps spécifique est réalisée par l'addition d'un conjugué à base de streptavidine.

On mesure le titre à 50% d'anticorps qui exprime la dilution de l'anticorps nécessaire pour obtenir une densité optique de 1500. En fait, plus on dilue, et plus la reconnaissance antigénique est importante.

Les résultats, donnés dans le Tableau II-2, corroborent l'absence de reconnaissance antigénique. Les deux tests, réalisés conjointement, montrent bien que l'absence de reconnaissance n'est pas due à un simple problème d'adsorption sur le support polymère.

Tests		Tests ELISA indirects réalisés avec les sérums de patients (Ac : anticorps anti-Fc d'IgG humaine)						Phase anticorps
Sérums	Négatif	1	2	3	4	5	6	
600-612	195	2356	2250	687	2500	1390	2500	1902
Blanc	13	28	71	29	14	19	144	-
RI1	200	53	40	31	29	20	48	211
RI2	218	32	28	31	17	23	43	115

Tableau II-2. Résultats des tests réalisés sur le peptide rétro-inverso.

II.5.2. Activité antigénique des analogues "réduits"

Dans le but d'étudier les effets de certaines modifications sur la reconnaissance antigénique du peptide cyclique 600-612 par des anticorps, différents peptides réduits ont été synthétisés, dans lesquels une des liaisons peptidiques à l'intérieur de la boucle et adjacentes à celle-ci a été substituée successivement par un lien pseudopeptidique méthylène amino $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ (analogues "réduits"). Ces derniers ont été modifiés au niveau des liaisons peptidiques se situant à l'intérieur de la boucle et adjacentes à celles-ci.

Par des remplacements systématiques, il est possible en théorie d'évaluer la contribution de chaque liaison peptidique dans la reconnaissance du peptide naturel par les anticorps.

Les tests ELISA ont été réalisés selon les deux méthodes (indirecte et "phase anticorps") citées précédemment. Cela a le mérite d'une part, avec le premier test, de nous placer dans les mêmes conditions que lors des tests de sérums des patients en milieu médical, et d'autre part, avec le second test, de déterminer si les analogues sont mieux reconnus lorsqu'ils sont libres en solution ou adsorbés sur le support polymère.

a. Réactivité de l'anticorps monoclonal 11B3

La reconnaissance antigénique des analogues réduits a été évaluée en présence de l'anticorps monoclonal 11B3. Un peptide correspondant à la séquence 600-612 mais dans lequel les cystéines ont été remplacées par des sérines a servi de témoin négatif.

Les résultats sont résumés dans le tableau II-3:

Peptides	Phase anticorps	ELISA indirect	
600-612	489	4883	4514
Ψ0: GlyΨ[CH ₂ NH]Cys	248	4221	5000
Ψ1: CysΨ[CH ₂ NH]Ser	49	2560	3108
Ψ2: SerΨ[CH ₂ NH]Gly	34	2320	2532
Ψ3: GlyΨ[CH ₂ NH]Lys	41	10	10
Ψ4: LysΨ[CH ₂ NH]Leu	172	3984	4677
Ψ5: LeuΨ[CH ₂ NH]Ile	287	4966	4108
Ψ6: IleΨ[CH ₂ NH]Cys	145	3613	4123
Ψ7: CysΨ[CH ₂ NH]Thr	563	3353	4313
Témoin (Ser ₆₀₃ , Ser ₆₀₉)	10	917	1381

Tableau II-3. Titres en anticorps 11B3 des pseudopeptides réduits (Titres à 50% d'anticorps pour une densité optique de 1500).

Les pseudopeptides sont dans leur majorité tous reconnus par l'anticorps monoclonal 11B3. Dans les deux méthodes, les pseudopeptides Ψ0 et Ψ7 figurent parmi les mieux reconnus avec des titres comparables à celui du peptide naturel. Il est à noter que dans ces deux cas, la liaison pseudopeptidique est localisée à l'extérieur de l'heptamère immunodominant, ce qui confirme bien que l'intégralité de la boucle est essentielle au maintien de la reconnaissance antigénique du peptide 600-612 par les anticorps.

On constate qu'une reconnaissance antigénique plus faible est enregistrée pour les pseudopeptides dont la liaison réduite se situe dans la région CSGK. Au contraire, la région KLIC semble plus permissive à l'introduction d'une liaison réduite dans la mesure où les titres obtenus sont proches de celui du peptide naturel.

La modification de la liaison située entre ces deux régions (GlyΨ[CH₂NH]Lys) conduit à une chute dramatique de la reconnaissance antigénique.

b. Reconnaissance antigénique des analogues réduits par les anticorps des sérums des patients

La reconnaissance antigénique des analogues réduits a été ensuite évaluée par un test ELISA indirect en présence des anticorps de sérums de patients (Figure II-14).

Plus la densité optique (DO) est élevée, et plus la reconnaissance antigénique est importante.

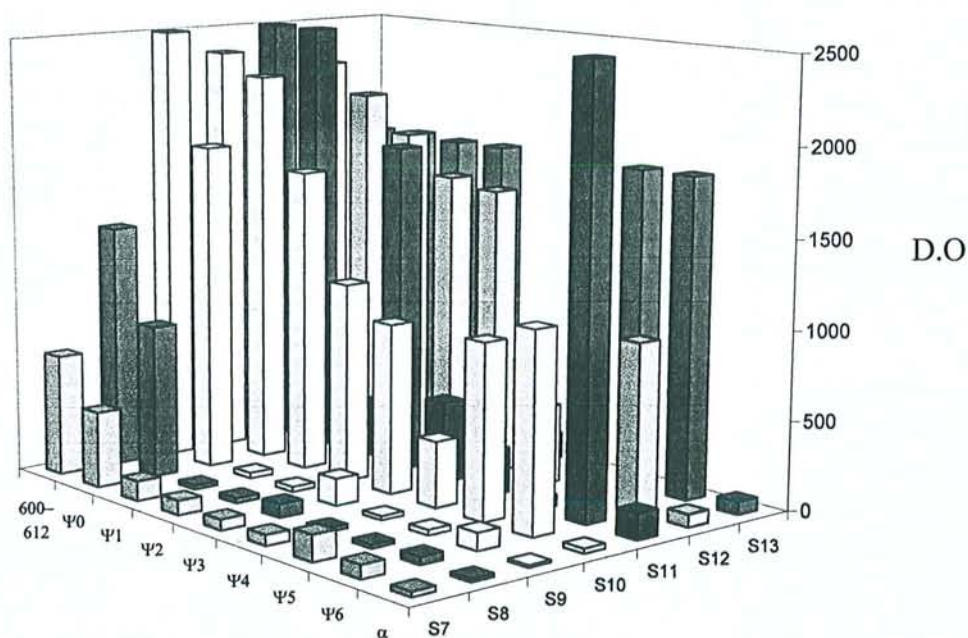


Figure II-14. Reconnaissance antigénique des pseudopeptides "réduits" en présence de sérums de patients séropositifs (S13: surnageant de l'hybridome 11B3).

Dans ce test ELISA, nous avons inclus le surnageant de l'hybridome 11B3 (S13) et nous confirmons dans ce format de test que seul le pseudopeptide Ψ3 (GlyΨ[CH₂NH]Lys) n'est pas reconnu par cet anticorps monoclonal. L'analogue Ψ0 (GlyΨ[CH₂NH]Cys) permet d'obtenir une reconnaissance antigénique comparable à celle du peptide naturel, spécialement dans le cas des sérums S7 et S8. Il semble tout de même au vu de ces résultats que l'intégrité de la boucle soit indispensable pour obtenir une reconnaissance antigénique optimale. En ce qui concerne les modifications localisées à l'intérieur de la boucle immunodominante, la

reconnaissance antigénique par les anticorps des sérums de patients est minimale pour les pseudo-peptides $\Psi 3$ et $\Psi 4$. Il apparaît ainsi que la région située au sommet de la boucle soit particulièrement importante dans la reconnaissance antigénique de ce peptide cyclique par les anticorps présents dans les sérums de patients.

Des tests complémentaires en présence de différentes classes de sérums de patients séropositifs ont été réalisés par la suite et sont décrits en annexe B. Ces tests confirment que les analogues réduits sont reconnus mais pas mieux que le peptide parent.

II.5.3. Activité antigénique des analogues comportant des acides β -aminés

a. Réactivité de l'anticorps monoclonal 11B3

Les analogues peptidiques renfermant un acide β -aminé ont été évalués dans un premier temps en présence de l'anticorps monoclonal 11B3 (Tableau II-4).

Acide β -aminé introduit	Test Phase	ELISA indirect	
600-612	973	4883	4514
HGly ₆₀₂	507	4574	4380
HCys ₆₀₃	545	4357	4461
HSer ₆₀₄	774	4415	4641
HGly₆₀₅	48	418	60
HLys ₆₀₆	607	2812	1900
HLeu ₆₀₇	658	4198	5054
Hlle ₆₀₈	/	/	/
Témoin (Ser ₆₀₃ , Ser ₆₀₉)	10	917	1381

Tableau II-4. Titre ELISA de l'anticorps monoclonal 11B3 avec les analogues (titre 50%, DO=1.5).

D'après le tableau II-4, les analogues peptidiques de la séquence 600-612 sont presque tous reconnus par l'anticorps monoclonal 11B3 à la seule exception de l'analogue HGly₆₀₅. Dans une moindre mesure, l'analogue HLys₆₀₆ présente également une reconnaissance antigénique plus réduite. L'introduction d'un acide aminé β homologue sur les positions comprises dans la région Gly₆₀₅-Leu₆₀₇ provoque donc la plus forte baisse de reconnaissance antigénique au même titre que l'introduction d'un lien réduit. Dans la mesure où il apparaît peu probable que deux modifications chimiques différentes puissent induire une même structuration, il semble que la conformation de la séquence GKL soit particulièrement importante pour recouvrir la totalité de l'activité antigénique. La reconnaissance antigénique de l'analogue HGly₆₀₂, qui renferme un acide β -aminé à l'extérieur de la boucle, est comparable à celle du peptide naturel.

b. Activité antigénique des analogues peptidiques substitués par des acides β -aminés vis-à-vis des anticorps des sérums des patients

Ces analogues peptidiques ont ensuite été évalués avec un test ELISA indirect en présence de sérums de patients séropositifs (Figure II-15).

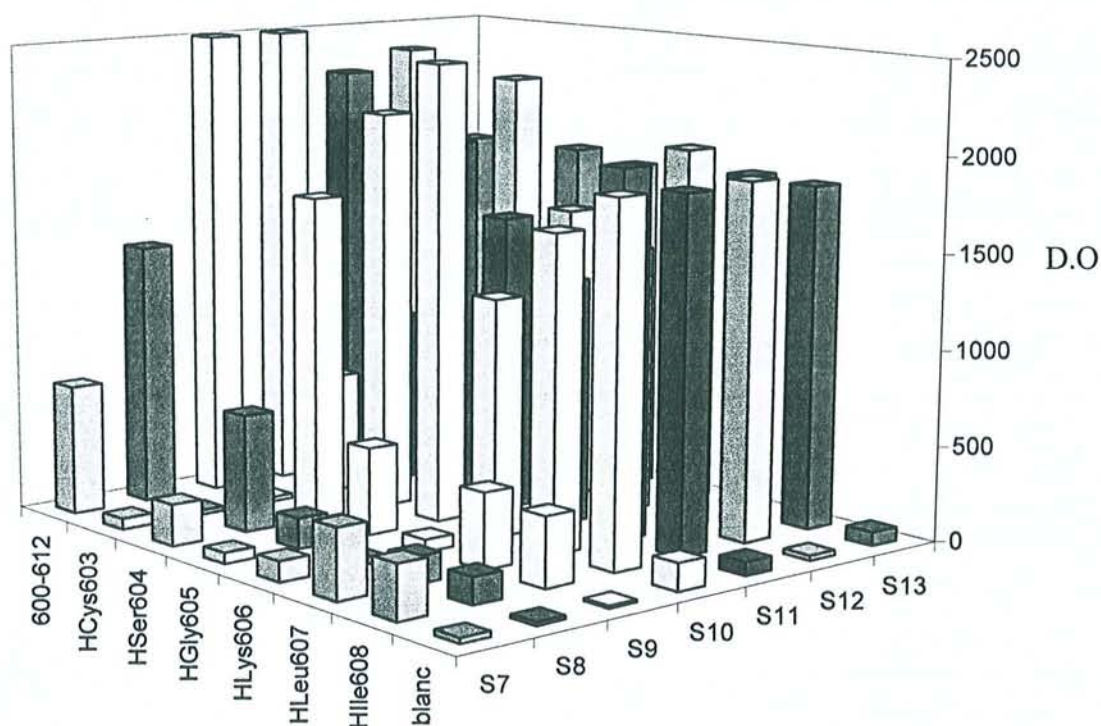


Figure II-15. Reconnaissance antigénique des analogues renfermant un acide β -aminé homologue en présence des sérums de patients séropositifs (S13: surnageant de l'hybridome 11B3).

Les tests réalisés avec les sérums S7-12 confirment les observations faites en présence des pseudopeptides renfermant une liaison réduite (Figure II-15). En effet, les analogues HGly₆₀₅ et HLys₆₀₆ présentent des activités antigéniques plus faibles par rapport aux autres analogues. En revanche, pour cette modification, une perte importante de reconnaissance antigénique est également enregistrée avec l'analogue HCys₆₀₃. Par contre, en présence de l'anticorps monoclonal 11B3 (S13), la reconnaissance antigénique est identique pour tous les analogues ainsi que pour le peptide naturel.

Des tests complémentaires en présence de différentes classes de sérums de patients séropositifs ont été réalisés par la suite et sont décrits en annexe B. Ces tests montrent que plusieurs sérums réagissent plus fortement en terme de densité optique (DO) avec certains analogues, notamment HSer₆₀₄ et HCys₆₀₃ qu'avec le peptide parent. La différence en DO est parfois très importante et très significative. En règle générale, ces derniers semblent mieux reconnus que le peptide parent.

A l'heure actuelle, il y a encore trop peu d'échantillons de chaque classe pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, mais ces résultats semblent prometteurs. Différents tests sont encore en cours de réalisation.

c. Réactivité des anticorps anti-peptide parent

Ces analogues peptidiques ont ensuite été évalués avec un test ELISA direct (Annexe B), en présence de différents anticorps monoclonaux anti-peptide parent 600-612 (Figure II-16).

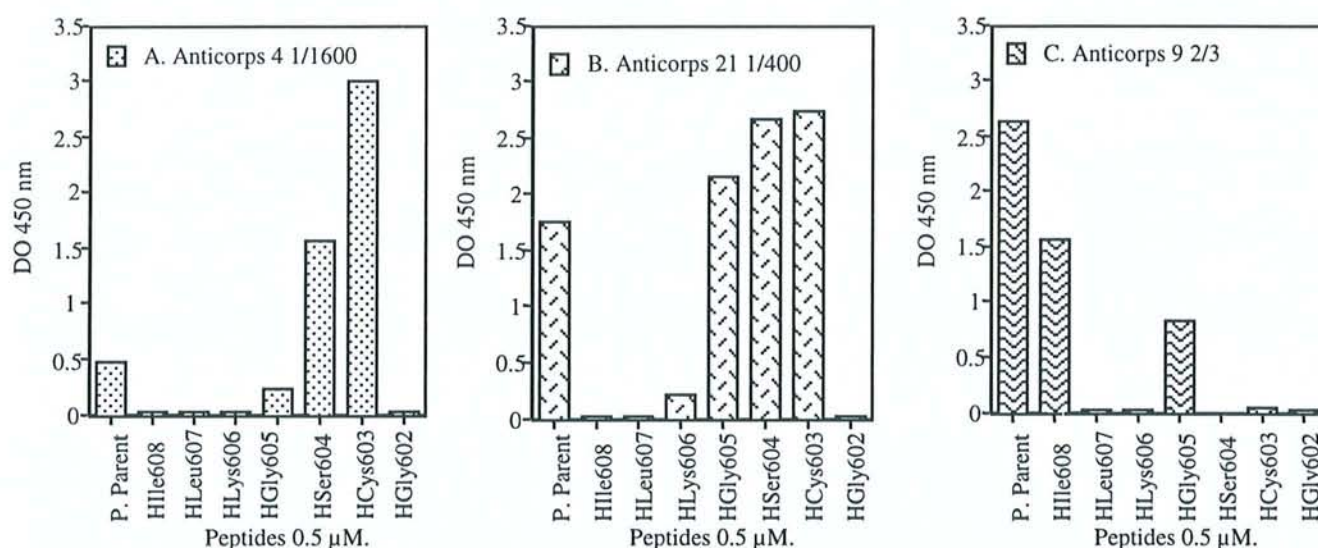


Figure II-16. Réactivité en ELISA des anticorps monoclonaux anti-peptide 600-612 envers le peptide parent et les analogues peptidiques β-aminés.

On constate que pour certains anticorps (anticorps 4 et 21), les analogues HCys₆₀₃ et HSer₆₀₄ sont très bien reconnus, voire même mieux que le peptide parent. Ces mêmes analogues, testés dans un format similaire, en présence de l'anticorps monoclonal 11B3, donnent des résultats de réactivité extrêmement faibles.

HLeu₆₀₇ et HLys₆₀₆ figurent parmi les moins reconnus et présentent des activités antigéniques plus faibles par rapport aux autres analogues.

La réactivité en présence des anticorps polyclonaux de sérums de lapins a également été testée (figure II-17).

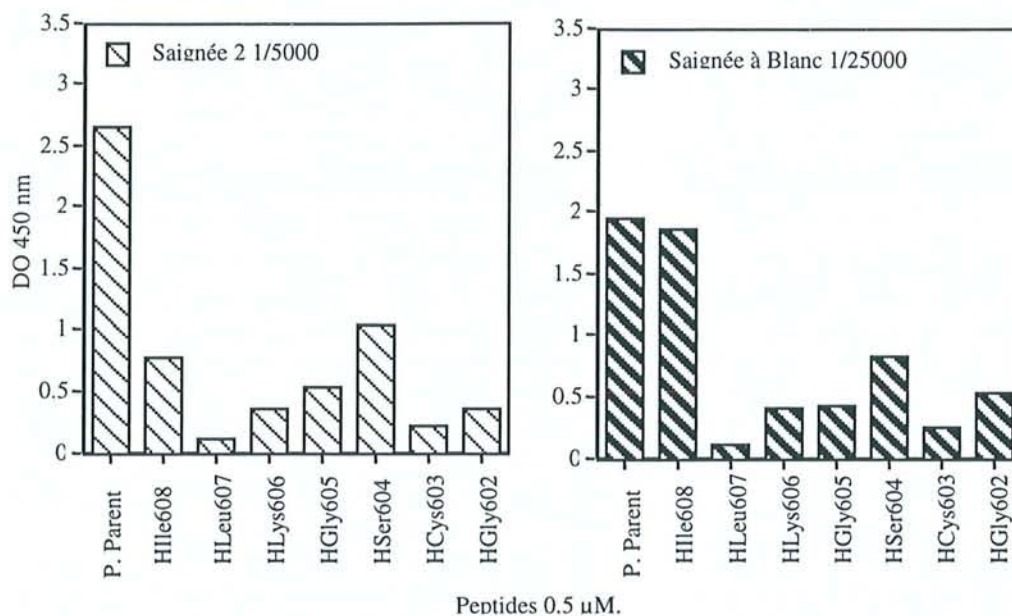


Figure II-17. Réactivité en ELISA des sérums de lapin anti-peptide 600-612 envers le peptide parent et les analogues peptidiques β -aminés.

HSer₆₀₄ demeure parmi les analogues les mieux reconnus, même si sa réactivité n'est plus égale voire supérieure à celle du peptide parent. Cet analogue est donc bien reconnu par les anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-parent et se démarque ainsi des autres analogues β .

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus avec ces différents analogues pseudopeptidiques nous a permis de délimiter la région GKL comme étant particulièrement impliquée dans la reconnaissance antigénique. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat: soit cette région est particulièrement exposée et est le site d'interaction préférentiel des anticorps, soit cette région est une zone charnière et toute modification de cette séquence entraîne des perturbations structurales importantes pour le reste de la boucle.

Dans ce cas, l'intégrité de la région GKL est nécessaire mais pas suffisante pour obtenir une bonne reconnaissance antigénique et la seconde hypothèse semble ainsi être la plus probable.

D'autre part, certains analogues β présentent la particularité d'être mieux reconnus que le parent lui-même par des anticorps monoclonaux anti-parent et en présence de quelques sérums de patients.

Une étude conformationnelle de ces différents analogues permettrait d'expliquer par des bases structurales les résultats précédemment obtenus.

II.6. ETUDES STRUCTURALES PAR RMN ET MODELISATION MOLECULAIRE DE L'EPITOPE MAJEUR 600-612 DE GP41 ET DE SES ANALOGUES

Nous nous sommes intéressés à l'étude comparative de la structure à l'état libre de l'épitope majeur 600-612 de gp41 en solution dans le DMSO et de plusieurs de ses analogues faisant intervenir des modifications de la nature chimique du squelette ou de la liaison peptidique.

Nous avons aussi voulu déterminer quelles étaient les implications structurales définies par le pont disulfure, décrit comme indispensable à la conservation de la reconnaissance antigénique. Dans ce but, le pont disulfure a été remplacé par un pont renfermant un lien amide, de taille variable.

Par la comparaison des conformations adoptées par les peptides présentant une activité biologique et par ceux qui en sont dépourvus, nous essayons d'établir une éventuelle corrélation structure/activité.

II.6.1. Etude préalable

Nous avons débuté notre étude par l'analyse structurale par RMN du fragment immunodominant 600-612 de la glycoprotéine gp41 du VIH-1.

Deux études par RMN avaient été effectuées auparavant: en 1991 par Oldstone et coll.,⁴⁵ et en 1998 par Rabenstein et coll.⁴⁶

Les conditions opératoires et les graphes de connectivités issus de la RMN sont résumés respectivement tableau II-5 et Figure II-18.

Conditions opératoires	Etude d'Oldstone		Notre étude	Etude de Rabenstein	
	Forme réduite	Forme oxydée	Forme oxydée	Forme réduite	Forme oxydée non soluble
Concentration	8mM impuretés détectées	6.9mM, 11mM	4 mM	8.5 mM	-
pH	3.80	4.02	5.70	3.80	4.00
Milieu	90%H ₂ O, 10%D ₂ O	90%H ₂ O, 10%D ₂ O	90%H ₂ O, 10%D ₂ O	90%H ₂ O, 10%D ₂ O	90%H ₂ O, 10%D ₂ O
Champ Magnétique	300 MHz		400 MHz	500 MHz	
Température	278, 310K		277K	288, 298K	

Tableau II-5. Conditions opératoires des différentes études effectuées.

Ces trois études ont été réalisées dans des conditions expérimentales différentes et conduisent donc à des résultats difficilement comparables.

Dans l'étude de Rabenstein et coll.,⁴⁶ il apparaît que la forme réduite (sans pont disulfure) est davantage structurée, présentant davantage de corrélations NOE par rapport au fragment plus court étudié par Oldstone et coll. L'impossibilité de produire des spectres NOE pour la forme oxydée ne permet pas d'effectuer une comparaison directe entre ces deux études et de corroborer la structure de type repliement β inverse centrée sur le fragment SGK_L.

D'autre part, Rabenstein et coll. ont étudié le même fragment de gp41 mais issu de la souche VIH-2. Ce dernier est soluble sous sa forme oxydée et présente moins de corrélations que sous sa forme réduite. On peut supposer que la forme oxydée de la souche VIH-1 suive le même schéma et par conséquent, soit peu structurée.

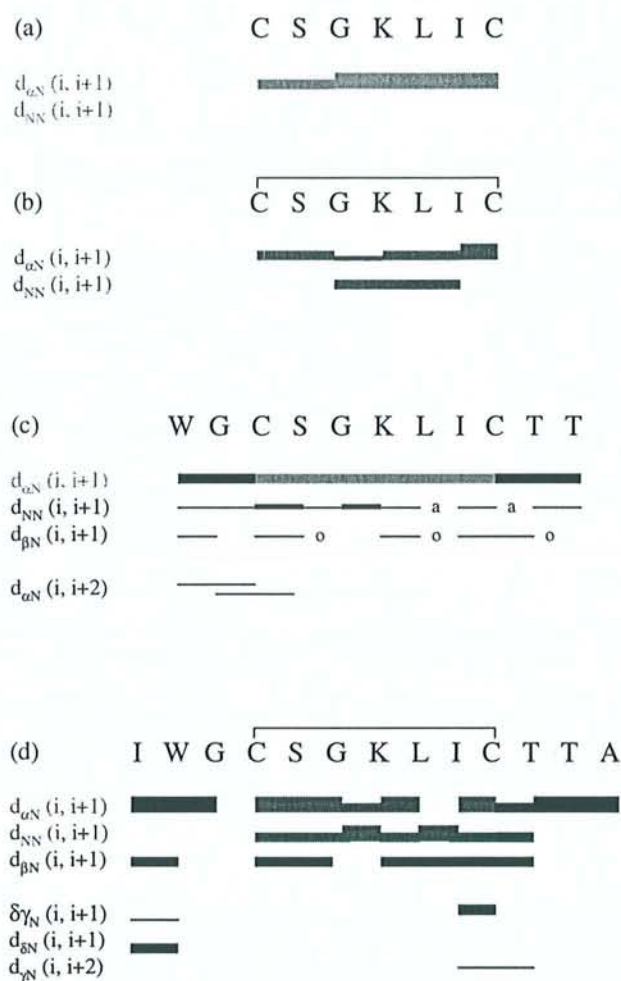


Figure II-18. Graphes de connectivités.

Les intensités sont proportionnelles à l'épaisseur des traits.

(a) et (b) Formes réduite et oxydée, tirées de l'étude d'Oldstone.⁴⁵

(c) Forme réduite, tirée de l'étude de Rabenstein.⁴⁶ La lettre a indique des résonances NH similaires, la lettre o indique un recouvrement.

(d) Forme oxydée de notre étude.

Dans les deux cas, VIH-1 et VIH-2, les résultats de RMN de Rabenstein et coll. semblent montrer que sous leur forme réduite, les peptides étudiés seraient plus structurés que sous leur forme oxydée et sont en désaccord avec les études d'Oldstone et coll. Cependant, ce dernier a effectué son étude sur un fragment plus court, ce qui pourrait expliquer les différences

observées. Les résidus supplémentaires de part et d'autre de la boucle pourraient stabiliser une structure secondaire différente.

De plus, les conditions opératoires présentent des différences, certes mineures mais suffisantes pour changer les conformations observées. L'échantillon réduit qu' Oldstone et coll. ont étudié présente des impuretés, notamment une contamination par une faible quantité de peptide oxydé, en l'absence de DTT.

Notre étude présente quant à elle des graphes de corrélations similaires à ceux obtenus par Oldstone et coll. mais n'a pas permis de retrouver la structuration en repliement β préconisé autour de SGK. Les coefficients de température mesurés, à la différence d'Oldstone, ne mettent pas en évidence de liaison hydrogène à ce niveau, qui sert de base à la prédiction de cette conformation. (Tableau II-6)

	Etude d'Oldstone et coll.		Notre étude	
	$-\Delta\delta/\Delta T, 10^3$ (ppm/K)	$^3J_{\text{HN}\alpha}$ (Hz)	$-\Delta\delta/\Delta T, 10^3$ (ppm/K)	$^3J_{\text{HN}\alpha}$ (Hz)
Ile	-	-	6.67	7.29
Trp	-	-	4.40	ND
Gly	-	-	5.76	ND
Cys	-	-	7.03	ND
Ser	7.4	6.75	4.93	6.14
Gly	7.6	ND	5.73	6.13
Lys	8.8	7.80	6.30	7.81
Leu	3.4	6.60	7.03	ND
Ile	9.5	8.61	6.00	8.33
Cys	9.1	7.47	6.30	7.71
Thr	-	-	6.50	7.61
Thr	-	-	8.80	ND
Ala	-	-	4.63	ND

Tableau II-6. Coefficients de température et constantes de couplages mesurés pour les peptides sous leur forme réduite dans l'étude d'Oldstone⁴⁵ et dans notre étude.

Des coefficients de température $\Delta\delta/\Delta T$ élevés en valeur absolue indiquent des protons amides exposés au solvant tandis qu'une variation faible suggère une liaison hydrogène intramoléculaire.

Dans l'étude d'Oldstone, tous les protons amides semblent être exposés au solvant, à l'exception du NH du résidu leucine qui a un coefficient plus faible, indiquant que ce proton est moins exposé au solvant. Cette observation, couplée à l'étude des graphes de connectivités, a suggéré la présence d'un repliement β inverse autour de SGKL. Cependant, les corrélations $d_{\alpha N}(i, i+2)$ et $d_{NN}(i, i+2)$ entre les résidus Gly et Leu, pouvant corroborer cette structure, ne sont pas observées et les auteurs expliquent cette absence par les conditions opératoires utilisées.

Dans notre cas, nous avons observé des coefficients de température faibles pour les protons des résidus Trp, Ser et Ala, qui seraient moins exposés au solvant par rapport aux autres résidus amino-acides de la séquence. Cependant les calculs de modélisation moléculaire n'ont pas mis en évidence la présence de structures secondaires conséquentes. Le peptide apparaît plutôt dans une conformation étendue. Toutefois, les différents résultats observés dans ces deux études peuvent être expliqués par les conditions de pH, de température et de concentration, qui ne sont pas rigoureusement identiques.

Si l'on veut mener une étude comparative entre différents analogues d'un même épitope, il est essentiel de se placer dans des conditions rigoureusement identiques.

Malheureusement certains des analogues que nous avons étudiés se sont révélés totalement insolubles en milieu aqueux, milieu le plus proche des conditions physiologiques ou dans le MeOH, dont la polarité peut mimer celle de l'interface membrane.⁴⁷ Etant donné la faible quantité de produits en notre possession, il ne nous a pas été possible d'effectuer d'autres essais dans différents solvants (mélange eau/SDS par exemple) et nous avons donc arbitrairement décidé de nous placer dans le DMSO, seul solvant où tous les produits étudiés se révélaient totalement solubles. L'intérêt biologique d'examiner des peptides dans le DMSO est souvent matière à discussion. Cependant, en l'absence d'autres possibilités, de telles études peuvent servir de point de départ pour la recherche d'éventuelles corrélations structure/activité. De nombreuses études ont d'ailleurs été effectuées dans le DMSO pour déterminer les conformations les plus stables de différents peptides.⁴⁸⁻⁵²

II.6.2. Protocole utilisé pour l'étude des différents analogues

Pour chacun des analogues étudiés, nous avons suivi le même protocole opératoire qui est décrit ci-dessous.

a. RMN

Les expériences RMN ont été réalisées sur les spectromètres Bruker DRX 400MHz et Bruker DRX 600MHz.

Les échantillons ont été dissous dans du DMSO- d_6 à des concentrations variant de 2 à 4 mM. Toutes les expériences ont été effectuées à 298K.

Pour chaque analogue, nous avons réalisé une expérience COSY-DQF, une expérience TOCSY, avec un temps de mélange de $\tau_m=70\text{ms}$, et différentes expériences NOESY à des temps de mélange variables (de 80 à 800ms).

Pour les expériences NOESY et TOCSY, 512 spectres, constituant la dimension F1, sont enregistrés avec 2048 points alors que le COSY-DQF est enregistré avec 8K points pour améliorer la précision digitale. Chaque spectre est composé de 40 à 128 accumulations selon l'expérience avec un délai de relaxation de 1,2s.

Les données de RMN sont traitées sur des stations Silicon Graphics, avec le logiciel XWIN-NMR.⁵³ Avant la transformée de Fourier, les interférogrammes ont été multipliés par une fonction d'apodisation de type sinus déphasée de $\pi/4$.

Après examen des courbes de "build-up", les expériences NOESY avec un temps de mélange $\tau_m=300\text{ms}$ (faible diffusion de spins pour tous les peptides étudiés) ont été choisies pour extraire les données structurales. Les volumes des pics ont été intégrés avec le logiciel XEASY⁵⁴ et ont été convertis en distance grâce au programme CALIBA⁵⁵ de DYANA,⁵⁶ qui a traduit les volumes des pics en limites supérieures et inférieures des intervalles de distances interprotoniques.

En considérant que tous les noyaux en interaction ont le même temps de corrélation,⁵⁷ nous avons estimé les distances interprotoniques à partir d'un pic croisé de deux protons séparés par une distance connue, c'est-à-dire les deux hydrogènes géminaux $C^\beta H_2$ (1.78Å) d'un résidu cystéine ou tryptophane.

Les corrélations NOE ont été divisées en trois classes selon leur intensité relative forte, moyenne et faible correspondant respectivement à des intervalles de distances 1.8-2.8Å, 2.8-

3.8Å et 3.8-5.5Å. L'attribution stéréospécifique des protons géminaux (protons Gly- C^αH₂ et protons C^βH₂ des chaînes latérales) n'a pas pu être réalisée et l'intervalle des distances a été majoré de ±0.5Å pour compenser l'erreur possible due à l'introduction d'un pseudo-atome.

b. Modélisation moléculaire

Une procédure combinée de géométrie de distances et de dynamique moléculaire (MD) a été utilisée pour déterminer les éléments structuraux des molécules étudiées.

Nous avons débuté avec des calculs de dynamique moléculaire avec la méthode du recuit simulé de DYANA pour générer des structures partiellement optimisées, qui seront ensuite améliorées par des calculs de simulation MD avec le logiciel DISCOVER.

Les calculs ont été réalisés à partir d'une structure étendue, en utilisant la procédure standard de recuit simulé de DYANA, constituée de 10000 pas en partant d'une température de 8 unités pour décroître vers 0 unité (les unités de température sont mesurées en unités de fonction cible par degré de liberté).⁵⁶

Les acides aminés D ont été introduits dans la librairie de DYANA en changeant le signe des coordonnées z pour chaque atome H^α et pour chaque atome des chaînes latérales. (Cela ne s'est pas avéré nécessaire pour les atomes de la chaîne principale, leurs coordonnées atomiques étant égales à zéro).

Les autres résidus pseudopeptidiques non standards ont été construits dans le logiciel DISCOVER,⁵⁸ puis soumis à des calculs semi-empiriques avec MOPAC⁵⁹ pour l'optimisation des charges électroniques des atomes et leur champ de force. Nous avons utilisé le logiciel MOLMOL⁶⁰ pour convertir le format des champs de forces DISCOVER en format compatible avec DYANA avant de les introduire dans la librairie de DYANA.

Dans le cas des cycles lactames, en l'absence de données NOE caractéristiques d'une liaison amide *cis*, nous avons créé une liaison amide avec la configuration plane et *trans* pour fermer le cycle.

En raison de l'arborescence spécifique des programmes de DYANA, qui ne permettent pas d'imposer des contraintes angulaires entre résidus non adjacents, nous avons imposé à la place des contraintes de distance sur la liaison amide, avec une constante de force plus importante que celle appliquées pour les contraintes de distances interprotoniques.

Les acides aminés de configuration L adoptent généralement des valeurs négatives pour les angles Φ , nous avons contraint leur variation entre -10 et -170 .

Pour chaque calcul, nous avons généré 50 structures, vérifiant au mieux le jeu des contraintes imposées. Les 30 meilleures structures issues des calculs de DYANA (c'est-à-dire ayant la fonction cible la plus faible) ont été ensuite soumises à un calcul de dynamique moléculaire avec le logiciel DISCOVER,⁵⁸ en utilisant les contraintes estimées par RMN et le champ de forces CVFF.⁶¹

Les calculs de simulation MD ont été effectués sous vide (*in vacuo*) avec le logiciel DISCOVER et le solvant n'a pas été inclus dans le système. En effet, la modélisation en présence d'une boîte de DMSO prendrait pour chaque molécule quelques mois de temps d'ordinateur. Dans le cas présent, pour éviter la surestimation des charges des groupements N et C-terminaux et des chaînes latérales chargées, les charges des chaînes latérales sont réduites de moitié alors que les groupements N et C-terminaux sont bloqués.

Une constante diélectrique dépendant de la distance, égale à $4r$ a été appliquée.

Les contraintes de distances ont été utilisées avec une constante de force de $k=20$ Kcal/mol/Å. La liaison lactame fermant les cycles a été imposée de façon classique par le biais d'une contrainte diédrale.

Chaque structure est d'abord minimisée par un cycle EM puis équilibrée à 300K par un calcul de dynamique moléculaire de 30ps, et suivie par un autre calcul MD de 200ps. Les données sont ensuite collectées au cours de ce dernier cycle. Les résultats sont analysés par des calculs de déviation des moindres carrés ou *rmsd* (*root mean square deviation*), afin de déterminer les conformères finaux, qui satisfont au mieux les données expérimentales. La qualité stéréochimique de ces conformations est vérifiée en utilisant le programme PROCHECK.⁶²

Grâce au programme PROMOTIF,⁶³ nous avons ensuite défini les éléments de structures secondaires présents dans tous nos conformères.

II.6.3. Etude du peptide parent

a. Résultats des mesures de RMN

L'étude par ¹H-RMN du peptide correspondant au fragment 600-612 de la glycoprotéine gp41 du VIH-1 (appelé par la suite peptide parent, figure II-19) a tout d'abord été menée en milieu aqueux, puis en solution dans le DMSO pour les raisons explicitées précédemment.

Par un souci de commodité, la position des résidus acides aminés dans le peptide sera numérotée selon le schéma de la figure II-19 et non pas entre 600-612.

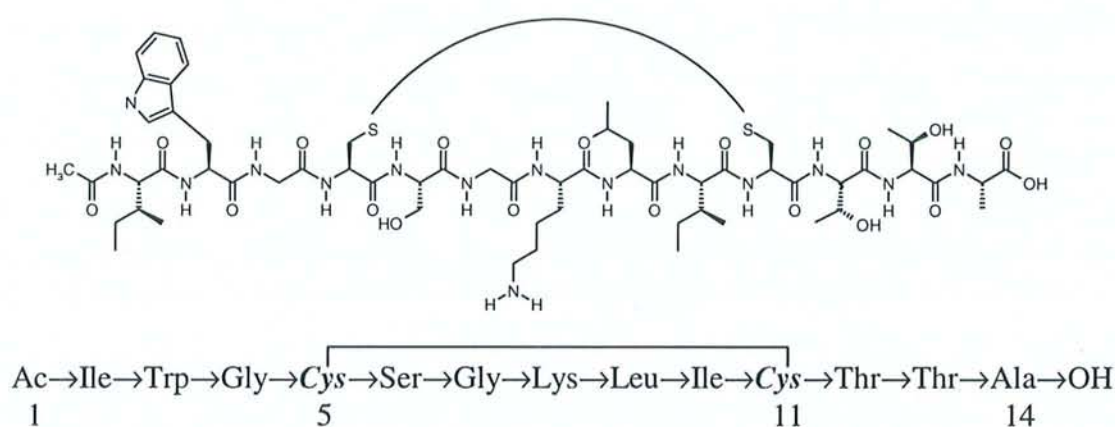


Figure II-19. Séquence du peptide cyclique parent.

Le sens des flèches désigne le sens de la liaison peptidique.

Les signaux RMN du peptide ont été attribués par combinaison des techniques TOCSY et NOESY (Figures II-20 et II-21).

La carte de corrélations totale TOCSY (Figure II-20) permet d'attribuer l'ensemble des signaux RMN intra résidus. Nous avons recours à l'expérience NOESY (Figure II-16), qui grâce aux connectivités séquentielles $NN(i, i+1)$ et $H^{\alpha}N(i, i+1)$, nous permet de faire une attribution précise de la position d'un résidu donné. Les déplacements chimiques des différents protons sont rassemblés en annexe B.

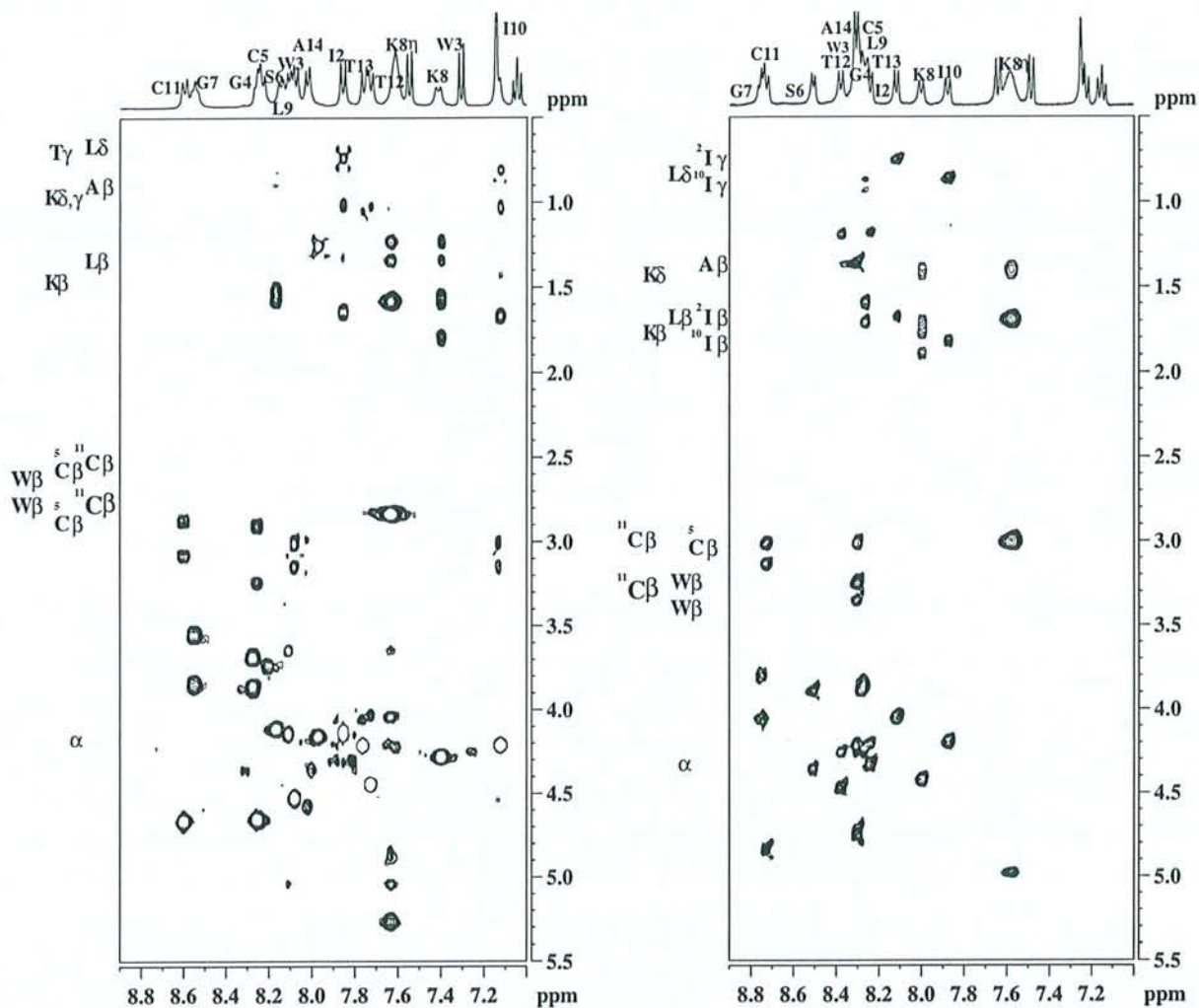


Figure II-20. Expansion de la partie CH/NH des spectres de corrélation TOCSY du peptide parent.

(a) dans le DMSO; (b) dans H₂O/D₂O 90/10 v/v (pH=5.7, 4°C, tampon phosphate).

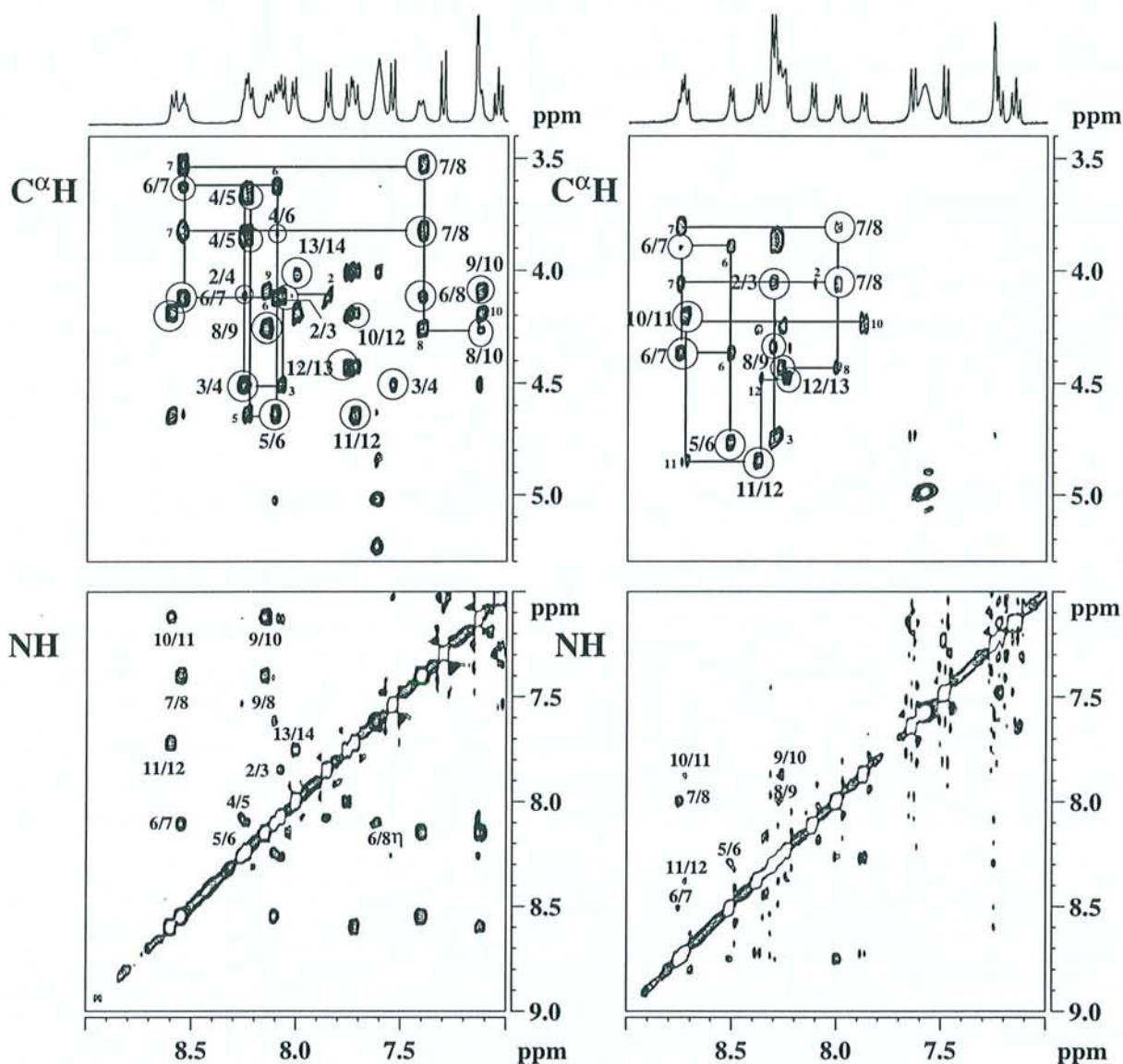


Figure II-21. Région de corrélations $C^{\alpha}H_i/NH_{i+1}$ et NH_i/NH_{i+1} des spectres NOESY du peptide parent.

(a) dans le DMSO; (b) dans H_2O/D_2O 90/10 v/v (pH=5.7, 4°C, tampon phosphate).

Le spectre NOESY (Figure II-22) dans l'eau présente moins de connectivités que celui effectué dans le DMSO. La présence de corrélations $d_{\alpha N}(i, i+1)$ de forte et moyenne intensité et l'absence de connectivités $d_{NN}(i, i+1)$ et de connectivités à moyenne distance pour les deux fragments en dehors de la boucle immunodominante 5-11 semblent suggérer que soit ces deux fragments adoptent une conformation étendue, soit qu'ils sont plus flexibles en milieu aqueux. Au contraire, dans le DMSO, on observe davantage de connectivités au niveau de ces deux fragments qui indiqueraient dans ce cas qu'ils sont plus structurés. Cependant, l'absence de

corrélations $NN(i, i+1)$ intenses dans la partie N-terminale indique qu'elle n'est pas bien stabilisée.

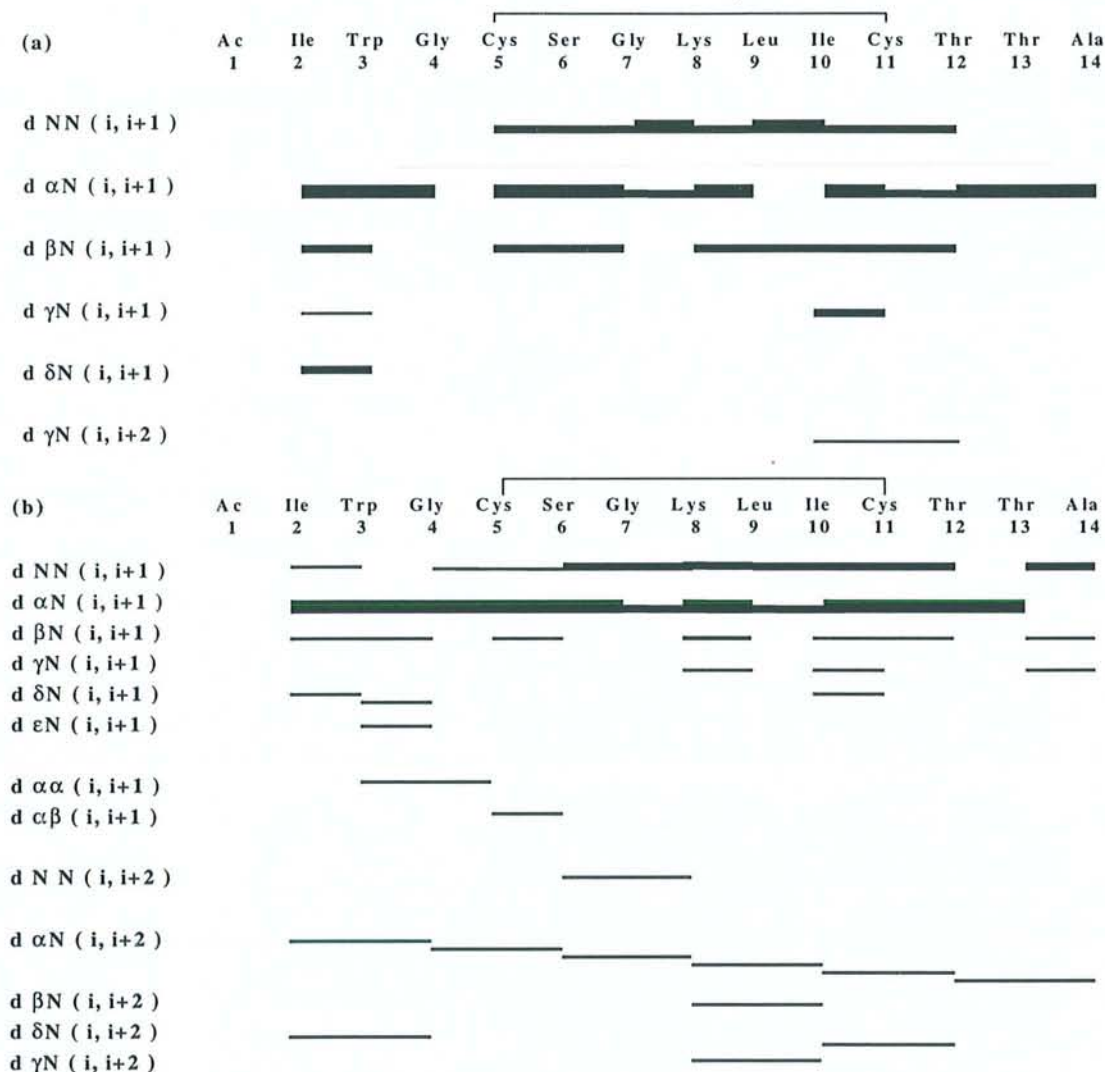


Figure II-22. Représentation, en fonction de leur intensité relative des corrélations NOE croisées pour le peptide parent.

(a) dans 90% H₂O, 10% D₂O; (b) dans le DMSO.

L'intensité est proportionnelle à l'épaisseur des traits.

Le fragment cyclique 5-11 immunodominant présente nettement plus de connectivités NOE, ce qui laisse penser que ce fragment est fortement structuré. Pour l'ensemble de cette boucle, les caractéristiques NOE se retrouvent dans les deux solvants, ce qui tend à prouver la présence de structures similaires dans chacun des deux milieux.

Les coefficients de température $\Delta\delta/\Delta T$ relatifs aux résonances des protons amide ont été calculés et rassemblés en annexe B. Les valeurs inférieures à -3 ppb/K en valeur absolue correspondent à des protons protégés du solvant et susceptibles de participer à une liaison hydrogène intramoléculaire. On constate que ces valeurs se rapportent aux protons NH des résidus Ser₆, Lys₈ et Ile₁₀.

b. Résultats de la modélisation moléculaire

Les calculs de modélisation moléculaire, effectués suivant la procédure décrite précédemment, nous ont permis de conserver un ensemble de 30 structures compatibles avec les données RMN. Ces conformations ont une structuration importante au niveau de la boucle immunodominante puisque nous arrivons à les superposer sur le fragment 4-12 avec un *rmsd* de 0.85Å. (Figure II-23)

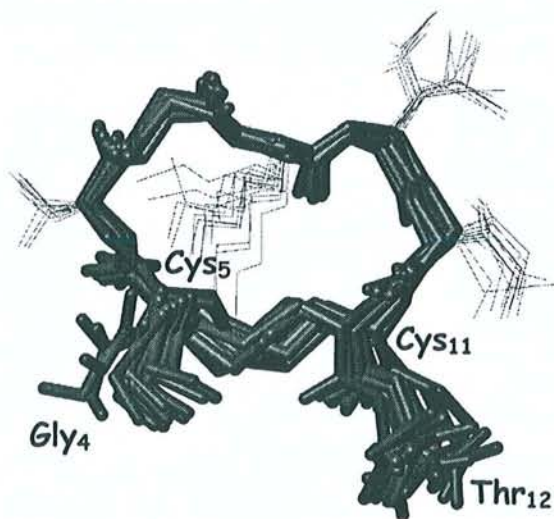


Figure II-23. Superposition du fragment 4-12 sur les positions des atomes du squelette peptidique pour les structures de plus basse énergie. Le squelette peptidique est représenté en traits gras, les chaînes latérales sont en traits fins.

Le programme PROMOTIF a permis de mettre en évidence 2 types de repliements (Tableau II-7).

- un repliement β de type $i+3 \rightarrow i$ autour du fragment CSGK avec une occurrence de 100%.
 - un repliement β de type $i+3 \rightarrow i$ autour du fragment KLIC avec une occurrence de 100%.
- Pour ce repliement, on n'observe pas de liaison hydrogène de type $i+3 \rightarrow i$. Cependant, 68% des structures sont réellement stabilisées par la liaison T_{12} -NH et I_{10} -CO.

En fait, le programme PROMOTIF comptabilise comme repliement β toute structure dont la distance $C_i^\alpha - C_{i+3}^\alpha$ est inférieure à 7Å, et dont les angles rotationnels correspondent à ceux des classes prédéfinies.

Ces résultats sont en bon accord avec les analyses qualitatives préliminaires issues des données RMN, qui préconisaient une bonne structuration au niveau de la boucle ainsi qu'une certaine mobilité des structures au niveau de la partie terminale de cette boucle.

Repliement	Région	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}	Occurrence
β_{IV}	CSGK	-130 ± 18	87 ± 5	72 ± 6	61 ± 8	100%
β_{VIII}	KLIC	-62 ± 3	-42 ± 6	-104 ± 11	86 ± 8	100%

Tableau II-7. Valeurs moyennes des angles rotationnels impliqués dans les repliements structuraux du peptide parent.

Les éléments de structuration sont résumés sur la figure II-24:

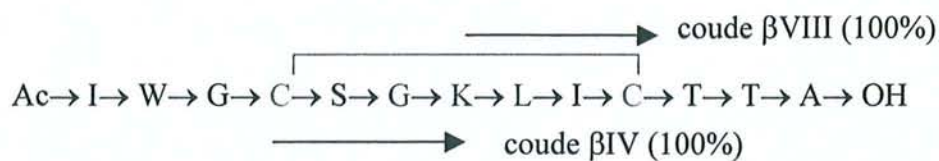


Figure II-24. Récapitulatif des structures du peptide parent. La présence d'un repliement β est symbolisée par une flèche en traits pleins.

La structure moyenne mettant en évidence les éléments structuraux est représentée sur la figure II-25:

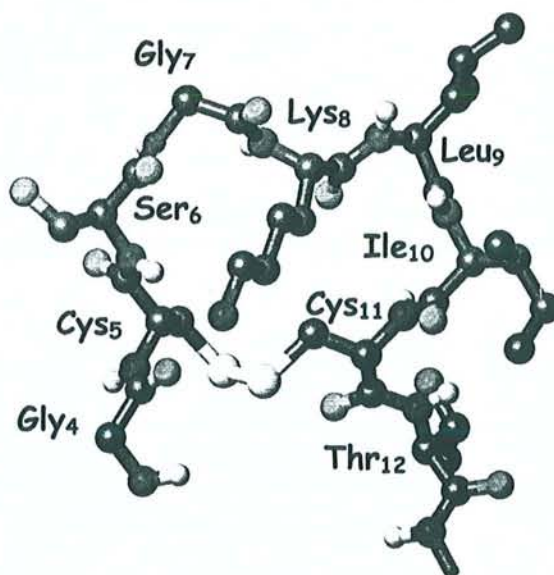


Figure II-25. Représentation de la structure moyenne de la partie structurée du peptide parent.

Le pont disulfure

On constate dans la distribution des angles de torsion de la liaison disulfure estimés par modélisation que plus de la moitié des structures adoptent la configuration "*left handed spiral*" (la conformation la plus courante pour les protéines, selon une étude réalisée sur les structures déposées à la Protein Data Bank (PDB)^{64,65}. 40% des structures adoptent la configuration "*right handed hook*", tandis que les 10% des structures restantes sont en configuration aléatoire.

c. Discussion

Il a été montré précédemment que les résidus Gly₇, Lys₈, Leu₉ sont particulièrement importants dans la reconnaissance antigénique puisque des modifications à ce niveau entraîneraient une perte dramatique de la réactivité. Les structures mises en évidence impliquent justement ces résidus. On peut noter que la conformation adoptée est telle que les chaînes latérales des résidus Lys₈ et Ile₁₀ sont positionnées sur une face, tandis que celle du résidu Leu₉ leur est opposée (figure II-26).

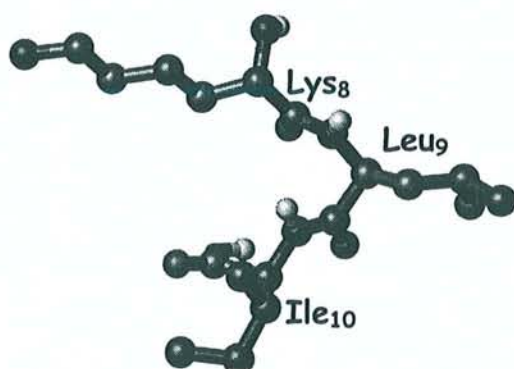


Figure II-26. Orientation des chaînes latérales du fragment K₈L₉I₁₀ de la structure moyenne du peptide parent.

La position de ces chaînes longues, et notamment celle du résidu Lys₈, seul résidu chargé, devrait jouer un rôle important au moment de la fixation à l'anticorps. En effet, ce dernier devrait en toute vraisemblance établir des liaisons avec des résidus de l'anticorps, soit par

formation de ponts salins, soit par formation de liaisons hydrogène qui stabiliseraient le peptide dans une conformation donnée.

Dans des études de peptides cycliques de petite taille, il n'est pas rare de trouver des repliements γ comme éléments de structuration.⁶⁶⁻⁷²

En général, les repliements γ sont bien conservés et certains se trouvent à des positions clés dans les protéines. Ils sont impliqués dans des sites de fixation du ligand ou près des sites actifs.⁷³

Dans les protéases à sérine, on trouve des repliements γ sur la boucle où se situe le site catalytique. Dans les protéases à thiols, un repliement γ est situé près d'une cystéine conservée et un autre près de l'histidine conservée. On en trouve également dans les globulines, entre les hélices H et G.

II.6.4. Etude de l'analogue rétro-inverso du peptide 600-612 de la gp41

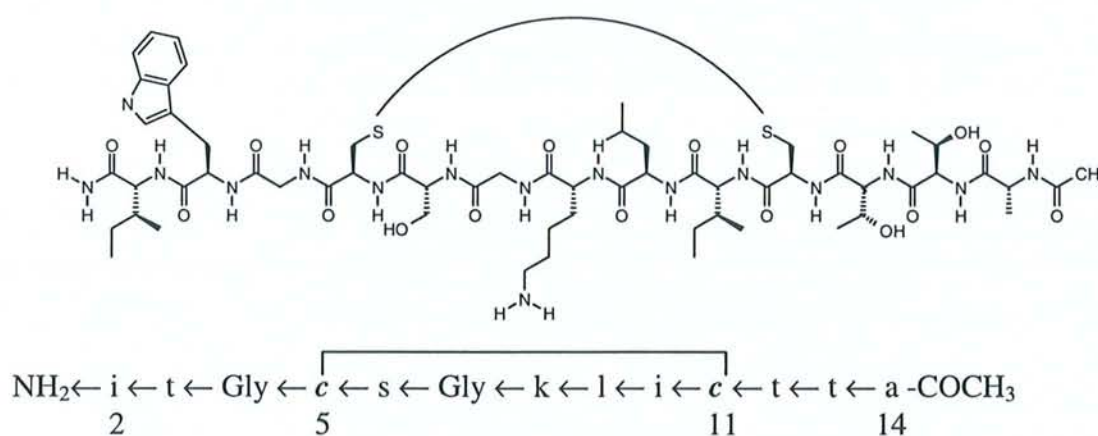


Figure II-27. Séquence primaire du peptide cyclique rétro-inverso.

Le sens des flèches désigne le sens de la liaison peptidique; nous utilisons cependant la même numérotation des résidus que celle du parent. Les acides aminés D sont représentés par leur symbole à une lettre en minuscule.

Afin d'expliquer l'absence de reconnaissance antigénique de l'analogue rétro-inverso du peptide 600-612 de la gp41, nous avons étudié les changements conformationnels que peut induire l'inversion de la liaison peptidique.

L'étude conformationnelle a été réalisée avec le pseudopeptide rétro-inverso (Figure II-27), bloqué à chacune des extrémités sous forme de carboxamide et d'acétamide respectivement,

ce qui permet de s'affranchir d'éventuels problèmes de racémisation du résidu malonique pendant l'acquisition des données.

a. Résultats des mesures de RMN

L'analyse combinée des spectres TOCSY et NOESY nous a permis d'attribuer l'ensemble des signaux protoniques du peptide rétro-inverso. Les déplacements chimiques des différents protons sont rassemblés en annexe B. Les spectres NOESY des peptides parent et rétro-inverso (Figure II-28) présentent de grandes différences, ce qui pourrait indiquer que les conformations adoptées par chacun des deux peptides seraient également très différentes.

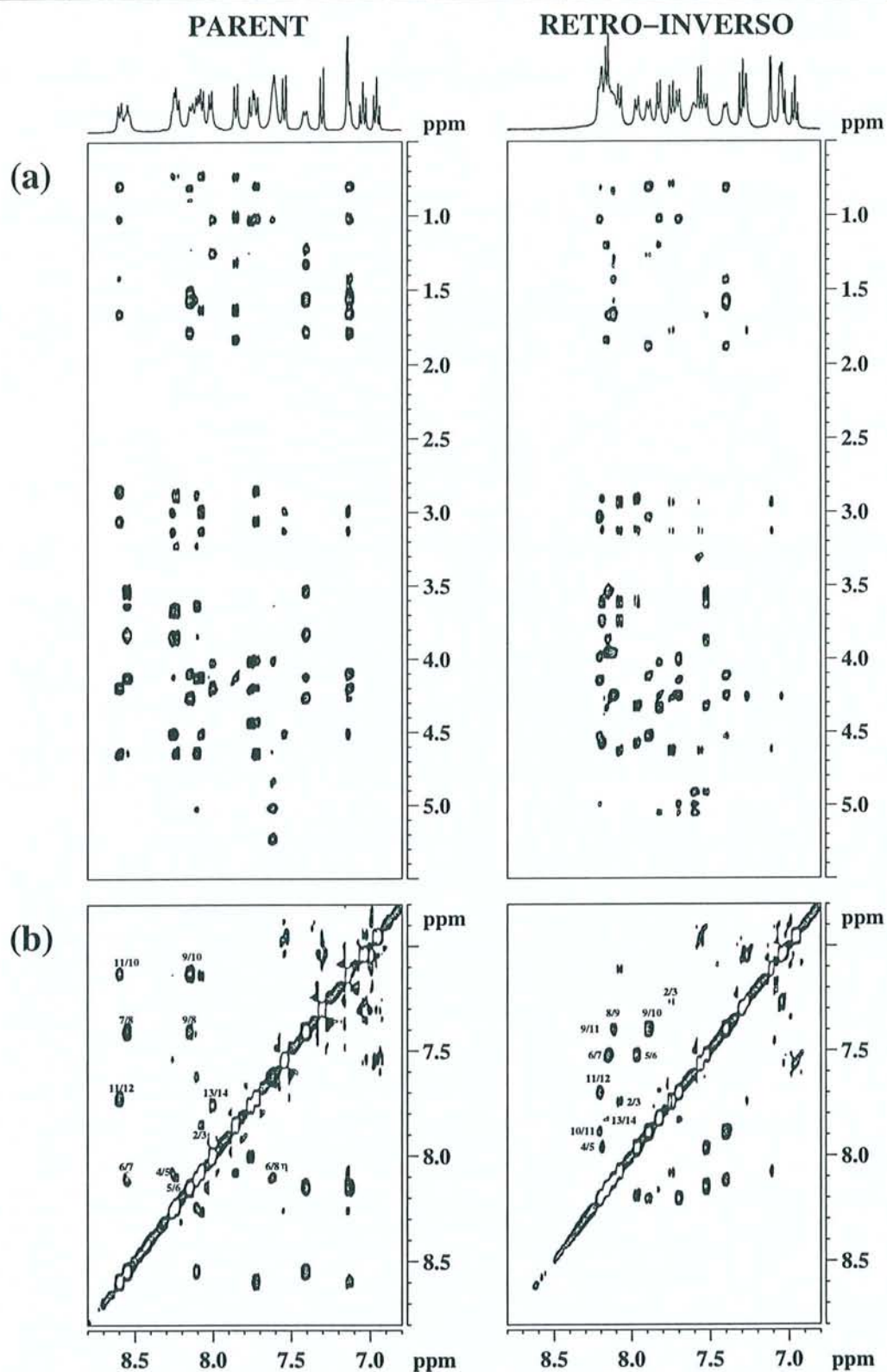


Figure II-28. Spectres de corrélations NOESY des peptides parent et rétro-inverso.

(a) Région de corrélations CH_i/NH_{i+1} ; (b) Région de corrélations NH_i/NH_{i+1} .

Les corrélations issues de l'intégration des spectres NOESY sont rassemblées sur le diagramme de la figure II-29.

Cette carte montre en plus des corrélations $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+1)$, la présence des corrélations $d_{NN}(i, i+2)$, $d_{\alpha N}(i, i+2)$ et $d_{\beta N}(i, i+2)$ dans la partie 8-11 de la boucle. Ceci semble indiquer que cette partie est structurée mais cependant moins que pour la partie correspondante du peptide parent, comme le montre le moins grand nombre de corrélations $(i, i+2)$ et l'absence de corrélations $(i, i+3)$.

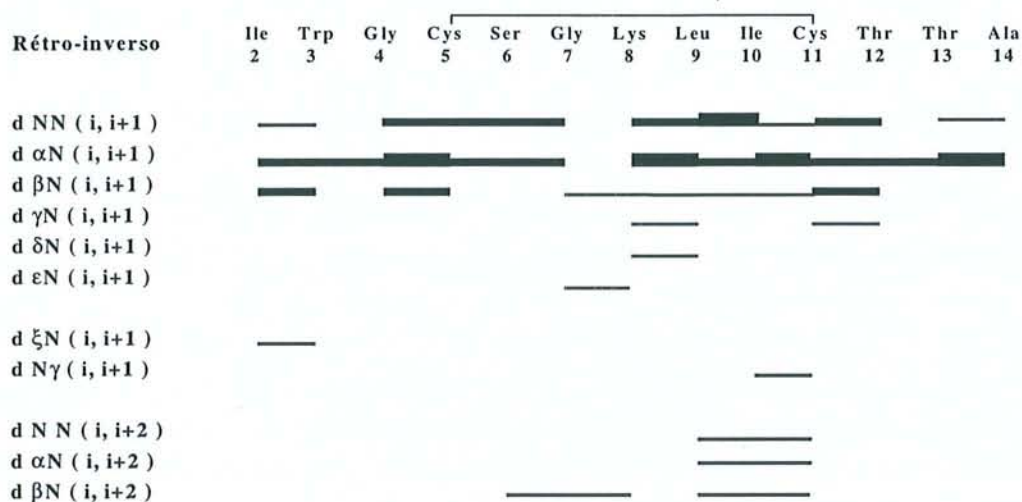


Figure II-29. Représentation, en fonction de leur intensité relative, des corrélations NOE croisées pour le peptide rétro-inverso. Les intensités sont proportionnelles à l'épaisseur des traits.

La figure II-30 représentant la différence entre les déplacements chimiques des protons NH et $C^{\alpha}H$ du peptide parent et du peptide rétro-inverso montre que pratiquement tous les protons NH et $C^{\alpha}H$ du peptide RI sont blindés, à l'exception des protons Lys₈-NH et Ile₁₀-NH

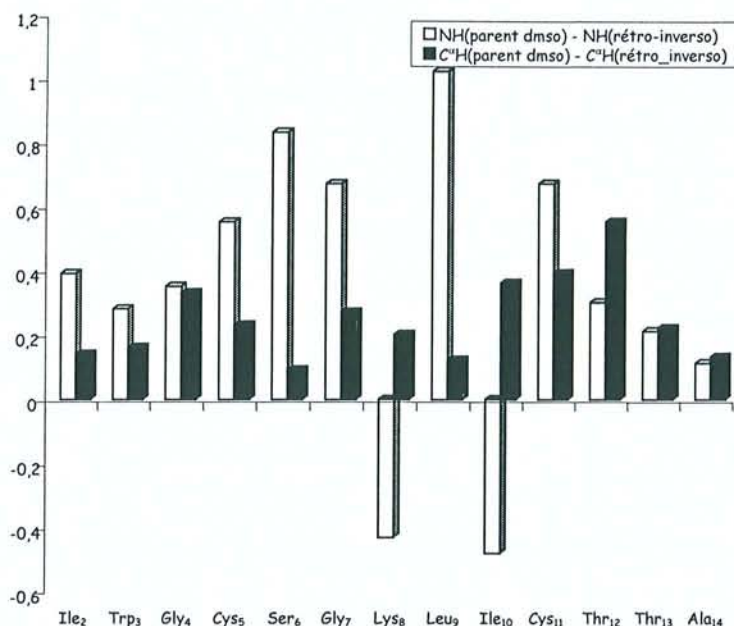


Figure II-30. Perturbations des déplacements chimiques des protons amides et des protons C $^{\alpha}$ H du peptide rétro-inverso considéré par rapport au peptide parent.

Ceci semble montrer que l'ensemble des protons C $^{\alpha}$ H et NH du squelette peptidique de l'analogue RI se trouvent dans un environnement magnétique différent de celui du peptide parent. Les résidus de l'ensemble de la boucle Cys₅-Cys₁₁ sont les plus perturbés (différence de 0.4 à 1ppm) et semblent jouer un rôle clé dans la structuration du peptide parent.

Les effets de température (Annexe B) montrent que les valeurs les plus faibles se rapportent aux protons NH des résidus Ser₆, Leu₉, Cys₁₁ et Thr₁₂.

b. Résultats de la modélisation moléculaire

Les calculs de modélisation ont permis d'isoler deux familles de structures, en proportion équivalente. Ces deux ensembles présentent une structure rigide au niveau de la boucle. En effet, la superposition des structures de la famille I conduit à un *rmsd* de 0.56Å sur la position des atomes du squelette peptidique du fragment 5-11, tandis que la superposition des structures de la famille II conduit à un *rmsd* de 0.89Å sur la position des atomes du squelette peptidique du fragment 3-12.

Les superpositions des structures de plus basse énergie pour chacune des deux familles sont représentées sur la figure II-31.

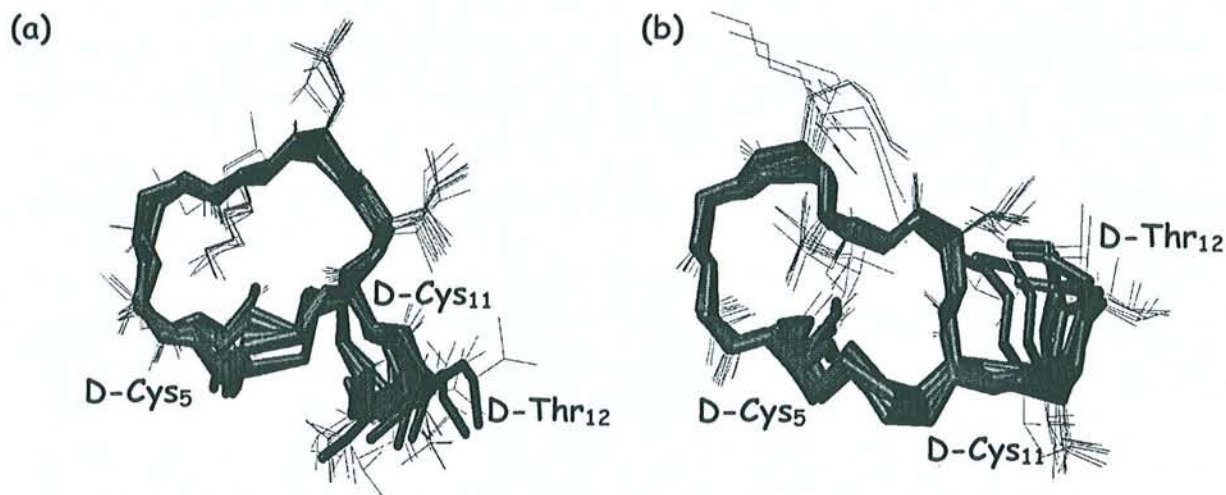


Figure II-31. Superposition des structures de plus basse énergie sur la position des atomes du squelette peptidique.

(a) Famille I fragment 5-11 ($rmsd=0.56\text{\AA}$); (b) Famille II fragment 3-12 ($rmsd=0.89\text{\AA}$). Pour la clarté de la figure, seule la boucle est représentée en totalité. Le squelette peptidique est représenté en traits gras, les chaînes latérales en traits fins.

Le programme PROMOTIF a permis de mettre en évidence la présence de repliements dans chacune des deux familles. Ces éléments de structuration sont résumés dans le tableau II-8.

Famille	Repliement	Région	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}	$dC_i^\alpha - C_{i+3}^\alpha (\text{\AA})$
I	$\beta I'$	kGsc	63 ± 9	52 ± 44	90 ± 30	0 ± 50	[5,8...6,5]
	β	ttci	87 ± 29	37 ± 70	124 ± 23	-101 ± 10	[5,5...7,0]
II	α	lkGsc	-	-	-	-	[5,2...6,1]
	β	ttci	76 ± 13	59 ± 10	93 ± 8	-106 ± 8	[5,6...6,9]

Tableau II-8. Valeurs moyennes des angles rotationnels impliqués dans les repliements du peptide rétro-inverso.

Famille I

Le programme PROMOTIF, sur la base des distances $C_i^\alpha - C_{i+3}^\alpha$ et des valeurs des angles, a caractérisé un repliement β déformé de type I', avec une occurrence de 100% mais non stabilisé par une liaison hydrogène (Tableau II-8). Un autre repliement, qui ne contient pas de liaison hydrogène et ne possède pas de géométrie correspondant aux types standards, a également été identifié dans 74% des cas et est classé de type IV.

Ces éléments de structuration, même sortant des normes, rigidifient la conformation du cycle dans une position précise.

Famille II

Dans cette famille de conformères, le repliement β de type I' observé avec la famille I est remplacé par un repliement α (Tableau II-8), stabilisé dans 94% des cas par la liaison hydrogène entre Leu₉-CO et Cys₅-NH, fermant un cycle à 13 atomes. Cela assure ainsi une structuration très compacte à ce niveau et explique la meilleure superposition sur l'ensemble des structures. La mobilité du résidu Gly₇ et son aptitude à adopter différentes orientations peuvent être à l'origine de ce changement structural. On trouve également dans 86% des cas le même repliement β de type IV que précédemment, avec sensiblement les mêmes caractéristiques angulaires.

Les éléments de structuration sont résumés sur la figure II-32:

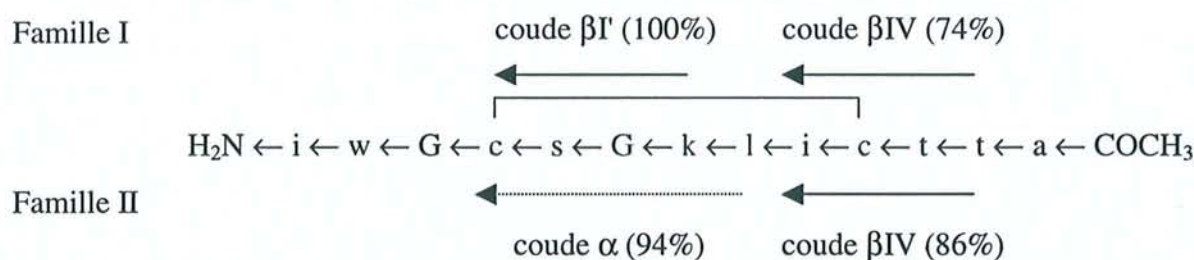


Figure II-32. Schéma des structures du peptide rétro-inverso, issues des calculs de modélisation moléculaire. La présence d'un repliement β est symbolisé par une flèche en traits pleins, celle d'un repliement α par une flèche en traits tirés. Les acides aminés D sont définis par leur symbole à une lettre en minuscule.

La structure moyenne de chacune des familles, mettant en évidence les éléments structuraux est représentée sur la figure II-33:

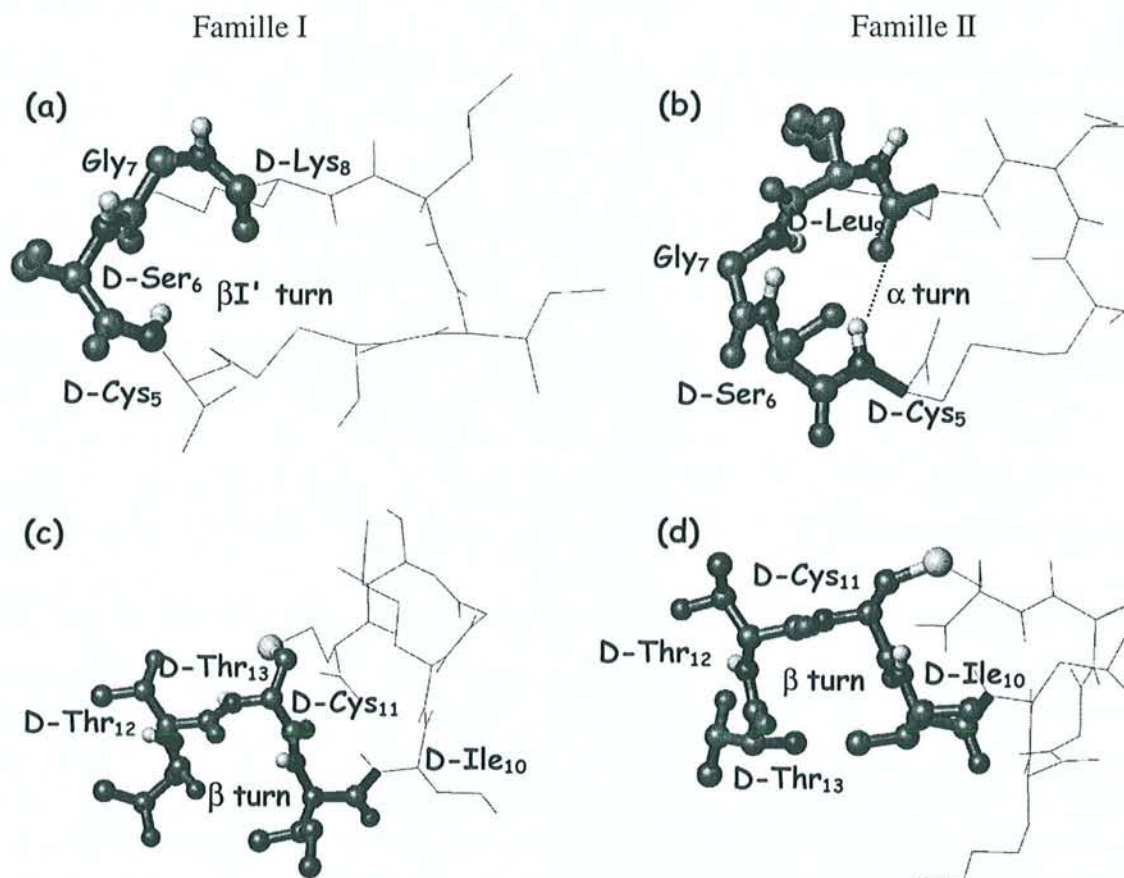


Figure II-33. Représentation de la structure moyenne de la partie structurée du peptide rétro-inverso.

(a) et (b) Région N-terminale; (c) et (d) Région C-terminale.

Le pont disulfure

Les angles de torsion de la liaison disulfure estimés par modélisation sont représentatifs de la configuration "right handed spiral" pour la famille I et de la configuration "right handed hook" pour la famille II. Ces configurations sont moins courantes.

c. Discussion

La modification de l'activité antigénique peut s'expliquer par deux effets:

(i). La conformation spatiale du peptide RI est totalement différente de celle du peptide parent. En particulier, l'orientation des chaînes latérales indispensables ne sont pas conservées (équivalence topologique des chaînes latérales).

(ii). Les interactions intermoléculaires entre les liaisons amide du peptide parent et celles de l'anticorps sont importantes. En raison de l'orientation inversée des liaisons peptidiques, ces interactions spécifiques ne sont plus conservées.

La première hypothèse semble s'appliquer dans notre étude. La superposition des structures moyennes de l'analogue rétro-inverso de chacune des deux familles et du peptide naturel permet de remarquer l'absence de longues régions structurales communes et superposables (Figure II-34). Ainsi, ces deux molécules ne se superposent parfaitement que sur les résidus GK ou KL. L'équivalence topologique n'a pu être observée.

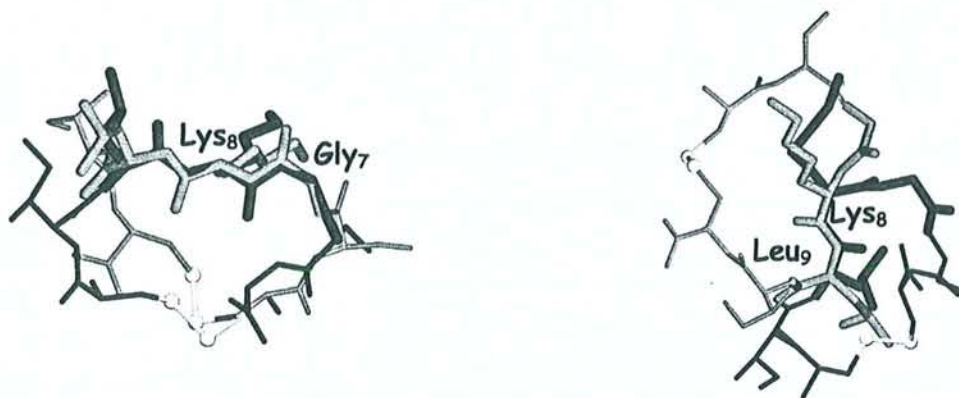


Figure II-34. Superposition des structures moyennes du pseudopeptide rétro-inverso (bleu) et du peptide naturel (rouge).

Il est impossible de superposer l'ensemble du fragment GKL en entier pour le peptide parent et le peptide rétro-inverso.

On peut supposer que la structure cyclique, formée par le pont disulfure dans le peptide naturel, induit une ou plusieurs zones conformationnelles spécifiques dans des régions proches de celle-ci. Deux analogues, dans lesquels une des cystéines a été successivement remplacée par un résidu de chiralité D, ont été synthétisés. D'après les résultats des tests ELISA, une faible reconnaissance antigénique par les anticorps a été observée. Par conséquent, la présence du pont disulfure, formé avec des cystéines de chiralité L, est cruciale pour le maintien de la reconnaissance antigénique.

On remarque que les configurations de la liaison disulfure sont différentes chez le peptide parent et l'analogue rétro-inverso. Ce dernier adopte des configurations moins courantes, certainement dues à la présence de motifs rétro-inverso au niveau des cystéines. Ces configurations de la liaison disulfure sont probablement moins reconnues par les anticorps.

D'autre part, l'analyse des éléments de structuration du peptide naturel et du peptide rétro-inverso montre qu'ils sont totalement différents. Pour le peptide RI, on observe un repliement

structuré au niveau de la première partie de la boucle (repliement de type I' ou α observé dans 94 à 100% des cas), alors qu'elle est moins contrainte pour le peptide naturel (repliement de type IV). Au cours des tests biologiques, on a vu que la modification de l'un des résidus de la région SGK entraîne une diminution de la reconnaissance antigénique.

Il semblerait que l'introduction de la liaison rétro-inverso entraîne un degré de structuration plus contraint dans une région qui nécessite une certaine mobilité pour une reconnaissance antigénique optimale. D'autre part, l'utilisation de résidus de chiralité D pour créer le pont disulfure entraîne des dispositions peu courantes de ce dernier, qui seront moins reconnues par les anticorps. Ces deux faits pourraient expliquer la moins bonne reconnaissance antigénique du peptide rétro-inverso.

L'étude de l'analogue RI a permis de mettre en évidence une structuration accrue par rapport au peptide naturel correspondant. Dans le cas de peptides linéaires de petite taille généralement dépourvus d'éléments de structures secondaires importants, cette augmentation des contraintes peut se révéler bénéfique comme dans le cas de la séquence immunodominante 141-159 de la protéine VP1 du virus de la fièvre aphteuse, développé précédemment. En ce qui concerne les peptides cycliques, ce concept a été appliqué avec succès à un peptide mimant une région en épingle à cheveux du récepteur FC ϵ RI des IgE.⁷⁴ L'étude structurale comparée de ce dernier a montré que l'analogue rétro-inverso est plus rigide que le peptide naturel et présente également une structure en épingle à cheveux conduisant à une équivalence topologique avec le peptide naturel. Dans ce cas, le pont disulfure ferme un cycle composé de 13 résidus, c'est-à-dire que le squelette peptidique est suffisamment long pour que les contraintes géométriques induites par la liaison rétro-inverso ne puissent pas s'exercer pour déformer le cycle, comme dans le cas de notre composé (7 résidus). En effet, la même observation a été signalée au cours de l'étude conformationnelle d'analogues rétro-inverso de pentapeptides cycliques renfermant des coudes β .^{75,76}

Toutefois, une étude par RMN ne se rapporte qu'à des structures moyennes. Par conséquent, l'absence de reconnaissance du peptide rétro-inverso par les anticorps présents dans les sérums des patients peut s'expliquer par le fait que la structure du rétro-inverso ne correspond à aucune conformation adoptée par le peptide naturel en solution (limitation d'ordre purement conformationnelle du concept rétro-inverso) ou bien par le manque d'anticorps dans les sérums des patients dirigés contre cette même conformation dans le peptide naturel (limitation due à la nature polyclonale de la réponse immune).

Il serait alors nécessaire d'évaluer la reconnaissance antigénique de l'analogue rétro-inverso par plusieurs anticorps monoclonaux différents induits contre le peptide naturel. L'absence d'anticorps monoclonaux capables de reconnaître la conformation adoptée par l'analogue rétro-inverso confirmerait bien que l'on se trouve dans le cas d'une limitation structurale du concept.

II.6.5. Etude des lactames

Nous avons voulu vérifier que le pont disulfure, décrit comme étant indispensable au maintien de la reconnaissance antigénique du peptide était impliqué en tant que tel dans la reconnaissance par les anticorps. Dans ce but, nous avons étudié des analogues comportant un lien amide en remplacement du lien disulfure et formant des cycles de taille variable.

La nomenclature utilisée fait référence aux deux acides aminés impliqués dans le pont lactame. Dap et Dab désignent respectivement l'acide diamino propionique et l'acide diamino butyrique, tandis que D et E désignent respectivement les acides aspartique et glutamique.

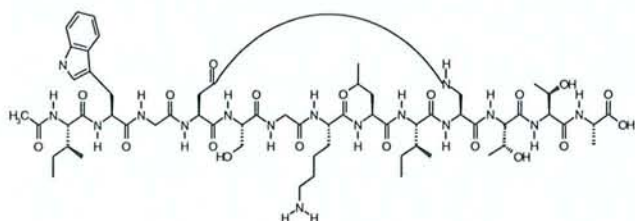
Analogues étudiés	Pureté
DDap	98%
DapD	96%
DDab	95%
DabD	88%
EDap	90%
DapE	65%
EDab	80%

Ces peptides sont représentés figure II-35:

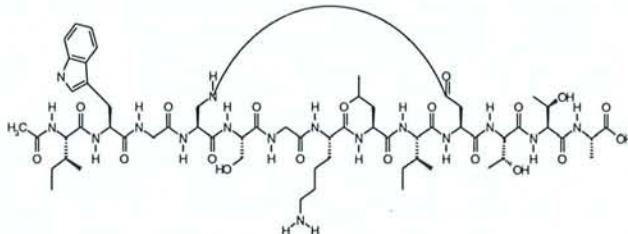
La série des peptides à gauche comportent une liaison amide CO-NH au niveau du pont lactame, la série à droite une liaison amide inversée NH-CO.

Liaison amide CO-NHLiaison amide inversée NH-CO

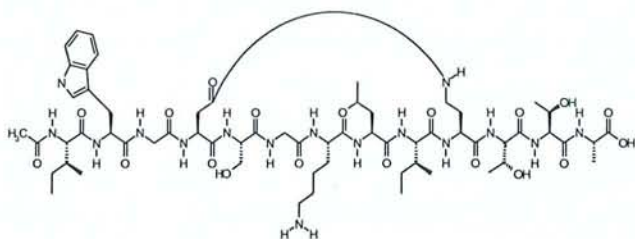
DDap



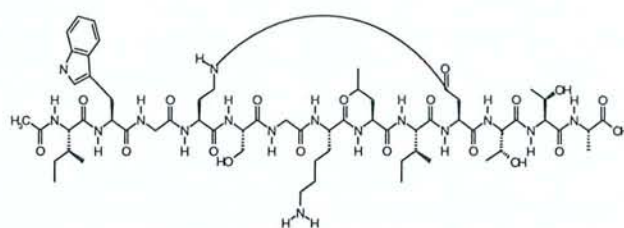
DapD



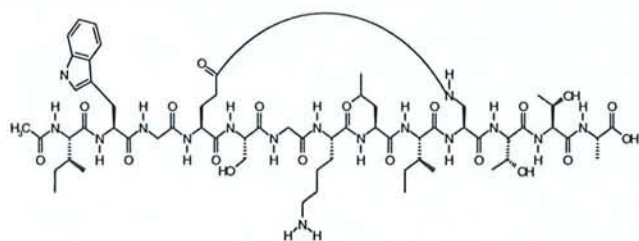
DDab



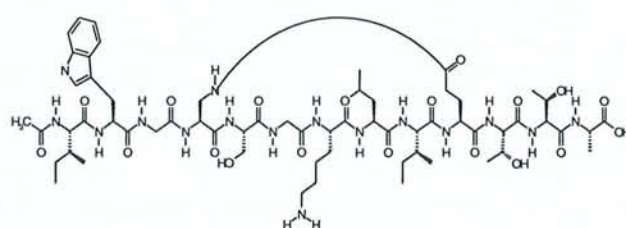
DabD



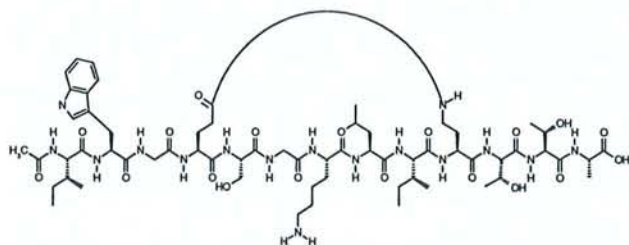
EDap



DapE



EDab

*Figure II-35. Représentation des analogues comportant un pont lactame.*

a. Résultats des mesures de RMN

Les spectres NOESY des différents analogues sont représentés figure II-36:

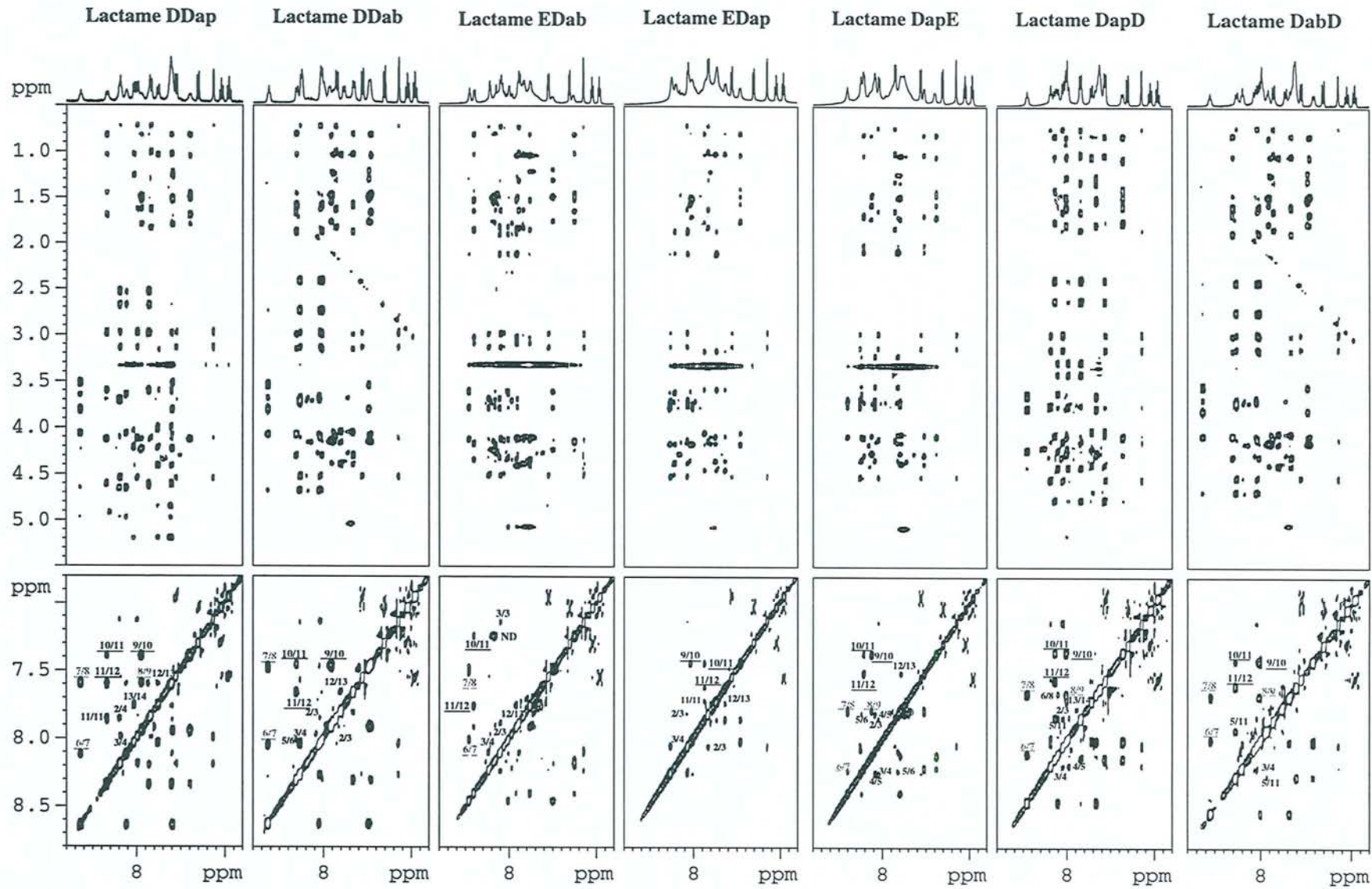


Figure II-36. Spectres de corrélations NOESY des différents analogues étudiés.

Dans l'ensemble, les différents analogues présentent un certain nombre de corrélations $d_{NN}(i, i+1)$, ce qui semble indiquer qu'ils sont plus ou moins structurés. Lorsque le cycle fermé par le pont lactame s'agrandit (analogues EDab, EDap et DapE), on constate que ces corrélations NOE sont moins nombreuses, traduisant une plus grande flexibilité du cycle. On constate également la présence d'une "empreinte" caractéristique chez tous les analogues, concernant la région 9-12 (corrélations $d_{NN}(L_9, I_{10})$, $d_{NN}(I_{10}, X_{11})$, $d_{NN}(X_{11}, T_{12})$ soulignées en traits pleins sur la figure II-36) et la région 6-9 (corrélations $d_{NN}(S_6, G_7)$, $d_{NN}(G_7, K_8)$, $d_{NN}(K_8, L_9)$ soulignées en pointillés sur la figure II-36). Ces dernières corrélations sont partiellement ou totalement absentes lorsque les cycles sont de taille trop importante (lactames EDab et EDap).

D'autre part, on constate certains traits caractéristiques de la liaison amide inversée NH-CO au niveau du pont lactame. (Figure II-37)

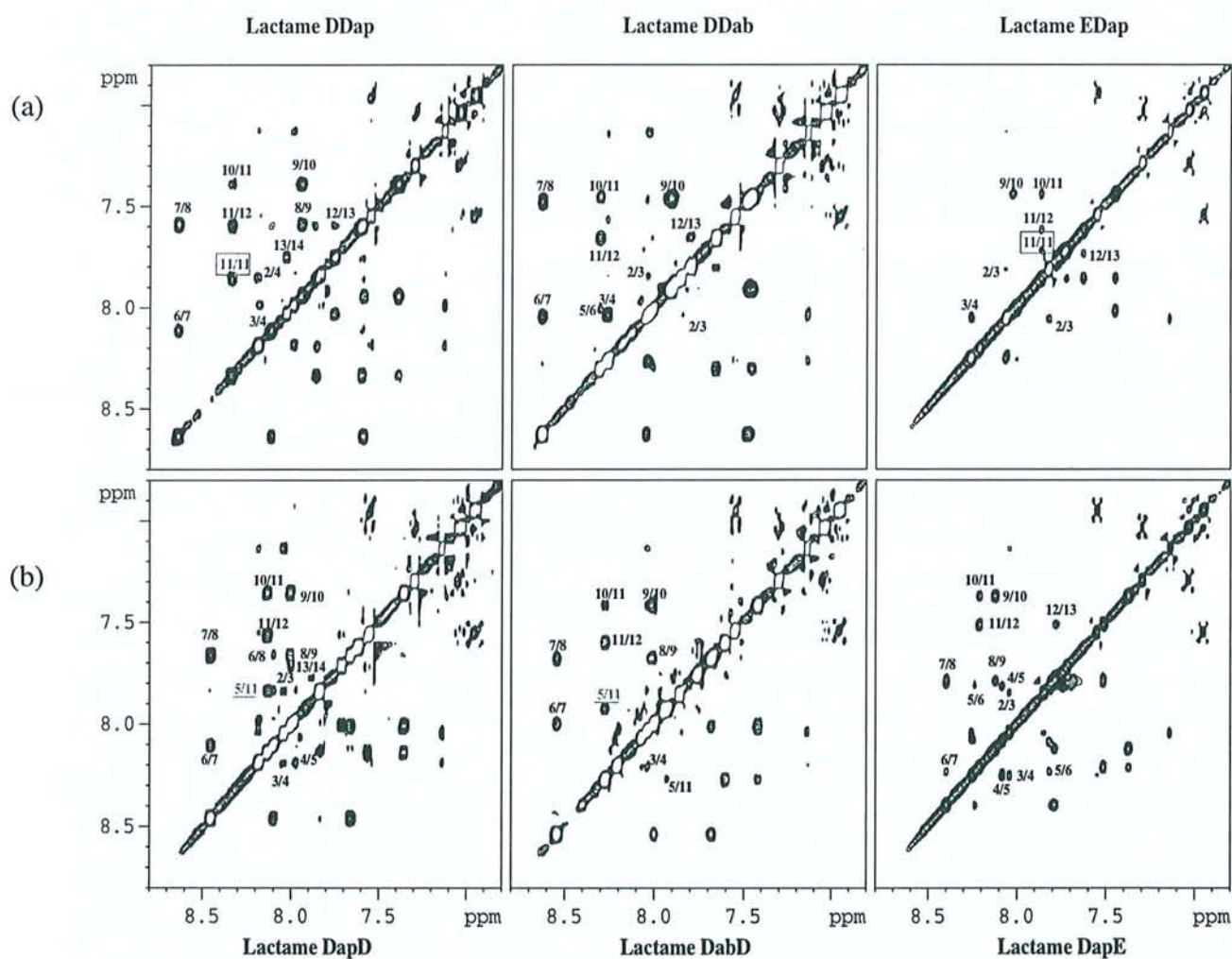
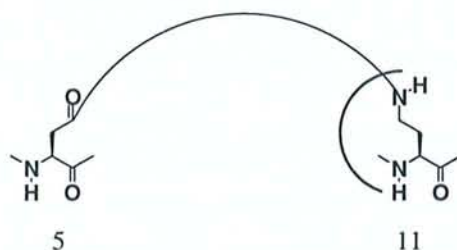


Figure II-37. Région des corrélations NH_i/NH_{i+1} des spectres NOESY des différents analogues.

(a) Série d'analogues comportant une liaison amide CO-NH au niveau du pont lactame;
 (b) Série d'analogues comportant une liaison amide inversée NH-CO au niveau du pont lactame.

Les analogues qui comportent une liaison amide CO-NH au niveau du pont (composés DDap, DDab, EDap, EDab) présentent des corrélations intra-résidus entre les protons H^γ et NH lorsque le résidu Dap est en position 11 (Figure II-37). L'intensité de cette corrélation (NH-11, H^γ -11) décroît lorsque la chaîne latérale du résidu en position 5 s'allonge (D→E). L'arrangement du pont serait tel que la chaîne latérale du résidu Dap₁₁ serait assez repliée et compacte. L'introduction d'un degré de liberté supplémentaire avec les substitutions Dap₁₁ → Dab₁₁ pourrait rendre plus flexible la chaîne latérale du résidu 11 intervenant dans le pont lactame.



Pour les analogues comportant une liaison amide inversée NH-CO, on observe une corrélation entre le proton H^γ du résidu en position 5 et le proton amide NH du résidu D en position 11. Cette corrélation disparaît lorsque la chaîne latérale du résidu en position 11 s'allonge (D→E). Il apparaît que dans le composé DapD, la rigidification du pont apportée par la liaison amide inversée, tend à éloigner les protons H^γ_5 et NH du résidu D₁₁. L'addition d'un CH_2 supplémentaire avec Dab₅ apporte un certain relâchement du cycle et permet le rapprochement de H^γ_5 avec le NH de D₁₁ (La corrélation NOE 5-11 du composé DabD est plus intense que celle du composé DapD). Par contre, l'augmentation de la chaîne latérale du côté du résidu 11 (D→E) éloigne le proton H^γ du proton NH₁₁ (7 liaisons) et pourrait entraîner une certaine flexibilité, d'où l'absence d'effet NOE H^γ_5 -NH₁₁.



L'analyse approfondie des spectres RMN a permis d'obtenir les corrélations NOE, résumées sur les figures II-38 et II-39:

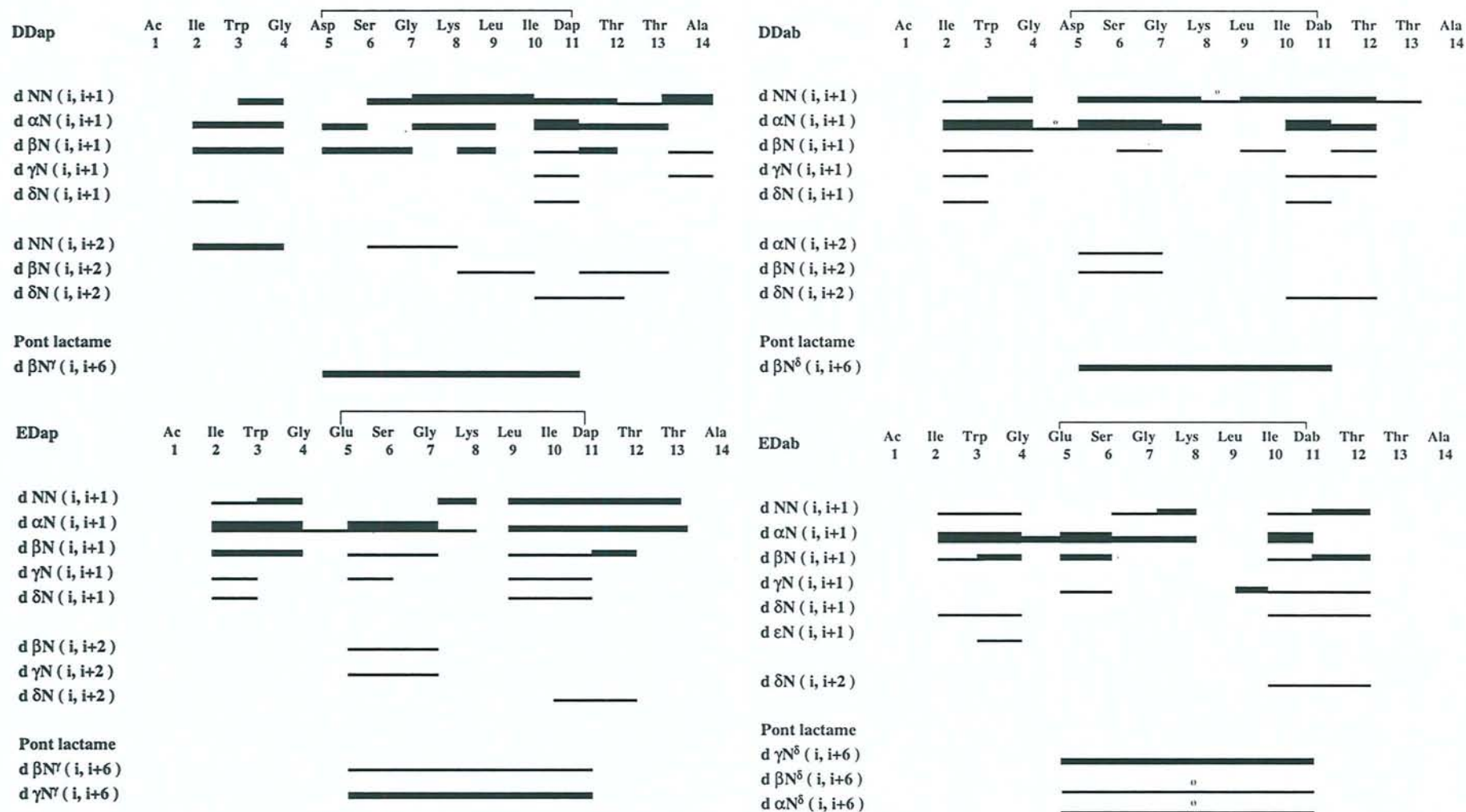


Figure II-38. Représentation des corrélations NOE des analogues comportant une liaison amide CO-NH.

Les intensités sont proportionnelles à l'épaisseur des traits. La lettre o désigne un recouvrement, une borne large a été imposée.

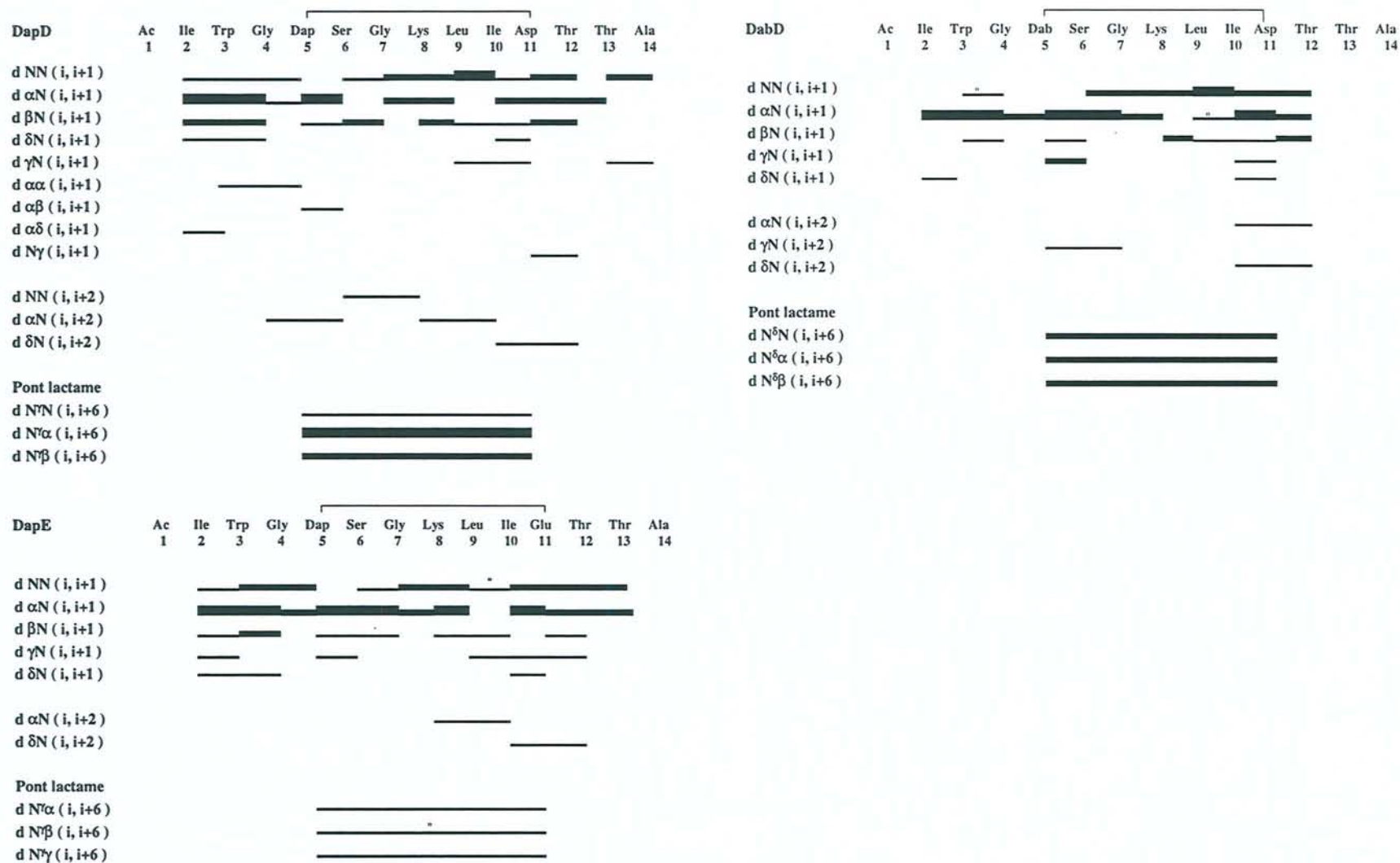


Figure II-39. Représentation des corrélations NOE des analogues comportant une liaison amide inversée NH-CO.

Les intensités sont proportionnelles à l'épaisseur des traits La lettre o désigne un recouvrement, une borne large a été imposée.

Le nombre plus important de corrélations NOE et leur intensité observées au niveau de la boucle pour les analogues dont le pont peptidique lactame est inversé (DapD, DabD et DapE) (Figure II-39) est compatible avec une structuration accrue de la boucle. Ceci est à comparer avec les corrélations $d_{NN}(i, i+6)$, $d_{\alpha N}(i, i+6)$ et $d_{\beta N}(i, i+6)$, qui sont plus faibles ou inexistantes, observées pour les analogues ayant une liaison amide CO-NH (DDap, DDab, EDap et Edab: figure II-39). Pour l'ensemble des composés examinés, l'absence de corrélations NOE entre les deux groupes méthylène adjacents à la liaison amide fermant le cycle lactame prouvent que la configuration de cette liaison est *trans*. Le caractère plan de la liaison amide rigidifie davantage le cycle comparé à la liaison disulfure du peptide parent. Hormis ces corrélations au niveau du cycle, on observe peu ou pas de corrélations de type (i, i+2) ou (i, i+3). Cela semble indiquer que les analogues lactames sont dans l'ensemble peu stabilisés par des structures secondaires prépondérantes. On a d'ailleurs observé que les lactames se dégradent très rapidement en solution dans le DMSO, en changeant de couleur avec formation d'un dépôt. Cela confirme la stabilité très relative de ces produits. Cela peut également être le résultat de la pureté très relative de ces peptides.

On peut apprécier les perturbations conformationnelles des analogues lactames par rapport au peptide parent grâce à la différence relative des déplacements chimiques (Figures II-40 et II-41). Dans tous les cas, les protons amides des résidus Lys₈, Leu₉, Ile₁₀ et occasionnellement celui en position C₁₁ sont les plus perturbés.

Ces conclusions rejoignent les tests immunochimiques qui montraient que les résidus Gly₇, Lys₈ et Leu₉ sont particulièrement impliqués dans la reconnaissance antigénique du peptide parent.

D'autre part, les effets de température (annexe B) montrent que les coefficients de température les plus faibles se rapportent essentiellement aux résidus Lys₈, Ile₁₀ pour chacun des lactames étudiés. Ces derniers sont les plus susceptibles de participer à des liaisons hydrogène intramoléculaires.

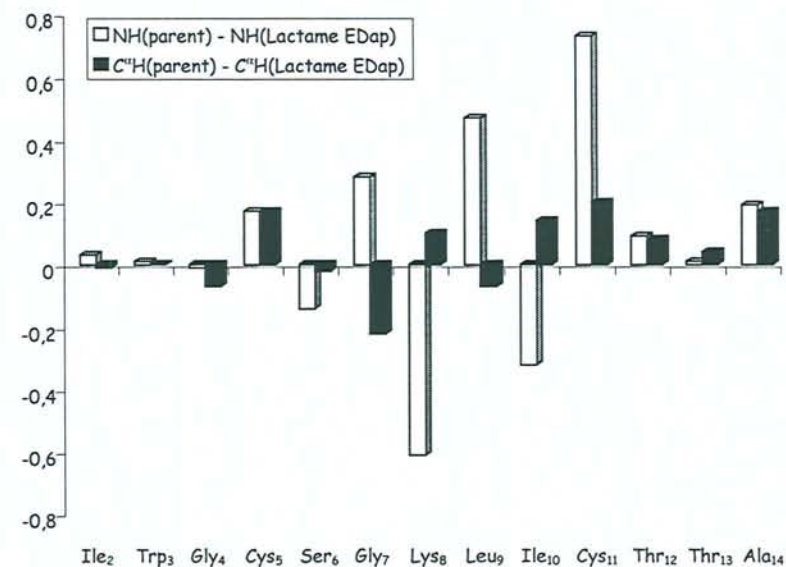
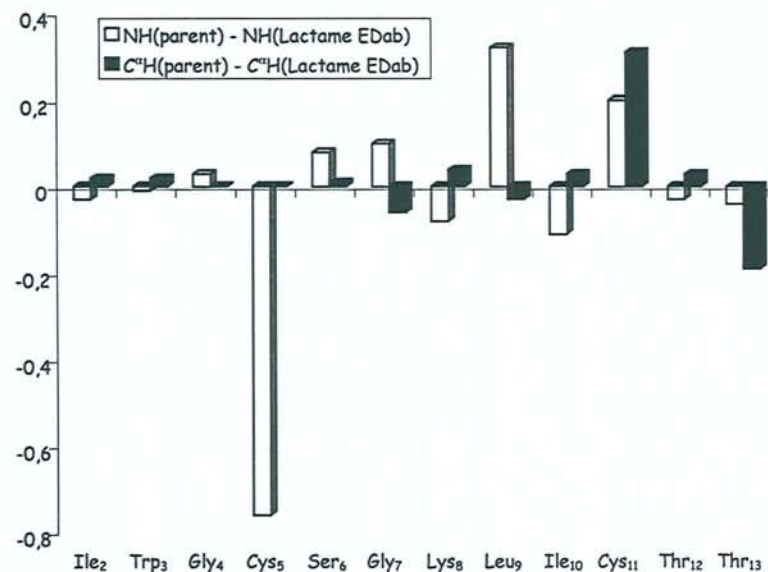
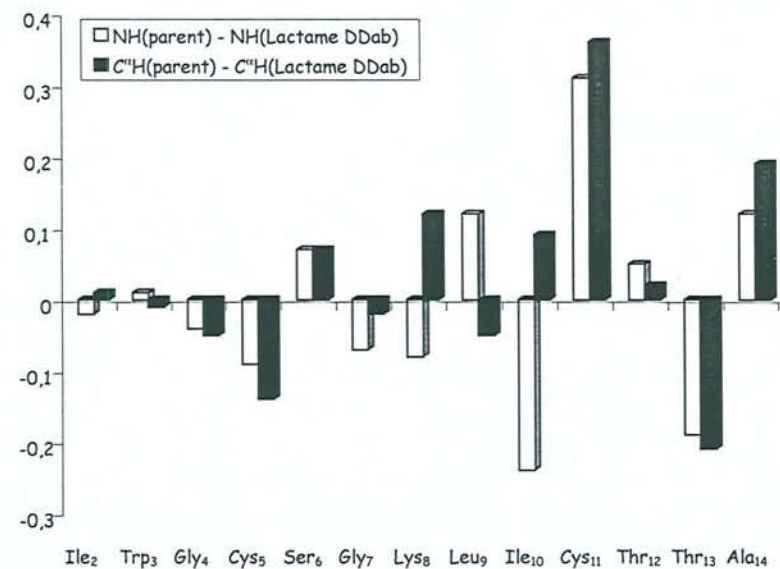
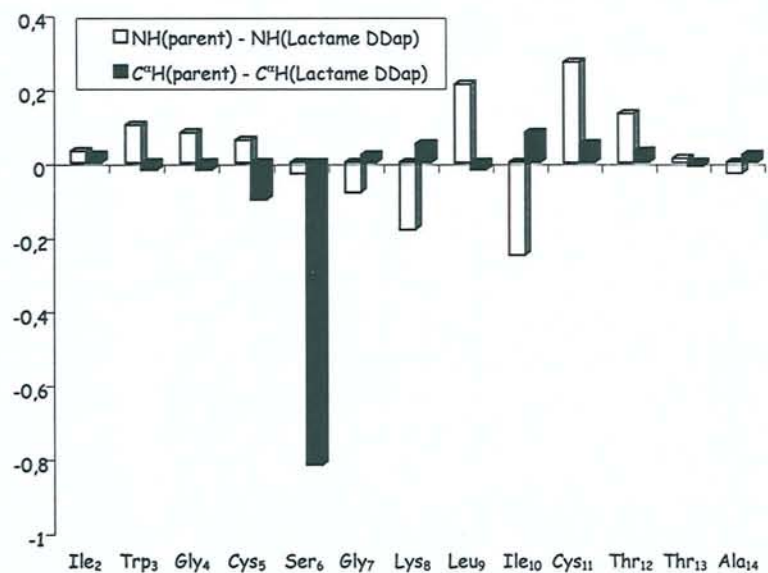


Figure II-40. Perturbations des déplacements chimiques des protons amides et des protons C^αH des différents lactames considérés par rapport au peptide parent.

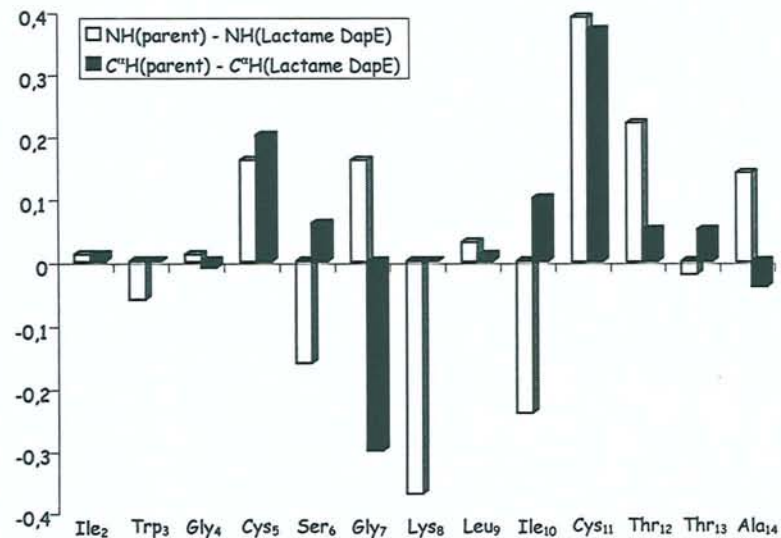
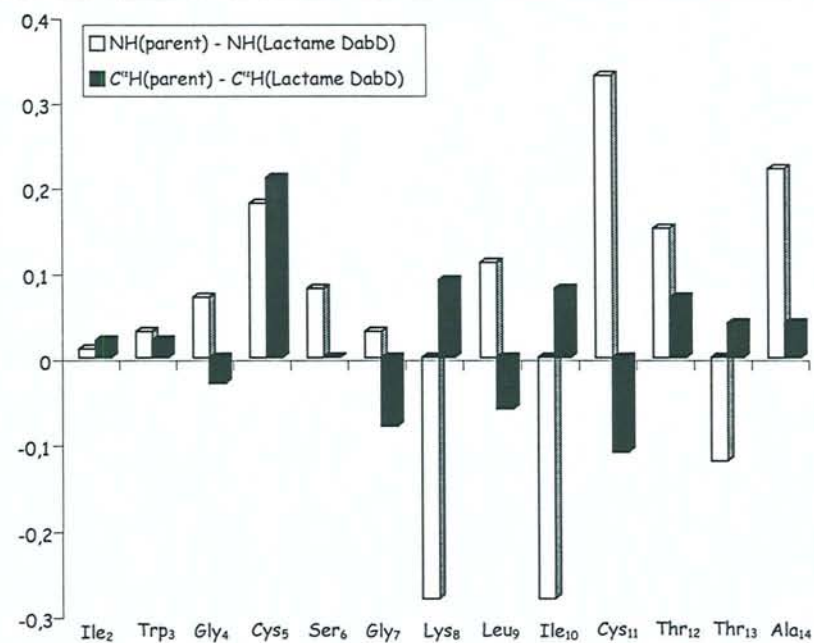
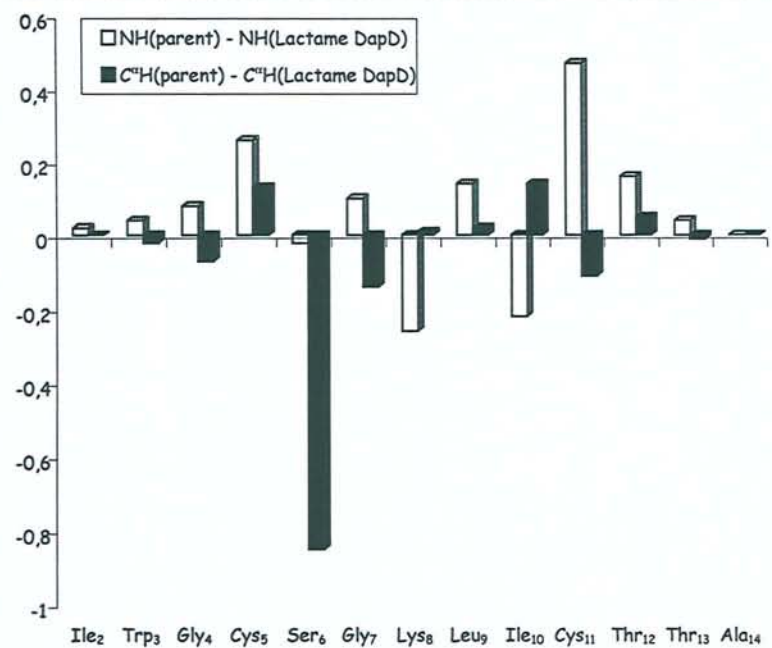


Figure II-41. Perturbations des déplacements chimiques des protons amides et des protons C^αH des différents lactames considérés par rapport au peptide parent.

c. Résultats de la modélisation moléculaire

Pour chacun des analogues, les calculs de modélisation moléculaire conduisent à un ensemble de structures avec une bonne superposition au niveau du cycle. Cependant, quand la taille du cycle augmente, un degré de liberté conformationnel supplémentaire est introduit et la superposition des structures conduit à un écart des moindres carrés (*rmsd*) plus important.

Les superpositions des structures de plus basse énergie pour chacun des analogues sont représentées figure II-42 pour la série comportant une liaison amide CO-NH et figure II-43 pour la série comportant une liaison amide inversée NH-CO:

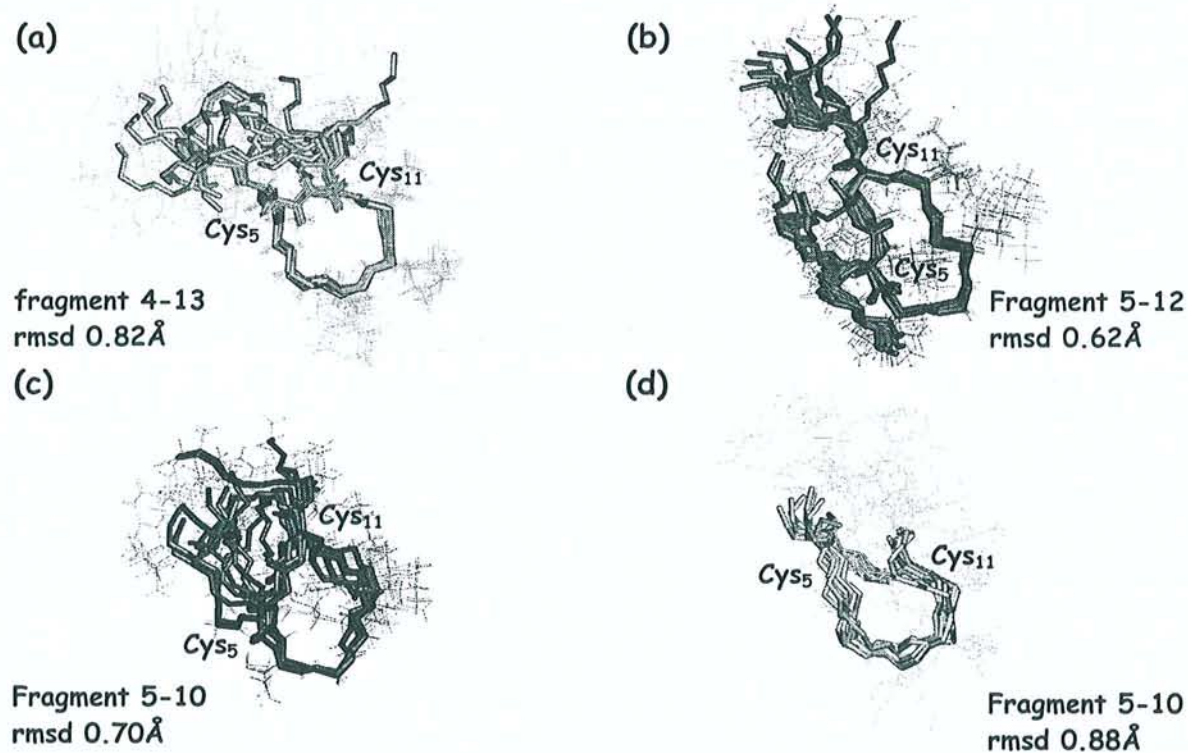


Figure II-42. Superposition des structures de plus basse énergie pour les analogues comportant une liaison amide CO-NH.

(a) Lactame DDap; (b) Lactame DDab; (c) Lactame EDap; (d) Lactame Edab.

Le squelette peptidique est représenté en traits gras, les chaînes latérales en traits fins.

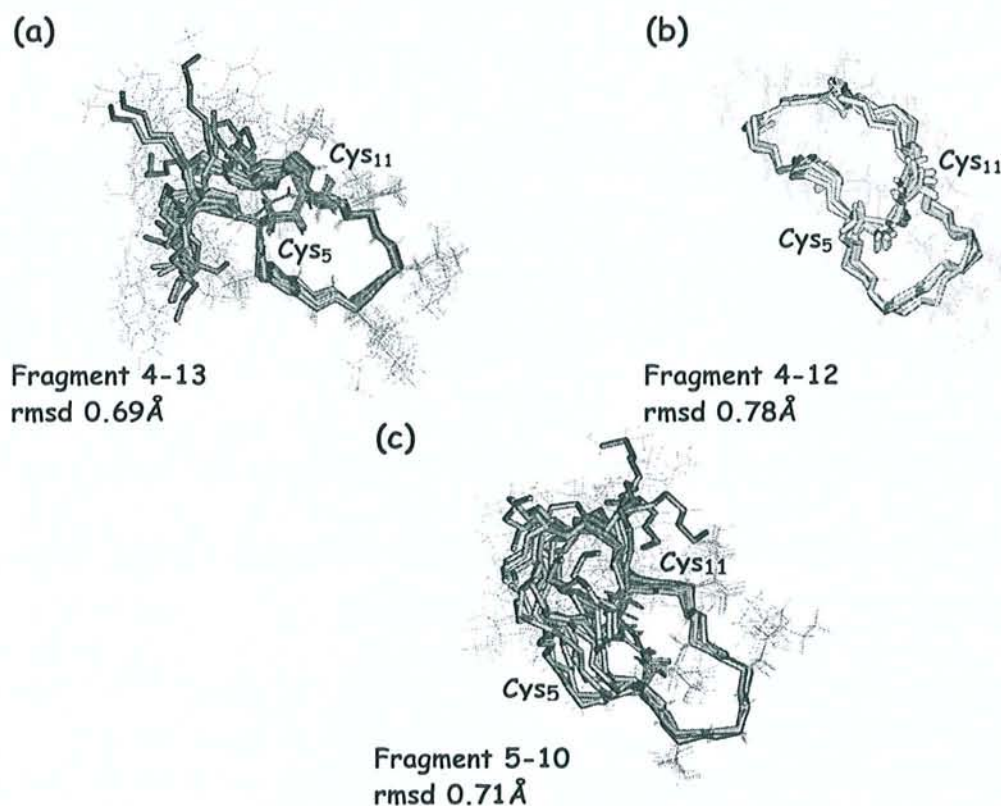


Figure II-43. Superposition des structures de plus basse énergie pour les analogues comportant une liaison amide inversée NH-CO.

(a) Lactame DapD; (b) Lactame DabD; (c) Lactame DapE.

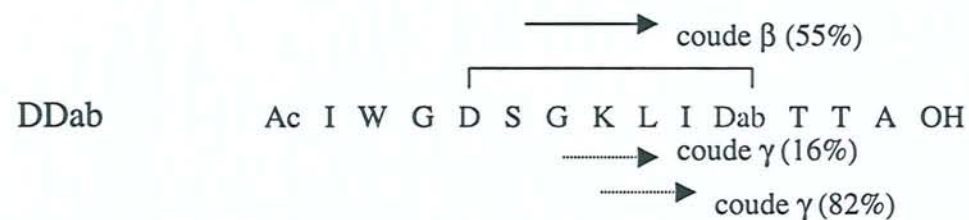
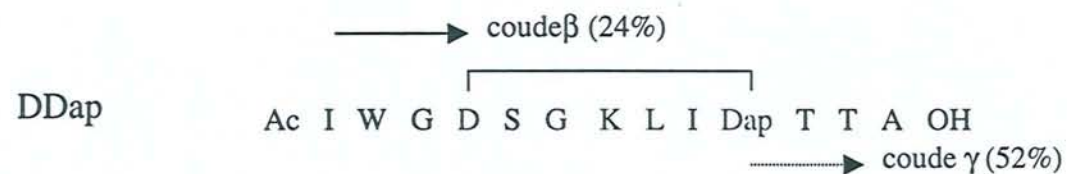
Le squelette peptidique est représenté en traits gras, les chaînes latérales en traits fins.

Les diverses structures secondaires trouvées pour chacun des analogues sont résumées sur la figure II-44. Les conformations estimées ont une structure rigide au niveau du pont lactame mais on dénombre une faible occurrence des éléments structuraux et dans la grande majorité, ils correspondent à des structures secondaires déformées et non stabilisées par des liaisons hydrogène.

L'analyse de la figure II-44 permet de constater que:

- (i) Pour les analogues comportant une liaison amide CO-NH, on observe une occurrence plus importante de structures repliées au niveau de la boucle lorsque le nombre de groupements $-CH_2$ de part et d'autre du pont lactame est inégale (analogues DDab et EDap). Dans le cas de l'analogue DDap dont le cycle est trop tendu, les repliements se forment à l'extérieur du cycle et dans les parties linéaires de la molécule.
- (ii) Pour les analogues comportant une liaison amide inversée NH-CO, au contraire, l'environnement géométrique semble être plus favorable en induisant une occurrence plus importante de structures repliées (coudes β et γ) du squelette peptidique. Ce résultat est en parfait accord avec l'analyse qualitative des données NOESY que nous avons rapportée précédemment, selon laquelle on observe une structuration accrue du squelette peptidique à l'intérieur de la boucle.

Liaison amide CO-NH



Liaison amide inversée NH-CO

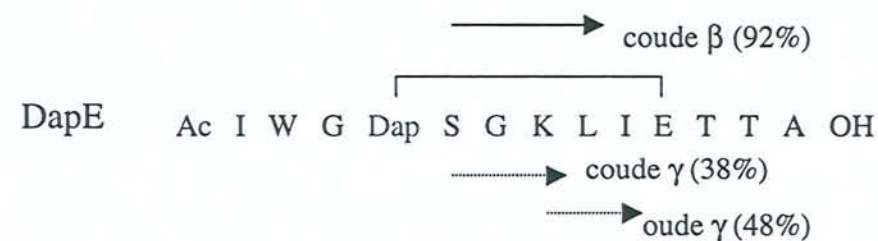
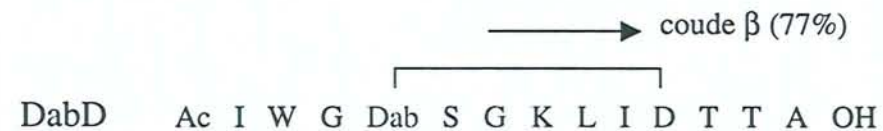
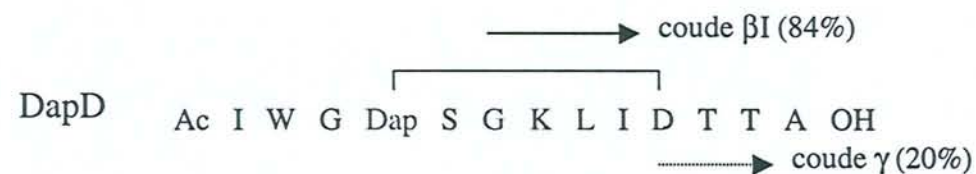


Figure II-44. Représentation des diverses structures secondaires obtenues par calculs de modélisation moléculaire. La présence d'un repliement γ est symbolisée par une flèche en traits pointillés, celle d'un repliement β par une flèche en traits pleins.

Afin de déterminer les implications structurales pouvant intervenir dans la réactivité antigénique, il est nécessaire d'effectuer une comparaison des structures des lactames avec la structure du peptide parent, biologiquement actif.

d. Discussion

La réactivité antigénique des sept analogues lactames est quasi inexistante, aussi bien vis-à-vis des anticorps monoclonaux anti-gp41, des anticorps monoclonaux anti-parent que des anticorps présents dans les sérums des patients. Cela signifie entre autre que les conformations adoptées diffèrent énormément de celle du peptide parent.

La figure II-45 représente la comparaison des structures moyennes des différents analogues avec le peptide parent.

La figure (a) concerne la superposition du parent et du lactame DDap. Ces deux peptides sont superposables sur le fragment 6-8 inclus dans la boucle avec un *rmsd* sur la position des atomes du squelette peptidique de 0.62Å. On remarque que la liaison disulfure et la liaison amide occupent un espace conformationnel différent. Nous avons signalé précédemment que le peptide DDap est plus structuré au niveau des fragments linéaires adjacents à la boucle alors que le peptide parent l'est à l'intérieur de la boucle même. Ceci explique pourquoi les deux structures sont relativement différentes.

D'autre part, on constate que les chaînes latérales du résidu Lys₈ des deux peptides sont orientées dans des directions différentes, ce qui pourrait avoir une influence non négligeable dans l'établissement des liaisons hydrogène avec l'anticorps par exemple. La cause de l'absence de l'activité antigénique de cet analogue serait probablement due à la rigidité du pont amide et au manque de flexibilité de part et d'autre de cette fonction, empêchant ainsi la formation d'un certain nombre de liaisons hydrogène qui stabilisent le peptide dans une conformation donnée pour permettre une présentation adéquate des chaînes latérales du cycle vis-à-vis du site actif de l'anticorps.

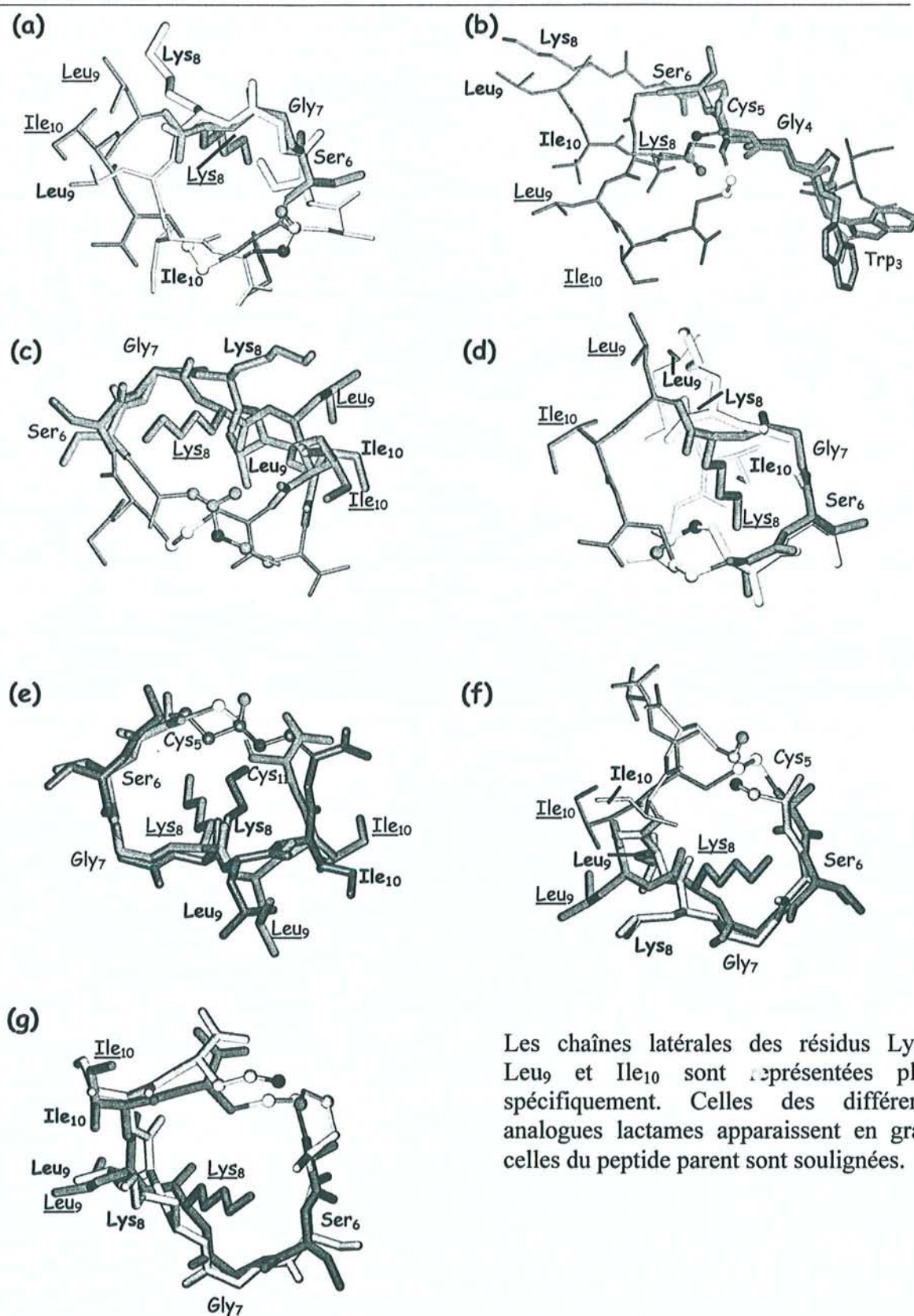


Figure II-45. Représentation de la superposition des structures du peptide parent (rouge) avec celles des différents analogues comportant une liaison lactame.

(a) parent/DDap; (b) parent/DapD; (c) parent/DDab; (d) parent/DabD;
(e) parent/EDap; (f) parent/DapE; (g) parent/EDab.

La figure (b) illustre la superposition du peptide parent et du lactame DapD. Les squelettes de ces deux peptides sont superposables sur le fragment 3-6 avec un *rmsd* de 0.78Å, du côté N-terminal de la boucle. La partie suivante comprenant les résidus GKL, impliqués dans la reconnaissance, diffère totalement, quant à l'orientation et à la surface spécifique occupée par le cycle. Comme dans la comparaison du lactame DDap, les chaînes latérales du résidu Lys₈ sont orientées différemment. De même, dans ce cas, l'absence de similitudes structurales sur ce fragment KLI expliquerait la perte de reconnaissance antigénique.

La figure (c) présente la superposition du peptide parent et du lactame DDab.

La similitude structurale du squelette de ces deux peptides est importante sur le fragment 6-10 avec un *rmsd* de 0.95Å et concerne pratiquement tous les résidus à l'intérieur du cycle. Comme pour le peptide rétro-inverso, la région SGKL du peptide lactame est rigidifiée par la présence d'un repliement β avec une occurrence de 55% et d'une liaison hydrogène entre le groupement carbonyle CO^γ-D₅ et le proton amide HN-I₁₀ avec une occurrence de 12%. Cette même moitié SGKL de la boucle est moins rigide dans le cas du peptide parent dû à l'absence d'interaction intramoléculaire. Les chaînes latérales du résidu Leu₉ sont orientées différemment. L'absence de similitudes structurales sur ce fragment KLI expliquerait la perte de reconnaissance antigénique du lactame DDab.

La figure (d) montre la superposition du peptide parent et du lactame DabD sur le fragment 5-8 avec un *rmsd* de 0.78Å. La présence dans la structure du peptide lactame d'un repliement β au niveau de la séquence GKLI avec une occurrence de 77% est incompatible avec la présence simultanée des deux repliements β (fragment CSGK et fragment KLIC) observés pour le peptide parent. Quoiqu'il existe une similitude structurale entre ces deux peptides pour une moitié des résidus du cycle (résidus Cys₅-Gly₇), l'autre moitié adopte des orientations totalement différentes (notamment pour les chaînes latérales des résidus essentiels Lys₈ et Ile₁₀). Ce lactame n'est pas reconnu par les anticorps.

La figure (e) représente la superposition du peptide parent et du lactame Edap sur l'ensemble des résidus du cycle (fragment 5-11) avec un *rmsd* de 0.86Å. La surface occupée par les cycles des deux peptides est très similaire. On constate que l'orientation des chaînes latérales des résidus Lys₈ et Ile₁₀ est conservée par rapport à celles du parent. Cependant, ce peptide

n'est pas reconnu. La présence de repliements γ avec des occurrences assez faibles, semble incompatible avec la présence des deux repliements β observés pour le peptide parent.

La figure (f) montre la superposition du peptide parent et du lactame DapE sur les résidus du fragment 5-9 avec un *rmsd* de 0.93Å. La surface occupée par le cycle du lactame DapE est très similaire à celui du peptide parent. La position du cycle et l'orientation adoptée par le squelette peptidique ne sont cependant pas suffisantes pour conduire à une reconnaissance antigénique optimale. L'analyse structurale de ce lactame montre que les chaînes latérales pourraient jouer un rôle non négligeable.

La figure (g) montre la superposition du peptide parent et du lactame EDab sur le fragment 5-11 avec un *rmsd* de 0.98Å. Quoiqu'il existe une similitude structurale entre ces deux peptides pour la majorité des résidus du cycle, ce lactame n'est pas reconnu par les anticorps testés. La présence d'un repliement β au niveau du fragment GKLI n'est pas compatible avec les repliements β observés sur les fragments CSGK et KLIC pour le peptide parent.

On constate qu'en augmentant la taille du cycle, les lactames correspondants acquièrent une structuration de plus en plus proche de celles du parent.

A cause de son caractère plan, la liaison amide a pour conséquence de rigidifier davantage la structure cyclique et d'imposer une conformation trop tendue. L'introduction de groupements -CH₂ supplémentaires permet d'ajouter un degré de liberté conformationnel additionnel et par la même, permet de mieux mimer la structure cyclique imposée par la liaison disulfure. Il n'est pas à négliger le rôle primordial des résidus cystéines, et notamment des groupements sulfures. Ces derniers peuvent interagir par exemple avec des résidus tryptophane, très fréquents dans les séquences des anticorps. D'autres paramètres entrent également en jeu, à savoir l'orientation des chaînes latérales, de même que la capacité de la structure cyclique équivalente d'engendrer des motifs structuraux similaires. En effet, la diminution de l'activité biologique est la conséquence d'un changement conformationnel dont l'orientation des chaînes latérales actives a été modifiée.

Pour résumer, plusieurs facteurs pourraient intervenir dans la reconnaissance antigénique par les anticorps testés:

(i) La surface occupée par le cycle fermé par le pont lactame doit être similaire à celle engendrée par la liaison disulfure.

(ii) La région GKL, particulièrement importante dans la reconnaissance, doit être structurée de façon spécifique.

De plus, l'orientation des chaînes latérales des résidus impliqués doit être telle que celles concernant les résidus Lys₈ et Ile₁₀ soient positionnées sur une face, tandis que celle de la Leu₉ leur est opposée. D'autre part, il n'est pas à négliger l'aspect instable des peptides lactames. L'absence de reconnaissance antigénique peut aussi tout simplement s'expliquer par la dégradation rapide de ces molécules qui entraîne la cassure de toute structure secondaire présente.

II.6.6. Etude des analogues comportant des acides β -aminés

Deux des analogues étudiés, HSer₆ et Hcys₅, ont la propriété de réagir avec les anticorps anti-parent mais non avec les anticorps monoclonaux anti-gp41. Du point de vue structural, il est intéressant d'étudier les implications structurales qui sont en cause.

a. Etude de l'analogue HSer₆

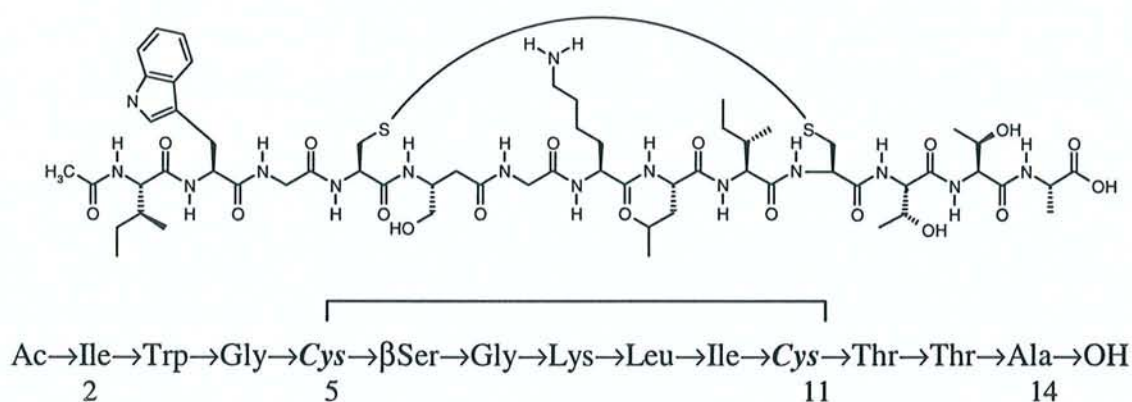


Figure II-46. Séquence de l'analogue HSer₆.

i. Résultats des mesures de RMN

Les spectres NOESY des peptides parent et HSer₆ (figure II-47) présentent de grandes différences. Pour ce dernier, les corrélations sont plus nombreuses sur la partie GKLIC du cycle.

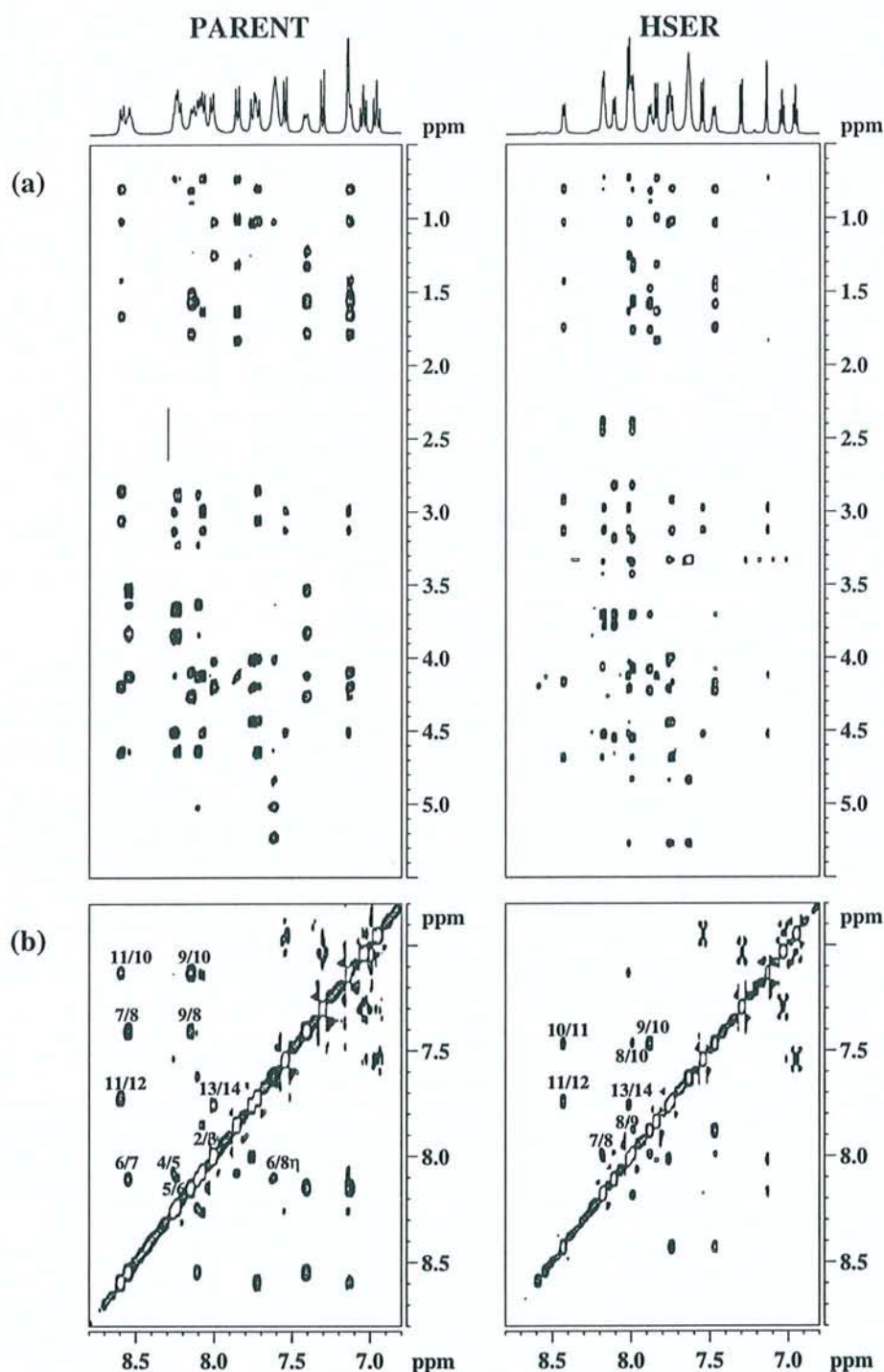


Figure II-47. Spectres de corrélations NOESY des peptides parent et HSer₆.

(a) Région de corrélations CH_i/NH_{i+1} ; (b) Région de corrélations NH_i/NH_{i+1} .

L'analyse des spectres RMN a permis d'obtenir les corrélations NOE, résumées sur la figure II-48.

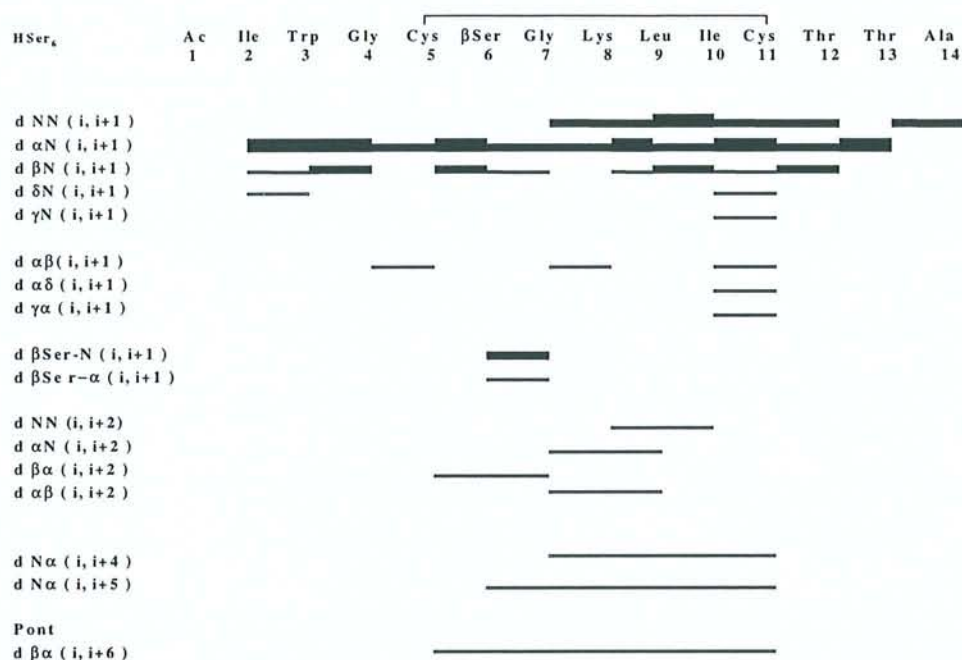


Figure II-48. Représentation, en fonction de leur intensité relative, des corrélations NOE croisées pour l'analogue HSer₆.

Les intensités sont proportionnelles à l'épaisseur des traits.

Le peptide semble se structurer davantage sur la partie C-terminale de la boucle, comme l'attestent les corrélations observées à ce niveau. Dans la partie N-terminale, le peptide semble adopter une conformation étendue, confortée par la présence de fortes et moyennes corrélations $d_{\alpha N}(i, i+1)$, couplée à l'absence de connectivités $d_{NN}(i, i+1)$ et de connectivités à moyenne distance.

Dans l'ensemble, on observe peu ou pas de corrélations de type $i, i+2$ ou supérieures. Le peptide ne semble pas avoir de structures secondaires prédominantes.

On peut apprécier les perturbations conformationnelles de l'analogue HSer₆ par rapport au peptide parent grâce à la différence relative des déplacements chimiques (Figures II-49). Dans le cas présent, les résidus Gly₇, Lys₈, Leu₉ et Ile₁₀ sont également les plus perturbés.

D'autre part, les effets de température (annexe B) montrent que les coefficients de température les plus faibles se rapportent aux résidus Lys₈, Leu₉. Ces derniers sont les plus susceptibles de participer à des liaisons hydrogène intramoléculaires.

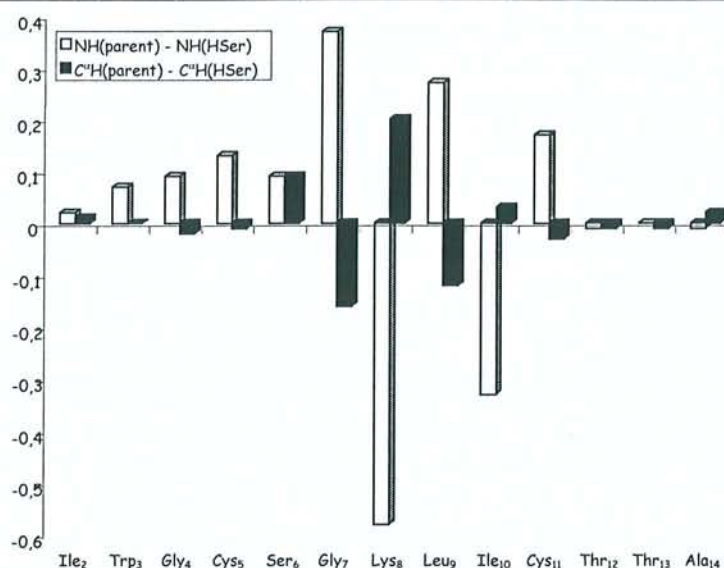


Figure II-49. Perturbations des déplacements chimiques des protons amides et des protons $C^{\alpha}H$ de l'analogue HSer₆ par rapport au peptide parent.

ii. Résultats de la modélisation moléculaire

Les conformations issues des calculs de modélisation moléculaire sont superposées sur le fragment 7-12 avec un *rmsd* de 0.74Å. (figure II-50)

La partie C-terminale est assez rigide, alors que la partie N-terminale paraît beaucoup plus flexible.

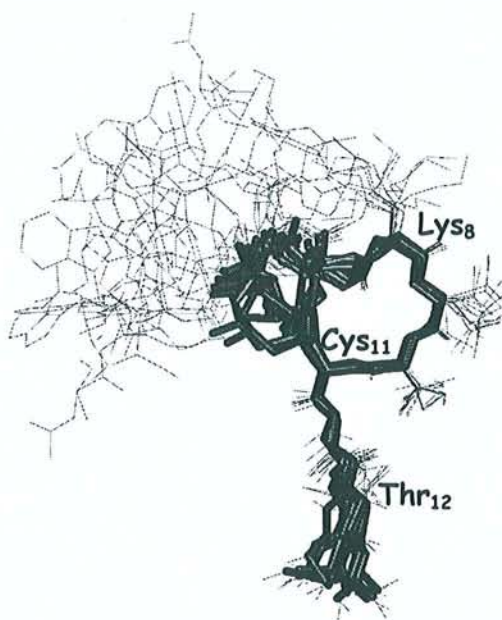


Figure II-50. Superposition du fragment 7-12 du squelette peptidique pour les structures de plus basse énergie (*rmsd*=0.74Å). Le squelette peptidique est représenté en traits gras, les chaînes latérales en traits fins.

Le programme PROMOTIF a permis de mettre en évidence 2 repliements γ inverses et consécutifs: un repliement γ concernant la région SGK, avec une occurrence de 25%, et un repliement γ concernant la région GKL, avec une occurrence de 78%. (Tableau II-9)

Le programme a également caractérisé un repliement β , avec une occurrence de 96% mais non stabilisé par une liaison hydrogène. (Tableau II-9)

Repliement	Région	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}	Occurrence
γ	SGK	-107±80	94±80			25%
γ	GKL	-79±12	57±9			78%
β	GKLI	-79±12	57±9	-152±21	-52±11	96%

Tableau II-9. Valeurs moyennes des angles rotationnels impliqués dans les repliements structuraux de l'analogue HSer₆.

Les éléments de structures secondaires sont résumés sur la figure II-51:

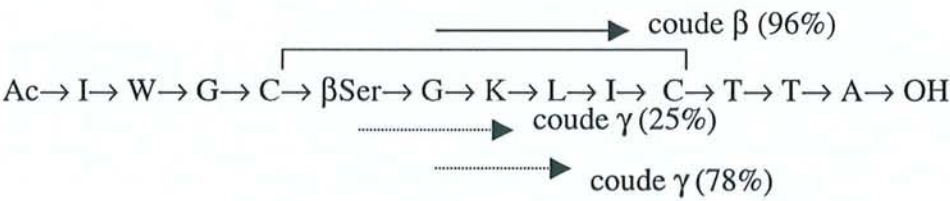


Figure II-51. Schéma des structures de l'analogue HSer₆. La présence d'un repliement γ est symbolisée par une flèche en traits pointillés, celle d'un repliement β par une flèche en traits pleins.

La structure moyenne mettant en évidence les éléments structuraux est représentée sur la figure II-52:

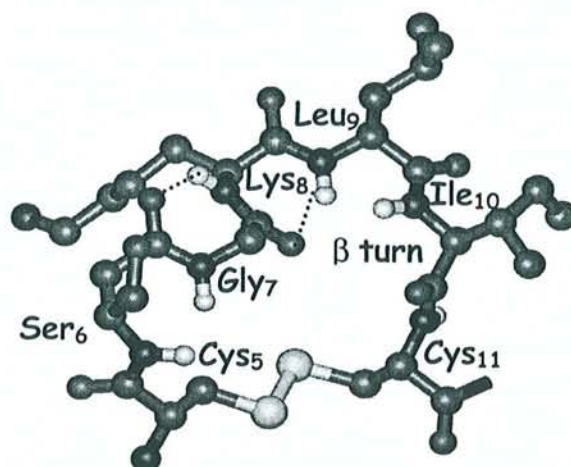


Figure II-52. Représentation de la structure moyenne de la partie structurée de l'analogue *HSer₆*.

Le pont disulfure

Les angles de torsion de la liaison disulfure n'ont pas de configuration privilégiée. Ils sont dans la grande majorité des cas en configuration aléatoire.

Ceci est probablement la conséquence de l'introduction du groupement $-CH_2$ supplémentaire sur le squelette peptidique du résidu Ser, proche de l'un des initiateurs de la liaison disulfure. Ce degré de liberté conformationnel se répercute sur l'ensemble de la séquence et perturbe la structuration du peptide.

iii. Discussion

Comme nous l'avons vu précédemment, les résultats des tests ELISA montrent que l'affinité de l'analogue *HSer₆* est extrêmement faible vis-à-vis des anticorps monoclonaux anti-gp41. Cependant, l'analogue *HSer₆* apparaît comme très bien reconnu par les anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-peptide parent.

Cela signifie notamment que les parties reconnues par les anticorps sont différentes sur l'ensemble de la boucle.

La figure II-53 représente la comparaison des structures moyennes de l'analogue HSer₆ avec le peptide parent:

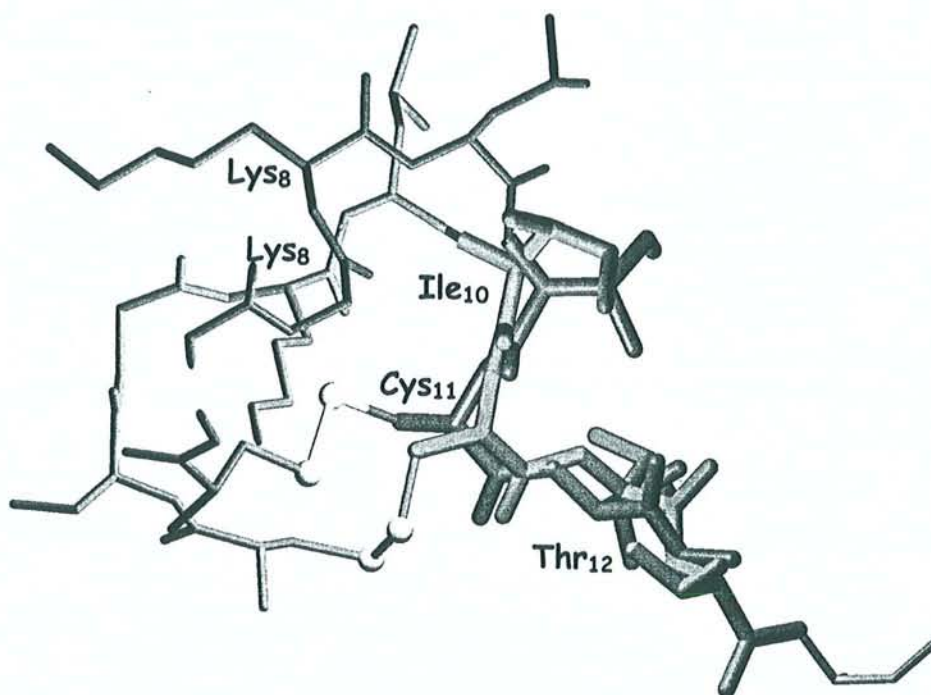


Figure II-53. Représentation de la superposition des squelettes du peptide parent (rouge) et de l'analogue HSer₆ (marron).

Nous avons supposé précédemment que la structuration particulière du peptide parent au niveau des résidus GKLI était responsable de l'activité antigénique du peptide avec les anticorps monoclonaux anti-gp41. On remarque que l'analogue HSer₆ adopte une structuration repliée en forme de S, totalement différente de celle du peptide parent. Le résidu Lys₈ se présente différemment dans l'espace conformationnel. L'introduction d'un acide β -aminé à la place du résidu Ser₆ a modifié le comportement structural de l'analogue dans cette région et induit des éléments structuraux différents, conduisant à la perte de la reconnaissance antigénique.

Par contre, on remarque que les squelettes du peptide parent et de l'analogue HSer₆ sont superposables sur le fragment 10-13 avec un *rmsd* de 0.81Å. Par cette comparaison, on peut constater que les chaînes latérales de l'analogue HSer₆ adoptent la même disposition que celle du peptide parent, à savoir celles des résidus Lys₈ et Ile₁₀ orientées sur une face, et celle du résidu Leu₉ sur l'autre face du cycle.

Le fragment KLIC de la boucle pourrait être responsable de la reconnaissance antigénique par les anticorps anti-parent. En effet, on a vu précédemment que le peptide parent se structurait à

deux niveaux de la boucle: Une partie comportant le repliement β au niveau du fragment CSGK, et une seconde partie structurée en repliement β sur le fragment KLIC. Les tests ELISA effectués avec les anticorps anti-gp41 ont montré l'importance de la région GKL et la structuration à ce niveau conditionnerait la reconnaissance du peptide vis-à-vis de ces anticorps.

L'analogue HSer₆ présente une structuration différente de celle du peptide parent au niveau du fragment SGKLI. La conservation de l'activité antigénique de cet analogue vis-à-vis de l'anticorps anti-parent serait due à l'orientation similaire des chaînes latérales Lys₈, Leu₉ et Ile₁₀ par rapport à la boucle. Cependant, cette condition ne serait pas suffisante pour la reconnaissance de l'analogue HSer₆ par d'autres anticorps.

b. Etude de l'analogue HCys₅

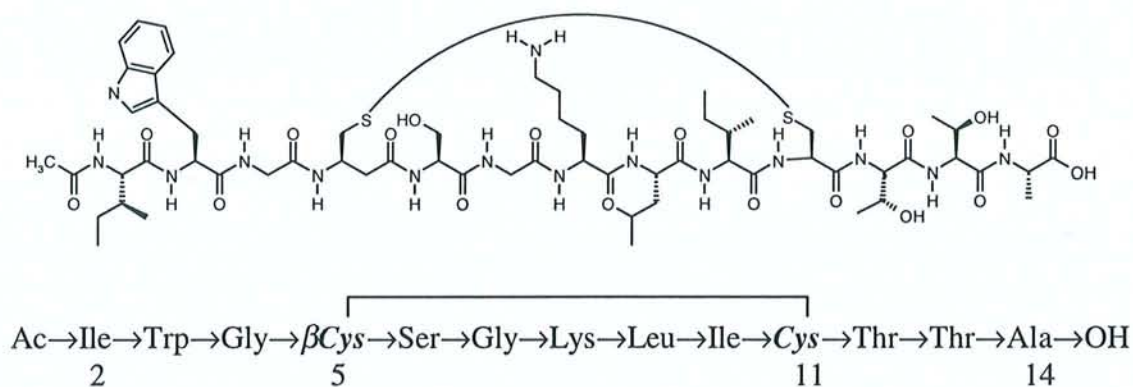


Figure II-54. Séquence de l'analogue Hcys₅.

i. Résultats des mesures de RMN

Les spectres NOESY des peptides parent et Hcys₅ (Figure II-55) présentent des profils différents. Pour l'analogue HCys₅, on observe davantage de corrélations au niveau des chaînes latérales. Les corrélations NOE, sont résumées sur la figure II-56.

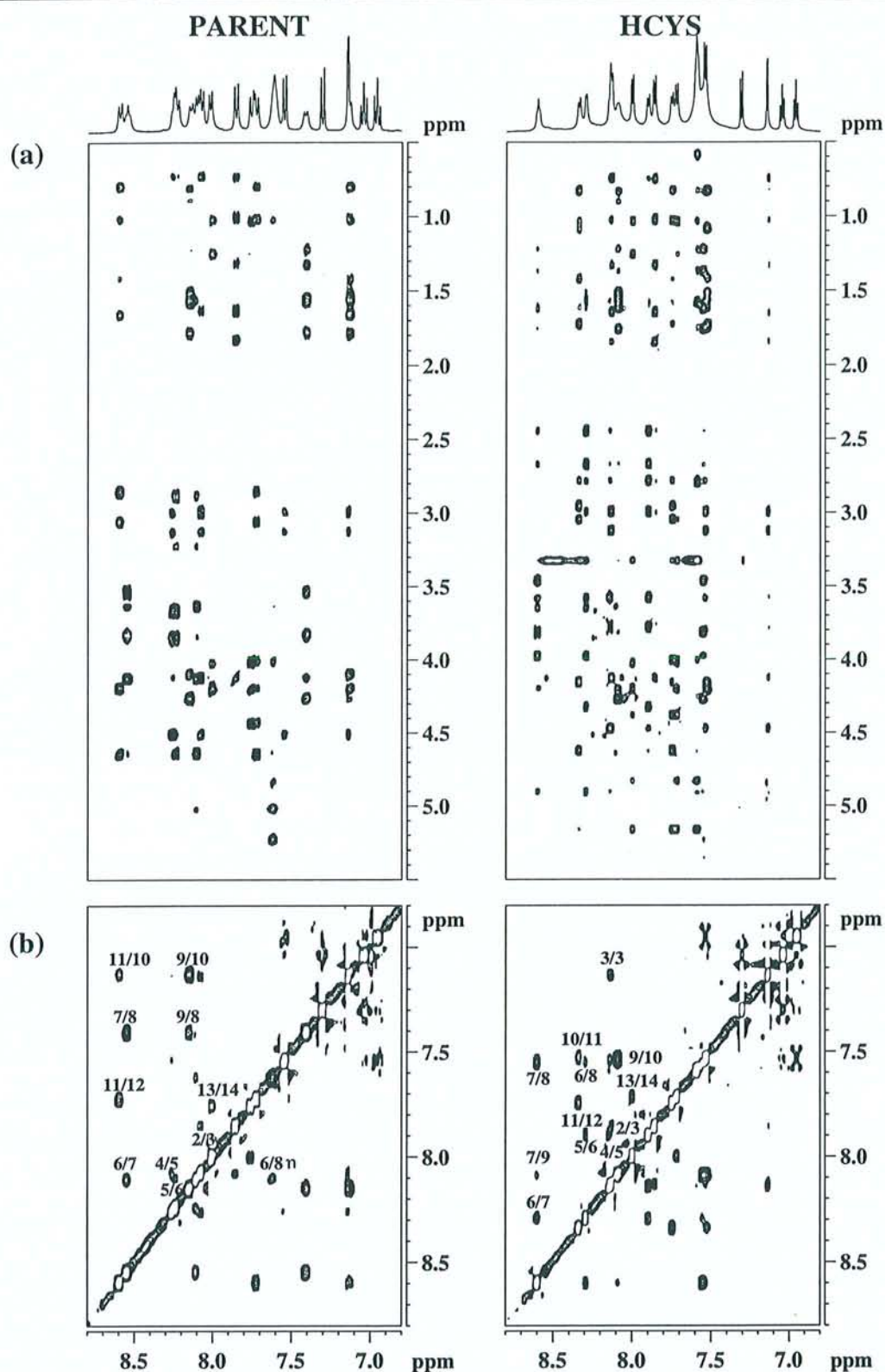


Figure II-55. Spectres de corrélations NOESY des peptides parent et Hcys₅.

(a) Région de corrélations CH_i/NH_{i+1} ; (b) Région de corrélations NH_i/NH_{i+1} .

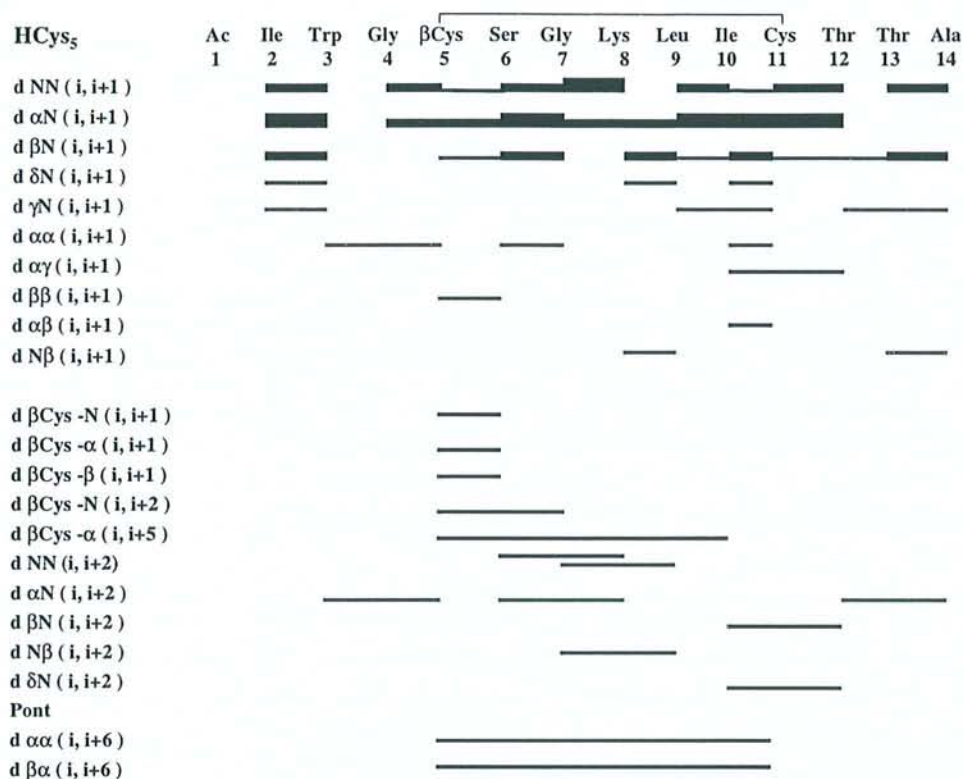


Figure II-56. Représentation des corrélations NOE croisées pour l'analogue Hcys₅ en fonction de leur intensité relative.

Les intensités sont proportionnelles à l'épaisseur des traits.

On observe un nombre de corrélations plus important en substituant le résidu Cys₅ par Hcys₅. En plus, on observe la présence des corrélations squelette-squelette et squelette-chaînes latérales de type (i, i+2) tout le long de la séquence. Cela semble dénoter une structuration accrue de la boucle conduisant à une conformation plus compacte.

On peut apprécier les perturbations conformationnelles de l'analogue Hcys₅ par rapport au peptide parent grâce à la différence relative des déplacements chimiques (Figures II-57). Dans le cas présent, les résidus Cys₅, Ile₁₀ et Cys₁₁ sont les plus perturbés.

D'autre part, les effets de température (annexe B) montrent que les coefficients de température les plus faibles se rapportent aux résidus Lys₈, Leu₉. Ces derniers sont les plus susceptibles de participer à des liaisons hydrogène intramoléculaires.

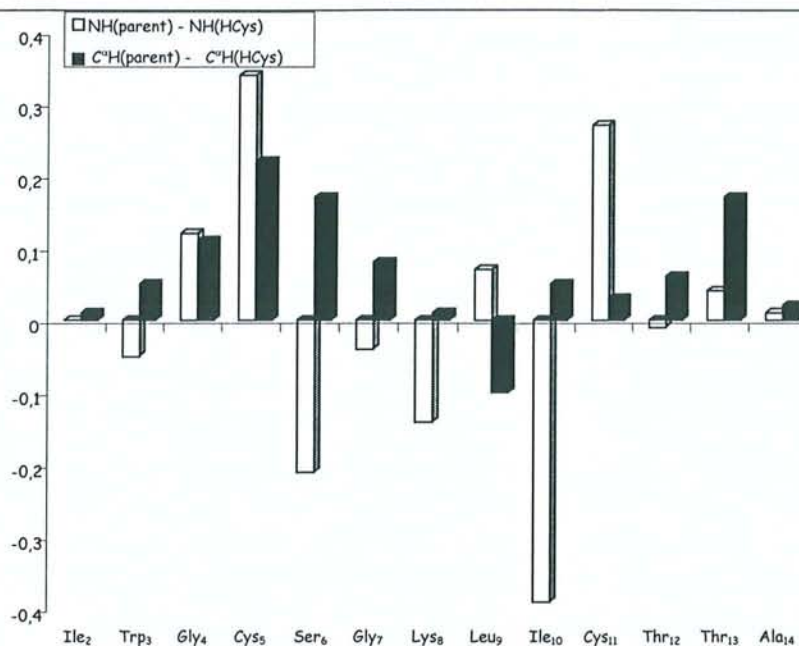


Figure II-57. Perturbations des déplacements chimiques des protons amides et des protons C α H de l'analogue Hcys₅ par rapport au peptide parent.

ii. Résultats de la modélisation moléculaire

Les conformations enregistrées au cours du cycle de calculs MD se superposent sur le fragment 5-11 avec un *rmsd* de 0.39Å (figure II-58). Le cycle apparaît donc très rigide.

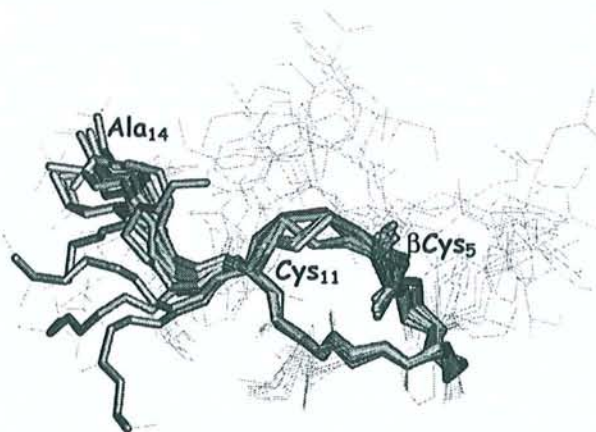


Figure II-58. Superposition des structures de plus basse énergie sur le squelette peptidique au niveau du fragment 5-11 (*rmsd*=0.39Å). Le squelette peptidique est représenté en traits gras, les chaînes latérales en traits fins.

Le programme PROMOTIF a permis de mettre en évidence deux repliements β consécutifs, localisés sur la boucle, ainsi qu'un repliement γ sur le fragment ICT (tableau II-10). On observe ainsi un repliement β tordu de type V avec une occurrence de 100%, ainsi qu'un deuxième repliement β de type VIII avec une occurrence de 42% mais aucun n'est stabilisé par des liaisons hydrogène conséquentes.

Repliement	Région	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}	Occurrence
βV	CSGK	-78 ± 8	87 ± 2	146 ± 6	-52 ± 2	100%
$\beta VIII$	GKLI	-75 ± 3	-68 ± 3	-160 ± 7	112 ± 5	42%
γ	ICT	-100 ± 20	84 ± 13			50%

Tableau II-10. Valeurs moyennes des angles rotationnels impliqués dans les repliements de l'analogue Hcys₅.

Les éléments de structuration sont résumés sur la figure II-59:

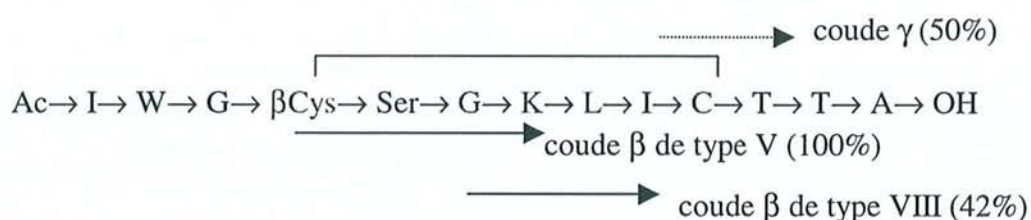


Figure II-59. Schéma des structures de l'analogue Hcys₅. La présence d'un repliement γ est symbolisée par une flèche en traits pointillés, celle d'un repliement β par une flèche en traits pleins.

La structure moyenne mettant en évidence les éléments structuraux est représentée sur la figure II-60:

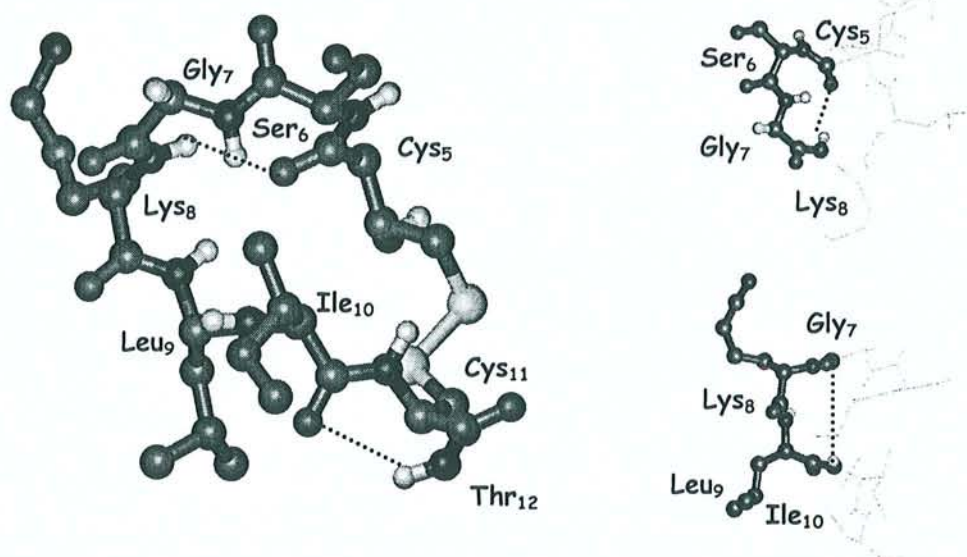


Figure II-60. Représentation de la structure moyenne de la partie structurée de l'analogue Hcys₅.

Le pont disulfure

On dénombre dans la distribution des angles de torsion de la liaison disulfure, mesurés sur l'ensemble des structures, un tiers de structures adoptant la configuration "*right hand hook*", un autre tiers la configuration "*right handed spiral*", et le dernier tiers en configuration aléatoire. Les autres configurations possibles de la liaison disulfure ne sont pas représentées. Ainsi, la liberté conformationnelle des liaisons disulfure est réduite. On se rapproche davantage des configurations adoptées par le parent, à savoir les configurations "*right hand hook*" et "*left handed spiral*".

iii. Discussion

La figure II-61 représente la comparaison des structures moyennes de l'analogue Hcys₅ avec le peptide parent:

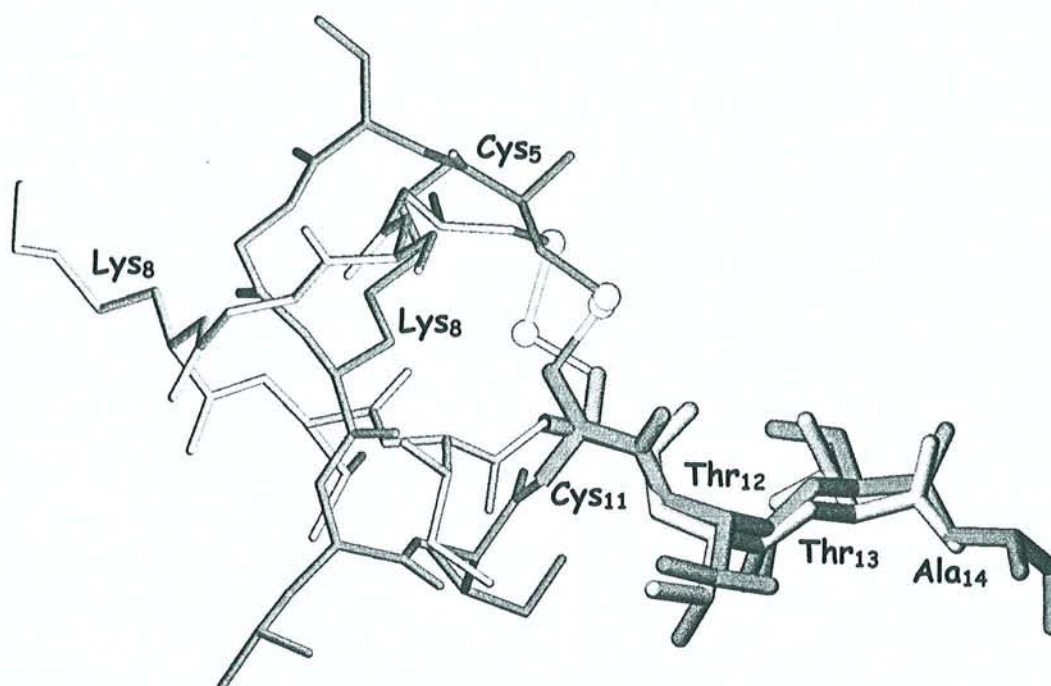


Figure II-61. Représentation de la superpositions des squelettes du peptide parent (rouge) et de l'analogue HCys₅ (violet).

De même que pour l'analogue HSer₆, on constate une très bonne superposition des peptides concernés sur le fragment 11-14 avec un rmsd de 0.68Å.

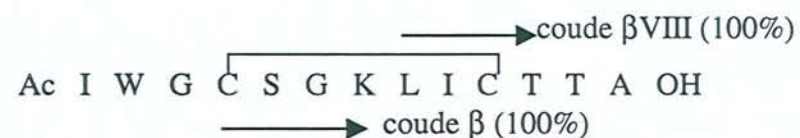
Comme dans les cas du peptide parent et de l'analogue HSer₅, on constate que les orientations des chaînes latérales des résidus Lys₈ et Ile₁₀ d'une part, et celle du résidu Leu₉ d'autre part, sont opposées par rapport à la surface définie par la boucle. Ce résultat semble confirmer que la reconnaissance du peptide par les anticorps anti-parent est conditionnée par l'orientation des chaînes latérales des résidus Lys₈, Leu₉ et Ile₁₀, tandis qu'une structuration spécifique de la partie SGKLI serait requise pour que le peptide soit reconnu par les anticorps anti-gp41.

II.6.7. Résumé de l'étude conformationnelle

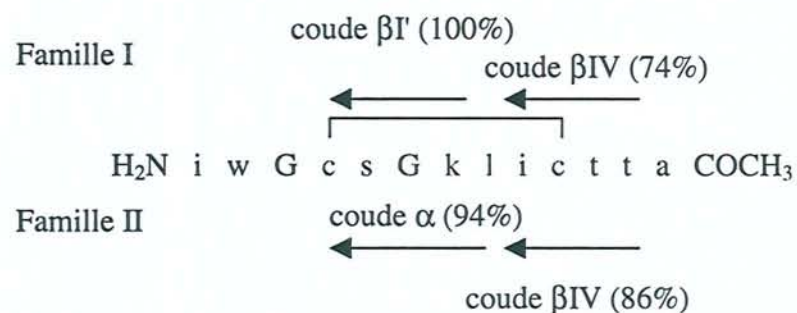
Les figures II-62 et II-63 rassemblent les résultats de l'étude conformationnelle réalisée sur les différents analogues. La présence d'un repliement γ est symbolisée par une flèche en traits pointillés, celle d'un repliement β par une flèche en traits pleins.

Le pourcentage indiqué correspond au nombre de conformations observées possédant cet élément de structure, par rapport au nombre total de structures enregistrées pendant le calcul de dynamique moléculaire.

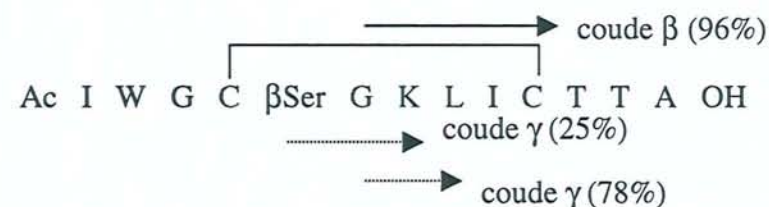
Peptide Parent



Peptide rétro-inverso



HSer



HCys

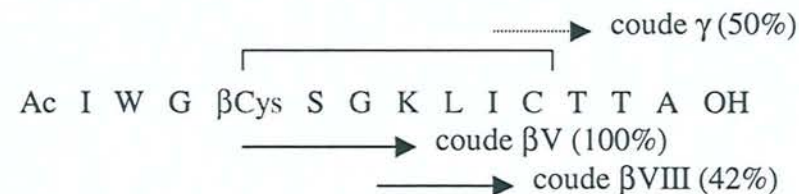


Figure II-62. Représentation des éléments de structuration pour les différents analogues. La présence d'un repliement γ est symbolisée par une flèche en traits pointillés, celle d'un repliement β par une flèche en traits pleins. Les acides aminés D sont représentés par leur symbole à une lettre en minuscule.

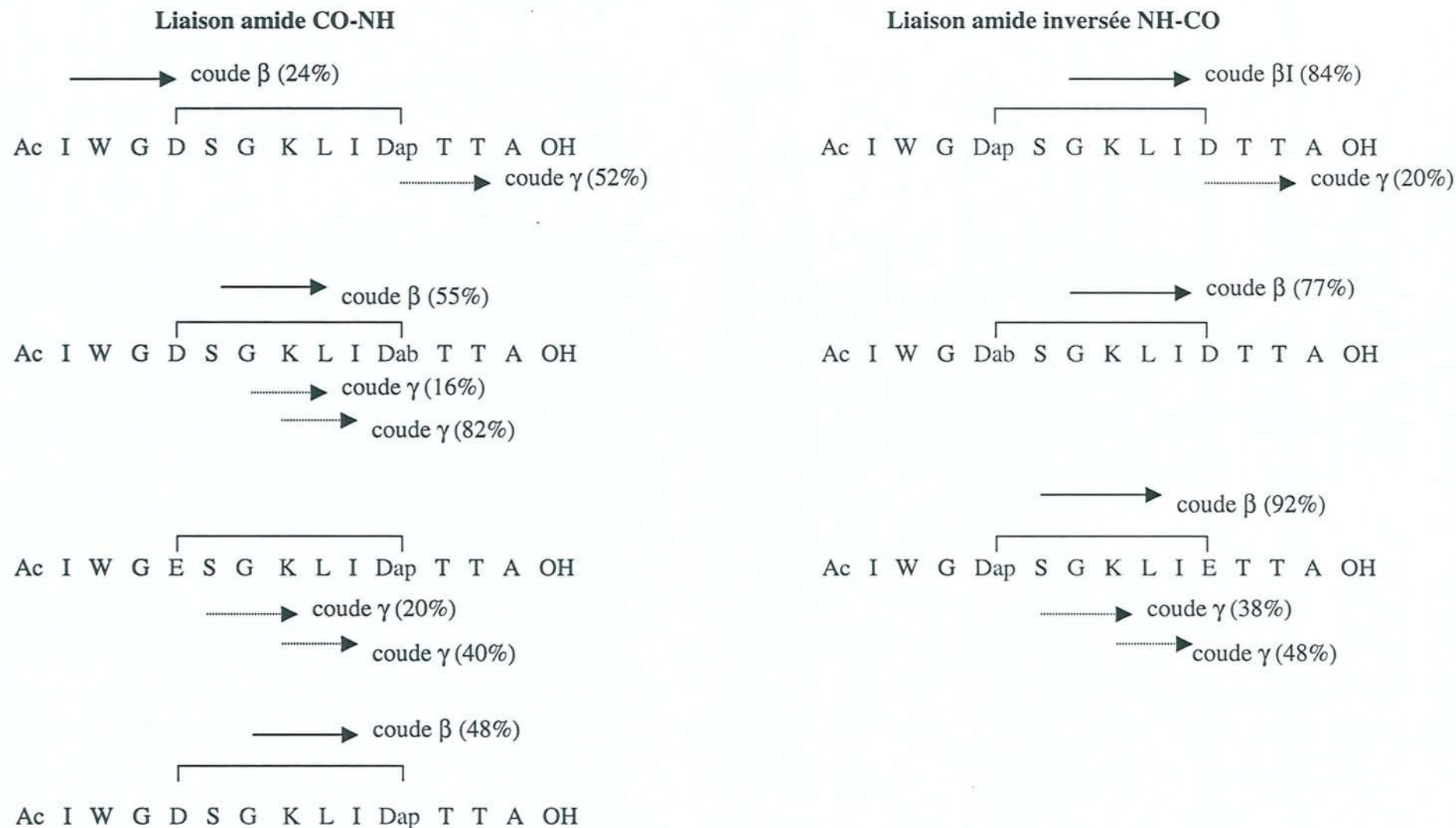


Figure II-63. Représentation des éléments de structuration pour les différents analogues. La présence d'un repliement γ est symbolisée par une flèche en traits pointillés, celle d'un repliement β par une flèche en traits pleins.

II.6.8. Conclusion et perspectives

Les peptides, agents naturels intervenant dans de nombreux processus biologiques, présentent un intérêt thérapeutique non négligeable. Améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques et métaboliques constitue l'un des objectifs de l'industrie pharmaceutique. Dans le but de stabiliser des structures repliées, on a souvent recours, avec succès, soit à des cyclisations à partir des extrémités N- et C-terminales du squelette des peptides linéaires, soit à des cyclisations entre une chaîne latérale fonctionnelle avec une autre ou avec une extrémité du squelette peptidique.

Cependant, jusqu'alors, aucune étude systématique n'avait été envisagée pour déterminer les possibilités de mimer une boucle naturelle fermée par un pont disulfure. Dans cette optique, différents analogues de la boucle immunodominante 600-612 de la glycoprotéine gp41 du VIH-1 ont été synthétisés et leur activité antigénique a été évaluée grâce à des tests ELISA mettant en œuvre soit un anticorps dirigé contre la gp41, soit un anticorps dirigé contre ce fragment 600-612, soit enfin des anticorps de sérums de patients séropositifs. Plusieurs modifications pseudopeptidiques ont été introduites dans le peptide, concernant soit tout ou une partie du squelette peptidique, soit les chaînes latérales, et plus particulièrement le pont disulfure.

D'un point de vue immunochimique, les résultats ont montré que la modification des liaisons peptidiques situées hors de la boucle permettait d'obtenir des analogues reconnus de manière comparable au peptide naturel. L'introduction de modifications à l'intérieur de cette boucle entraînait par contre une forte diminution de la reconnaissance antigénique.

Ces résultats peuvent s'expliquer par une flexibilité importante de la boucle naturelle qui conduit, lors de l'infection virale, à des populations d'anticorps reconnaissant un ensemble de conformations. Dans ce cas, les modifications chimiques introduites ne permettent pas aux analogues de mimer toutes ces conformations mais seulement certaines d'entre elles.

Il apparaît également que les analogues, dont la modification se situe au sommet de la boucle entre les positions Gly₆₀₅ et Leu₆₀₇, figurent parmi les moins bien reconnus selon les résultats des tests ELISA. Ce fragment doit être le siège d'une structuration importante impliquée dans le processus de reconnaissance antigénique par les anticorps anti-gp41 sélectionnés.

D'autre part, certains analogues comportant des modifications au niveau du squelette peptidique (présence d'acides β -aminés) présentent une antigénicité importante, semblable

voire supérieure à celle du peptide parent, vis-à-vis des anticorps anti-parents alors que cette antigénicité est très faible vis-à-vis des anticorps anti-gp41 sélectionnés. On peut ainsi penser que les parties de la boucle reconnues par les anticorps anti-gp41 et anti-parents sont différentes.

Le remplacement du pont disulfure par un pont amide, inclus dans un cycle de même taille ou de taille supérieure induit une perte de reconnaissance antigénique pour ces analogues, tant par les anticorps monoclonaux anti-gp41 que par les anticorps monoclonaux anti-parents, que par les anticorps des sérums des patients. De plus, une forte diminution de la reconnaissance antigénique de la boucle est également observée pour des analogues dont la chiralité des résidus cystéines impliqués dans le pont disulfure est inversée. Une structure cyclique différente n'est pas suffisante pour maintenir la reconnaissance antigénique originale.

Ces résultats semblent indiquer que le pont disulfure, présent dans la boucle 600-612, est nécessaire à la reconnaissance antigénique du peptide et induit des conformations bien définies notamment dans la région GKL.

Nous avons réalisé l'étude conformationnelle par RMN du peptide naturel et de quelques analogues afin de tenter d'expliquer plus précisément les résultats obtenus selon les tests ELISA.

Il semblerait que l'introduction de la liaison rétro-inverso entraîne un degré de structuration trop contraignant dans une région qui nécessite une certaine flexibilité pour une reconnaissance antigénique optimale. D'autre part, l'utilisation de résidus de chiralité D pour former un pont disulfure entraîne des modifications topologiques, non compatibles avec une bonne reconnaissance.

Ces deux conséquences pourraient être à l'origine de la moins bonne reconnaissance antigénique du peptide rétro-inverso.

Dans le cas des lactames, on constate qu'en augmentant la taille du cycle, les peptides correspondants acquièrent une structuration de plus en plus proche de celle du peptide parent. Cependant, la liaison amide a pour conséquence de rigidifier davantage la structure cyclique et d'imposer une famille de conformations trop contraintes. L'introduction d'autres groupements –méthylène intracycliques ajoute un degré de liberté conformationnel supplémentaire et permet par la même de mieux mimer la structure cyclique imposée par la liaison disulfure. Cependant, étant donné la faible reconnaissance de ces analogues, d'autres paramètres pourraient entrer en jeu.

Toute structure cyclique équivalente doit être capable d'engendrer des motifs structuraux similaires. En effet, toute diminution de l'activité signifie en règle générale la perte d'un élément structural important. Cela implique notamment que la géométrie du conformère imposée par le pont disulfure doit être respectée. Or, dans le cas des lactames, la liaison amide secondaire est figée dans une disposition généralement trans alors que la liaison disulfure adopte le plus souvent des formes gauche⁺ ou gauche⁻. D'autre part, la région GKL, largement impliquée dans la reconnaissance, doit comporter des éléments de structuration indispensables et spécifiques (structures repliées). L'orientation requise des chaînes latérales des résidus impliqués dans la région GKLI doit être telle que celles concernant les résidus Lys₆₀₆ et Ile₆₀₈ pointent du même côté de la surface définie par la molécule, tandis que celle de la Leu₆₀₇ leur soit opposée. L'absence d'au moins l'un de ces facteurs conduit à une perte notable de la reconnaissance antigénique.

Enfin, l'étude conformationnelle d'analogues contenant des acides β -aminés a permis de mettre en évidence la présence d'une autre région structurée de la boucle, qui est située en partie C-terminale et pourrait être la région reconnue préférentiellement par les anticorps anti-parents. Ces dispositions, couplées à un positionnement adapté des chaînes latérales, assurent une reconnaissance importante par les anticorps anti-parent.

D'autres analogues sont en cours de synthèse, en vue d'obtenir des analogues cycliques ne possédant pas de pont disulfure et qui soient bien et voire même mieux reconnus que le peptide naturel par les anticorps des sérums des patients. En tenant compte des données structurales issues de nos études conformationnelles, nous espérons ainsi être en mesure de concevoir et de synthétiser des analogues plus réactifs.

Il serait également intéressant d'effectuer les mêmes études structurales mais en présence d'anticorps anti-gp41 et anti-parents pour vérifier que les conclusions énoncées sont similaires lorsque l'on se trouve en présence de l'anticorps. Cela permettrait d'observer la conformation liée du peptide dans le site de fixation de l'anticorps. En effet, dans le cas d'une interaction récepteur-ligand, il n'est pas rare que la structure des deux composants du complexe (récepteur et ligand) soit sujette à des changements conformationnels lors de l'interaction. Une étude systématique permettrait ainsi de confirmer ou d'infirmer nos premières conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

1. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
2. Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J.-L. & Montagnier, L. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343-346 (1986).
3. Turner, B. G. & Summers, M. F. Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **285**, 1-32 (1999).
4. Barin, F., McLane, M. F., Allan, J. S., Lee, T. H., Groopman, J. E. & Essex, M. Virus envelope protein of HTLV-III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. *Science* **228**, 1094-1096 (1985).
5. Willey, R. L., Bonifacio, J. S., Potts, B. J., Martin, M. A. & Klausner, R. D. Biosynthesis, cleavage and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9580-9584 (1988).
6. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877 (1996).
7. Modrow, S., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Gallo, R. C., Wong-Staal, F. & Wolf, H. Computer assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variables regions. *J. Virol.* **61**, 570-578 (1987).
8. Stein, B. S., Gowda, S. D., Lifson, J. D., Penhallow, R. C., Bensch, K. G. & Engleman, E. G. pH independent HIV entry into CD4 positive T-Cells via Virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* **49**, 659-668 (1987).
9. Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P. S. Core structure of gp41 from HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273 (1997).
10. Tan, K., Liu, J.-H., Wang, J.-H., Shen, S. & Lu, M. Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**, 12303-12308 (1997).
11. Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, 426-430 (1997).

12. Caffrey, M., Cai, M., Kaufman, J., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. Determination of the secondary structure and global topology of the 44kDa ectodomain of gp41 of the simian immunodeficiency virus by multidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **271**, 819-826 (1997).
13. Caffrey, M., Cai, M., Kaufman, J., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., Covell, D. G., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. Three-dimensional solution structure of the 44kDa ectodomain of SIV gp41. *The EMBO Journal* **17**, 4572-4584 (1998).
14. Caffrey, M., Kaufman, J., Stahl, S., Wingfield, P., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. Monomer-trimer equilibrium of the ectodomain of SIV gp41: insight into the mechanism of peptide inhibition of HIV infection. *Protein Science* **8**, 1904-1907 (1999).
15. Shugars, D. C., Wild, C. T., Greenwell, T. K. & Matthews, T. J. Biophysical characterization of recombinant proteins expressing the leucine zipper-like domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J. Virol.* **70**, 2982-2991 (1996).
16. Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M. & Markowitz, M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**, 123-126 (1995).
17. Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. & Ho, D. D. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**, 1582-1586 (1996).
18. Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A. & Hahn, B. H. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**, 117-122 (1995).
19. Sattentau, Q. J., Moore, J. P., Vignaux, F., Traincard, F. & Poignard, P. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J. Virol.* **67**, 7383-7393 (1993).
20. Maddon, P. J., Dalgleish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A. & Axel, R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**, 333-348 (1986).
21. Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. & Paxton, W. A. HIV-1 entry

- into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673 (1996).
22. Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. & Sodroski, J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148 (1996).
 23. Deng, H. K., Unumatz, D., KewalRamani, V. N. & Littman, D. R. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**, 296-300 (1997).
 24. Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G. & Doms, R. W. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**, 1149-1158 (1996).
 25. Plesskoff, O., Treboute, C., Brelot, A., Heveker, N., Seman, M. & Alizon, M. Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* **276**, 1874-1878 (1997).
 26. Lapham, C. K., Ouyang, J., Chandrasekhar, B., Nguyen, N. Y., Dimitrov, D. S. & Golding, H. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* **274**, 602-605 (1996).
 27. Wu, L., Gerard, N. P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A. A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C. & Sodroski, J. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179-183 (1996).
 28. Weissman, D., Rabin, R. L., Arthos, J., Rubbert, A., Dybul, M., Swofford, R., Venkatesan, S., Farber, J. M. & Fauci, A. S. Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor. *Nature* **389**, 981-985 (1997).
 29. Chan, D. C. & Kim, P. S. HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684 (1998).
 30. Sonigo, P., Girard, M. & Dormont, D. Design and trials of AIDS vaccines. *Immunol. Today* **11**, 465-471 (1990).
 31. Nuwayhid, N. F. Laboratory tests for detection of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical and diagnostic Laboratory Immunology* **2**, 637-645 (1995).
 32. Constantine, N. T., Callahan, J. D. & Watts, D. M. *Retroviral Testing* (ed. CRC Press) (, London, 1992).

33. DiMarzo, V. F., DeVico, A. L., Copeland, T. D., Oroslan, S., Gallo, R. C. & Sarngadharan, M. G. Characterisation of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* **229**, 1402-1404 (1985).
34. Gnann, J. W., Schwimbeck, P. L., Nelson, J. A., Truax, A. B. & Oldstone, M. B. A. Diagnostic of AIDS by using a 12-amino acid peptide representing an immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus. *J. Infec. Dis.* **156**, 261-267 (1987).
35. Gnann, J. W., Nelson, J. A. & Oldstone, M. B. A. Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **61**, 2639-3641 (1987).
36. Smith, R. S. & Parks, E. D. Synthetic peptide assays to detect Human Immunodeficiency Virus types 1 and 2 in seropositive individuals. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **114**, 254-258 (1990).
37. Alizon, M., Wain-Hobson, S., Montagnier, L. & Sonigo, P. Genetic variability of the AIDS virus : nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell* **46**, 63-74 (1986).
38. Muesing, M. A., Smith, D. H., Cabradilla, C. D., Benton, C. V., Lasky, L. A. & Capon, D. J. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* **313**, 450-458 (1985).
39. Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, J., Starich, B., Josephs, S. F., Doran, F. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, S. R., Pearson, M. L., Lautenberger, J. A., Papas, T. S., Ghayeb, J., Chang, N. T., Gallo, R. C. & Wong-Staal, F. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLVIII. *Nature* **313**, 277-284 (1985).
40. Sanchez-Pescador, R., Power, M. D., Barr, P. J., Steimer, K. S., Stempien, M. M., Brown-Shimer, S. L., Gee, W. W., Renard, A., Randolph, A., Levy, J. A., Dina, D. & Luciw, P. A. Nucleotide sequence and expression of AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* **227**, 484-492 (1985).
41. Starcich, B. R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., McNeely, P. D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E. S., Parks, W. P., Josephs, S. F., Gallo, R. C. & Wong-Staal, F. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**, 637-648 (1986).
42. Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S. & Alizon, M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* **40**, 9-17 (1985).

43. Gnann, J. W., McCormick, J. B., Mitchell, S., Nelson, J. A. & Oldstone, M. B. A. Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections. *Science* **237**, 1346-1349 (1987).
44. Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L. & Alizon, M. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**, 662-669 (1987).
45. Oldstone, M. B. A., Tishon, A., Lewicki, H., Dyson, H. J., Feher, V. A., Assa-Munt, N. & Wright, P. E. Mapping the anatomy of the immunodominant domain of the human immunodeficiency virus gp41 transmembrane protein : peptide conformation analysis using monoclonal antibodies and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Virol.* **65**, 1727-1734 (1991).
46. Rabenstein, D. L., Russel, J. & Gu, J. Characterisation of the thiol/disulfide chemistry of peptides corresponding to the 603-609 disulfide loop of the human immunodeficiency virus (HIV) envelope glycoprotein gp41. *J. Pept. Res.* **51**, 437-443 (1998).
47. Zachariasse, K. A., Phuc, N. V. & Kozankiewicz, V. Investigation of micelles, microemulsions, and phospholipid bilayers with the pyridinium N-Phenolbetaine ET(30), a polarity probe for aqueous interfaces. *J. Phys. Chem.* **85**, 2676-2683 (1981).
48. Saulitis, J., Mierke, D. F., Byk, G., Gilon, C. & Kessler, H. Conformation of cyclic analogues of substance P : NMR and molecular dynamics in dimethyl sulfoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 4818-4827 (1992).
49. Kessler, H., Bats, J. W., Griesinger, C., Koll, S., Will, M. & Wagner, K. Peptide conformations. Conformational analysis of a superpotent cytoprotective cyclic somastostatin analogue. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1033-1049 (1988).
50. Yamazaki, T., Mierke, D. F., Said-Nejad, O. E., Felder, E. R. & Goodman, M. 14-membered cyclic opioids related to dermorphin and their partially retro-inverso modified analogues. *J. Pept. Res.* **39**, 161-181 (1992).
51. Coutinho, E., Kamath, S., Saran, A. & Srivastava, S. NMR and molecular dynamics studies of tachikins : conformation of substance P fragment 4-11. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **16**, 747-755 (1998).
52. Bach, A. C., Eyermann, C. J., Gross, J. D., Bower, M. J., Harbow, R. L., Weber, P. C. & DeGrado, W. F. Structural studies of a family of high affinity ligands for GPIIb/IIIa. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3207-3219 (1994).
53. *Xwin-NMR software Manual, Bruker Analytische Messtechnik GmbH* (, 1995).

54. Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Guntert, P. & Wuthrich, K. The program XEASY for computer NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR* **5**, 1-10 (1995).
55. Berndt, K. D., Guntert, P. & Wutrich, K. Conformational sampling by NMR solution structures calculated with the program DIANA evaluated by comparison with long-time molecular dynamics calculations in explicit water. *Proteins* **24**, 304-313 (1996).
56. Guntert, P., Mumenthaler, C. & Wuthrich, K. Torsion Angle Dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* **273**, 283-298 (1997).
57. Gondol, D. & van Binst, G. Distance determination by a two-dimensional NOE NMR study on the medium-sized peptide gramicidin S. *Biopolymers* **25**, 977-983 (1986).
58. Biosym Technologies Inc. *Discover Manual Version 2.8* (, San Diego, SA, 1992).
59. Stewart, J. P. MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. *J. Computer-Aided Mol. Des.* **4**, 1-105 (1990).
60. Koradi, R., Billeter, M. & Wutrich, K. MOLMOL : a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* **14**, 51-55 (1996).
61. Biosym Inc. User Guide, part 1. *San Diego, SA* (1992).
62. Laskowski, R. A., McArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. PROCHECK : a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291 (1993).
63. Hutchinson, E. G. & J.M., T. PROMOTIF-a program to identify and analyse structural motifs in proteins. *Protein Sci.* **5**, 212-220 (1996).
64. Thornton, J. M. Disulfide bridges in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **151**, 261-287 (1981).
65. Srinivasan, N., Sowdhamini, R., Ramakrishnan, C. & Balaram, P. Conformation of disulfide bridges in proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* **36**, 147-155 (1990).
66. Winantz, C., Sugg, E., Hruby, V. J. & Van Binst, G. Conformational study of a somatostatin analogue by high field NMR spectroscopy in aqueous solution. *Int. J. Pept. Protein Res.* **30**, 541-547 (1987).
67. Lautz, J., Kessler, H., Boelens, R., Kaptein, R. & Van Gunsteren, W. F. Conformational analysis of a cyclic thymopoietin-analogue by ^1H NMR spectroscopy and restrained molecular dynamics simulations. *Int. J. Pept. Protein Res.* **30**, 404-414 (1987).

68. Stroup, A. N., Rockwell, A. L. & Gierasch, L. M. Solution conformations of two flexible cyclic peptapeptides: cyclo(Gly-Pro-D-Phe-Gly-Ala) and cyclo(Gly-Pro-D-Phe-Gly-Val). *Biopolymers* **32**, 1713-1725 (1992).
69. Jois, D. S., Easwaran, K., Bednarek, M. & Blout, E. R. conformational and ion binding properties of a cyclic octapeptide, cyclic (Ala-Leu-Pro-Gly)₂. *Biopolymers* **32**, 993-1001 (1992).
70. Wollborn, U., Brunne, R. M., Harting, J., Holzemann, G. & Leibfritz, D. Comparative conformational analysis and in vitro pharmacological evaluation of three cyclic hexapeptide NK-2 antagonists. *Int. J. Pept. Protein Res.* **41**, 376-384 (1993).
71. Mrestani-Klaus, C., Brandt, W., Schmidt, R., Neubert, K. & Schiller, P. Proton NMR conformational analysis of cyclic beta-casomorphin analogues of the type Tyr-cyclo(N-omega-D-Orn-Xaa-Yaa-Gly-). *Arch. Pharm. (Weinheim)* **329**, 133-142 (1996).
72. Volpon, L., Besson, F. & Lancelin, J. NMR structure of active and inactive forms of the sterol-dependent antifungal antibiotic bacillomycin L. *Eur. J. Biochem.* **264**, 200-210 (1999).
73. Milner-White, E. J. Situations of gamma-turns in proteins. Their relation to alpha-helices, beta-sheets and ligand binding sites. *J. Mol. biol.* **216**, 385-397 (1990).
74. Verdoliva, A., Ruvo, M., Cassani, G. & Fassina, G. Topological mimicry of cross-reacting enantiomeric peptide antigens. *J. Biol. Chem.* **270**, 30422-30427 (1995).
75. Wermuth, J., Goodman, S. & Kessler, H. *Proc. of the 23rd Eur. Peptide Symposium* (ed. Maia, H. S. C.) (, ESCOM, Leiden, 1995).
76. Wermuth, J., Goodman, S. L., Jonczyk, A. & Kessler, H. Stereomerism and biological activity of the selective and superactive $\alpha_v\beta_3$ integrin inhibitor cyclo(-RGDfV-) and its retro-inverso peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1328-1335 (1997).

CHAPITRE III

ANALYSE STRUCTURALE DE PEPTIDES ACTIFS EN PRESENCE D'ANTICORPS MONOCLONAUX

CHAPITRE III ANALYSE STRUCTURALE DE PEPTIDES ACTIFS EN PRESENCE D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Le système immunitaire est notre principal moyen de défense vis-à-vis des agresseurs extérieurs tels que les virus, bactéries, champignons ou autres parasites. Capable de distinguer entre *le soi et le non soi*, il est conçu pour combattre ces agents et s'opposer à leur prolifération, en les détruisant.

Le système immunitaire utilise deux stratégies distinctes mais en étroite relation l'une avec l'autre: l'immunité non spécifique, qui constitue la première ligne de défense de notre organisme, et l'immunité spécifique, capable de garder "la mémoire" de l'agent pathogène contre lequel il a été dirigé.

Les cellules phagocytaires (monocytes et macrophages) participent principalement à l'immunité non spécifique en digérant toutes les particules étrangères par phagocytose. Les cellules tueuses spécifiques (*natural killer* ou NK) quant à elles, sont capables de détruire des cellules cibles en libérant des médiateurs, formant des pores dans la membrane et induisant ainsi sa lyse.

Les lymphocytes assurent l'immunité spécifique. Ils sont eux-mêmes divisés en deux groupes (lymphocytes T et B), qui permettent de distinguer deux types de réponse immunitaire, humorale ou cellulaire. Les lymphocytes T sont de deux sortes : les lymphocytes T-Killer participent à l'immunité cellulaire en tuant les cellules qui exposent à leur surface des motifs étrangers, éliminant ainsi les cellules infectées avant que le virus ne soit répliqué. Les lymphocytes T-Helper stimulent la réponse humorale en apportant leur concours aux lymphocytes B, précurseurs des plasmocytes.

Les éléments de reconnaissance de la réponse humorale sont des protéines solubles appelées anticorps et capables de reconnaître, de façon hautement spécifique un agent étranger à l'organisme: l'antigène. Ce dernier, une fois reconnu, est complexé par l'anticorps avant d'être fixé sur le récepteur F_c d'une cellule phagocytaire, responsable de sa destruction finale.

Les anticorps ou immunoglobulines, sont des glycoprotéines d'une masse moléculaire de l'ordre de 150kDa, présentes dans le sérum et dans les liquides interstitiels des mammifères. Ils se répartissent en cinq classes distinctes (IgG, IgM, IgA, IgD et IgE).

Les IgG constituent la principale classe du sérum mais les IgM sont la première classe à apparaître à la suite de l'exposition à un antigène. Les IgA sont la classe majeure des sécrétions externes et les IgE reconnaissent les parasites. Le rôle des IgD n'est encore pas bien connu.

L'organisme échoue parfois à distinguer les molécules étrangères de ses propres molécules, et réagit contre les constituants de son propre système immunitaire, donnant lieu au phénomène d'auto-immunisation.

De telles réactions auto-immunes sont responsables de nombreuses maladies. Les auto-anticorps produits peuvent avoir pour cibles les déterminants spécifiques d'un organe (par exemple, le récepteur de l'acétylcholine situé à la jonction muscle-nerf dans le cas de la myasthénie grave (*myasthenia gravis*) ou les mêmes déterminants présents à la surface de différents organes (comme les fragments F_c des IgG dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde).

La réponse immunitaire est un mécanisme complexe qui donne lieu à une cascade de réactions extrêmement diversifiées. Ainsi, le même épitope antigénique peut entraîner la sécrétion de différents anticorps avec un haut degré de spécificité. De même, un même anticorps peut reconnaître et lier plusieurs antigènes: on parle de dégénérescence de la réponse immunitaire.

Cette spécificité des interactions antigène/anticorps est induite en grande partie par l'effet d'une complémentarité chimique et structurale entre le site de fixation du ligand (paratope), situé à la surface de la protéine, et le déterminant antigénique (épitope).

La connaissance de la géométrie locale du site d'interaction entre l'anticorps et son ligand est fondamentale pour mieux appréhender le mode de reconnaissance spécifique de l'antigène par l'anticorps, qu'il soit une macromolécule ou des peptides modifiés chimiquement. Cette connaissance est également essentielle pour comprendre les mécanismes pathologiques des maladies auto-immunes et permettre par là-même d'explorer et de développer des approches thérapeutiques efficaces.

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressés à ces deux aspects des interactions antigène/anticorps.

La première partie de ce chapitre est consacrée à l'étude d'un fragment peptidique modèle de l'histone H3 et de ses analogues rétro-inverso, en interaction avec un anticorps monoclonal dirigé contre le fragment parent.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'étude de peptides mimant une partie du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (RACH) et comportant une tyrosine phosphorylée. La destruction du RACH par les anticorps produit une maladie auto-immune, la myasthénie (*myasthenia gravis*).

Il a été montré que la phosphorylation des tyrosines affectait de nombreuses fonctions de RACH. En effet, certains anticorps anti-RACH, dirigés spécifiquement contre les sites de phosphorylation de la sous-unité β , inhibent l'ouverture du canal ionique pour le transfert de l'ion, conduisant à un manque de transmission de l'influx nerveux, ce qui tendrait à prouver que ces sites sont capables de contrôler ce canal.

L'étude des interactions avec les anticorps correspondants a ainsi été menée dans le but de comprendre le rôle de la phosphorylation de la tyrosine dans le mécanisme du récepteur RACH.

III.1. ETUDE DES INTERACTIONS ANTIGENE/ANTICORPS DANS LE CAS DE PEPTIDES MODIFIES

Les peptides synthétiques sont fréquemment utilisés pour mimer les sites antigéniques des protéines mais leur utilisation intensive dans les applications thérapeutiques se heurte notamment à leur faible résistance à la protéolyse dans les fluides biologiques.

Depuis quelques années, différentes approches ont été développées pour créer des analogues qui soient plus actifs, plus spécifiques et plus résistants aux protéases. Il est probable qu'une meilleure résistance des peptides aux protéases affecte considérablement leur immunogénicité intrinsèque.

Les recherches des corrélations structure/activité ont montré entre autre que l'introduction de modifications sur le squelette peptidique au niveau de séquences peptidiques biologiquement actives affectait leur activité, leur stabilité enzymatique et leurs propriétés conformationnelles et pouvait conduire dans certains cas à l'obtention d'analogues comportant des propriétés intéressantes.

Les applications potentielles de ces analogues couvrent un large domaine, comprenant entre autre l'élaboration de vaccins synthétiques, l'utilisation en diagnostic ou le développement de nouvelles générations d'immunomodulateurs d'intérêt potentiel pour la thérapie antitumorale et antivirale.

L'introduction de la modification rétro-inverso est l'une des approches les plus prometteuses. Il a été observé que des anticorps monoclonaux induits contre le peptide naturel se liaient aux analogues rétro-inverso avec une constante d'affinité à l'équilibre nettement supérieure à celle mesurée pour le peptide parent (jusqu'à 500 fois, ou plus). De plus, ces analogues sont hautement immunogènes et présentent des temps de demi-vies en présence d'enzymes protéolytiques augmentées jusqu'à 100 fois.^{1,2}

La séquence C-terminale IRGERA, représentant l'épitope majeur 130-135 de l'histone H3 a été abondamment utilisée comme exemple dans les essais de modifications pseudopeptidiques et elle s'est avérée un bon modèle pour l'étude des propriétés antigéniques et immunogènes de ces analogues modifiés. En effet, ce fragment est non immunogène en l'absence de protéine porteuse et particulièrement sensible aux protéases. De ce fait, il constitue une sonde intéressante pour l'étude de ses interactions avec les anticorps.

Parmi les différentes familles d'analogues pseudopeptidiques synthétisés et étudiés par les équipes de Jean-Paul Briand et de Sylviane Muller à l'IBMC de Strasbourg, les dérivés rétro-inverso s'avèrent les plus intéressants. En effet, il a été observé que l'analogue rétro-inverso du fragment IRGERA était plus résistant à la protéolyse que le peptide naturel^{3,4} et que son temps de demi-vie en présence de trypsine était au moins 7 fois plus élevé.³ Cependant, cette propriété n'explique pas pourquoi les peptides rétro-inverso sont souvent mieux reconnus que le peptide parent par les anticorps, avec des constantes d'affinité augmentées d'un facteur 10 à 100 dans certains cas.³⁻⁵

L'analyse conformationnelle comparée de la séquence peptidique IRGERA et de ses analogues rétro-inverso est d'un grand intérêt en relation avec leur reconnaissance par les anticorps monoclonaux. Nous avons donc mené une analyse structurale de la séquence IRGERA et de plusieurs de ses analogues peptidiques et rétro-inverso en présence d'un anticorps monoclonal anti-peptide parent 4x11, par les expériences NOESY transféré et par des calculs de dynamique moléculaire. Il est fort probable, que dans le complexe, le fragment adopte une conformation voisine de celle qui est la sienne dans la protéine entière.

III.1.1. Présentation

Les histones (Figure III-1) sont de petites molécules cationiques qui s'associent entre elles et avec l'ADN, pour former les nucléosomes, les unités fondamentales répétitives de la chromatine.

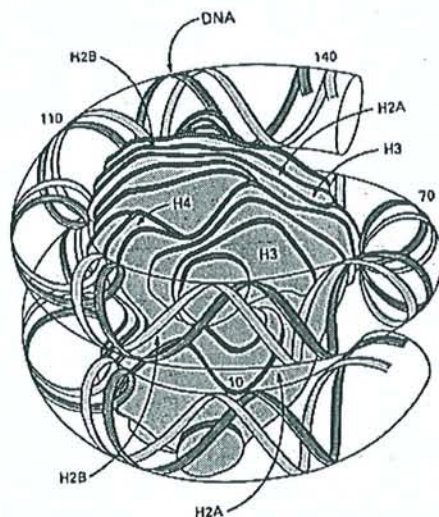


Figure III-1. Représentation d'un cœur de nucléosome (D'après R. Kornberg et A. Klug)

Les anticorps anti-histones sont communément trouvés dans les sérums de patients souffrant de maladies auto-immunes.⁶⁻⁸

Dans le but de tester la capacité des pseudopeptides rétro-inverso à servir de cibles possibles pour les anticorps produits par des patients atteints de telles maladies, des peptides correspondant entre autres à la partie C-terminale 130-135 de l'histone H3 ont été synthétisés et testés par des tests ELISA sur des sérums de patients auto-immuns.⁹

Il a ainsi été montré que les peptides rétro-inverso étaient aussi bien reconnus, voire même mieux que les peptides naturels.⁹ D'autre part, il a été observé que le simple remplacement du résidu C-terminal L-Ala par un résidu D-Ala suffisait pour abolir la reconnaissance du peptide résultant par les anticorps induits contre le peptide parent.¹⁰ De plus, ces anticorps reconnaissent les analogues rétro-inverso avec une très bonne affinité. En effet, les constantes d'association à l'équilibre (K_a) mesurées pour le peptide naturel CGGIRGERA et son analogue CGGIRGERG sont respectivement de 3 et $7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ alors que celles mesurées pour leurs dérivés rétro-inverso sont significativement plus élevées (225 et $1900 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), c'est-à-dire 75 et 275 fois plus élevées par rapport à celles mesurées vis-à-vis des peptides parents

respectifs, et presque équivalente à celle mesurée pour l'histone complète H3 ($K_a=2280 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).

Nous avons mené une étude conformationnelle sur le même échantillon utilisé dans les tests ELISA et les mesures de BIAcore, à savoir sur le nonapeptide CGGIRGERA. Le fragment CGG a été ajouté à la séquence IRGERA pour permettre le couplage du peptide au support de dextrane du biocapteur BIAcore et ne fait pas partie de l'épitope.

Pour mimer au mieux la partie C-terminale, qui est particulièrement importante dans la reconnaissance du peptide par les anticorps, un résidu malonate a été introduit lors de la synthèse du rétro-inverso. Ce dernier se présente donc sous forme de deux diastéréoisomères au sein de la solution. L'analogue mGreGriGGC, comportant le composé non chiral Gly, a été utilisé pour résoudre les cartes de RMN-2D, relativement complexes avec le peptide mAreGriGGC.

Les séquences des peptides étudiés sont résumées sur la figure III-2.

Les acides aminés L sont définis par leur symbole à une lettre en majuscules, les acides aminés D par ceux en minuscules. La même numérotation que les peptides L a été conservée pour les peptides rétro-inverso.

Peptides parent L

Peptide L(A)	$\text{H-C}_1 \rightarrow \text{G}_2 \rightarrow \text{G}_3 \rightarrow \text{I}_4 \rightarrow \text{R}_5 \rightarrow \text{G}_6 \rightarrow \text{E}_7 \rightarrow \text{R}_8 \rightarrow \text{A}_9\text{-OH}$
Peptide L(G)	$\text{H-C}_1 \rightarrow \text{G}_2 \rightarrow \text{G}_3 \rightarrow \text{I}_4 \rightarrow \text{R}_5 \rightarrow \text{G}_6 \rightarrow \text{E}_7 \rightarrow \text{R}_8 \rightarrow \text{G}_9\text{-OH}$
Peptide L(a)	$\text{H-C}_1 \rightarrow \text{G}_2 \rightarrow \text{G}_3 \rightarrow \text{I}_4 \rightarrow \text{R}_5 \rightarrow \text{G}_6 \rightarrow \text{E}_7 \rightarrow \text{R}_8 \rightarrow \text{a}_9\text{-OH}$

Peptides rétro-inverso (RI)

Peptide RI(mG)	$\text{H}_2\text{N-C}_1 \leftarrow \text{G}_2 \leftarrow \text{G}_3 \leftarrow \text{i}_4 \leftarrow \text{r}_5 \leftarrow \text{G}_6 \leftarrow \text{e}_7 \leftarrow \text{r}_8 \leftarrow \text{mG}_9\text{-OH}$
Peptide RI(mA)	$\text{H}_2\text{N-C}_1 \leftarrow \text{G}_2 \leftarrow \text{G}_3 \leftarrow \text{i}_4 \leftarrow \text{r}_5 \leftarrow \text{G}_6 \leftarrow \text{e}_7 \leftarrow \text{r}_8 \leftarrow (\text{R}, \text{S})\text{mA}_9\text{-OH}$

Figure III-2. Séquence des peptides étudiés avec $\text{mA} = \text{CO-CH}(\text{CH}_3)\text{-CO}$ et $\text{mG} = \text{CO-CH}_2\text{-CO}$.

III.1.2. Analyse conformationnelle des peptides dans leur état lié à l'anticorps

a. Protocole utilisé pour l'étude des différents analogues

Pour chacun des analogues étudiés, nous avons suivi le même protocole opératoire qui est décrit ci-dessous.

i. RMN

L'anticorps monoclonal 4x11 a été choisi parmi trois anticorps induits contre le peptide L, en raison de sa bonne affinité vis-à-vis du peptide parent et aussi de son comportement très particulier vis-à-vis des analogues rétro-inverso.⁴ Cet anticorps a été produit en grande quantité pour les besoins des mesures de RMN-2D.

Les expériences de NOESY transféré ont été examinées avec plusieurs rapports molaires peptide/anticorps de 10/1 à 100/1, en solution aqueuse H₂O/D₂O (95/5 v/v) à pH=7 (100mM de tampon phosphate contenant 0.2% d'azide de sodium) afin de déterminer le meilleur rapport conduisant à un transfert optimum des NOE. Le rapport molaire a ensuite été fixé à 50/1 (c'est-à-dire 5mM de peptide et 0.1mM d'anticorps) pour l'ensemble des peptides examinés. Le sel de triméthysilyl-3-propionate 2,2,3,3-d₄ de sodium a été choisi comme référence interne.

Les expériences ¹H RMN ont été réalisées sur un spectromètre DRX 400MHz à 4°C.

Pour chaque peptide, nous avons réalisé une expérience TOCSY, avec un temps de mélange de $\tau_m=70\text{ms}$, et différentes expériences TR-NOESY à des temps de mélange variables (de 100 à 500ms), ceci afin de sélectionner le temps de mélange optimal pour une diffusion de spins minimale. 512 spectres, constituant la dimension F1, sont enregistrés sur 2048 points, sur une largeur spectrale de 5000Hz. La fréquence porteuse O₁ a été centrée sur le signal de l'eau. Pour toutes les expériences, la suppression du signal de l'eau a été réalisée en utilisant la séquence WATERGATE.¹¹

Les données de RMN sont traitées avec le logiciel XWIN-NMR.¹² Avant la transformée de Fourier des données 2D, les interférogrammes sont multipliés par une fonction d'apodisation de type sinus déphasée de $\pi/4$ (Q4).

Les volumes des pics sont intégrés au temps de mélange $\tau_m=200\text{ms}$ (absence ou faible diffusion de spins pour tous les peptides étudiés), avec le logiciel XEASY¹³ et sont convertis en distance grâce au programme CALIBA¹⁴ de DYANA.¹⁵

En considérant que tous les noyaux en interaction ont le même temps de corrélation, nous avons estimé les distances interprotoniques à partir d'un pic croisé de deux protons séparés par une distance connue, par exemple avec les deux hydrogènes géminaux C^βH_2 ($1.78\text{\AA}$) de la cystéine.

Les corrélations TR-NOE ont été ensuite divisées en trois classes selon leur intensité relative forte, moyenne et faible correspondant respectivement à des intervalles de distances $1.8\text{-}2.8\text{\AA}$, $2.8\text{-}3.8\text{\AA}$ et $3.8\text{-}5.5\text{\AA}$. Dans le cas des paires de protons géminaux dont la stéréochimie n'a pas été déterminée (protons Gly- $\text{C}^\alpha\text{H}_2$ et protons C^βH_2 des chaînes latérales), l'intervalle de distances a été majoré de $\pm 0.5\text{\AA}$ pour compenser l'erreur possible due à l'introduction d'un pseudo-atome.

ii. Modélisation moléculaire

Les calculs ont été réalisés à partir d'une structure étendue construite sous DYANA,¹⁵ qui a été soumise à un calcul de dynamique moléculaire *in vacuo*, avec le logiciel DISCOVER,¹⁶ en utilisant le champ de forces CVFF¹⁷ et les contraintes géométriques issues de la RMN.

Les acides aminés D ont été introduits dans la librairie de DYANA¹⁵ en changeant le signe des coordonnées z pour chaque H^α et pour chaque atome des chaînes latérales. (Cela ne s'est pas avéré nécessaire pour les atomes de la chaîne principale, leurs coordonnées atomiques étant égales à zéro).

Les résidus maloniques ont été construits à partir du logiciel DISCOVER¹⁶ et introduits dans la librairie de DYANA par des transformations via le logiciel MOLMOL.¹⁸

Dans les conditions de l'expérience TR-NOESY, bien que les constantes de couplage vicinal ^3J soient aisément mesurables, elles correspondent cependant à une valeur moyenne issues des structures adoptées par le peptide à l'état isolé. Elles ne sont donc pas utilisables pour le calcul de la structure du peptide en présence d'anticorps. Les contraintes angulaires que nous avons introduites dans les calculs pour les angles Φ servent à imposer les domaines angulaires généralement adoptées par les résidus L (entre 0° et -175°) et les résidus D (entre 0° et $+175^\circ$).

Comme le solvant n'est pas inclus dans les calculs, les charges des acides aminés chargés sont réduites de moitié, tandis que celles des groupements N et C-terminaux sont négligées, ceci afin d'éviter des artéfacts de calculs causés par la surestimation de ces charges dans le cas de la simulation de peptides de petite taille. En effet, dans un calcul classique, on observe couramment une interaction entre les deux groupement C- et N-terminaux chargés.

Une constante diélectrique dépendant de la distance, égale à $4r$ a été appliquée.

Les contraintes de distances ont été utilisées avec une constante de force $k=20$ Kcal/mol/Å.

Les calculs ont été effectués à partir d'un protocole de recuit simulé, qui implique l'exploration de tout l'espace conformationnel afin de trouver le minimum énergétique de la molécule.

Les différentes étapes de ce protocole sont les suivantes:

1. Une minimisation d'énergie préliminaire (300 pas de calculs avec la méthode du steepest descent, 300 pas de calculs avec la méthode du gradient conjugué et 300 pas de calculs avec la méthode de Newton-Raphston).
2. 200 ps de dynamique moléculaire sous contraintes à 1000K, avec une sauvegarde de la structure observée toutes les 4 fs. Au total, 50 structures sont générées.
3. 5ps de dynamique appliquée à chaque structure et à chaque étape durant le refroidissement de 1000K à 300K, avec un pas de 100K.
4. Une minimisation finale (300 pas de steepest descent, 300 pas de gradient conjugué et 300 pas avec la méthode de Newton-Raphston).

b. Résultats des mesures de RMN

Les signaux RMN des peptides ont été attribués par combinaison des techniques TOCSY (Figure III-3) et TR-NOESY (Figure III-4).

En raison de la faible concentration d'anticorps présents dans le milieu, les molécules à l'état libre et lié à l'anticorps sont en échange rapide. Les conditions expérimentales sont ainsi en adéquation pour observer des NOE transférés.

La carte TOCSY du peptide RI(mA) montre clairement la présence d'un mélange de deux diastéréoisomères dû à la présence du résidu malonate de méthyle (mA) racémique.

On observe en effet un dédoublement de tous les systèmes de spins des résidus i_4 , r_5 , e_7 et r_8 . Cette difficulté nous a conduit à étudier de façon parallèle le peptide L(G) et son analogue rétro-inverso RI(mG) dont l'extrémité malonate mG ne conduit qu'à un seul diastéréoisomère.

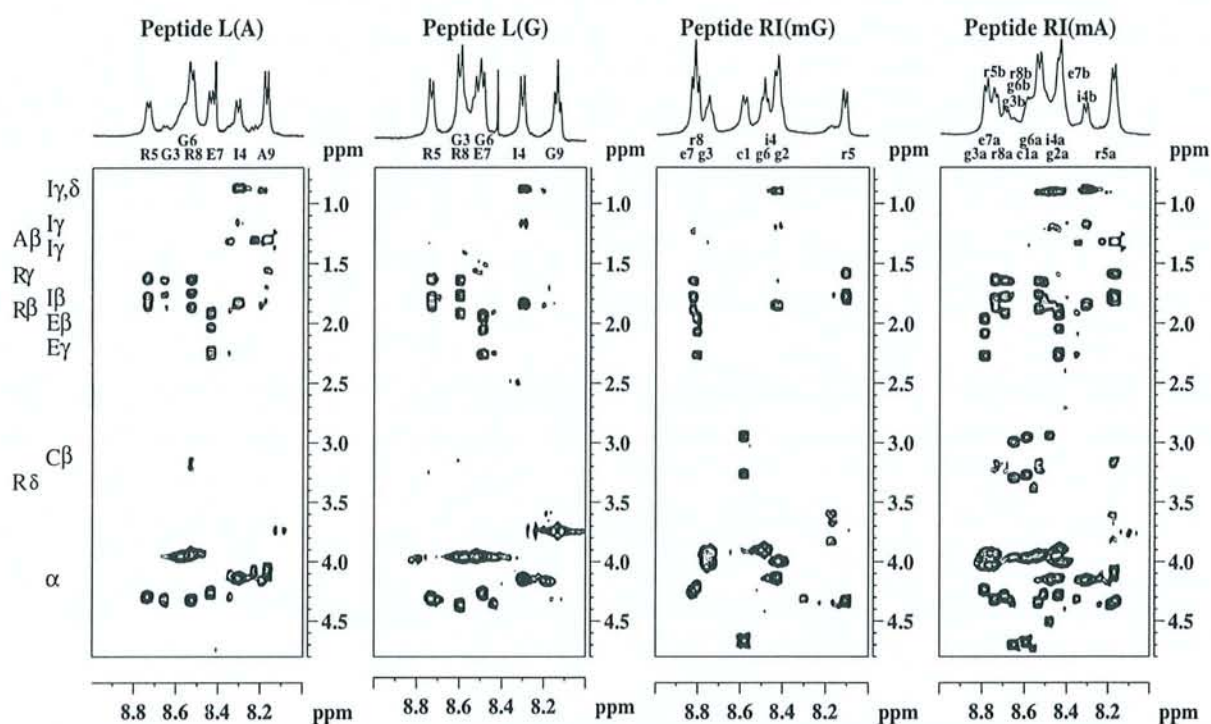


Figure III-3. Spectres TOCSY pour les différents peptides étudiés, en présence de 2% d'anticorps 4x11 dans H_2O/D_2O 95/5 v/v (pH=7, 4°C, $\tau_m=200ms$).

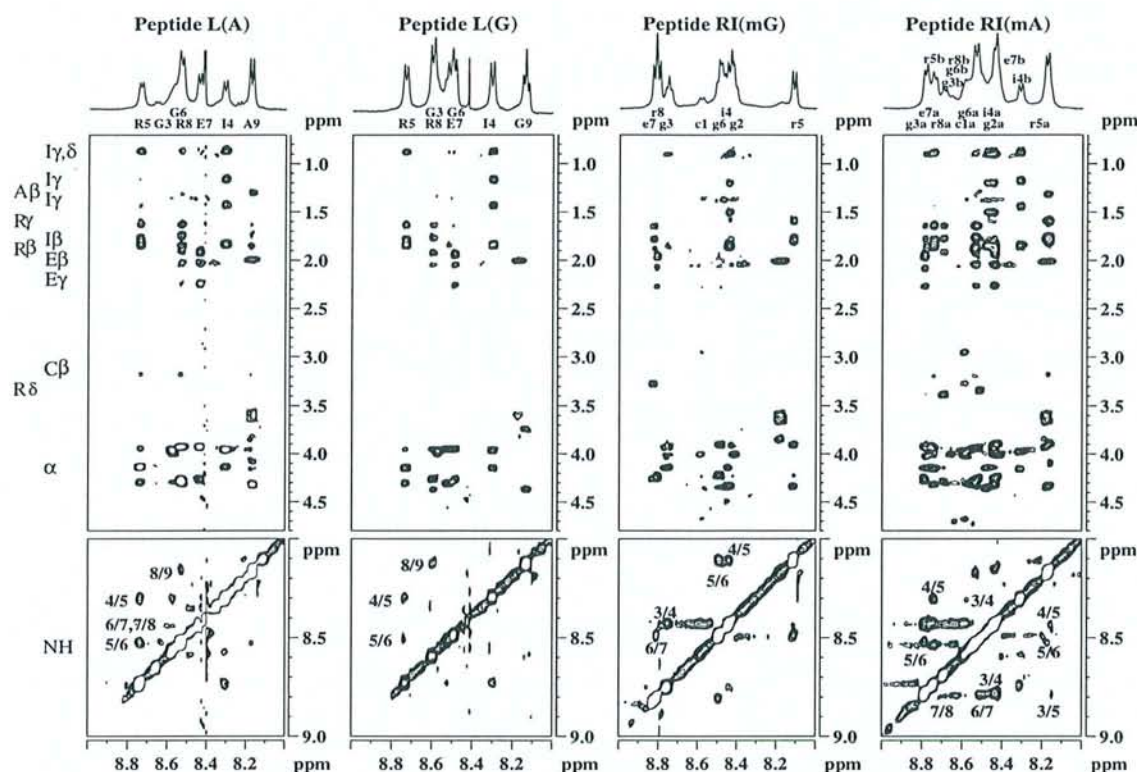


Figure III-4. Spectres TR-NOESY pour les différents peptides étudiés, en présence de 2% d'anticorps 4x11 dans H_2O/D_2O 95/5 v/v (pH=7, 4°C, $\tau_m=200ms$).

Pour les peptides de configuration L, l'attribution des systèmes de spins de Ile₄, Glu₇ et Ala₉ est immédiate sur le spectre TOCSY (Figure III-3). La seule ambiguïté réside dans l'attribution des systèmes de spins de Arg₅/Arg₈ et de Gly₂/Gly₃/Gly₆/Gly₉ et elle est levée par l'attribution séquentielle des corrélations NN(i, i+1) et $\alpha N(i, i+1)$. Un examen rapide de la carte TOCSY du composé RI(mA) permet de trouver une certaine similitude pour les systèmes de spins de l'un des deux diastéréoisomères avec ceux du composé RI(mG). L'analyse approfondie du spectre NOESY du composé RI(mA) est rendue plus complexe en raison de la présence des deux diastéréoisomères, que nous avons désigné par RIa(mA) et RIb(mA) par la suite (Figure III-5). Les signaux RMN du diastéréoisomère RIa(mA) ont été corrélés par homologie à ceux de RI(mG). Les signaux restants ont été attribués au diastéréoisomère RIb(mA).

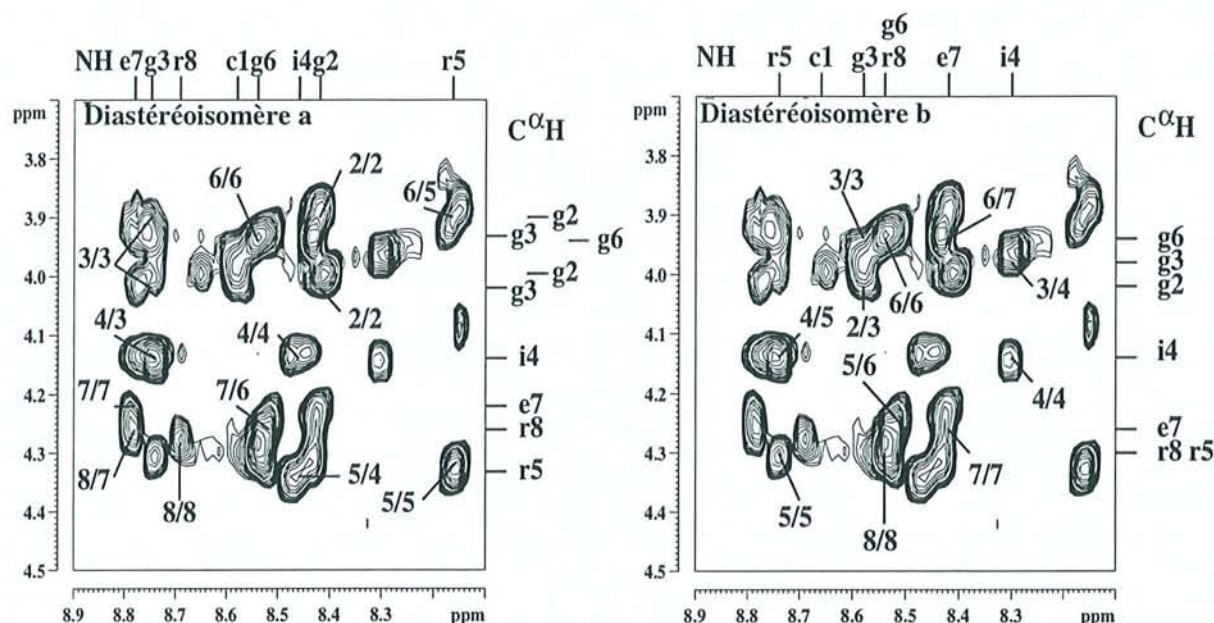


Figure III-5. Région $C^{\alpha}H$ -NH de la carte de TR-NOESY du peptide RI(mA). Les corrélations NOE correspondant au diastéréoisomère a sont indiquées sur la figure de gauche, celles correspondant au diastéréoisomère b sont indiquées sur celle de droite.

Les déplacements chimiques issus de l'attribution séquentielle des cartes de TR-NOESY des divers composés sont rassemblés dans le tableau III-1 et les corrélations NOE identifiées sont résumées sur la figure II-6.

En l'absence d'anticorps, un peptide de petite taille en solution aqueuse présente très peu de corrélations NOE, avec une intensité positive qui traduit bien un échange rapide entre les différentes conformations. Seules quelques faibles connectivités ROE sont observées pour des temps de mélange longs ($\tau_m \geq 500$ ms). L'observation de corrélations croisées d'intensité négative dans les expériences de TR-NOESY pour L(A), L(G), RI(mA) et RI(mG), en présence d'anticorps, est la preuve de l'existence d'une interaction antigène/anticorps et confirme l'induction d'une conformation plus contrainte. Comme le dérivé L(a) n'est pas reconnu par l'anticorps monoclonal 4x11, on constate l'absence totale de corrélations dans son spectre TR-NOESY en présence de l'anticorps.

Peptides		L(A)	L(G)	RI(mG)	RIa(mA)	RIb(mA)
Cys ₁	NH			8.58	8.59	8.65
	α	4.14	4.13	4.66	4.66	4.70
	β	3.22, 3.06	3.23, 3.07	3.26, 2.95	3.27, 2.96	3.30, 2.99
Gly ₂	NH	ND	ND	8.42	8.43	ND
	α	4.00	4.01	4.00	4.00, 3.90	4.02
Gly ₃	NH	8.57	8.59	8.75	8.77	8.59
	α	3.95	3.96	4.00, 3.90	4.02, 3.92	3.96
Ile ₄	NH	8.31	8.30	8.43	8.47	8.31
	α	4.14	4.15	4.14	4.14	4.14
	β	1.84	1.85	1.86	1.86	1.85
	γ	1.43, 1.17	1.44, 1.18	1.37, 1.20	1.48, 1.21	1.50, 1.18
	δ	0.88	0.88	0.91	0.91	0.89
Arg ₅	δ	0.84	0.84	0.85	0.87	0.87
	NH	8.73	8.73	8.11	8.17	8.74
	α	4.28	4.30	4.34	4.34	4.31
	β	1.84, 1.77	1.86, 1.79	1.82, 1.76	1.82, 1.76	1.86, 1.80
	γ	1.62	1.64	1.60	1.60	1.64
	δ	3.17	3.20	3.16	3.18	3.18
	N ^ε H	7.34	7.37	7.34	7.33	7.35
Gly ₆	N ^η H ₂	6.95, 6.51	6.96, 6.52	6.97, 6.53		
	NH	8.54	8.52	8.49	8.52	8.52
	α	3.92	3.96	3.90	3.94	3.96
Glu ₇	NH	8.44	8.49	8.80	8.78	8.44
	α	4.27	4.26	4.20	4.23	4.28
	β	2.03, 1.92	2.06, 1.95	2.08, 1.96	2.08, 1.96	2.05, 1.93
Arg ₈	γ	2.24	2.27	2.28	2.28	2.28, 2.25
	NH	8.53	8.60	8.82	8.69	8.53
	α	4.32	4.36	4.25	4.29	4.34
	β	1.86, 1.74	1.92, 1.78	1.90, 1.78	1.92, 1.78	1.88, 1.76
	γ	1.74, 1.64	1.78, 1.65	1.78, 1.66	1.78, 1.65	1.76, 1.65
	δ	3.18	3.20	3.20	3.18	3.18
	N ^ε H	7.28	7.31	7.34	7.38	7.29
Ala ₉ /Gly ₉ mA ₉	N ^η H ₂	6.95, 6.51	6.96, 6.52	6.97, 6.53		
	NH	8.17	8.14			
	α	4.08	3.74	3.37	3.40	3.34
	β	1.31			1.30	1.30

Tableau III-1. Valeurs des déplacements chimiques δ (ppm) des nonapeptides étudiés en présence de l'anticorps monoclonal 4x11 (pH=7, 4°C, H₂O/D₂O 95/5 v/v).

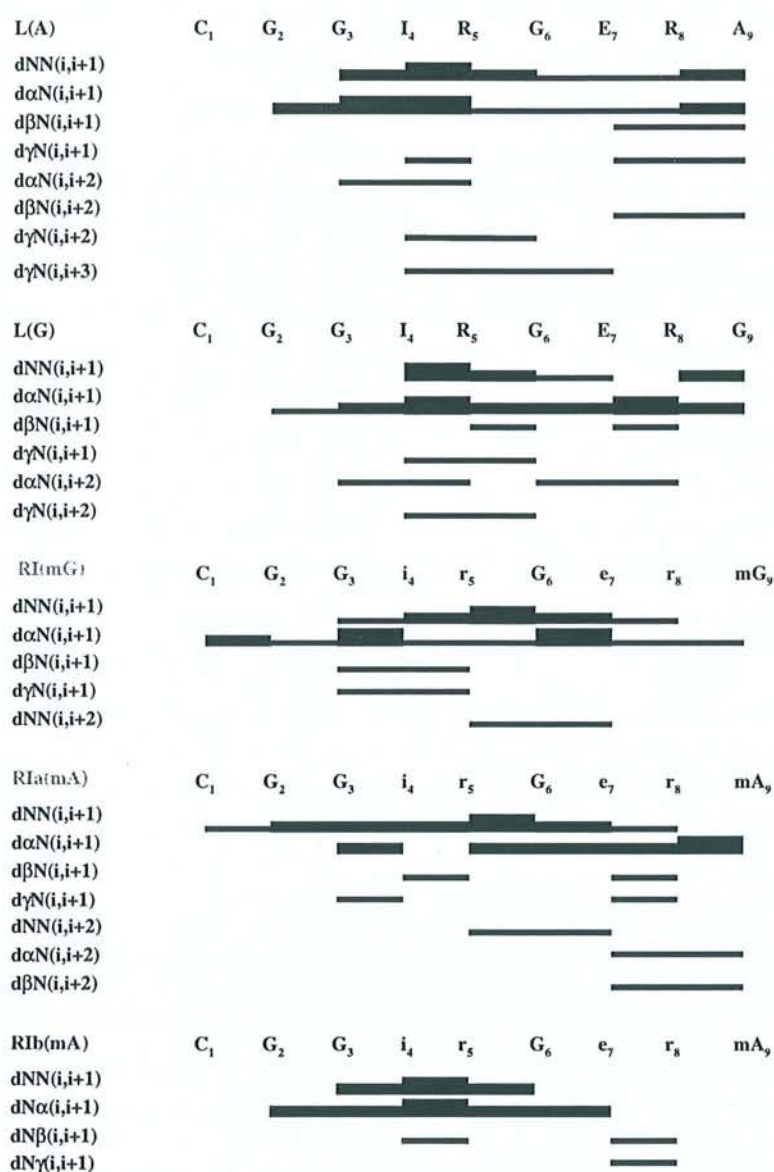


Figure III-6. Représentation, en fonction de leur intensité relative, des corrélations croisées pour les différents analogues. L'intensité est proportionnelle à l'épaisseur des traits.

A l'examen des schémas de corrélations NOE (Figure III-6), l'absence de corrélations successives $\alpha\text{N}(i, i+1)$ intenses, simultanément avec des corrélations $\text{NN}(i, i+1)$ de faible intensité d'une part, et l'absence de corrélations $\alpha\text{N}(i, i+2)$, $\text{NN}(i, i+2)$, $\alpha\text{N}(i, i+3)$ et $\beta\text{N}(i, i+3)$ sur plusieurs résidus consécutifs d'autre part, semblent indiquer que la conformation adoptée par les peptides examinés n'est ni étirée, ni en hélice.¹⁹

Au contraire, la distribution des corrélations $\alpha N(i, i+1)$ et $NN(i, i+1)$, et la présence de quelques corrélations $\alpha N(i, i+2)$, $NN(i, i+2)$ et $\beta N(i, i+2)$ sont compatibles avec l'existence d'une structure repliée.

Les caractéristiques spectrales des peptides L(A) et L(G) sont très similaires, montrant que les conformations adoptées par ces deux peptides sont très proches l'une de l'autre.

La présence simultanée d'une corrélation TR-NOE intense de type $NN(i, i+1)$ et d'une autre de faible intensité de type $\alpha N(i, i+2)$, notamment les connectivités $NN(I_4, R_5)$ et $\alpha N(G_3, R_5)$, permet de suggérer la présence d'une forme repliée pour la séquence $G_2G_3L_4R_5$.

Au contraire, les spectres des dérivés rétro-inverso sont très différents de ceux de leurs peptides parents. La présence d'une corrélation intense de type $NN(i, i+1)$, couplée à la présence d'une autre corrélation faible de type $\alpha N(i, i+2)$, notamment les connectivités $NN(r_5, g_6)$ et $\alpha N(r_5, e_7)$, permet de proposer la présence d'une forme repliée pour la séquence $r_5G_6e_7r_8$.

Seules quelques connectivités ont été recueillies pour le diastéréoisomère b du peptide RI(mA), en raison de sa faible reconnaissance par l'anticorps 4x11, ou du recouvrement partiel des signaux NH avec ceux du diastéréoisomère a. En particulier, la nature des corrélations observée est assez inhabituelle, à savoir $N\alpha(i, i+1)$, $N\beta(i, i+1)$, et $N\gamma(i, i+1)$ au lieu des corrélations conventionnelles $\alpha N(i, i+1)$ et $\beta N(i, i+1)$. La distribution de ces corrélations est similaire à celles des peptides parents L(A) et L(G) mais incompatible avec une analyse structurale classique. Ces résultats ne seront pas pris en compte dans les calculs de modélisation moléculaire.

Les protons amides sont les plus sensibles. L'écart entre les déplacements chimiques NH des peptides analogues avec ceux du peptide parent est résumé sur la figure III-7. Les perturbations conformationnelles entre les différents analogues et le peptide parent peuvent être appréciées grâce à la différence relative de leurs déplacements chimiques, qui traduit généralement une différence d'environnement magnétique du proton examiné.

Les différences sont minimales entre les deux peptides parent L(A) et L(G) (Figure III-7.a). Cela est également vrai pour l'analogue L(a) sauf en ce qui concerne le résidu terminal a_9 (Figure III-7.b), qui comporte une différence de déplacements chimiques de 0.25ppm.

Ces observations semblent indiquer la conservation de la structuration de L(a) par rapport à celle de L(A) mais l'orientation du groupe méthyle de a_9 semble incompatible avec une bonne reconnaissance, ce qui expliquerait la non réactivité de ce peptide.¹⁰

Les deux dérivés rétro-inverso RI(mG) et RIa(mA) sont perturbés de la même façon par rapport au peptide L(A), notamment concernant les résidus G_3 , i_4 , e_7 et r_8 (différence de 0.1 à 0.4ppm) (Figure III-7.c et III-7.d). Le résidu r_5 semble être le résidu le plus perturbé, avec une différence de 0.6ppm. Ce dernier semble jouer un rôle clé dans la structuration des peptides L et RI.

L'isomère RIa(mA) semble adopter la même structuration que l'analogue RI(mG) (Figure III-7.f) alors que l'environnement des NH de l'isomère RIb(mA) est similaire à celui des NH du peptide L(A) (Figure III-7.f).

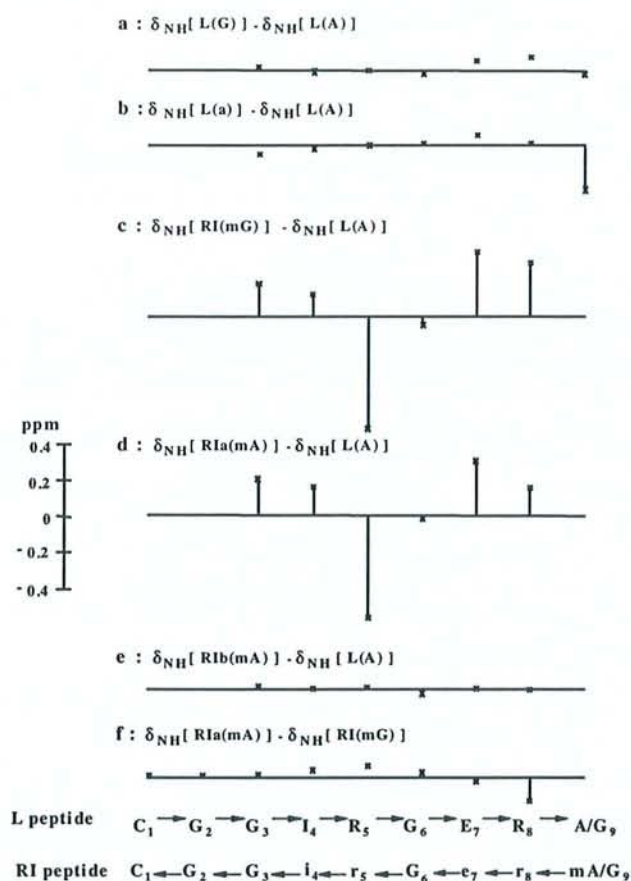


Figure III-7. Perturbations des déplacements chimiques des protons amides des analogues considérés par rapport au peptide L(A) (a-e) ou au peptide RI(mG) (f).

c. Résultats des calculs de modélisation moléculaire

Les peptides étudiés sont exactement les mêmes que ceux utilisés dans les tests d'immunochimie (ELISA et BIAcore). Seules les concentrations sont très différentes.

Le protocole décrit précédemment a été appliqué à chaque peptide.

Pour le peptide RI(mA), les signaux RMN ont été attribués pour chacun des diastéréoisomères présents. Les contraintes concernant l'isomère b n'étaient pas suffisantes pour obtenir un modèle valide. Nous avons mené deux calculs parallèles avec soit l'énantiomère R de l'acide malonique, soit l'énantiomère S.

Les structures de plus basse énergie issues des calculs de modélisation, pour chaque analogue, sont présentées sur la figure III-8.

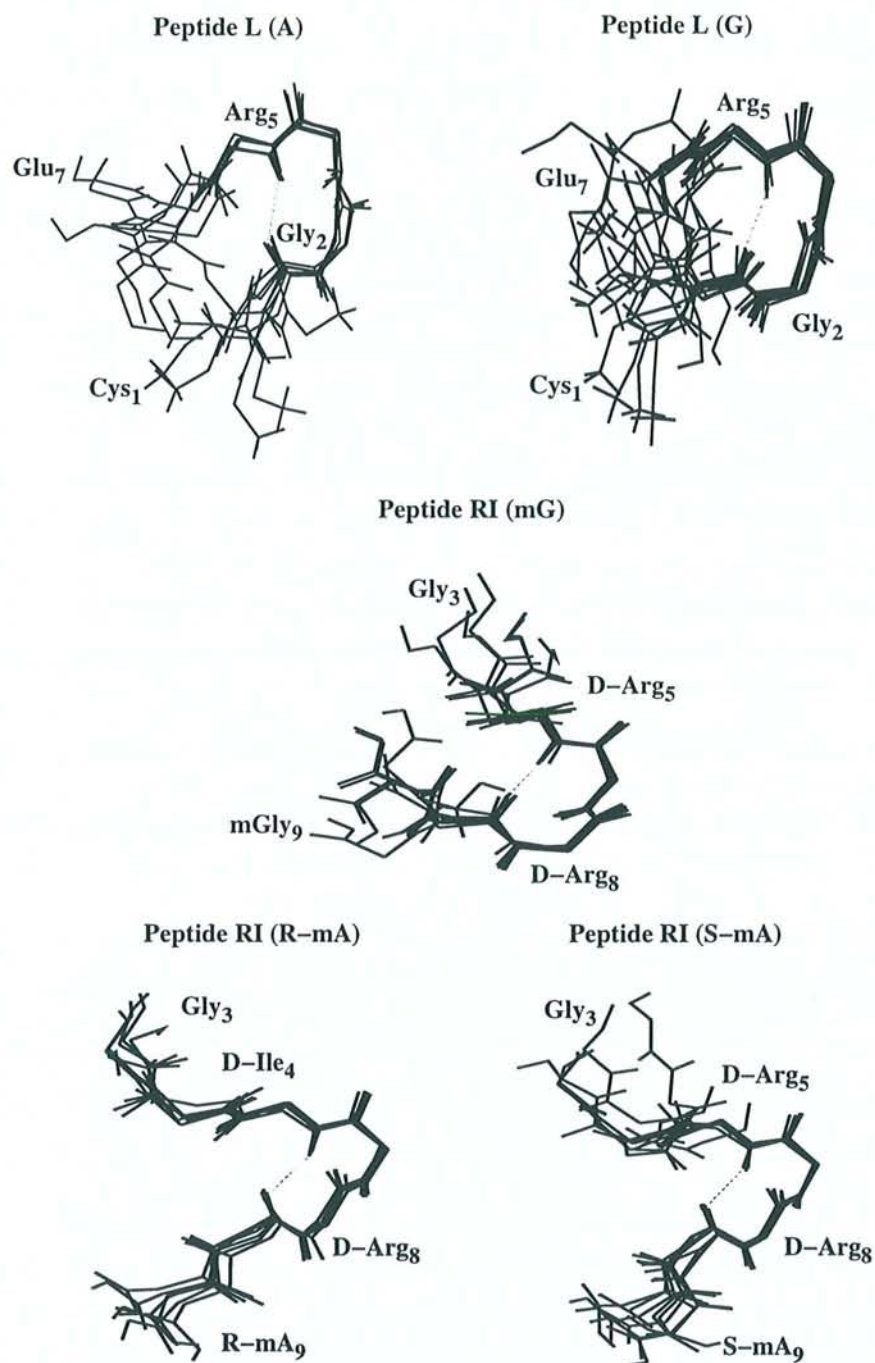


Figure III-8. Superposition des structures de plus basse énergie des différents analogues étudiés.

Le tableau III-2 résume les valeurs des angles dièdres ϕ , ψ et χ_1 des structures moyennes obtenues à partir des meilleures structures issues de la modélisation.

Résidu	Angle	L(A)	L(G)	RI(mG)	RIa(mA ^R)	RIa(mA ^S)
Cys ₁	ϕ			113±64	100±62	126±31
	ψ	117±73	116±52			
	χ_1	168±82	-99±76	178±46	161±92	168±91
Gly ₂	ϕ	-174±81	-172±28	173±13	-133±92	-164±77
	ψ	-56±95	-148±73	52±101	106±104	115±84
Gly ₃	ϕ	69±10	74±10	-87±72	-127±78	-162±64
	ψ	-130±30	-101±17	21±32	-69±105	-70±103
Ile ₄	ϕ	-90±32	-97±32	91±13	99±34	92±22
	ψ	6±23	-3±17	44±70	-12±67	-19±60
	χ_1	105±78	175±94	79±77	-88±95	55±99
Arg ₅	ϕ	-157±5	-154±4	145±5	135±8	129±20
	ψ	154±78	101±57	-91±8	-86±3	-70±60
	χ_1	-172±66	-130±89	152±80	123±57	137±56
Gly ₆	ϕ	-117±38	151±86	81±4	82±3	79±7
	ψ	77±16	157±73	18±7	18±5	15±9
Glu ₇	ϕ	-159±2	-157±2	50±5	51±2	53±4
	ψ	132±83	115±92	42±4	41±4	41±4
	χ_1	164±65	-171±52	153±95	-105±99	113±105
Arg ₈	ϕ	-158±4	-156±3	86±31	105±15	96±6
	ψ	95±70	94±51	72±34	-93±6	-74±14
	χ_1	130±93	-149±46	123±55	96±58	166±89
Ala ₉ /Gly ₉ / mA ₉ /mG ₉	ϕ	-178±69	175±68			
	ψ				-110±5	-71±112
	χ_1	164±82			117±65	63±91

Tableau III-2. Valeurs moyennes des angles dièdres des nonapeptides étudiés.

On peut remarquer le caractère flexible de certaines parties des molécules conduisant à des déviations importantes.

i. Structure des peptides L

La superposition des positions des atomes du squelette peptidique des meilleures structures issues des calculs de recuit simulé, sur le fragment $G_2G_3I_4R_5$ donne une déviation (*rmsd*) de $0.59\text{\AA}\pm 0.19\text{\AA}$ pour le peptide L(A) et un *rmsd* de $0.66\text{\AA}\pm 0.25\text{\AA}$ pour le peptide L(G) (Figure III-8). Les deux extrémités N et C-terminales apparaissent comme assez flexibles.

La présence simultanée de corrélations TR-NOE intenses $NN(I_4, R_5)$ et $\alpha N(G_3, I_4)$, couplée à la présence d'une connectivité faible $\alpha N(G_3, R_5)$ suggère la présence d'un repliement β autour de la séquence $G_2G_3I_4R_5$, stabilisé par une liaison hydrogène entre R_5-NH et G_2-CO . Cela est confirmé par les valeurs des angles (ϕ_3, ψ_3) et (ϕ_4, ψ_4) , caractéristiques de la présence d'un repliement β de type II'(Tableau III-2).

La comparaison des deux peptides permet de mettre en évidence deux régions bien définies: la région $G_2G_3I_4R_5$ avec un *rmsd* de $0.80\text{\AA}$ sur le squelette peptidique et la région $G_6E_7R_8A_9(G_9)$ avec un *rmsd* de $0.7\text{\AA}$, suggérant que leurs structures 3D sont très similaires (Figure III-8). Cette observation est corroborée par la très faible variation des déplacements chimiques des protons amides entre les deux peptides L (Figure III-7).

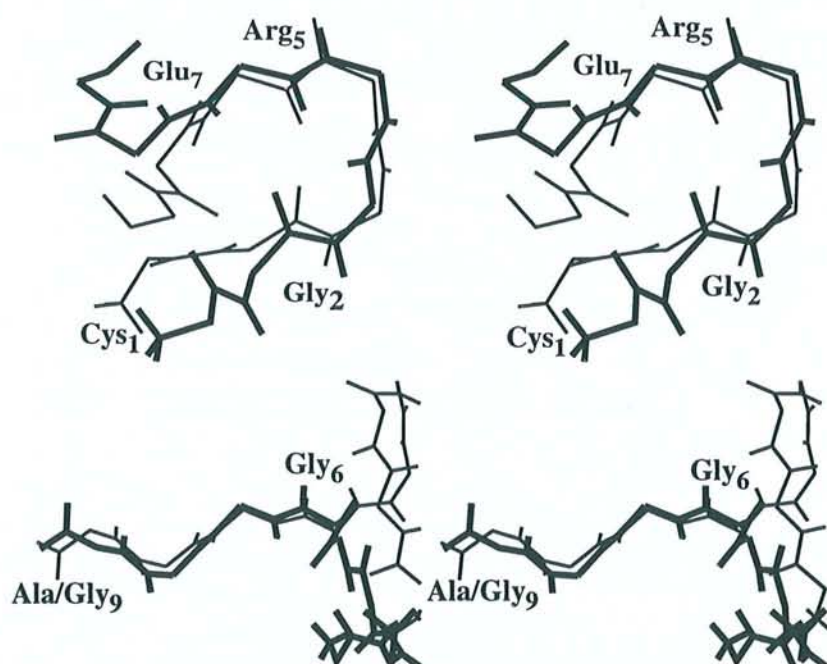


Figure III-9. Superposition des structures moyennes de L(A) (traits gras) et L(G) (traits fins) sur le fragment G_2-R_5 (en haut) et sur le fragment $G_6-A_9(G_9)$ en bas.

ii. Structure des peptides RI

La superposition sur la position des atomes du squelette peptidique des meilleures structures issues des calculs de recuit simulé, sur le fragment $i_4r_5g_6e_7r_8$ donne un *rmsd* de $0.29\text{\AA}\pm 0.10\text{\AA}$ pour le peptide RIa(R-mA), un *rmsd* de $0.54\text{\AA}\pm 0.27\text{\AA}$ pour le peptide RIa(S-mA), et un *rmsd* de $0.30\text{\AA}\pm 0.13\text{\AA}$ pour le peptide RI(mG) (Figure III-8).

La structure des peptides RI semble être globalement plus rigide que celle des peptides parent. On constate une certaine flexibilité dans les deux régions C et N-terminales, observée également pour les peptides L.

La présence d'une corrélation TR-NOE intense $NN(r_5, g_6)$, couplée à la présence d'une connectivité faible $\alpha N(r_5, e_7)$ suggère la présence d'un repliement β autour de la séquence $r_5g_6e_7r_8$, stabilisé par une liaison hydrogène entre $r_5\text{-NH}$ et $r_8\text{-CO}$. Cela est confirmé par les valeurs des angles (ϕ_7, ψ_7) et (ϕ_6, ψ_6) , caractéristiques de la présence d'un repliement β de type I (Tableau III-2).

La figure III-10 montre la superposition des peptides RIa(R-mA) et RIa(S-mA) avec le peptide RI(mG). La superposition sur le fragment $i_4r_5g_6e_7r_8$ est meilleure avec l'analogue RIa(R-mA) (*rmsd* sur la position des atomes du squelette peptidique de $0.5\text{\AA}$) que pour l'analogue RIa(S-mA) (*rmsd* la position des atomes du squelette peptidique de $1\text{\AA}$).

D'autre part, les calculs de modélisation montrent une flexibilité conformationnelle accrue de l'extrémité N-terminale dans sa configuration S. En tenant compte de ce résultat, nous avons attribué la configuration S du résidu malonate au composé RIb(mA), et la configuration R est attribuée au composé RIa(mA).

Les corrélations observées pour le diastéréoisomère RIb(mA) sont très similaires à celles observées pour les peptides L, ce qui semble suggérer que ce dernier pourrait adopter une structure topologiquement équivalente aux peptides L.

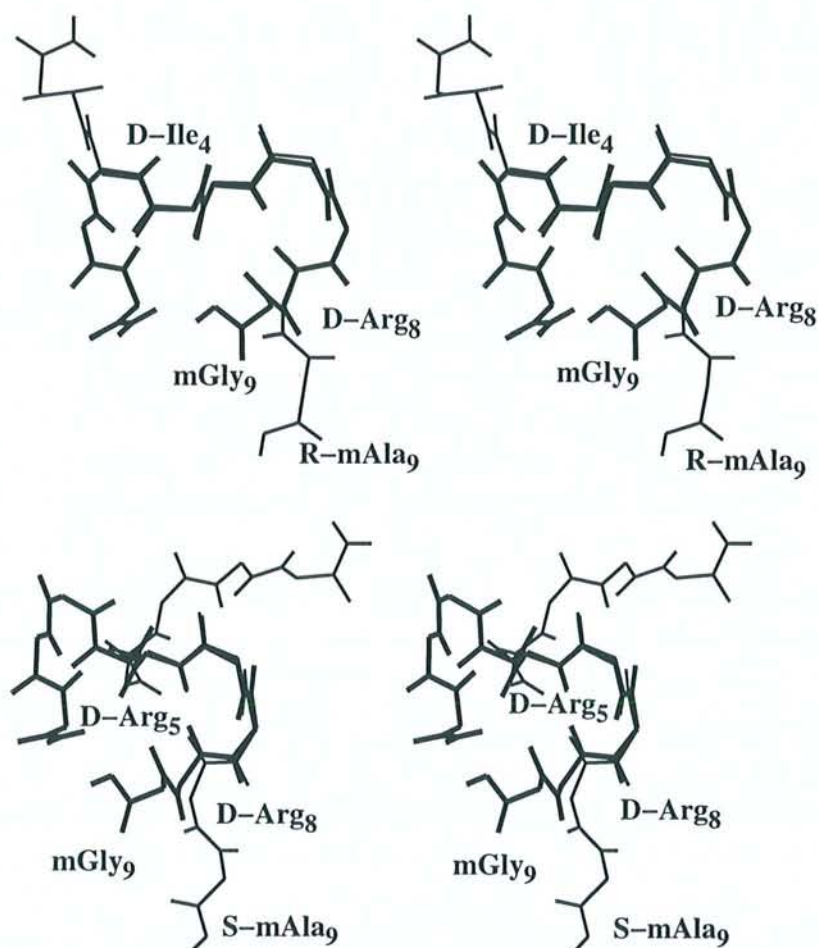


Figure III-10. Superposition des structures moyennes de RI(mG) (traits gras) et RI(mA) (traits fins).

En haut: superposition avec le diastéréoisomère RI(R-mA) sur le fragment i₄-r₈.

En bas: superposition avec le diastéréoisomère RI(S-mA) sur le fragment r₅-r₈.

iii. Comparaison des peptides L et des peptides RI

Les tests biologiques ont montré que les anticorps induits contre L(A) pouvaient réagir de manière croisée, et ceci de façon plus ou moins intense, aussi bien avec les peptides L(A) et RI(mA) qu'avec la protéine entière H3.^{3,4}

La nécessité de synthétiser les peptides L(G) et RI(mG) pour les études de RMN et de modélisation moléculaire nous a conduit à évaluer également l'affinité de ces deux dérivés vis-à-vis de l'anticorps monoclonal 4x11.

Les constantes d'affinité k_a et k_d et la constante à l'équilibre K_a des quatre analogues vis-à-vis de l'anticorps monoclonal 4x11 sont résumées dans le tableau III-3.

Les constantes d'association k_a et de dissociation k_d sont les valeurs moyennes obtenues à partir de deux à quatre mesures indépendantes.

Peptides	$k_a \times 10^{-3}$ $M^{-1}.s^{-1}$	$k_d \times 10^5$ s^{-1}	$K_a \times 10^{-6}$ M^{-1}	Etude
Peptides L				
L(A)	3 ± 0.2	100 ± 0.3	3	référence ⁴
L(G)	25 ± 0.3	350 ± 0.2	7	Notre étude
L(a)	-			référence ⁴
Histone H3	137 ± 0.2	6 ± 0.4	2280	référence ⁴
Peptides RI				
RI(mA)	18 ± 0.5	8 ± 0.2	225	référence ⁴
RI(mG)	354 ± 1.6	18 ± 1.9	1900	Notre étude

Tableau III-3. Constantes d'affinité k_a et k_d et constante à l'équilibre K_a des nonapeptides étudiés vis-à-vis de l'anticorps monoclonal 4x11 à 25°C.

Les constantes d'association à l'équilibre (K_a) mesurées pour les peptides naturels L(A) et L(G) sont respectivement de 3 et $7 \times 10^{-6} M^{-1}$ alors que celles mesurées pour leurs dérivés rétro-inverso sont significativement plus élevées (225 et $1900 \times 10^{-6} M^{-1}$), c'est-à-dire 75 et 275 fois plus élevées par rapport à celles mesurées vis-à-vis des peptides parents respectifs, et presque équivalente avec le dérive RI(mG) à celle mesurée pour l'histone complète H3 ($K_a = 2280 \times 10^{-6} M^{-1}$). Il faut noter que la valeur de K_a pour RI(mG) est 8 fois plus importante que celle de l'analogue RI(mA).

Nous avons vu que ce dernier se présentait sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, dont l'un se comportait structuralement comme RI(mG), et l'autre comme les peptides naturels. Par conséquent, la valeur mesurée pour RI(mA) est une valeur moyenne et est donc naturellement inférieure à celle mesurée pour RI(mG).

Les calculs de dynamique moléculaire ont montré que les éléments de structuration observés pour les peptides parents et les peptides rétro-inverso étaient sensiblement différents.

Un repliement β de type II' est impliqué pour les peptides L dans la région N-terminale $G_2G_3L_4R_5$, tandis qu'un repliement β de type I' est impliqué pour les peptides RI dans la région $r_5g_6e_7r_8$.

Dans le cas des peptides L, le repliement β implique les résidus G_2G_3 , qui ne font pas partie de l'épitope et ont été rajoutés pour permettre la fixation à la résine dans les tests BIAcore. Nous pensons que cette forme repliée n'est pas favorable pour la reconnaissance par les anticorps parce que la partie restante du peptide est rendue très mobile en raison de la proximité du repliement et se retrouve plaquée contre la résine. Au contraire, dans les peptides rétro-inverso, le repliement implique les quatre résidus centraux de l'épitope hexapeptidique et est présenté librement aux anticorps par le lien CGG, ce qui pourrait expliquer la plus forte affinité des analogues rétro-inverso. En dépit de cette différence, les peptides L demeurent reconnus.

Dans une étude précédente, il a été montré que la substitution des résidus E_7 , R_8 et A_9 par leurs énantiomères D altérerait de façon conséquente l'antigénicité des peptides résultants tandis que la substitution de $L-R_5$ par un résidu L-Lys ou D-Ala ne modifiait ni l'antigénicité ni l'immunogénicité des peptides modifiés.¹⁰

Par conséquent, les résidus terminaux E_7 , R_8 et A_9 sont primordiaux dans la reconnaissance par les anticorps.

Dans le but de trouver une explication plausible d'un point de vue structural entre les peptides parents et leurs analogues RI sur la reconnaissance croisée de l'anticorps monoclonal 4x11 induit contre le peptide parent L(A) vis-à-vis des analogues pseudopeptidiques RI (RI(mA) et RI(mG)), nous avons superposé la séquence $G_6E_7R_8A_9$ du peptide parent avec la séquence équivalente de son analogue RI(mA). Cette superposition a montré que les chaînes latérales indispensables à la reconnaissance du peptide sont orientées dans le même sens (Figure III-11), expliquant la reconnaissance croisée du peptide parent et des analogues RI vis-à-vis de l'anticorps monoclonal 4x11. De plus, on remarque également que les chaînes latérales de ces résidus essentiels sont moins flexibles dans le cas du peptide RIa(mA) que dans le cas du peptide parent L(A), ce qui dénote certainement une meilleure fixation dans le site de liaison de l'anticorps.

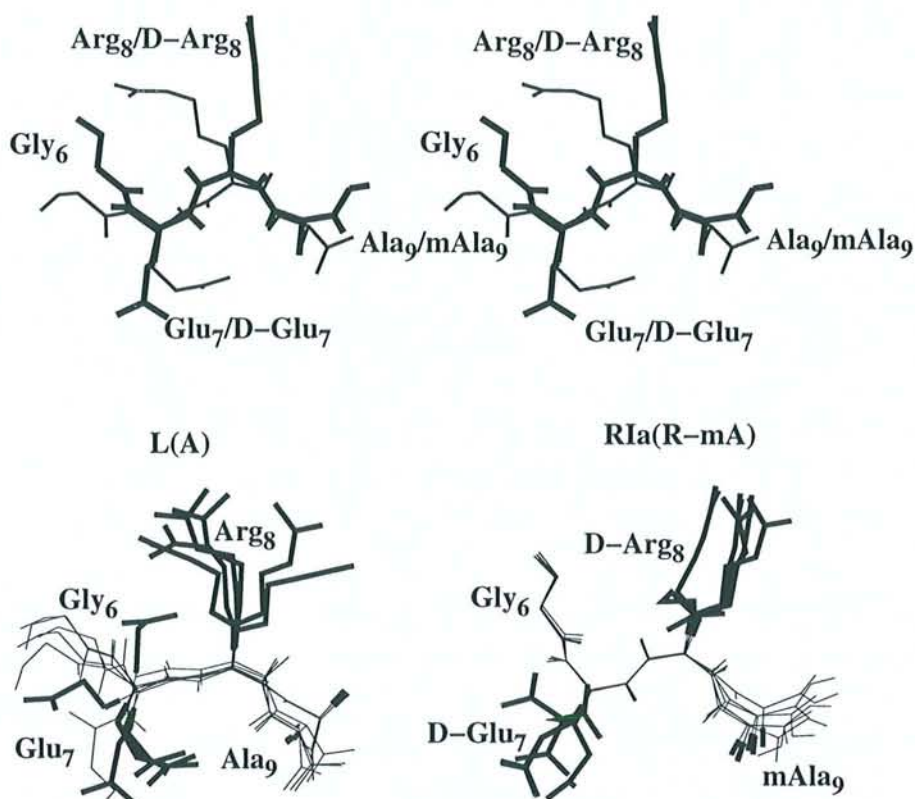


Figure III-11.

En haut: Vues stéréo de la superposition des structures moyennes de L(A) (traits gras) et RIa(R-mA) (traits fins).

En bas: Superposition des meilleures structures de L(A) et RIa(R-mA) au niveau du fragment G₆-A₉(mA₉). Les chaînes latérales sont représentées en traits gras.

d. Conclusion

Il a largement été démontré qu'un grand nombre de peptides en interaction avec des anticorps adoptaient des repliements β , ce qui constituerait un motif structural essentiel dans la reconnaissance par les anticorps.²⁰ Par ce mode de structuration, on pourrait obtenir une présentation adéquate des chaînes latérales essentielles à la reconnaissance par les anticorps. Dans la présente étude, nous avons montré que les peptides L et RI de la séquence IRGERA adoptent une structure repliée au contact de l'anticorps monoclonal 4x11. Cependant, leur mode de repliement β implique des régions différentes dans les deux séries de peptides.

Un repliement β de type II' est observé pour les peptides L dans la partie N-terminale $G_2G_3L_4R_5$ de la molécule. Cependant les deux résidus GG ne font pas partie de l'épitope. A notre avis, ce repliement n'est probablement pas indispensable à la reconnaissance. Au contraire, les peptides RI adoptent un repliement β de type I', impliquant les quatre résidus $r_5G_6e_7r_8$ de l'épitope. La forte affinité vis-à-vis de l'anticorps monoclonal 4x11, observée avec les peptides rétro-inverso, voire proche de celle de l'histone H3, montre que les peptides rétro-inverso sont capables de mimer favorablement le site antigénique dans la protéine entière.

Les calculs de dynamique moléculaire ont montré que les chaînes latérales des résidus essentiels Glu₇, Arg₈ et Ala₉(mA₉) conservaient la même orientation par rapport au squelette peptidique, ce qui pourrait être une explication de l'activité antigénique croisée observée entre les peptides parents et rétro-inverso. D'autre part, les simulations suggèrent que l'acide malonique de configuration R, qui mime le résidu N-terminal D-Ala, devrait être attribué au peptide RIa(mA), qui est le diastéréoisomère ayant la plus grande constante d'affinité K_a .

III.2. ETUDE DES INTERACTIONS ANTIGENE/ANTICORPS DANS LE CAS D'UNE MALADIE AUTO-IMMUNE: LA MYASTHENIE

Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (RACH) des muscles de mammifères et de l'organe électrique du poisson torpille est une glycoprotéine transmembranaire composée de cinq sous-unités homologues de stœchiométrie $\alpha_2\beta\gamma\delta$ et de masse moléculaire d'environ 250kDa.²¹ Il constitue un canal ionique pour le transfert de l'influx nerveux, commandé par la fixation de l'acétylcholine.

Il est la cible d'une maladie auto-immune chez l'homme, appelée myasthénie (MG pour *myasthenia gravis*). La myasthénie est une maladie de la jonction neuromusculaire due à la production d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur RACH.

Le RACH musculaire est l'auto-antigène principal dans la myasthénie. Les anticorps anti-RACH sont trouvés chez environ 85% des malades (patients séropositifs). Ils sont très spécifiques de la myasthénie.

Les auto-anticorps anti-RACH causent sa destruction et/ou son blocage fonctionnel, entraînant un manque de transmission neuromusculaire et une paralysie évolutive.²²⁻²⁴

Des anticorps monoclonaux anti-RACH ont été obtenus par induction de la myasthénie chez les rats. On a montré qu'environ 2/3 des anticorps anti-RACH issus de rats ou de malades sont principalement dirigés contre la région α 67-76 de la sous-unité α du RACH, appelée MIR (*main immunogenic region*, région immunogène majeure), région différente de celle où se fixe l'acétylcholine. Cependant, 10 à 15% des malades n'ont pas d'anticorps anti-RACH malgré un tableau clinique très comparable aux patients séropositifs et le taux des anticorps anti-RACH n'est pas corrélé à la sévérité de la maladie:²⁵ on parle alors de myasthénie séronégative (*seronegative myasthenia gravis SNMG*). Les anticorps anti-RACH sont très hétérogènes.²⁶ Ils n'ont probablement pas tous la même pathogénicité.²⁷ Il est aussi possible que d'autres facteurs viennent moduler l'effet des auto-anticorps.

Différentes études²⁸⁻³⁰ suggèrent que les patients atteints de myasthénie séronégative possèdent soit des anticorps de faible affinité qui interfèrent directement sur la fonction du récepteur RACH mais ne se lient pas directement à des récepteurs solubles, soit des anticorps qui affectent indirectement la fonction du récepteur en se liant à une autre cible de la membrane musculaire. Une possible implication de la phosphorylation du récepteur RACH dans les mécanismes de déclenchement de la MG séronégative a été suggérée.³¹

La phosphorylation des protéines est fondamentale dans la transduction du signal nerveux, elle est intimement impliquée dans la régulation de la fonction synaptique.³²

Dans le cas du récepteur RACH, elle est responsable de l'initiation de plusieurs effets: elle intervient dans l'assemblage sous forme de pentamère du RACH, dans l'inactivation du canal par le biais d'une régulation fonctionnelle, dans l'augmentation des récepteurs RACH et la médiation de son agrégation dans les membranes postsynaptiques.³³⁻³⁹

Le RACH peut être phosphorylé sur huit résidus cytoplasmiques (cinq résidus sérine et trois résidus tyrosine) par au moins trois protéines kinases. Les sous-unités γ et δ du RACH peuvent être phosphorylées par une protéine kinase cAMP-dépendante, les sous-unités α et δ par une protéine kinase C, et les sous-unités α , δ et γ par une tyrosine kinase endogène non identifiée.⁴⁰

Tous les sites de phosphorylation identifiés du RACH sont localisés dans le domaine cytoplasmique de chaque sous-unité.⁴⁰⁻⁴² Les trois sites de phosphorylation de la tyrosine du poisson torpille sont situés sur les résidus β Tyr355, γ Tyr364 et δ Tyr372.⁴³

La phosphorylation des tyrosines du RACH semble être impliquée dans au moins deux phénomènes. Il a été montré que la phosphorylation de la tyrosine du RACH du poisson torpille régule son taux de désensibilisation^(a).³⁴ Les sous-unités spécifiques impliquées dans le mécanisme ne sont pas encore bien connues.

Il a également été suggéré que la phosphorylation de la tyrosine de la sous-unité β jouerait un rôle important en régulant la distribution des récepteurs RACH sur la membrane. Elle semble directement impliquée dans l'agrégation du récepteur RACH et permettrait l'immobilisation des récepteurs.³⁶

Dans le but de comprendre le rôle de la phosphorylation de la tyrosine dans le mécanisme du récepteur RACH, différents anticorps anti-RACH dirigés spécifiquement contre les sites de phosphorylation de trois tyrosine du RACH, localisées dans les sous-unités β , γ et δ ont été caractérisés. Plus spécifiquement, les épitopes reconnus par 15 anticorps monoclonaux dirigés contre la partie cytoplasmique de la sous-unité β ont été localisés par l'utilisation de peptides synthétiques.⁴⁴ (Figure III-12)

La plupart de ces anticorps se lient à un octapeptide très immunogène de la sous-unité β du RACH du poisson torpille β 352-359, appelé VICE β (Very Immunogenic Cytoplasmic Epitope) et qui contient le résidu β Tyr355. Chacun des résidus compris entre β 352 et β 359 apparaissent comme indispensables à la reconnaissance par l'anticorps. Pour quelques résidus (Glu354, Ile357 et Arg358), même des substitutions par des résidus équivalents abolissent la liaison à certains anticorps.

Des résultats similaires sont obtenus avec des fragments peptidiques du RACH humain, analogues du VICE β du poisson torpille.

^(a)Après une courte période d'activité, le récepteur portant le ligand devient inactif. Un arrêt rapide est une caractéristique de presque tous les systèmes de transduction du signal. Cette *désensibilisation* est réversible.

Les changements induits par le remplacement de l'atome d'hydrogène par un groupement phosphate sont évidents: les caractéristiques stériques, les charges, et la possibilité de former des liaisons hydrogène sont de ce fait altérés. Dans certains cas, ces données à elles seules sont suffisantes pour expliquer les différents effets observés.^{48,49}

Dans la majorité des mécanismes observés, la phosphorylation entraîne un changement conformationnel local.⁵⁰⁻⁵⁶

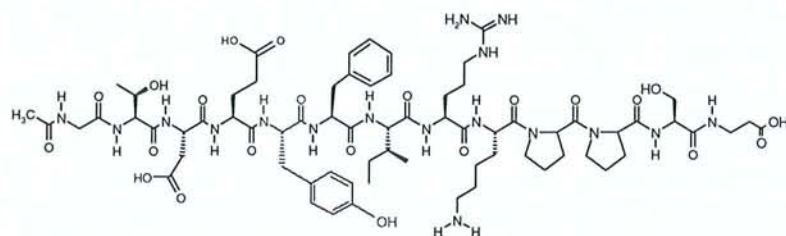
Différentes études ont été réalisées sur des peptides modèles par RMN ^1H , ^{31}P , ^{13}C et ^{15}N pour tenir compte de la phosphorylation, notamment du résidu tyrosine.⁵⁷⁻⁵⁹

Hoffmann et al.⁵⁷ ont montré entre autres que la phosphorylation du résidu tyrosine modifie très peu la valeur du pK_a du groupe phosphate ainsi que les déplacements chimiques des signaux ^{31}P , alors que les signaux ^1H du cycle aromatique subissent de grands changements. Tholey et al.⁵⁹ ont quant à eux montré que dans le cas de la tyrosine dans le modèle Gly-Ser-Tyr-Ser, une interaction intermoléculaire ne peut être possible qu'avec des résidus situés à grande distance, mais que le proton amide du résidu phosphorylé lui-même n'est pas positionné correctement pour une interaction stable. La présence d'un groupe électronégatif sur le cycle aromatique ne semble pas entraîner de changements structuraux directs.

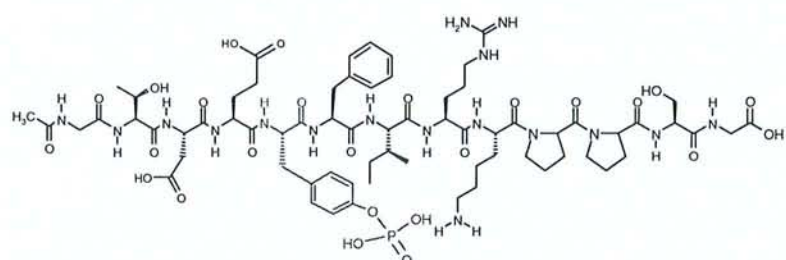
Le rôle de la phosphorylation de la tyrosine a été plus spécifiquement élucidé dans de nombreux systèmes biologiques⁶⁰⁻⁶⁵ mais aucune n'a été réalisée jusqu'ici dans le cas du récepteur de l'acétylcholine.

Nous proposons dans cette étude d'examiner par RMN le fragment β 363–374 du RACH humain sous ses deux formes phosphorylée et non phosphorylée, à l'état libre et au contact de l'anticorps monoclonal mAb148.

Par un souci de commodité, la position des résidus acides aminés dans le peptide sera numérotée selon le schéma de la figure III-13 et non pas entre 363-374.



CH₃CO G₁ T₂ D₃ E₄ Y₅ F₆ I₇ R₈ K₉ P₁₀ P₁₁ S₁₂ βA₁₃



CH₃CO G₁ T₂ D₃ E₄ Y₅(PO₃H₂) F₆ I₇ R₈ K₉ P₁₀ P₁₁ S₁₂ G₁₃

Figure III-13. Séquences des peptides phosphorylé et non phosphorylé.

III.2.1. Protocole utilisé pour l'étude des peptides

Pour chacun des peptides étudiés, nous avons suivi le même protocole opératoire qui est décrit ci-dessous.

a. RMN

Les solvants utilisés ont été le DMSO-d₆ (99.95% D) et l'eau, avec respectivement le tétraméthylsilane et le sel de triméthysilyl-3-propionate 2,2,3,3-d₄ de sodium comme référence interne.

La concentration des peptides libres a été fixée à 5 mM dans le DMSO-d₆.

Le rapport molaire peptide/anticorps dans H₂O/D₂O (95/5 v/v) à pH=7 (100mM de tampon phosphate contenant 0.2% d'azide de sodium) a été fixé à 50/1 (c'est-à-dire 5mM de peptide et 0.1mM d'anticorps) pour le peptide phosphorylé et 100/1 pour le peptide non phosphorylé.

Les expériences ¹H RMN ont été réalisées sur un spectromètre DRX 600MHz à 4°C et 23°C. Pour chaque peptide, nous avons réalisé une expérience TOCSY, avec un temps de mélange de $\tau_m=70\text{ms}$, et différentes expériences NOESY à des temps de mélange variables, ceci afin de sélectionner le temps de mélange optimal correspondant à une diffusion de spin minimale. 512 spectres, constituant la dimension F1, sont enregistrés sur 2048 points, sur une largeur spectrale de 6600Hz. La fréquence du signal de l'eau a été choisie comme fréquence porteuse (O₁). Pour toutes les expériences, la suppression du signal de l'eau a été réalisée en utilisant la séquence WATERGATE.¹¹

Les données de RMN sont traitées avec le logiciel XWIN-NMR.¹² Avant la transformée de Fourier, les interférogrammes sont multipliés par une fonction d'apodisation de type sinus carré déphasée de $\pi/4$ (Q4).

Les volumes des pics sont intégrés au temps de mélange $\tau_m=350\text{ms}$ (faible diffusion de spin pour les peptides étudiés), avec le logiciel XEASY¹³ et sont convertis en distance grâce au programme CALIBA¹⁴ de DYANA.¹⁵

En considérant que tous les noyaux en interaction ont le même temps de corrélation, nous avons estimé les distances interprotoniques à partir d'un pic croisé de deux protons séparés par une distance connue, par exemple la distance entre deux hydrogènes géminaux C ^{β} H₂ (1.78Å). Les corrélations NOE ont été divisées en trois classes selon leur intensité relative forte, moyenne et faible correspondant respectivement à des intervalles de distances 1.8-2.8 Å, 2.8-3.8 Å et 3.8-5.5Å. Dans le cas des paires de protons géminaux dont la stéréochimie n'a pas été déterminée (protons Gly- C ^{α} H₂ et protons C ^{β} H₂ des chaînes latérales), l'intervalle de distances a été majoré de $\pm 0.5\text{Å}$ pour compenser l'erreur possible due à l'introduction d'un pseudo-atome.

b. Modélisation moléculaire

Une procédure combinée de géométrie de distances (DGII) et de dynamique moléculaire (MD) a été utilisée pour déterminer les caractéristiques structurales des molécules étudiées.

Nous avons débuté avec des calculs de dynamique moléculaire selon la méthode du recuit simulé de DYANA¹⁵ pour générer des structures partiellement optimisées, qui seront ensuite améliorées par des calculs de simulation MD avec le logiciel DISCOVER.¹⁶

Les calculs ont été réalisés à partir d'une structure étendue, en utilisant la procédure standard de recuit simulé de DYANA,¹⁵ constituée de 10000 pas en partant d'une température de 8 unités pour décroître vers 0 unités (unités mesurées en unités de fonction cible, propres au programme).

Dans les cas de peptides de petite taille, les acides aminés de configuration L adoptent généralement des valeurs négatives pour l'angles Φ , nous avons contraint leur variation entre -10 et -170 .

Pour chaque calcul, nous avons généré 50 structures, vérifiant au mieux le jeu des contraintes imposées. Les 30 meilleures structures issues de DYANA (c'est-à-dire ayant la fonction cible la plus faible) sont ensuite soumises à un calcul de dynamique moléculaire en utilisant les contraintes estimées par RMN, avec le logiciel DISCOVER et en utilisant le champ de forces CVFF.

A cause de la disponibilité d'accès au logiciel DISCOVER, les calculs de simulation MD ont été effectués sous vide (*in vacuo*) et le solvant n'a pas été inclus dans le système. Dans le cas présent, pour éviter la surestimation des charges des groupements N et C-terminaux et des chaînes latérales chargées, les charges des chaînes latérales sont réduites de moitié alors que les groupements N et C-terminaux sont bloqués.

Une constante diélectrique dépendant de la distance, égale à $4r$ a été appliquée.

Les contraintes de distances ont été utilisées avec une constante de force $k=20$ Kcal/mol/Å.

Les calculs ont été effectués à partir d'un protocole de recuit simulé, qui implique l'exploration de tout l'espace conformationnel afin de trouver le minimum énergétique de la molécule.

Les différentes étapes de ce protocole sont les suivantes:

1. Une minimisation d'énergie préliminaire (300 pas de calculs avec la méthode du steepest descent, 300 pas de calculs avec la méthode du gradient conjugué et 300 pas de calculs avec la méthode de Newton-Raphston)
2. Une équilibration à 1000K par un calcul de dynamique moléculaire sous contraintes de 10ps, suivie de 4 cycles de 10ps au cours desquels les poids des constantes de force varient

3. 140ps de dynamique moléculaire sous contraintes à 1000K. Les structures sur les 40 dernières ps sont sauvegardées toutes les 2,5ps.
4. 2ps de dynamique appliquée à chaque structure et à chaque étape durant le refroidissement de 1000K à 300K.
5. Une minimisation finale (300 pas de calculs avec la méthode du steepest descent, 300 pas de calculs avec la méthode du gradient conjugué et 300 pas de calculs avec la méthode de Newton-Raphston)

Elles ont été appliquées à chaque structure de départ.

III.2.2. Etude du peptide non phosphorylé

a. Résultats de RMN

L'analyse combinée des spectres TOCSY et NOESY nous a permis d'attribuer l'ensemble des signaux protoniques du peptide non phosphorylé. Les spectres du peptide libre sont représentés sur la figure III-14. Ceux du peptide en présence de l'anticorps m148 sont représentés sur la figure III-15.

L'observation de nombreuses corrélations croisées confirme l'induction d'une conformation contrainte en présence de l'anticorps mAb148. D'autre part, on constate la présence de nombreuses corrélations correspondant aux protons des cycles des résidus tyrosine et phénylalanine, ce qui suggère que les chaînes latérales aromatiques de ces résidus sont fortement rigidifiées au contact de l'anticorps.

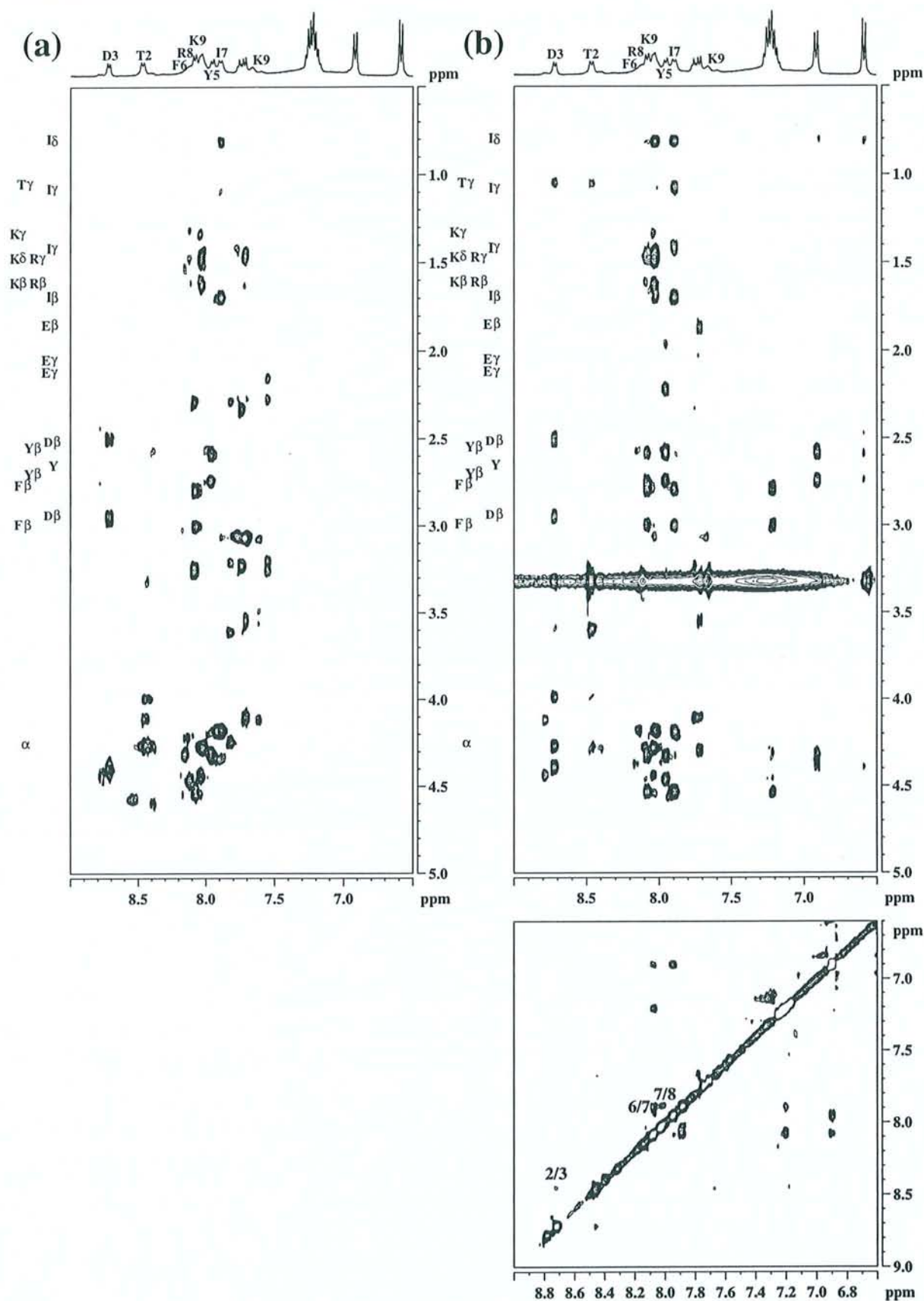


Figure III-14. Spectres du peptide non phosphorylé en solution dans le DMSO.

(a) TOCSY; (b) NOESY.

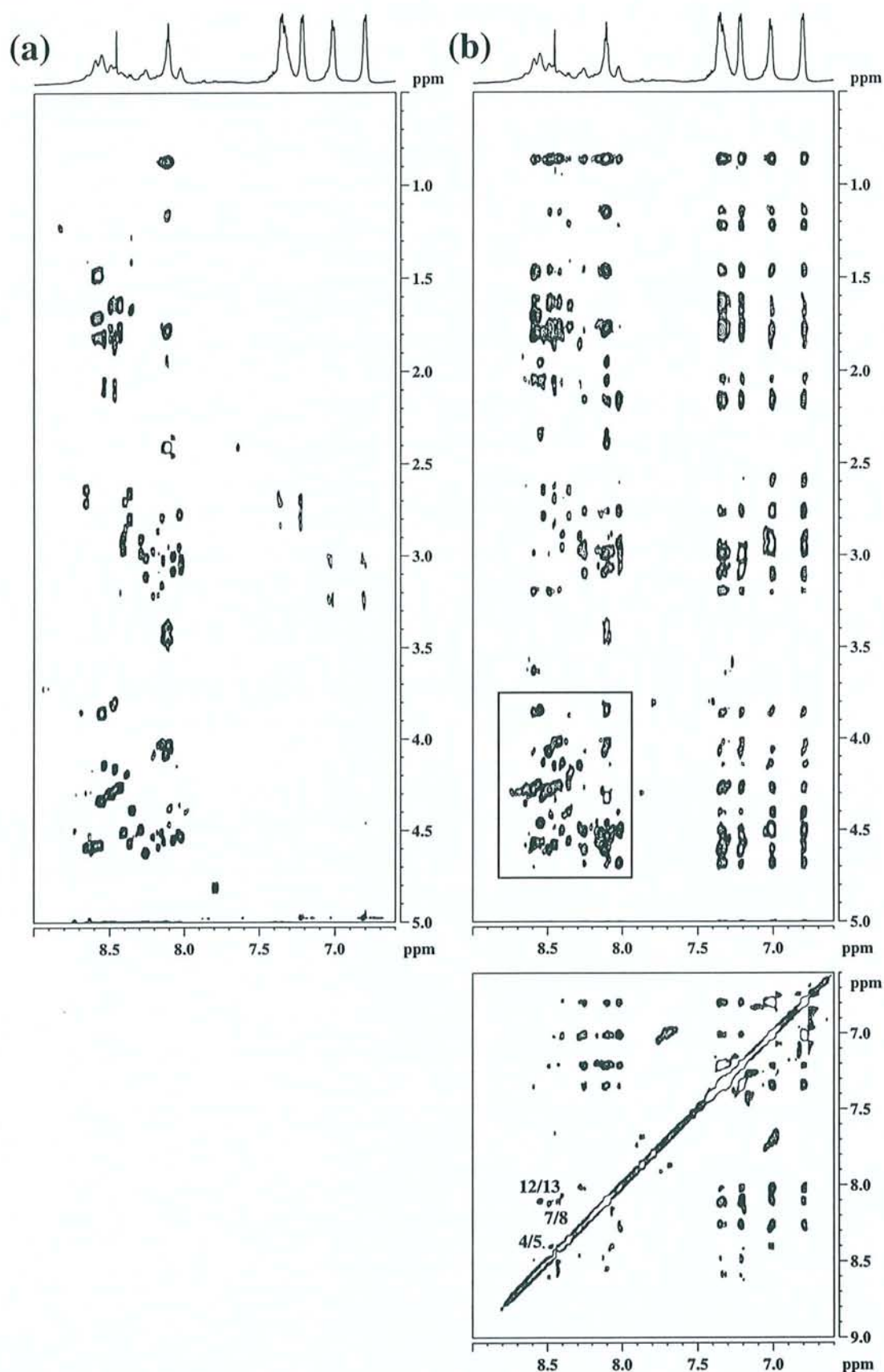


Figure III-15. Spectres du peptide non phosphorylé en solution dans H_2O/D_2O 95%/5% v/v, et en présence de l'anticorps mAb148.
(a) TOCSY; (b) NOESY.

En raison de la présence de deux résidus proline dans la partie C-terminale du peptide, une possible isomérisation *cis/trans* est à envisager. Pour le peptide à l'état libre dans le DMSO, on observe sur le spectre TOCSY (Figure III-16(a)) un dédoublement des pics concernant le résidu proline P₁₁, ce qui suggère un équilibre entre une forme *trans* et une forme *cis*, dans un rapport 80/20 respectivement. Sur le spectre NOESY (Figure III-16(b)), seules les corrélations $\alpha\delta(K_9, P_{10})$ sont observées, ce qui confirme la seule position *trans* entre les résidus K₉ et P₁₀. D'autre part, des corrélations $\alpha\delta(P_{10}, P_{11})$ majoritaires sont également observées, impliquant que la forme *trans* entre les résidus P₁₀ et P₁₁ est prédominante. Les corrélations $\alpha\alpha(P_{10}, P_{11})$, associées à la disposition *cis*, ne sont pas observées mais cela peut s'expliquer par la très faible proportion de ce conformère.

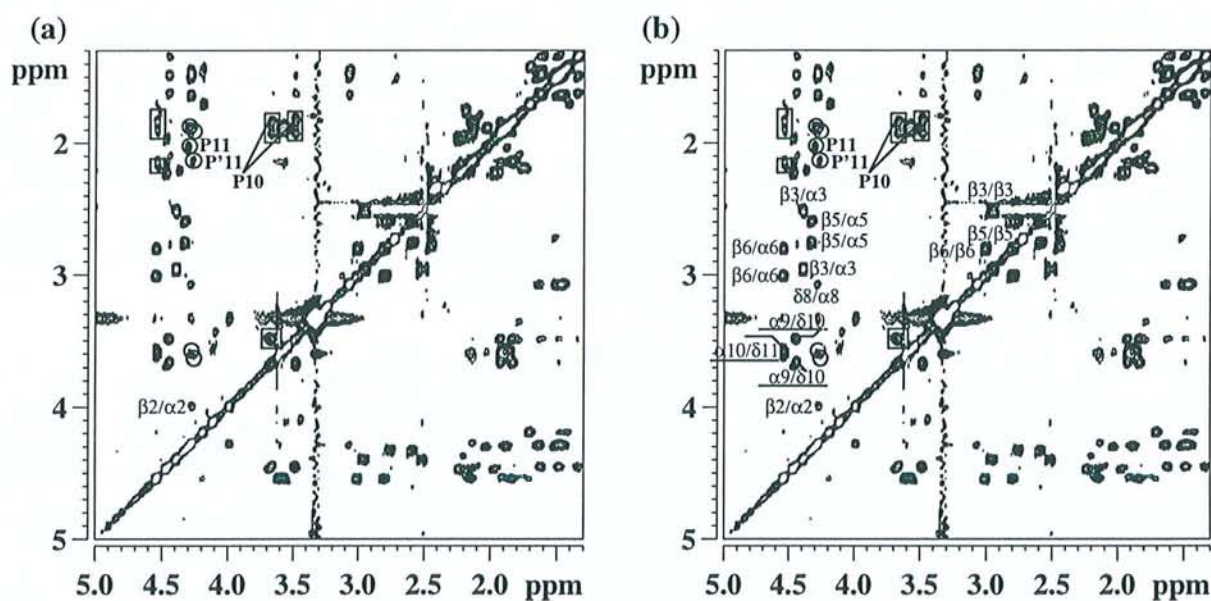


Figure III-16. Corrélations représentatives des dispositions *trans* et *cis* sur le fragment

K₉P₁₀P₁₁ pour le peptide non phosphorylé, à l'état libre dans le DMSO.

(a) TOCSY ; (b) NOESY.

Dans le cas du peptide en présence de l'anticorps mAb148, les spectres RMN montrent que seule la forme *trans* est présente sur le fragment K_9P_{10} (corrélations $\alpha\delta(K_9, P_{10})$ et $N\delta(K_9, P_{10})$ observées). Les deux formes *trans* et *cis* sont observées sur le fragment $P_{10}P_{11}$, étant donné la présence simultanée des corrélations $\alpha\delta(P_{10}, P_{11})$ et $\alpha\alpha(P_{10}, P_{11})$ (Figure III-17).

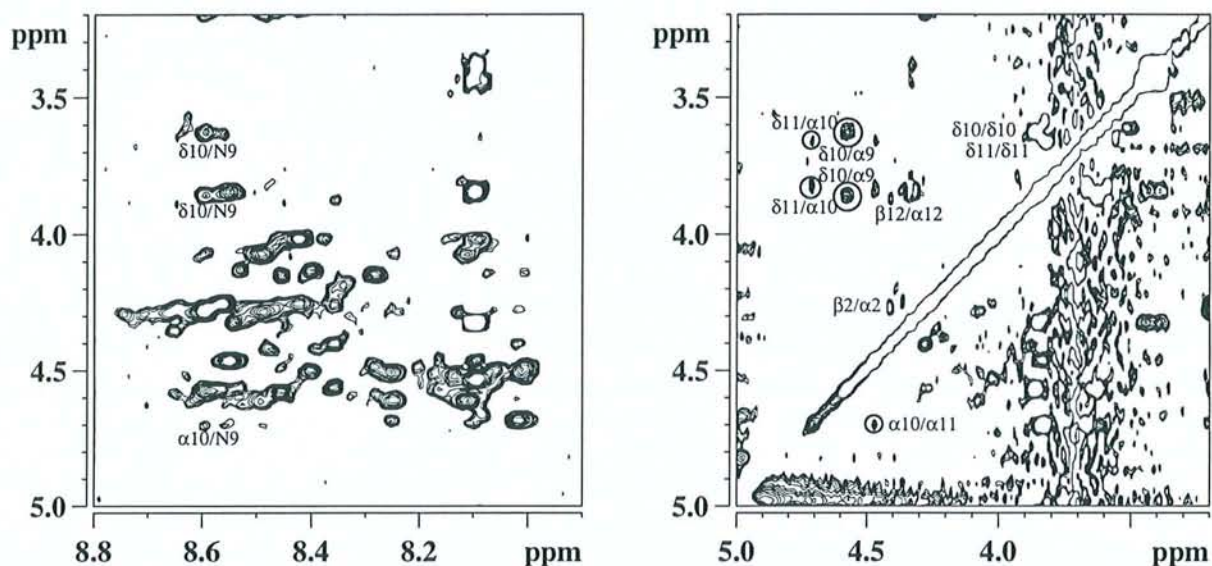


Figure III-17. Corrélations NOE sur la carte TR-NOESY représentatives des dispositions *cis* et *trans* sur le fragment $P_{10}P_{11}$ du peptide non phosphorylé en interaction avec l'anticorps mAb 148.

L'isomérisation *cis/trans* de la liaison P_{10}/P_{11} conduit à la présence de deux conformères bien distincts dans le milieu, dans des proportions quasi égales 50/50. (Figure III-18).

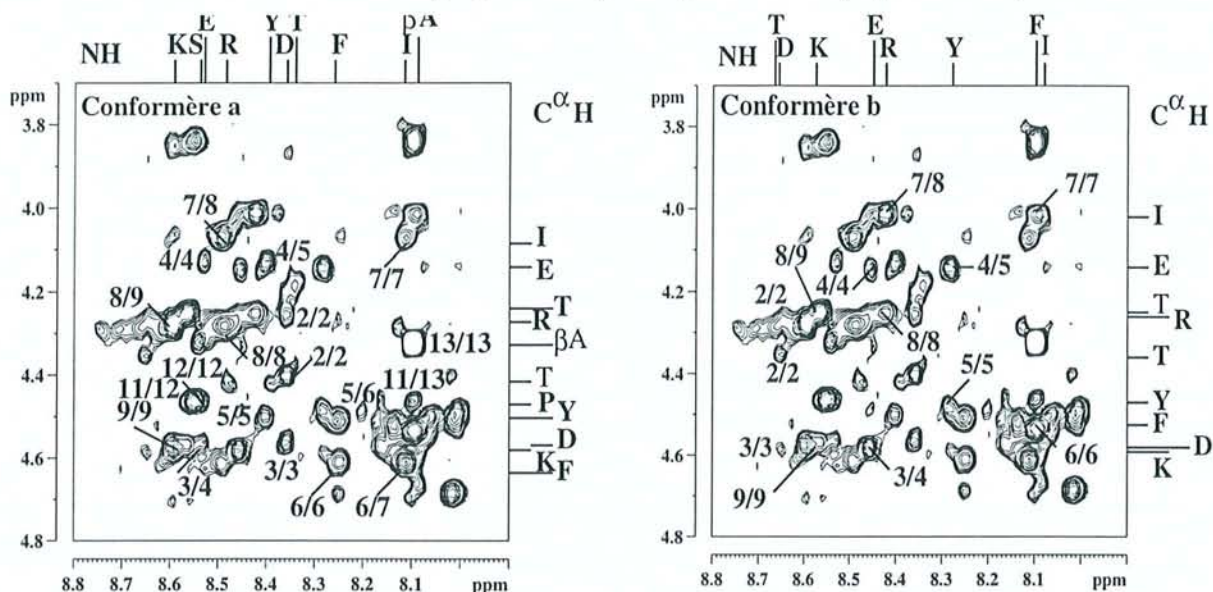


Figure III-18. Région $C^{\alpha}H$ -NH des cartes de TR-NOESY pour le peptide non phosphorylé en présence de l'anticorps mAb148. Les NOE correspondant au conformère a sont indiqués sur la figure de gauche, ceux correspondant au conformère b sur la figure de droite.

Ce phénomène n'est pas dû à la présence d'impuretés. En effet, nous avons examiné le même échantillon en solution aqueuse en absence de l'anticorps et la présence des deux isomères a été observée dans un rapport 80/20, comme dans le DMSO.

Le TR-NOESY s'effectue dans des conditions adéquates d'échange rapide entre la forme libre et la forme liée. Différents rapports molaires antigène/anticorps ont été effectués et ce phénomène est reproductible dans les différents cas.

En présence de l'anticorps mAb148, il semblerait que les deux conformères résultant des dispositions *cis/trans* de la liaison $P_{10}P_{11}$ cohabitent et soient reconnus de la même manière.

Les corrélations NOE quantifiées à partir des expériences NOESY sont résumées sur les schémas de la figure III-19:

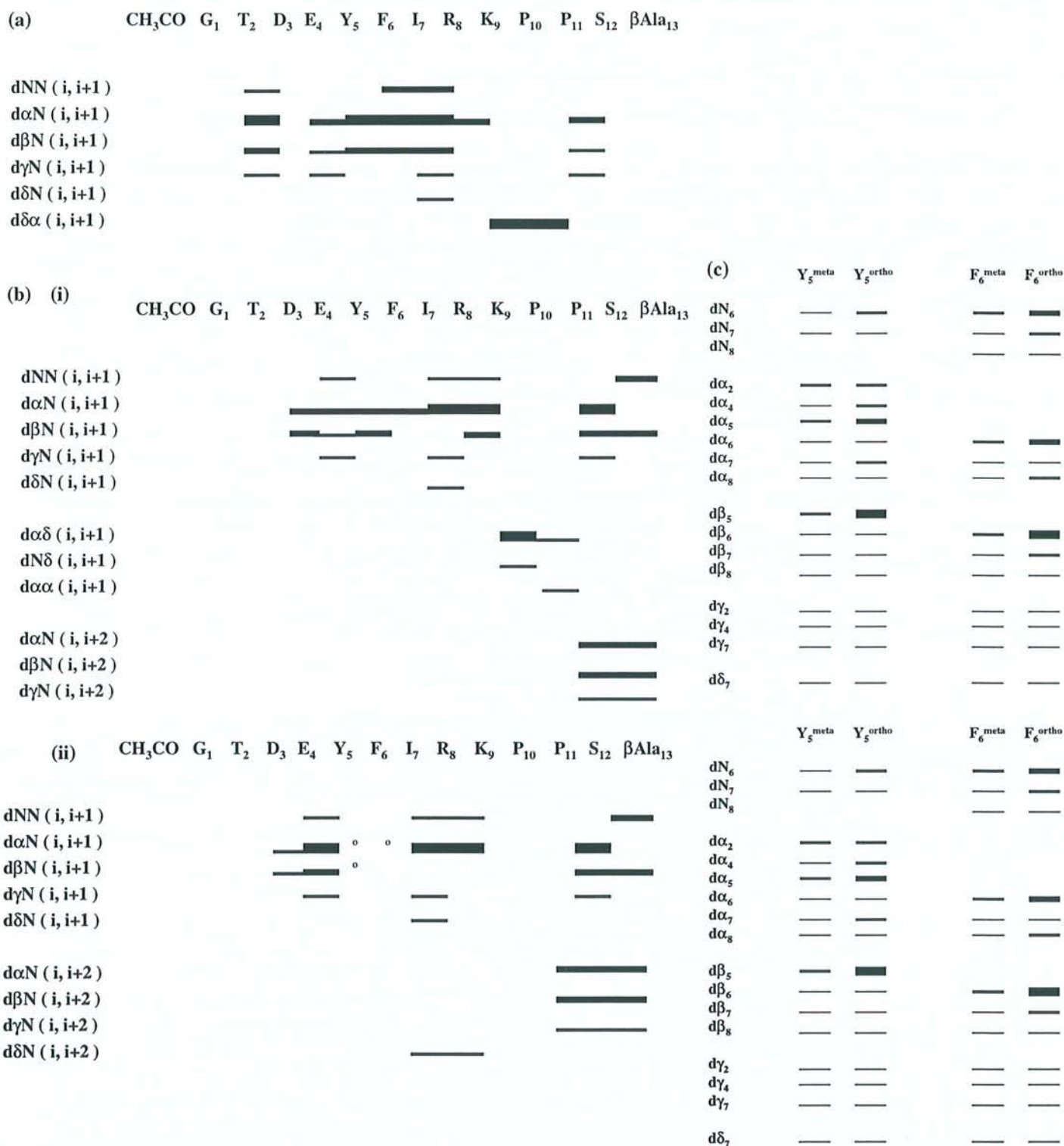


Figure III-19. Représentation, en fonction de leur intensité relative, des corrélations croisées du peptide non phosphorylé. Les intensités sont proportionnelles à l'épaisseur des traits.

(a) dans le DMSO ; (b) dans H₂O/D₂O 95%/5% v/v; (i) Isomère a; (ii) Isomère b.

(c) corrélations des protons aromatiques des résidus Y₅ et F₆ avec les autres protons du peptide.

La lettre o désigne des recouvrements.

Des corrélations intenses de type $d_{\alpha N}(i, i+1)$, qui sont généralement observées dans les structures étendues,^{66,67} apparaissent tout le long de la séquence. Les corrélations $d_{NN}(i, i+1)$, représentatives de structures hélicoïdales ou repliées, ne sont observées que pour quelques résidus, aussi bien pour le peptide à l'état libre qu'en présence de l'anticorps mAb148.

Dans le cas des dispositions *cis/trans* de la liaison entre les deux prolines P₁₀ et P₁₁ conduisant à la présence de deux conformères, il est difficile d'attribuer spécifiquement les corrélations relatives à chaque contribution en raison de nombreux recouvrements, notamment sur les chaînes latérales. Cependant, dans les deux cas, on observe des corrélations similaires pour les deux conformères et de même intensité.

Le tableau III-4 résume les valeurs des déplacements chimiques, issues des cartes TOCSY et NOESY.

	Angles	dans le DMSO	En présence de mAb148	
			Conformère a	Conformère b
Thr ₂	NH	8.44	8.34	8.64
	α	4.27	4.41	4.37
	β	3.99	4.27	4.26
	γ	1.06	1.22	1.22
Asp ₃	NH	8.70	8.36	8.65
	α	4.40	4.56	4.56
	β	2.95; 2.51	2.78; 2.65	2.71; 2.64
Glu ₄	NH	8.08	8.52	8.46
	α	4.46	4.13	4.17
	β	1.97	1.82	1.86
	γ	2.23; 2.14	2.09; 2.04	2.13; 2.06
Tyr ₅	NH	7.94	8.40	8.29
	α	4.33	4.50	4.49
	β	2.75; 2.59	2.96; 2.90	2.98; 2.91
	cycle	6.59	6.80	6.80
		6.90	7.01	7.01
Phe ₆	NH	8.07	8.25	8.07
	α	4.54	4.61	4.55
	β	3.01; 2.79	3.10; 3.0	3.08; 3.00
	cycle	7.21	7.21	7.21
		-	7.35	7.35
Ile ₇	NH	7.89	8.11	8.12
	α	4.19	4.07	4.09
	β	1.70	1.78	1.80
	γ	1.41	1.46	1.47
		1.08	1.14	1.17
	δ	0.82	0.86	0.87
Arg ₈	NH	8.02	8.49	8.42
	α	4.28	4.28	4.26
	β	1.63	1.79; 1.63	1.80; 1.75
	γ	1.47	1.46	1.63
	δ	3.07	3.20	-
	N ^ε H	7.70	-	-
Lys ₉	NH	8.08	8.59	8.57
	α	4.45	4.57	4.58
	β	1.61	1.80	1.80
	γ	1.34	1.47	1.46
	δ	1.48	1.71	1.70
	N ^η H ₂	2.72	2.99	-
Pro ₁₀	NH	-	-	-
	α	4.53	4.71	4.71
	β	2.14; 1.92	2.37; 2.04	2.37; 2.04
	γ	1.83	1.90	1.90
	δ	3.65; 3.48	3.86; 3.63	3.86; 3.63
Pro ₁₁	NH	-	-	-
	α	4.29	4.47	4.47
	β	2.03	2.34; 2.05	2.34; 2.05
	γ	1.88	1.96	1.96
	δ	3.58	3.83; 3.66	3.83; 3.66
Ser ₁₂	NH	7.71	8.55	8.55
	α	4.11	4.32	4.32
	β	3.56	3.84	3.84
βAla ₁₃	NH	-	8.10	8.10
	α	-	4.32	4.32

Tableau III-4. Valeurs des déplacements chimiques δ (ppm) du peptide non phosphorylé à l'état libre dans le DMSO et en présence de l'anticorps monoclonal mAb148.

b. Résultats de modélisation moléculaire

Le protocole décrit précédemment a été appliqué.

Les structures de plus basse énergie issues des calculs de modélisation sont représentées sur les figures III-20 et III-21:

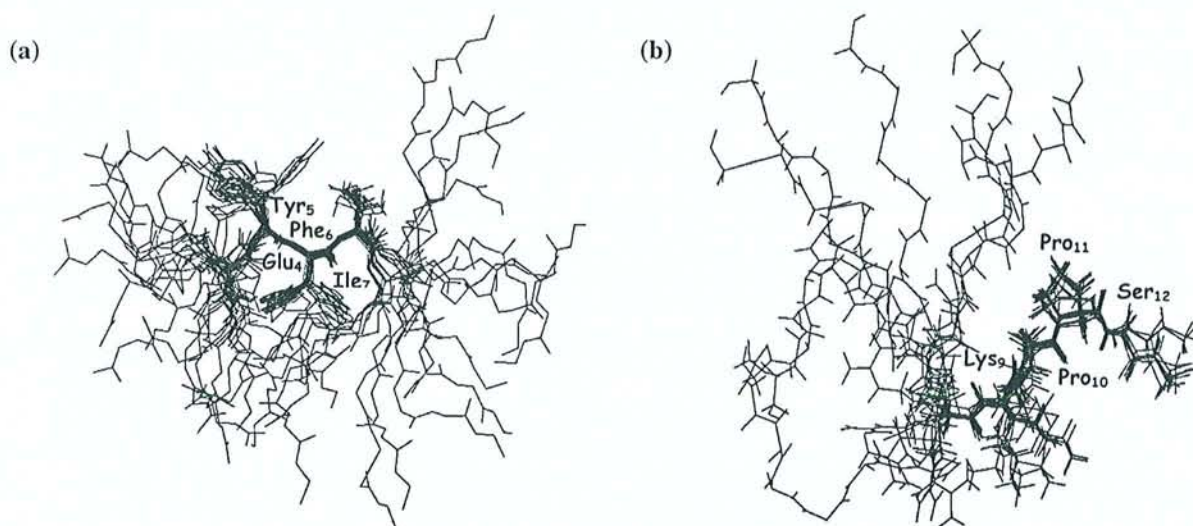


Figure III-20. Vues superposées des conformères issus du calcul de dynamique moléculaire du peptide non phosphorylé à l'état libre dans le DMSO.

(a) sur le fragment 4-7 ($rmsd\ 0.59\text{\AA}\pm0.19\text{\AA}$); (b) sur le fragment 8-12 ($rmsd\ 0.60\text{\AA}\pm0.19\text{\AA}$).

A l'état libre dans le DMSO, le peptide non phosphorylé présente deux parties structurées: sur le fragment 4-7 avec un $rmsd$ de $0.59\text{\AA}\pm0.19\text{\AA}$, et sur le fragment 8-12, avec un $rmsd$ de $0.60\text{\AA}\pm0.19\text{\AA}$.

Les signaux RMN pour le peptide non phosphorylé en présence de l'anticorps mAb148 ont été attribués pour chacun des conformères présents.

Comme les corrélations sont globalement similaires pour les deux conformères et qu'on observe de nombreux recouvrements, les contraintes du conformère a ont été appliquées dans les calculs de modélisation moléculaire, en tenant compte des dispositions *cis* et *trans* de la liaison entre les deux prolines P₁₀ et P₁₁.

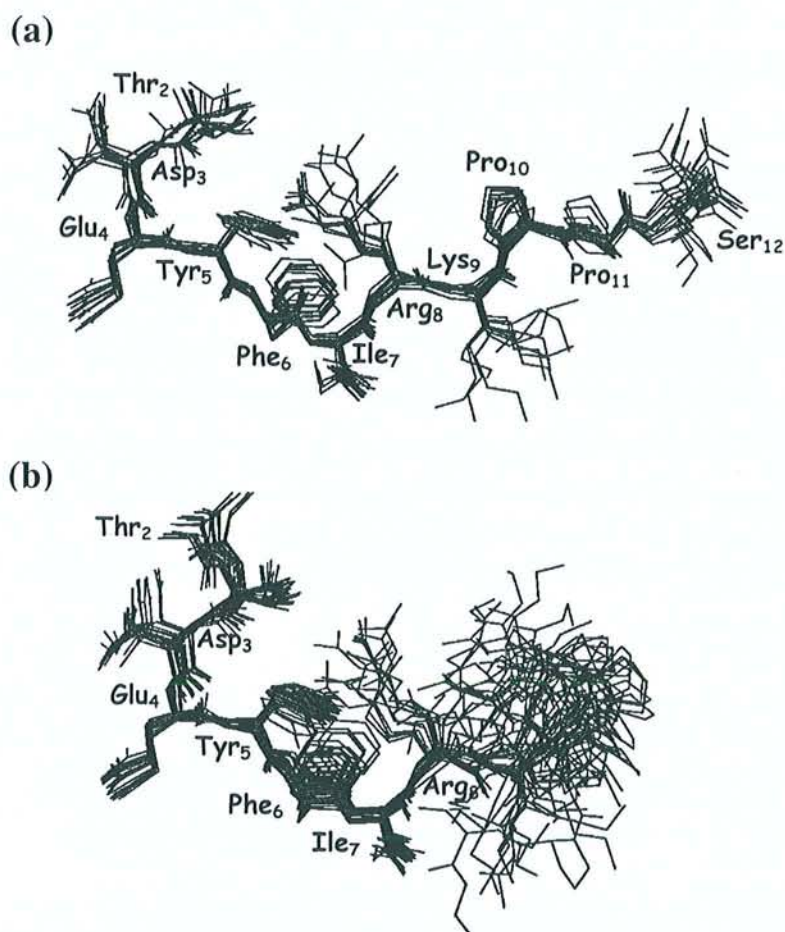


Figure III-21. Vues superposées des conformères issus du calcul de dynamique moléculaire du peptide non phosphorylé en interaction avec l'anticorps monoclonal mAb148 effectué avec:

- (a) la disposition *trans* de la liaison entre les deux prolines P_{10} et P_{11} .
- (b) la disposition *cis* de la liaison entre les deux prolines P_{10} et P_{11} .

En présence de l'anticorps monoclonal mAb148, le peptide se structure davantage.

Les meilleures structures issues de la dynamique moléculaire se superposent sur les atomes du squelette peptidique du fragment 2-13 avec un *rmsd* de $0.89\text{\AA} \pm 0.27\text{\AA}$ lorsque la disposition de la liaison entre les deux prolines $P_{10}P_{11}$ est *trans*. Elles se superposent sur les atomes du squelette peptidique du fragment 2-10 avec un *rmsd* de $0.86\text{\AA} \pm 0.37\text{\AA}$ lorsque la disposition de la liaison entre les deux prolines $P_{10}P_{11}$ est *cis*.

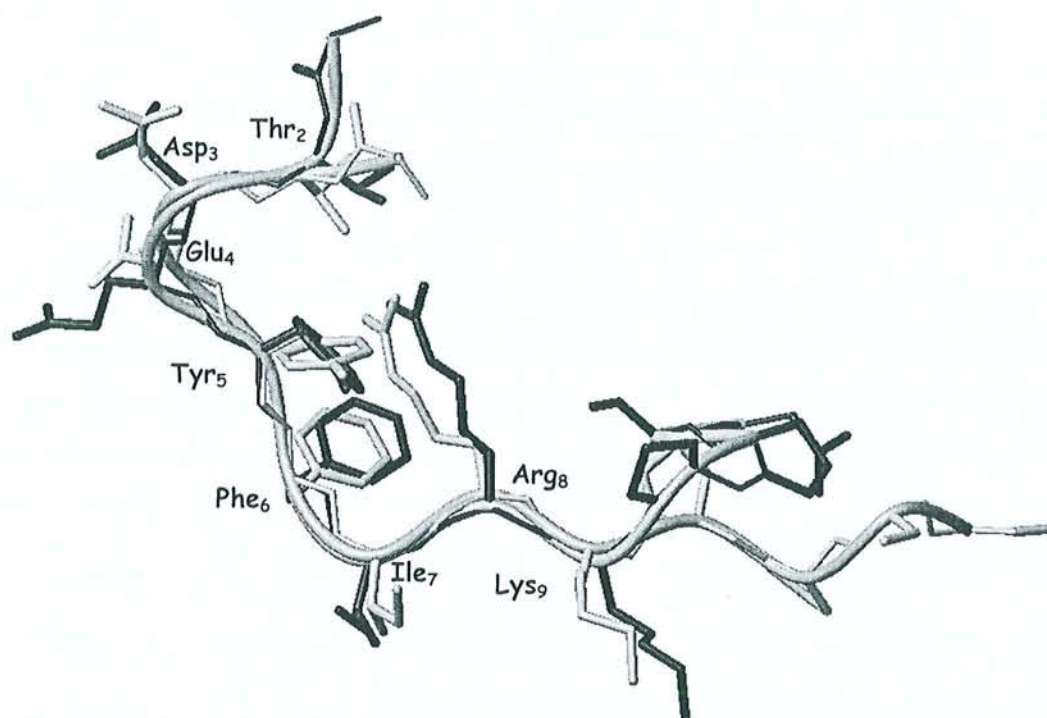


Figure III-22. Comparaison entre les structures du peptide non phosphorylé estimé d'une part avec la disposition *trans* de la liaison entre les deux prolines $P_{10}P_{11}$ (foncé) et d'autre part, la disposition *cis* de la liaison entre les deux prolines $P_{10}P_{11}$ (clair).

Le peptide non phosphorylé en présence de l'anticorps mAb148 adopte une structure étendue. Les formes *cis* et *trans* conservent des conformations similaires sauf dans la partie C-terminale au niveau des résidus proline, comme le montre la figure III-22.

Il a été montré précédemment que chacun des résidus compris entre D_3 et K_9 étaient indispensables pour la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps. Pour quelques résidus (Glu₄, Ile₇ et Arg₈), même des substitutions par des résidus équivalents (Glu₄→Gln, Ile₇→Leu, Arg₈→Lys) abolissent la liaison à certains anticorps. La conformation de cette partie du peptide serait donc essentielle et serait à même d'expliquer les différences d'activités. Le fait que les deux isomères résultant des deux dispositions *cis-trans* de la liaison entre les deux prolines P_{10} - P_{11} soient également reconnus par l'anticorps monoclonal mAb148 semble indiquer que seul le fragment T₂-K₉ est à l'intérieur du site de reconnaissance, tandis

fragment C-terminal restant se situe à l'extérieur du site de liaison de l'anticorps mAb148. Ainsi l'isomérisie *cis/trans* de la liaison P₁₀/P₁₁ ne perturbe pas l'affinité du peptide.

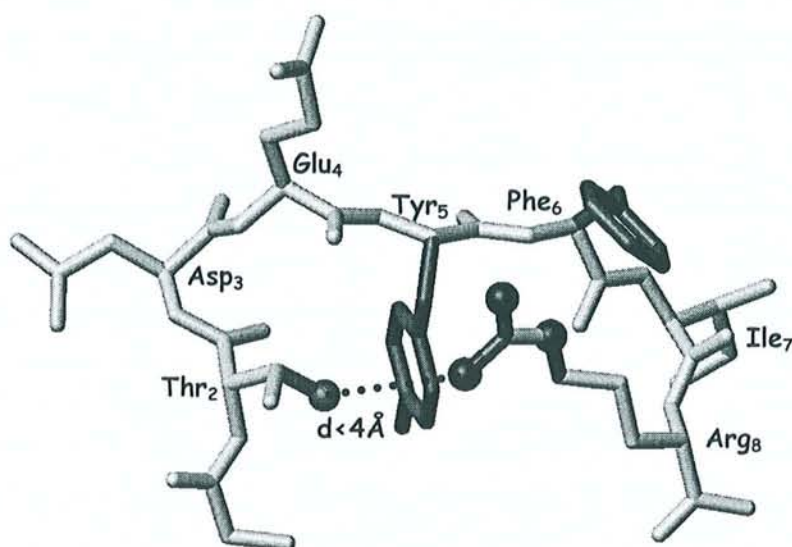


Figure III-23. Représentation du repliement sur le fragment T₂D₃E₄Y₅F₆I₇R₈

Sur la figure III-23, on constate que la région allant du résidu T₂ à R₈ forme une boucle repliée autour du résidu Y₅. En effet, la distance entre le groupement OH de la chaîne latérale du résidu T₂ et le NH du guanidinium du résidu R₈ est inférieure à 4 Å. Les résidus D₃, E₄, F₆ et I₇ ont leurs chaînes latérales bien dégagées à l'extérieur de cette boucle, alors que celle du résidu Y₅ est isolée. Les chaînes latérales des résidus I₇ et R₈, importants pour la liaison à l'anticorps, ont des orientations opposées.

Les caractéristiques géométriques des structures sont consignées dans le tableau III-5.

Résidu	Angle	dans le DMSO	En présence de mAb148	
			Conformation <i>trans</i> entre P ₁₀ P ₁₁	Conformation <i>cis</i> entre P ₁₀ P ₁₁
Gly ₁	ψ	-97.7±96.0	-129±91	-106±99
Thr ₂	ϕ	-105±22	-108±19	-103±4
	ψ	104±6	95±104	87±8
	χ_1	70±32	30±65	56±1
Asp ₃	ϕ	-113±28	-101±35	-91±1
	ψ	125±76	-75±13	-73±9
	χ_1	-157±93	-130±93	-4±103
Glu ₄	ϕ	-90±23	-105±13	-96±2
	ψ	22±61	99±7	100±8
	χ_1	179±85	-179±2	-177±1
Tyr ₅	ϕ	-116±27	-122±22	-129±19
	ψ	106±12	156±2	156±1
	χ_1	-61±82	72±4	70±3
Phe ₆	ϕ	-149±7	-89±6	-90±5
	ψ	113±6	178±6	176±4
	χ_1	-112±48	58±2	59±1
Ile ₇	ϕ	-112±22	-65±6	-63±4
	ψ	87±19	116±5	120±8
	χ_1	40±71	-131±24	-134±15
Arg ₈	ϕ	-141±38	-111±14	-99±21
	ψ	-69±65	123±7	124±13
	χ_1	-144±58	-66±62	-78±76
Lys ₉	ϕ	-134±15	-118±7	-122±18
	ψ	97±11	102±8	114±16
	χ_1	-149±69	-136±52	-118±87
Pro ₁₀	ω		172±2	175±4
	ψ	144±17	128±8	128±3
Pro ₁₁	ω		178±1	-1±1
	ψ	90±16	150±2	140±5
Ser ₁₂	ϕ	-157±4	-67±4	-66±3
	ψ	114±100	-12±7	-10±6
	χ_1	7±62	-63±87	-95±60

Tableau III-5. Valeurs moyennes des angles dièdres calculés à partir des structures issues des calculs de la dynamique moléculaire.

III.2.3. Etude du peptide phosphorylé

a. Résultats de RMN

Le peptide phosphorylé a été examiné en présence de l'anticorps mAb148. Les signaux RMN ont été attribués par combinaison des techniques TOCSY et NOESY (Figure III-24).

L'observation de nombreuses corrélations croisées NOE d'intensité négative indique que le peptide se structure en présence de l'anticorps mAb148. Comme pour le peptide non phosphorylé, on constate la présence de nombreuses corrélations relatives aux protons des cycles aromatiques de la tyrosine et de la phénylalanine, ce qui suggère que ces cycles sont fortement bloqués au contact de l'anticorps.

Contrairement au peptide non phosphorylé, seule la conformation *trans* est présente au niveau du fragment $K_9P_{10}P_{11}$, comme l'atteste la seule présence des corrélations $N\delta(K_9, P_{10})$ et $\alpha\delta(K_9, P_{10})$, ainsi que la corrélation $\alpha\delta(P_{10}, P_{11})$. (Figure III-25)

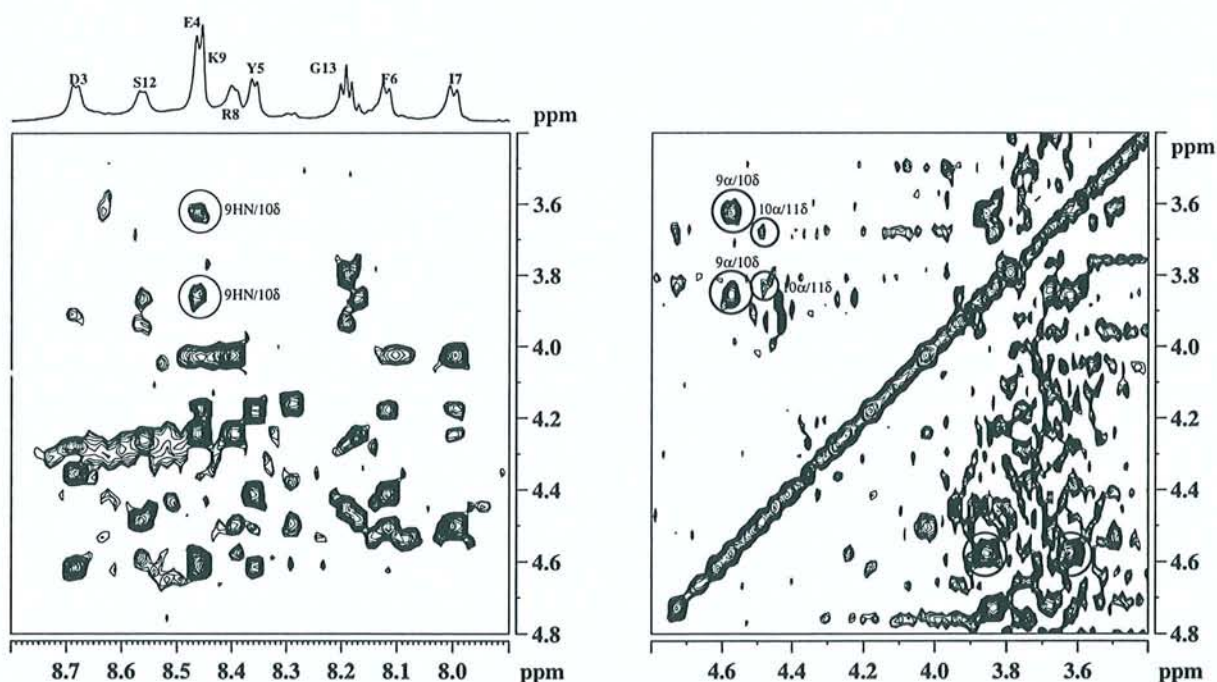


Figure III-25. Corrélation NOE sur la carte TR-NOESY représentatives de la conformation *trans* présente au niveau du fragment $K_9P_{10}P_{11}$ pour le peptide phosphorylé en présence de l'anticorps mAb148.

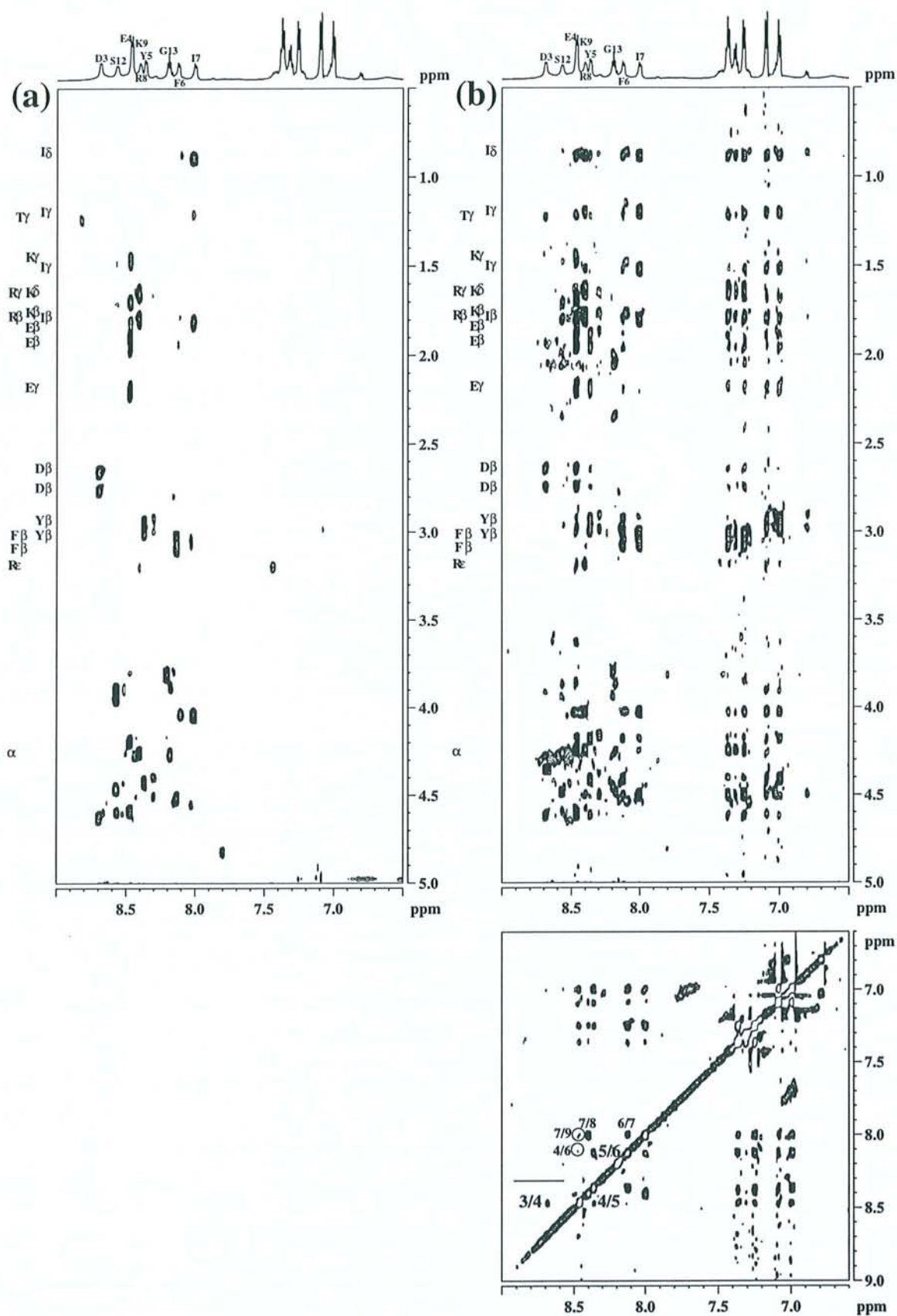


Figure III-24. Spectres RMN du peptide phosphorylé en présence de 2% d'anticorps mAb148, dans H_2O/D_2O 95%/5% v/v (pH=7, 4°C, $\tau_m=350ms$).
(a) TOCSY; (b) TR-NOESY.

Le schéma des corrélations NOE sont résumées sur la figure III-26:

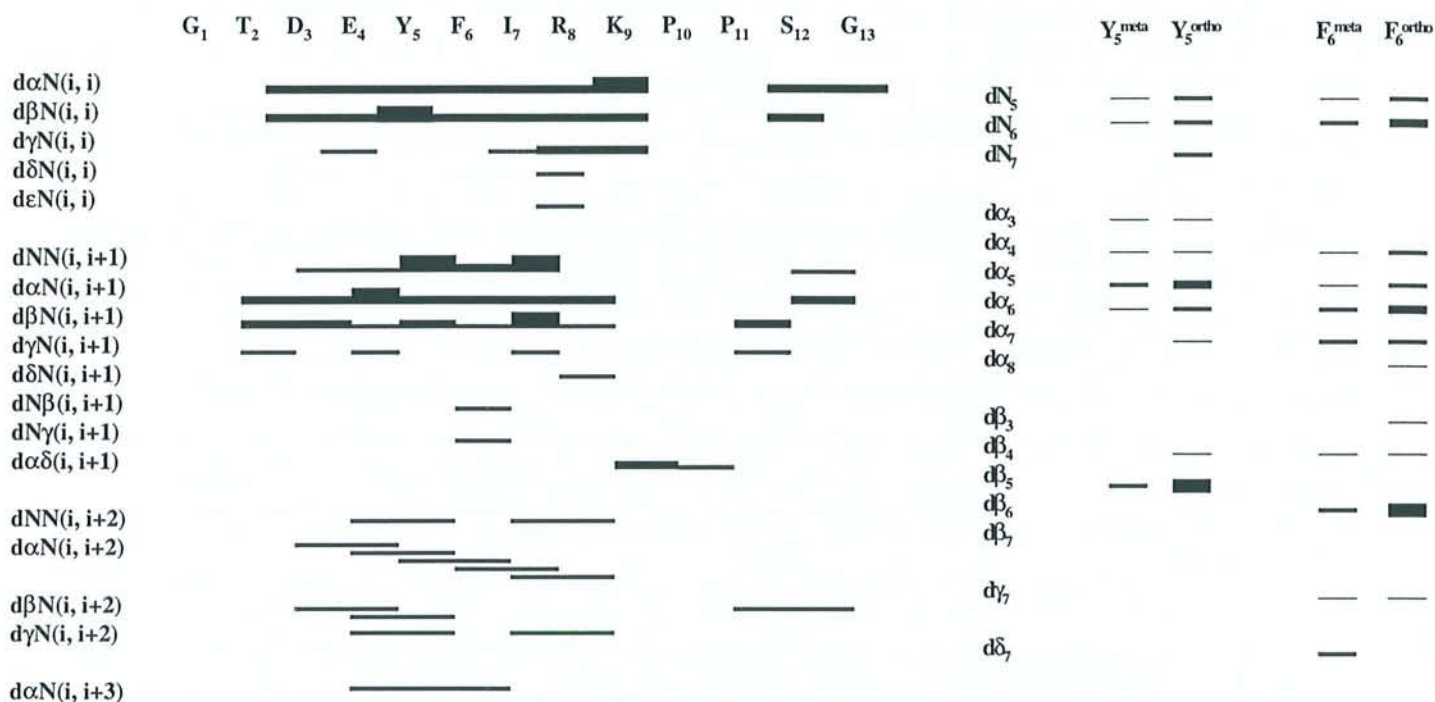


Figure III-26. Représentation, en fonction de leur intensité relative, des corrélations croisées du peptide phosphorylé en présence de l'anticorps mAb148. Leur intensité est proportionnelle à l'épaisseur des traits.

L'examen complet des pics de corrélation des protons amide entre eux ou avec les protons $C^{\alpha}H$ montre que le composé adopte une structure repliée compacte en présence de l'anticorps mAb148. La présence de corrélations NOE intenses, de type NN(i, i+1) à savoir NN(Y₅, F₆) et NN(I₇, R₈), couplée à la présence continue de corrélations NOE faibles de type α N(i, i+2) le long de la séquence D₃-K₉ montre que cette partie de la molécule, incluant le site de phosphorylation tyrosine, est fortement repliée. La présence additionnelle de quelques corrélations NOE de type NN(i, i+2), β N(i, i+2), γ N(i, i+2) et α N(i, i+3) suggère que le fragment D₃E₄Y₅F₆I₇R₈ adopterait soit une structure en hélice, soit plusieurs repliements β adjacents, d'autant plus que les cycles des résidus Y₅ et F₆ relatifs sont très contraints dans cette région et présentent de nombreuses corrélations NOE avec les protons du squelette peptidique et d'autres chaînes latérales.

Le tableau III-6 résume les valeurs des déplacements chimiques, issues des cartes TOCSY et NOESY.

Résidus	Angles	Peptide phosphorylé en interaction avec mAb148
Thr ₂	NH	-
	α	4.36
	β	4.28
	γ	1.24
Asp ₃	NH	8.68
	α	4.61
	β	2.75; 2.64
Glu ₄	NH	8.46
	α	4.18
	β	1.96; 1.89
	γ	2.20
Tyr ₅	NH	8.35
	α	4.41
	β	2.90; 2.94
	cycle	6.99
Phe ₆		7.08
	NH	8.11
	α	4.50
	β	3.08; 3.01
	cycle	7.25
Ile ₇		7.31
		7.36
	NH	8.00
	α	4.03
	β	1.80
Arg ₈	γ	1.52
		1.21
	δ	0.89
	NH	8.39
	α	4.24
Lys ₉	β	1.78
	γ	1.65
	NH	8.45
	α	4.57
	β	1.81
Pro ₁₀	γ	1.47
	δ	1.69
	N ⁿ H ₂	2.98
	NH	-
	α	4.72
Pro ₁₁	β	2.37; 2.05
	γ	1.93
	δ	3.85; 3.63
	NH	-
	α	4.48
Ser ₁₂	β	2.34; 2.06
	γ	1.99
	δ	3.85
	NH	8.55
Gly ₁₃	α	4.45
	β	3.95; 3.89
	NH	8.18
	α	3.79

Tableau III-6. Valeurs des déplacements chimiques δ (ppm) du peptide phosphorylé en présence de l'anticorps monoclonal mAb148 (pH=7, 4°C, H₂O/D₂O 95%/5% v/v).

b. Résultats de modélisation moléculaire

Le protocole de calculs décrit précédemment a été appliqué.

Les structures de plus basse énergie issues des calculs de modélisation sont représentées sur la figure III-27:

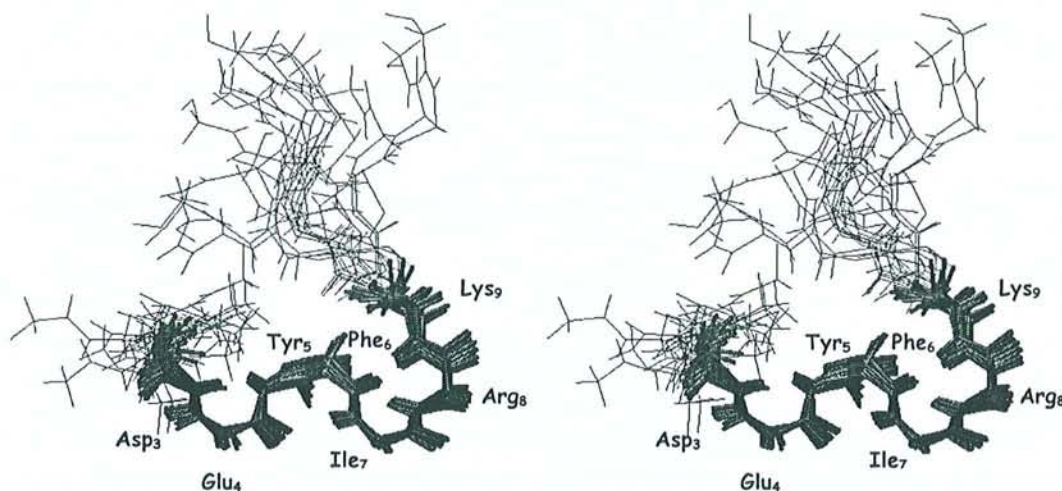


Figure III-27. Vues stéréos des meilleures structures issues du calcul MD.

La superposition sur le squelette peptidique des meilleures structures issues des calculs de recuit simulé sur le fragment D₃E₄Y₅F₆I₇R₈K₉ donne un *rmsd* de 0.59Å±0.28Å.

Les caractéristiques géométriques de ces structures sont consignées dans le tableau III-7.

Les calculs de dynamique moléculaire conduisent aux valeurs suivantes: (-54±5) (-2±8) (-86±5) (-19±8) pour les angles dièdres (ϕ_4 , ψ_4) et (ϕ_5 , ψ_5). Ceci correspond à une structure repliée de type β I autour de la séquence D₃E₄Y₅F₆, stabilisée par la liaison hydrogène entre F₆-NH et D₃-CO.(Figure III-28)

On note également la présence d'un autre repliement β , adjacent au premier et localisé dans la région Y₅F₆I₇R₈. Il est stabilisé par l'interaction $i+3 \rightarrow i$ entre les groupes R₈-NH et Y₅-CO. Cela est confirmé par les valeurs suivantes des angles : (-62±5) (-15±2) (-70±3) (-29±2) des

angles (ϕ_6 , ψ_6) et (ϕ_7 , ψ_7) (Tableau III-7), caractéristiques de la présence d'un repliement β de type III. (Figure III-28)

Résidu	Angle	peptide phosphorylé en interaction avec mAb148
Gly ₁	ψ	146±86
Thr ₂	ϕ	-109±25
	ψ	-79±53
	χ_1	47±66
Asp ₃	ϕ	-106±33
	ψ	170±17
	χ_1	-78±95
Glu ₄	ϕ	-54±5
	ψ	-2±8
	χ_1	-173±67
Tyr ₅	ϕ	-86±5
	ψ	-19±8
	χ_1	55±65
Phe ₆	ϕ	-62±5
	ψ	-15±2
	χ_1	80±6
Ile ₇	ϕ	-70±3
	ψ	-29±2
	χ_1	-35±4
Arg ₈	ϕ	-141±12
	ψ	-30±14
	χ_1	68±47
Lys ₉	ϕ	-129±25
	ψ	101±35
	χ_1	-56±56
Pro ₁₀	ψ	180±68
Pro ₁₁	ψ	131±55
Ser ₁₂	ϕ	-104±21
	ψ	81±47
	χ_1	33±91

Tableau III-7. Valeurs moyennes des angles dièdres calculés dans les structures issues de la dynamique moléculaire.

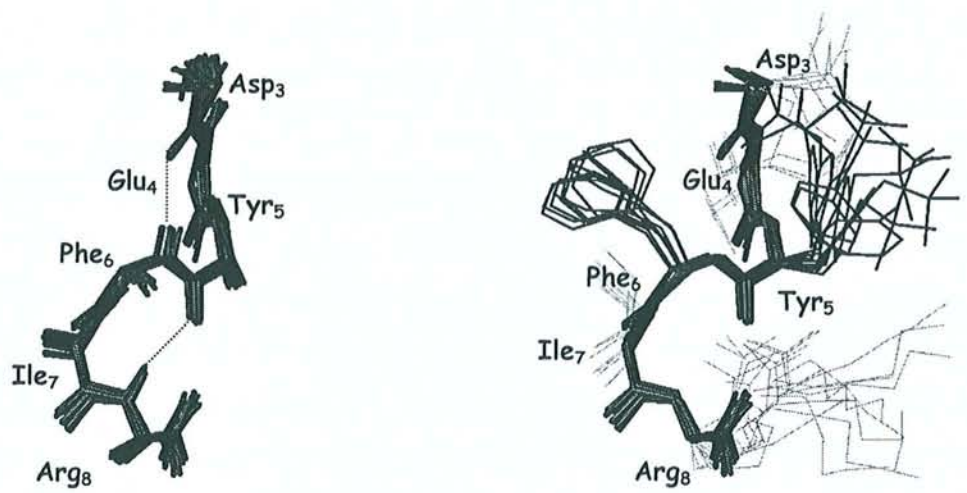


Figure III-28. Vues superposées des conformères issus du calcul de dynamique moléculaire sur le fragment D₃E₄Y₅F₆I₇R₈K₉.

- (a) Représentation avec le squelette peptidique seul.
- (b) Représentation avec les chaînes latérales.

Le tableau III-8 résume les caractéristiques des liaisons hydrogène intervenant dans les repliements β observés.

Donneur	Accepteur	Type HB	Dimensions HB		Occurrence (%)	Type de repliement
			H-N...O	(H-N...O)		
			(Å)	(°)		
Liaisons hydrogène intramoléculaires						
Y ₅ -NH	D ₃ -CO	i+2→i	1.91-2.19	15.0-25.4	100	βI
F ₆ -NH	D ₃ -CO	i+3→i	2.43-2.93	2.80-17.7	100	
R ₈ -NH	Y ₅ -CO	i+3→i	2.38-2.93	9.5-27.2	100	
K ₉ -NH	Y ₅ -CO	i+4→i	2.01-2.63	16.3-34.7	95	α ⁶⁹
S ₁₂ -HG	P ₁₀ -CO	i+2→i	1.94-3.02	11.0-18.4	27	βIII ⁶⁸
G ₁₃ -HN	P ₁₁ -CO	i+2→i	2.21-2.90	29.0-35.0	41	

Tableau III-8. Dimensions (Å, deg.) et occurrence (%) des liaisons hydrogène du peptide phosphorylé en interaction avec l'anticorps mAb148.

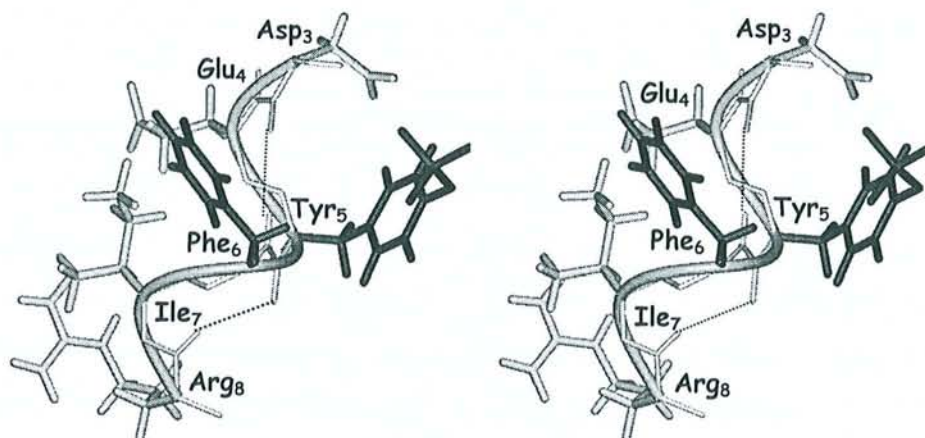


Figure III-29. Vues stéréos de la conformation moyenne issue de la dynamique moléculaire sur le fragment $D_3E_4Y_5F_6I_7R_8$.

La structure moyenne issue des calculs de dynamique moléculaire est représentée sur la figure III-29. On constate que la chaîne latérale du résidu Tyr₅ est bien dégagée et située à l'extérieur de la structure repliée.

A la différence du peptide non phosphorylé, présent sous forme étendue en présence de l'anticorps mAb148, le peptide phosphorylé adopte une structure très compacte, avec formation d'une hélice 3_{10} déformée au niveau du fragment $D_3E_4Y_5F_6I_7R_8$. Cet arrangement implique une présentation différente des chaînes latérales des résidus adjacents, notamment de celle du résidu R₈.

III.2.4. Comparaison entre les structures adoptées par le peptide phosphorylé et le peptide non phosphorylé en présence de l'anticorps mAb148

Les perturbations conformationnelles du peptide non phosphorylé par rapport au peptide phosphorylé peuvent être appréciées grâce à la différence relative de leurs déplacements chimiques (Figure III-30).

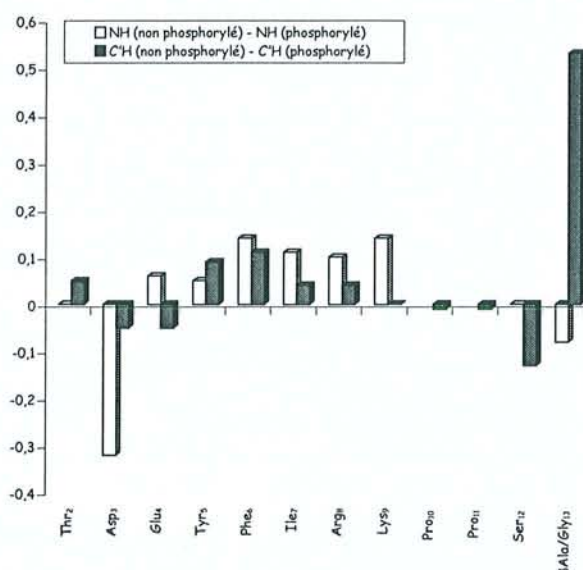


Figure III-30. Perturbations des déplacements chimiques des protons amides et des protons C α H du peptide non phosphorylé par rapport au peptide phosphorylé.

Les protons NH sont en majorité perturbés par l'effet de la phosphorylation. Le résidu D₃ est le plus fortement touché avec une différence de 0.3 ppm. Le changement observé au niveau de ce résidu pourrait être le résultat d'une liaison hydrogène intervenant pour le peptide phosphorylé, et non pour le peptide non phosphorylé.

La différence de 0.1 ppm des déplacements chimiques des NH de la portion E₄-K₉ suite à la phosphorylation est compatible avec le passage d'une forme étendue (peptide non phosphorylé) à une forme en hélice 3_{10} (peptide phosphorylé).⁷⁰

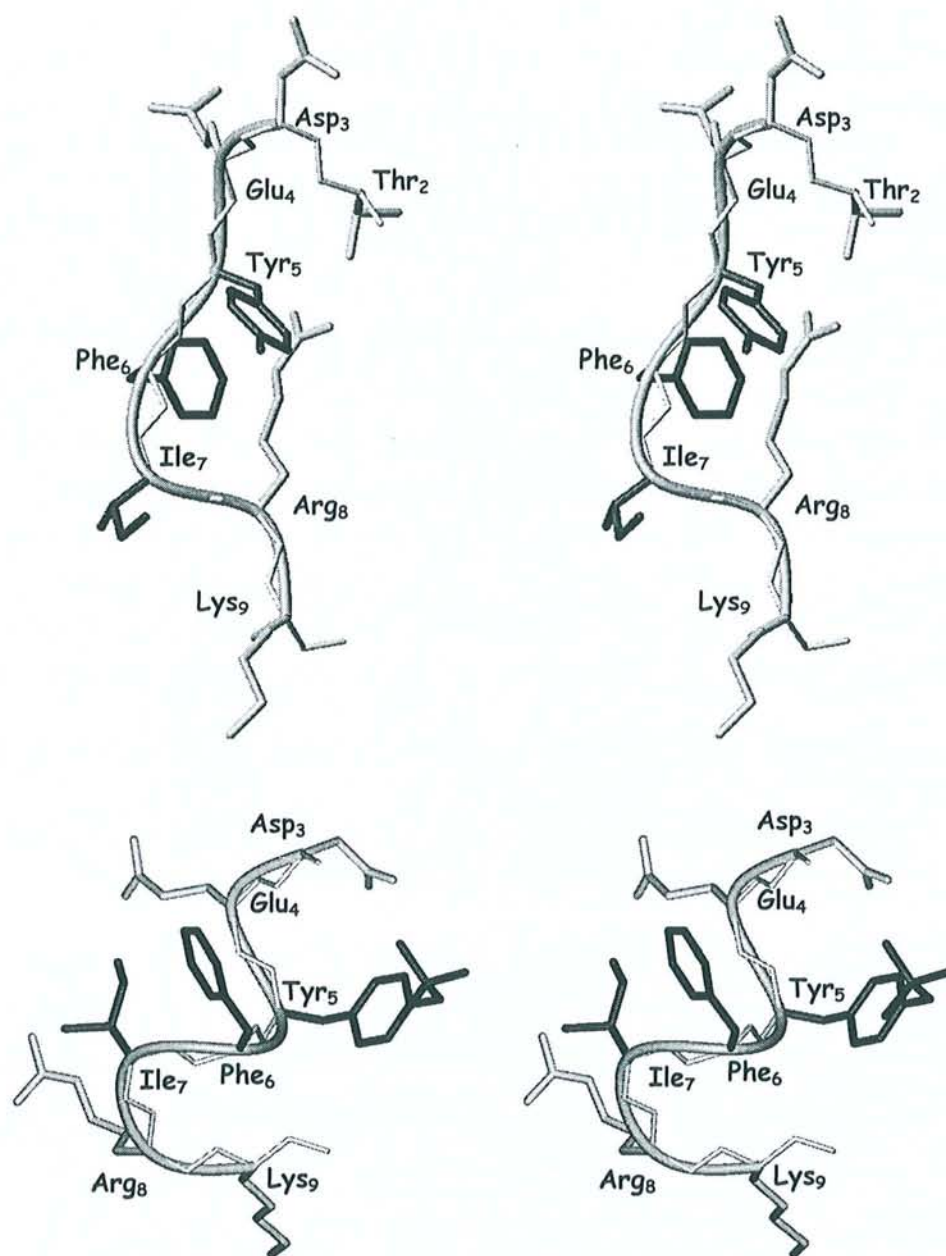


Figure III-31. Vues stéréos de la conformation moyenne issue de la dynamique moléculaire sur le fragment $D_3E_4Y_5F_6I_7R_8K_9$.

(a) Peptide non phosphorylé ; (b) Peptide phosphorylé.

La figure III-31 représente les vues stéréos de la conformation moyenne du peptide phosphorylé et non phosphorylé, en interaction avec l'anticorps mAb148.

La différence dans le comportement conformationnel entre les deux peptides est aussi visible en comparant les expériences de TR-NOESY (Figure III-15b et III-24b). Le peu de corrélations NN(i, i+1) de faible intensité observées dans le cas du peptide non phosphorylé dénote une structure étendue. Au contraire, le peptide phosphorylé présente simultanément plusieurs corrélations NN(i, i+1) intenses, des corrélations NN(i, i+2) et plusieurs corrélations α N(i, i+2) continues au niveau du fragment D₃-K₉ compatibles avec une structure en hélice 3_{10} . De ce fait, toutes les chaînes latérales dans les structures tridimensionnelles n'ont pas la même orientation.

On constate aussi que lors de la complexation, les protons aromatiques (Y₅, F₆) dans les deux peptides, phosphorylé et non phosphorylé, présentent un grand nombre de corrélations NOE avec les protons des autres résidus adjacents. Ce fait semble indiquer qu'au contact de l'anticorps mAb148 et dans la conformation du complexe, les deux cycles aromatiques des résidus Y₅ et F₆ sont bloqués et occupent une position centrale.

On a vu que la phosphorylation de la β Tyr367 réduit sensiblement la liaison de l'antigène à l'anticorps mAb148. Ce phénomène pourrait s'expliquer par les conformations différentes adoptées : la phosphorylation induit une structuration accrue de l'octapeptide VICE β , notamment dans la région comportant le site de phosphorylation. Cela suggère que la tyrosine, encombrée par le groupement PO₃H₂, entraîne une conformation locale plus compacte du peptide. Il se pourrait donc que le site de liaison de l'anticorps mAb148 soit un sillon assez étroit dans lequel la structure étendue du peptide non phosphorylé pourrait s'adapter. au contraire, l'encombrement de la structure compacte adoptée par le peptide phosphorylé semblerait être moins favorable. Ceci expliquerait la faible valeur de l'affinité du peptide phosphorylé vis-à-vis de l'anticorps mAb148, comparée à celle du peptide non phosphorylé.

III.2.5. Conclusions

Dans le but de déterminer le rôle fonctionnel et structural du site de phosphorylation Tyr, un fragment peptidique de la sous-unité β du récepteur de l'acétylcholine (RACH) a été étudié, sous forme phosphorylée et non phosphorylée, à l'état libre dans le DMSO et en interaction avec l'anticorps mAb148.

En raison de la présence de la séquence KPP, le peptide non phosphorylé à l'état libre se présente sous forme d'un mélange de deux conformères *trans* et *cis*, dans un rapport 80/20 respectivement. Les calculs de modélisation moléculaire ont montré la présence de deux parties structurées au niveau des fragments EYFI et RKPPS. En présence de l'anticorps mAb148, le rapport *cis/trans* augmente jusqu'à 50/50. Les deux conformères sont également reconnus et présentent une meilleure affinité que le peptide phosphorylé. Deux calculs parallèles ont été effectués en tenant compte de l'isomérisation *cis/trans* concernant la séquence Pro-Pro, et ont conduit dans les deux cas à des structures étendues superposables le long du fragment TDEYFIR. Les structures des deux conformères ne diffèrent que dans la partie C-terminale du peptide.

Contrairement au peptide non phosphorylé, le peptide phosphorylé adopte une structure compacte avec formation d'une hélice 3_{10} déformée au niveau du fragment DEYFIR. Seule la conformation *trans* est présente. Les différences structurales observées sont en bon accord avec les tests biologiques.

Cette étude conformationnelle préalable peut servir de point de départ à une meilleure compréhension du rôle de la phosphorylation de la tyrosine dans le mécanisme d'action du récepteur RACH. Dans cette optique, une étude similaire mérite d'être entreprise avec le fragment homologue de la sous-unité β du RACH du poisson torpille, qui partage les mêmes conclusions immunologiques. Il serait également judicieux d'étudier ces différents fragments en présence d'un autre anticorps dirigé contre le site de phosphorylation, mais ne pouvant inhiber le canal ionique du récepteur.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wiley, R. A. & Rich, D. H. Peptidomimetics derived from natural products. *Med. Res. Rev.* **13**, 327-384 (1993).
2. Giannis, A. & Kolter, T. Peptidomimetics for receptor-ligands - discovery, development and medical perspectives. *Angew. Chem. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1244-1267 (1993).
3. Guichard, G., Benkirane, N., Zeder-Lutz, G., Van Regenmortel, M. H. V., Briand, J.-P. & Muller, S. Antigenic mimicry of natural L-peptides with retro-inverso peptidomimetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 9765-9769 (1994).
4. Benkirane, N., Guichard, G., Van Regenmortel, M. H. V., Briand, J.-P. & Muller, S. Cross-reactivity of antibodies to retro-inverso peptidomimetics with the parent protein histone H3 and chromatin core particle. *J. Biol. Chem.* **270**, 11921-11926 (1995).
5. Briand, J.-P., Benkirane, N., Guichard, G., Newman, J. F. E., Van Regenmortel, M. H. V., Brown, F. & Muller, S. A retro-inverso peptide corresponding to the GH loop of foot-and-mouth disease virus elicits high levels of long -lasting protective neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**, 12545-12550 (1997).
6. Monestier, M. & Kotzin, B. L. Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus and drug-induced lupus syndromes. *Rheumatol. Dis. Clin. North America* **18**, 415-436 (1992).
7. Cohen, M. G. & Webb, J. Antihistone antibodies in rheumatoid arthritis and Felty's syndrome. *Arthritis Rheum.* **32**, 1319-1324 (1989).
8. Konikoff, F., Swissa, M. & Shoenfeld, Y. Autoantibodies to histones and their subfractions in chronic liver diseases. *Clin. Immun. Immunopathol.* **51**, 77-82 (1989).
9. Briand, J.-P., Guichard, G., Dumortier, H. & Muller, S. Retro-inverso peptidomimetics as new immunological probes. *J. Biol. Chem.* **270**, 20686-20691 (1995).
10. Benkirane, N., Friede, M., Guichard, G., Briand, J. P., Van Regenmortel, M. H. V. & Muller, S. Antigenicity and immunogenicity of modified synthetic peptides containing D-amino acid residues. Antibodies to a D-enantiomer do recognize the parent L-hexapeptide and reciprocally. *J. Biol. Chem.* **268**, 26279-26285 (1993).
11. Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**, 661-665 (1992).
12. *Xwin-NMR software Manual, Bruker Analytische Messtechnik GmbH* (, 1995).

13. Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Guntert, P. & Wuthrich, K. The program XEASY for computer NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR* **5**, 1-10 (1995).
14. Berndt, K. D., Guntert, P. & Wutrich, K. Conformational sampling by NMR solution structures calculated with the program DIANA evaluated by comparison with long-time molecular dynamics calculations in explicit water. *Proteins* **24**, 304-313 (1996).
15. Guntert, P., Mumenthaler, C. & Wuthrich, K. Torsion Angle Dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* **273**, 283-298 (1997).
16. Biosym Technologies Inc. *Discover Manual Version 2.8* (, San Diego, SA, 1992).
17. Biosym Inc. User Guide, part 1. *San Diego, SA* (1992).
18. Koradi, R., Billeter, M. & Wutrich, K. MOLMOL : a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* **14**, 51-55 (1996).
19. Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. Determination of three-dimensional structures of proteins in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Eng.* **1**, 275-288 (1987).
20. Wilson, I. A. & Stanfield, R. L. Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 857-867 (1994).
21. Unwin, N. Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Cell* **72**, 31-41 (1993).
22. Lindstrom, J., Shelton, D. & Fugii, Y. Myasthenis gravis. *Adv. Immunol.* **42**, 233-284 (1988).
23. Drachman, D. B., de Silva, S., Ramsay, D. & Pestronk, A. Humoral pathogenesis of myasthenia gravis. *Ann. NY Acad. Sci.* **505**, 90-105 (1987).
24. Wilcox, N. & Vincent, A. *B Lymphocytes in human disease* (eds. Bird, A. G. & Calvert, J.) (, Blackwells, Oxford, UK, 1988).
25. Lindstrom, J. M., Seybold, M. E., Lennon, V. A., Whittingham, S. & Duane, D. D. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic values. *Neurology* **26**, 1054-1059 (1976).
26. Tindall, R. S. A. Humoral immunity in myasthenia gravis: biochemical characterization of acquired antireceptor antibodies and clinical correlations. *Ann. Neurol.* **10**, 430-447 (1981).

27. Richman, D. P., Wollmann, R. L., Maselli, R. A., Gomez, C. M., Corey, A. L., Agius, M. A. & Fairclough, R. H. Effector mechanisms of myasthenic antibodies. *Ann. NY Acad. Sci.* **681**, 264-273 (1993).
28. Yamamoto, T., Vincent, A., Ciulla, T. A., Lang, B., Johnson, I. & Newsom-Davis, J. Seronegative myasthenia gravis: a plasma factor inhibiting agonist-induced acetylcholine receptor function copurifies with IgM. *Ann. Neurol.* **30**, 550-557 (1991).
29. Vincent, A., Li, Z., Hart, A., Barrett-Jolley, R., Yamamoto, T., Burges, J., Wray, D., Byrne, N., Molenaar, P. & Newsom-Davis, J. Seronegative myasthenia gravis. Evidence for plasma factors interfering with acetylcholine receptor function. *Ann. NY Acad. Sci.* **681**, 529-538 (1993).
30. Barrett-Jolley, R., Byrne, N., Vincent, A. & Newsom-Davis, J. Plasma from patients with seronegative myasthenia gravis inhibit AchR responses in the TE671/RD cell line. *Pflugers Arch.* **428**, 492-498 (1994).
31. Vincent, A., Li, Z., forrester, N., Riemersma, S., Roberts, M., Barret-Jolley, R. & Newsom-Davis, J. Seronegative myasthenia gravis (SNMG). *4e conférence européenne sur la myasthénie, Euromyasthenia IV*, 26-29 Avril 1994, 49 (1994).
32. Nestler, E. J., Walaas, S. I. & Greengard, P. Neuronal phosphoproteins: physiological and clinical implications. *Science* **225**, 1357-1364 (1984).
33. Huganir, R. L., Delcour, A. H., Greengard, P. & Hess, G. P. Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature* **321**, 774-776 (1986).
34. Hopfield, J. F., Tank, D. W., Greengard, P. & Huganir, R. L. Functional modulation of the nicotinic acetylcholine receptor by tyrosine phosphorylation. *Nature* **336**, 677-680 (1988).
35. Mülle, C., Benoit, P., Pinset, C., Roa, M. & Changeux, J. P. Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **85**, 5728-5732 (1988).
36. Wallace, B. G., Qu, Z. & Huganir, R. L. Agrin induces phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **6**, 869-878 (1991).
37. Ferrer-Montiel, A. V., Montal, M. S., Diaz-Munoz, M. & Montal, M. Agonist-independent activation of acetylcholine receptor channels by protein kinase A phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **88**, 10213-10217 (1991).
38. Green, W. N., Ross, A. F. & Claudio, T. Acetylcholine receptor assembly is stimulated by phosphorylation of its gamma subunit. *Neuron* **7**, 659-666 (1991).

39. Baker, L. P. & Peng, H. B. Tyrosine phosphorylation and acetylcholine receptor cluster formation in cultured *Xenopus* muscle cells. *J. Cell. Biol.* **120**, 185-195 (1993).
40. Huganir, R. L. & Miles, K. Protein phosphorylation of nicotinic acetylcholine receptors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24**, 183-215 (1989).
41. Safran, A., Provenzano, C., Sagi-Eisenberg, R. & Fuchs, S. Phosphorylation of membrane-bound acetylcholine receptor by protein kinase C: characterisation and subunit specificity. *Biochemistry* **29**, 6730-6734 (1990).
42. Schroeder, W., Meyer, H. E., Buchner, K., Bayer, H. & Hucho, F. Phosphorylation sites of the nicotinic acetylcholine receptor. A novel site detected in position delta S362. *Biochemistry* **30**, 3583-3588 (1991).
43. Wagner, K., Edson, K., Heginbotham, L., Post, M., Huganir, R. L. & Czernik, A. J. Determination of the tyrosine phosphorylation sites of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 23784-23789 (1991).
44. Tzartos, S. J., Valcana, C., Kouvatsou, R. & Kokla, A. The tyrosine phosphorylation site of the acetylcholine receptor β -subunit is located in a highly immunogenic epitope implicated in channel function: antibody probes for β -subunit phosphorylation and function. *EMBO J.* **12**, 5141-5149 (1993).
45. Lindstrom, J., Tzartos, S. & Gullick, W. Structure and function of the acetylcholine receptor molecule studied using monoclonal antibodies. *Ann. NY Acad. Sci.* **377**, 1-19 (1981).
46. Wan, K. K. & Lindstrom, J. M. Effects of monoclonal antibodies on the function of acetylcholine receptors purified from *Torpedo Californica* and reconstituted into vesicles. *Biochemistry* **24**, 1212-1221 (1985).
47. Blatt, Y., Montal, M. S., Lindstrom, J. M. & Montal, M. Monoclonal antibodies specific to the beta and gamma subunits of the *Torpedo* acetylcholine receptor inhibit single-channel activity. *J. Neurosci.* **6**, 481-486 (1986).
48. Dean, A. M. & Koshland Jr, D. E. Electrostatic and steric contributions to regulation at the active site of isocitrate dehydrogenase. *Science* **249**, 1044-1046 (1990).
49. Hurley, J. H., Dean, A. M., Sohl, J. L., Koshland Jr, D. E. & Stroud, R. M. Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science* **249**, 1012-1016 (1990).
50. Sprang, S. R., Acharya, K. R., Goldsmith, E. J., Stuard, D. I., Varvill, K., Fletterick, R. J., Madsen, N. B. & Johnson, L. N. Structural changes in glycogen phosphorylase induced by phosphorylation. *Nature* **336**, 215-221 (1988).

51. Barford, D. & Johnson, L. N. The allosteric transition of glycogen phosphorylation. *Nature* **340**, 609-616 (1989).
52. Barford, D., Hu, S. H. & Johnson, L. N. Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *J. Mol. Biol.* **218**, 233-260 (1991).
53. Rajagopal, P., Waygood, E. B. & Klevit, R. E. Structural consequences of histidine phosphorylation: NMR characterization of the phosphohistidine form of histidine-containing protein from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 15271-15282 (1994).
54. Jones, D. H., Barber, K. R. & Grant, W. M. the EGF receptor transmembrane domain: ^2H NMR study of peptide phosphorylation effects in a bilayer environment. *Biochemistry* **37**, 7504-7508 (1998).
55. Bloemink, M. J. & Moore, P. B. Phosphorylation of ribosomal protein L18 is required for its folding and binding to 5S rRNA. *Biochemistry* **38**, 13385-13390 (1999).
56. Hoffmann, R., Hoffmann, T., Tholey, A., Schulte, A. C. & Kalbitzer, H. R. Synthesis and NMR spectroscopy of peptides containing either phosphorylated or phosphorylated cis- or trans-4-hydroxy-L-proline. *J. Pept. Res.* **49**, 163-173 (1997).
57. Hoffmann, R., Reichert, I., Wachs, W. O., Zeppezauer, M. & Kalbitzer, H. R. ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy of phosphorylated model peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* **44**, 193-198 (1994).
58. Bienkiewicz, E. A. & Lumb, K. J. Random-coil chemical shifts of phosphorylated amino acids. *Journal of Biomolecular NMR* **15**, 203-206 (1999).
59. Tholey, A., Lindemann, A., Kinzel, V. & Reed, J. Direct effects of phosphorylation on the preferred backbone conformation of peptides: a nuclear magnetic resonance study. *Biophys. J.* **76**, 76-87 (1999).
60. Chavanieu, A., Keane, N. E., Quirk, P. G., Levine, B. A., Calas, B., Wei, L. & Ellis, L. Phosphorylation effects on flanking charged residues - Structural implications for signal transduction in protein kinases. *Eur. J. Biochem.* **224**, 115-123 (1994).
61. Zhou, M. M., Meadows, R. P., Logan, T. M., Yoon, H. S., Wade, W. S., Ravichandran, K. S., Burakoff, S. J. & Fesik, S. W. Solution structure of the Shc SH2 domain complexed with a tyrosine-phosphorylated peptide from the T-cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7784-7788 (1995).
62. Eisenmesser, E. Z. & Post, C. B. Insights into tyrosine phosphorylation control of protein-protein association from the NMR structure of a band 3 peptide inhibitor

- bound to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **37**, 867-877 (1998).
63. Daly, N. L., Hoffmann, R., Otvos Jr, L. & Craik, D. J. Role of phosphorylation in the conformation of τ peptides implicated in Alzheimer's disease. *Biochemistry* **39**, 9039-9046 (2000).
64. Cho, H. S., Lee, S.-Y., Yan, D., Pan, X., Parkinson, J. S., Kustu, S., Wemmer, D. E. & Pelton, J. G. NMR structure of activated CheY. *J. Mol. Biol.* **297**, 543-551 (2000).
65. Gaul, B. S., Harrison, M. L., Geahle, R. L., Burton, R. A. & Post, C. B. Substrate recognition by the Lyn protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 16174-16182 (2000).
66. Dyson, H. J., Rance, M., Houghten, R. A., Wright, P. E. & Lerner, R. A. Folding of immunogenic peptide fragments of proteins in water solution. II. The nascent helix. *J. Mol. Biol.* **201**, 201-217 (1988).
67. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Defining solution conformations of small linear peptides. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 519-538 (1991).
68. Rose, G. D., Gierasch, L. M. & Smith, J. A. Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **37**, 1-109 (1985).
69. Pavone, V., Gaeta, G., Lombardi, A., Nastri, F., Maglio, O., Isernia, C. & Saviano, M. Discovering protein secondary structures: classification and description of isolated alpha-turns. *Biopolymers* **38**, 705-721 (1996).
70. Wishart, D. S., Sykes, B. D. & Richards, F. M. Relationship between Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.* **222**, 311-333 (1991).

CONCLUSION

CONCLUSION - PERSPECTIVE

Les peptides, agents naturels intervenant dans de nombreux processus biologiques, présentent un intérêt thérapeutique important mais leur fragilité face aux protéases est telle qu'ils ne peuvent être utilisés *in vivo*. L'introduction de liaisons pseudopeptidiques dans des peptides est devenue au cours de ces dernières années une stratégie des plus intéressantes afin d'améliorer leurs caractéristiques physico-chimiques propres et leur aptitude à interagir avec leurs partenaires biologiques.

Afin de rigidifier le squelette peptidique et de favoriser l'établissement de structures privilégiées, les cyclisations du squelette par l'intermédiaire des extrémités N- et C-terminales ou par le biais des chaînes latérales fonctionnelles, ont été réalisées pour remplacer les peptides linéaires. Dans de nombreux cas, ces peptides cycliques se sont avérés être plus actifs que leurs précurseurs linéaires. Cependant, jusque là, aucune étude systématique n'avait été entreprise pour déterminer les possibilités de mimer une boucle naturelle fermée par un pont disulfure.

Dans la première partie de ce mémoire, nous nous sommes intéressés au fragment immunodominant cyclique 600-612 de la glycoprotéine gp41 du VIH-1, utilisé couramment dans les trousses de diagnostic du SIDA.

Des études structurales et immunologiques ont été menées en parallèle sur le peptide parent et différents analogues, comportant des modifications visant soit tout ou une partie du squelette peptidique, soit les chaînes latérales. L'analyse conformationnelle de la séquence naturelle est d'un grand intérêt en relation avec sa reconnaissance par les anticorps et dans le but d'aider à la conception d'une molécule dotée d'une plus forte affinité pour les anticorps. Nous avons ainsi conduit une modélisation moléculaire sous contraintes, dans le vide, des structures du peptide parent et de ses analogues, en espérant mettre en évidence des propriétés conformationnelles modulant leur activité par les anticorps. Les tests immunochimiques ont mis en évidence la présence d'analogues ayant une meilleure affinité que le peptide parent en

présence de sérums de patients séropositifs. Ils ont également montré que les résidus G, K et L étaient indispensables à la reconnaissance par les anticorps anti-gp41. Notre analyse conformationnelle a révélé que cette région était le siège d'éléments structuraux spécifiques (structures repliées). D'autre part, la disposition des chaînes latérales est telle que celles des résidus Lys et Ile pointent du même côté de la surface définie par la molécule, tandis que celle du résidu Leu leur est opposée. Les analogues comportant un pont lactame, de taille variable, ne peuvent généralement adopter de telles caractéristiques, expliquant par-là leur absence d'affinité vis-à-vis des anticorps anti-gp41. Nous avons aussi montré que le pont lactame ne pouvait constituer dans ce cas un bon mime de la liaison disulfure requise pour la reconnaissance du peptide. Le pont lactame impose une conformation trop contrainte du cycle. L'introduction de groupements méthylène $-CH_2$ apporte des degrés de liberté conformationnelle supplémentaires et permet de retrouver la flexibilité relative engendrée par le pont disulfure.

Enfin, notre étude a révélé que la conservation de la disposition des chaînes latérales des résidus essentiels permettait d'expliquer l'affinité des analogues substitués avec des acides aminés β vis-à-vis des anticorps anti-parents et en présence de quelques sérums de patients séropositifs. Ces dispositions ne sont cependant pas suffisantes vis-à-vis des anticorps anti-gp41, étant donné l'absence de structuration spécifique au niveau de la boucle.

Cette étude sur des pseudopeptides cycliques a consisté en une approche préalable pour tenter de déterminer des corrélations claires entre les données structurales et les propriétés immunochimiques. L'ensemble de ces résultats laisse entrevoir des orientations intéressantes dans la poursuite de ce travail. Dans la perspective de développer des mimes plus efficaces de la structure cyclique naturelle, il serait judicieux de conduire une étude en présence des anticorps monoclonaux anti-gp41 et anti-parents afin de vérifier les hypothèses avancées. Dans ces conditions, on se placerait dans le cas d'un système similaire à celui appliqué à la détection de l'antigène p24 dans les tests commerciaux de diagnostic du VIH-1. Un calcul de modélisation par homologie de la structure tridimensionnelle des anticorps, suivi par une opération par "*docking*" de l'antigène dans la cavité du site de liaison permettrait une connaissance plus approfondie de l'environnement structural du site de liaison des anticorps.

D'autre part, l'étude conjointe de la région homologue du VIH-2, formant également une boucle fermée par un pont disulfure, pourrait s'avérer riche en renseignements. Les deux séquences diffèrent largement dans leurs séquences primaires mais se révèlent fortement immunogènes. La mise en évidence de caractéristiques structurales conjointes constituerait un point de départ pour l'élaboration de nouvelles molécules.

Dans une seconde partie, nous avons développé des études structurales d'antigènes spécifiques, en interaction avec les effecteurs du système immunitaire car il n'est pas rare d'observer une évolution conformationnelle lors de la fixation de l'antigène par les anticorps. La connaissance de la géométrie locale du site d'interaction entre l'anticorps et son ligand est fondamentale pour mieux appréhender le mode de reconnaissance spécifique de l'antigène par l'anticorps, qu'il soit une macromolécule ou des peptides modifiés. Les expériences de transfert des effets Overhauser nucléaires permettent notamment d'obtenir des renseignements d'ordre structural sur la conformation de l'antigène au contact de l'anticorps.

Nous avons effectué l'étude structurale du fragment C-terminal de l'histone H3 et de ses analogues rétro-inverso, en interaction avec un anticorps monoclonal dirigé contre le fragment parent. Nous avons ainsi montré que les peptides L et RI de la séquence IRGERA adoptent une structure repliée au contact de l'anticorps monoclonal 4x11. Cependant, leur mode de repliement β implique des régions différentes dans les deux séries de peptides. La forte affinité vis-à-vis de l'anticorps monoclonal 4x11, observée avec les peptides rétro-inverso, voire proche de celle de l'histone H3, montre que les peptides rétro-inverso sont capables de mimer favorablement le site antigénique dans la protéine entière. Les calculs de dynamique moléculaire ont également montré que les chaînes latérales des résidus essentiels Glu₇, Arg₈ et Ala₉(mA₉) conservaient la même orientation par rapport au squelette peptidique, ce qui pourrait être une explication de l'activité antigénique croisée observée entre les peptides parents et rétro-inverso.

L'approche rétro-inverso est apparue comme une démarche originale dans le cadre de la reconnaissance antigénique et a montré son succès sur de nombreux systèmes. Cependant, jusqu'à présent, peu d'études structurales ont été réalisées sur ces analogues pseudopeptidiques. Cette étude est la première réalisée en présence d'anticorps spécifiques, et non à l'état libre. Elle a permis d'avancer des données structurales permettant de mieux appréhender le mécanisme de la reconnaissance antigénique dans le cas de ce type de pseudopeptides.

Enfin, dans la dernière partie de ce mémoire, nous avons mené une étude d'un système antigène/anticorps en relation avec une maladie auto-immune, la myasthénie (*Myasthenia Gravis*). Dans le but de déterminer le rôle fonctionnel et structural du site de phosphorylation Tyr, un fragment peptidique de la sous-unité β du récepteur de l'acétylcholine (RACH) a été étudié, sous forme phosphorylée et non phosphorylée, à l'état libre dans le DMSO et en interaction avec l'anticorps mAb148, dirigé contre le peptide non phosphorylé..

En raison de la présence de la séquence KPP, le peptide non phosphorylé à l'état libre se présente sous forme d'un mélange de deux conformères *trans* et *cis*, dans un rapport 80/20 respectivement. En présence de l'anticorps mAb148, le rapport *cis/trans* augmente jusqu'à 50/50. Les deux conformères sont également reconnus et présentent une meilleure affinité que le peptide phosphorylé.

Contrairement au peptide non phosphorylé, le peptide phosphorylé adopte une structure compacte avec formation d'une hélice 3_{10} déformée au niveau du fragment DEYFIR. Seule la conformation *trans* est présente. Les différences structurales observées sont en bon accord avec les tests biologiques. Cette étude conformationnelle préalable constitue un point de départ non négligeable pour une meilleure compréhension du rôle de la phosphorylation de la tyrosine dans le mécanisme du récepteur RACH. Les perspectives de ce travail sont prometteuses. Il serait entre autre judicieux d'étudier ces différents fragments en présence d'un autre anticorps dirigé contre le site de phosphorylation, mais ne pouvant inhiber le canal ionique du récepteur.

Les résultats présentés dans cette thèse illustrent l'apport de la RMN et de la modélisation moléculaire dans la détermination de structures tridimensionnelles de peptides seuls ou en interaction avec un anticorps monoclonal. Ils montrent en particulier les modifications structurales dues aux mécanismes d'interaction entre les différents partenaires biologiques.

ANNEXE A

MODELISATION MOLECULAIRE

A. MODELISATION MOLECULAIRE

La modélisation moléculaire est une méthode relativement ancienne qui a connu un développement spectaculaire grâce aux améliorations des capacités informatiques.

Elle est ainsi devenue partie intégrante du registre des méthodes d'analyse structurale, au même titre que la spectroscopie par Résonance Magnétique et la diffraction des rayons X.

Son but est entre autre de déterminer une structure ou un ensemble des structures tridimensionnelles de molécules biologiquement actives, compatibles avec les données de RMN ou de RX. Cette technique est particulièrement utile lorsqu'il s'agit de rationaliser la conception de nouvelles molécules à visée thérapeutique (drug design), de développer de nouveaux matériaux ou encore d'étudier la réactivité moléculaire.

A-1. Représentation de la fonction d'énergie potentielle

Le champ de force est la représentation empirique de la surface d'énergie potentielle et contient tous les paramètres nécessaires aux calculs:

- La forme mathématique des équations mettant en jeu les coordonnées utilisées (longueur des liaisons, angles de valence et angles dièdres) et les atomes non liés (termes électrostatiques et de van der Waals).
- Les paramètres expérimentaux utilisés pour reproduire correctement la structure covalente d'une molécule.¹

Ces valeurs sont collectées d'après des résultats expérimentaux obtenus par spectroscopie Infra-Rouge, micro-onde, diffraction des rayons X, diffraction des neutrons ou à partir de calculs quantiques ou semi-empiriques.

a. Description

Le champ de force se décompose en plusieurs termes:

$$V(r) = V_{(\text{covalent})} + V_{(\text{non covalent})}$$

$$\text{Où } V_{(\text{covalent})} = V_d + V_\theta + V_\phi + V_\chi + V_{\text{déformation}}$$

$$V_{(\text{non covalent})} = V_{\text{VDW}} + V_{\text{élec.}} + V_{\text{HB}}$$

Il sera décrit ici les équations du champ de force CVFF² (Consistent Valence Forcefield), implémenté dans le logiciel DISCOVER³ que nous avons utilisé dans nos études.

$$\begin{aligned}
 E_{pot} = & \sum_b D_b [1 - \exp(-a(b - b_o))]^2 + \frac{1}{2} \sum_{\vartheta} H_{\vartheta} (\vartheta - \vartheta_o)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\phi} H_{\phi} [1 + \cos(n\phi - \tau)] + \frac{1}{2} \sum_{\chi} H_{\chi} \chi^2 \\
 & + \sum_b \sum_{b'} F_{bb'} (b - b_o)(b' - b'_o) + \sum_{\vartheta} \sum_{\vartheta'} F_{\vartheta\vartheta'} (\vartheta - \vartheta_o)(\vartheta' - \vartheta'_o) + \sum_b \sum_{\vartheta} F_{b\vartheta} (b - b_o)(\vartheta - \vartheta_o) \\
 & + \sum_{\phi} F_{\vartheta\vartheta'\phi} \cos \phi (\vartheta - \vartheta_o)(\vartheta' - \vartheta'_o) + \sum_{\chi} \sum_{\chi'} F_{\varphi\chi} \chi \chi' + \sum_i \sum_{j>i} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right] + \sum_{\text{paires}} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{10}}
 \end{aligned}$$

Une illustration de ces termes est donnée sur la figure A-1:

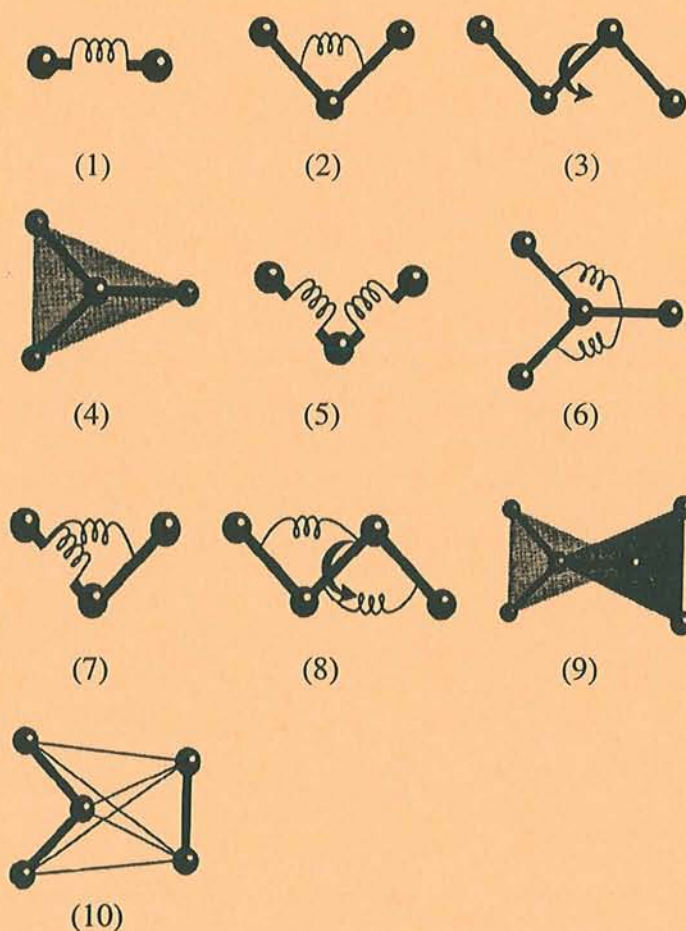


Figure A-1. Représentation graphique du champ de force CVFF

V_d (Figure A-1.1) est une fonction d'énergie de Morse liée à la longueur b de la liaison chimique. Le paramètre D_b est une constante de force associée à cette liaison et variable selon son type. La constante b_0 est la constante à l'équilibre.

V_θ (Figure A-1.2) est une fonction harmonique qui force l'angle de valence θ à s'approcher de sa valeur d'équilibre θ_0 ; H_θ est la constante de force.

V_ϕ (Figure A-1.3) est une fonction qui correspond à l'énergie de rotation de l'angle dièdre ϕ : H_ϕ est la constante de force, ϕ_0 la phase et n la multiplicité.

V_χ (Figure A-1.4) est une fonction associée aux angles de torsion impropres des atomes coplanaires

$V_{\text{déformation}}$ (Figure A-1.5/9) correspond à des termes non diagonaux représentant l'énergie de couplage de déformation des différentes coordonnées internes. Contrairement aux autres termes, ce terme n'a pas d'influence décisive sur le résultat des calculs.

V_{VDW} (Figure A-1.10) est le potentiel de Lennard-Jones de type "6-12" comprenant trois termes d'interaction: la répulsion de van der Waals provenant du principe d'exclusion de Pauli, la répulsion électrostatique nucléaire et la dispersion de London (attraction de type dipôle-dipôle) due à la fluctuation des charges d'un atome à proximité d'un autre.

A_{ij} et b_{ij} sont spécifiques de chaque couple d'atomes i, j et r_{ij} est la distance entre ces deux atomes.

V_{elec} (Figure A-1.10) est un terme représentant l'énergie d'interactions coulombiennes entre 2 atomes porteurs de charges ponctuelles q_i et q_j , séparés par une distance r_{ij} et dans un milieu caractérisé par une constante diélectrique ϵ .

V_{HB} est une fonction de type Lennard-Jones introduisant explicitement l'énergie de liaison hydrogène. Elle n'est pas définie dans tous les champs de force. Sa présence dans l'équation est facultative. Essentiellement d'ordre correctif, V_{HB} est introduit dans quelques champs de force afin de compenser une mauvaise description des liaisons hydrogène.

Comme on l'a vu, chaque champ de force est caractérisé par son jeu de paramètres. Ils ont ensuite été testés et affinés sur différents systèmes. Cela implique que chaque jeu de paramètres est adapté aux types de molécules pour lesquels il a été ajusté. Certains champs de force sont plus particulièrement destinés aux petites molécules organiques comme MM2⁴ ou organo-métalliques comme ECFF.²

D'autres s'adaptent mieux aux macromolécules biologiques comme ECEPP,⁵ AMBER,⁶ GROMOS,⁷ CHARMM⁸ ou CVFF.² Certains champs de force sont plus généralistes: TRIPOS⁹ ou CFF91.¹⁰

b. Problèmes liés à l'évaluation des interactions non liées

Le calcul des termes énergétiques de toutes les paires d'atomes non liés d'une molécule prendrait un temps considérable car le nombre d'opérations à effectuer est proportionnel à N^2 , N étant le nombre d'atomes de la molécule. On doit donc limiter dans les calculs la portée des interactions à une certaine distance appelée distance de coupure ou *cut off*.

Comme la valeur des forces de van der Waals est proportionnelle à $1/r^6$, il est raisonnable de prendre une distance de coupure de l'ordre de 8-10Å. Dans le cas des forces coulombiennes, proportionnelles à $1/r$, il faut définir un rayon de coupure plus grand.

Cependant, si les *cut offs* sont appliqués sur la base d'une interaction atome-atome, des artefacts peuvent être introduits lorsque le dipôle comporte un atome à l'intérieur du rayon de coupure et un autre à l'extérieur. Au lieu d'ignorer une interaction dipôle-dipôle relativement faible, on introduit artificiellement une grande interaction monopôle-monopôle. Pour éviter ces artefacts, on applique les *cut offs* sur les groupes chargés. Si la distance entre deux atomes de deux groupes chargés est inférieure au *cut off*, toutes les interactions entre paires sont tenues en compte. Par contre, si elle est supérieure, tous les atomes sont exclus.

Cependant, couper abruptement les interactions non liées à une certaine distance conduit à des discontinuités dans le calcul de l'énergie. La stricte conservation de l'énergie dans le système microcanonique (où le nombre N de molécules, le volume V et l'énergie interne E demeurent constants) est rompue.¹¹

C'est pourquoi, pour éviter la discontinuité de l'énergie, on multiplie les termes d'interaction non liée à proximité de l'extrémité de la distance de coupure par une fonction $S(r)$, dite fonction d'amortissement ou de *switch* qui est définie par deux variables :

- Une qui détermine le point à partir duquel la fonction est égale à zéro
- Une qui définit l'intervalle dans lequel la fonction décroît doucement de 1 à 0

Cela permet d'atténuer l'énergie d'interaction de manière continue.⁸

La forme de cette fonction est représentée sur la figure A-2:

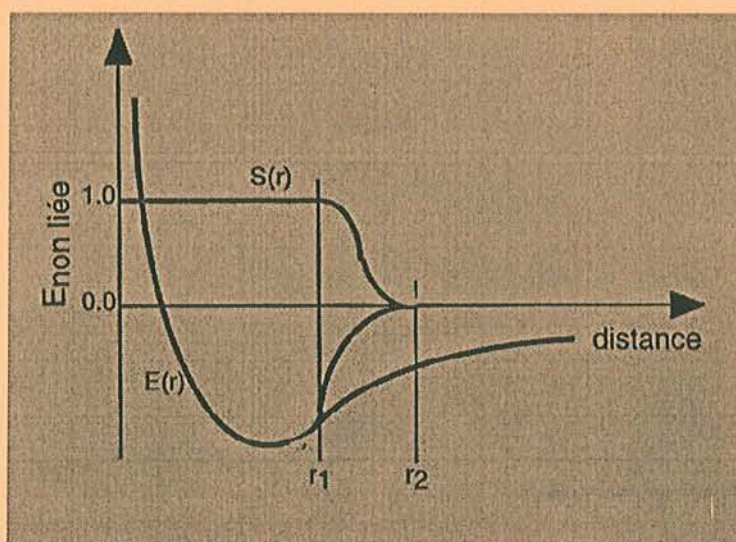


Figure A-2. Le potentiel effectif, $E_{\text{non liée}}$, est le produit du potentiel non lié $E(r)$ et de la fonction d'amortissement $S(r)$

La forme la plus courante de la fonction $S(r)$ est celle d'un polynôme d'ordre 2:¹²

$$\begin{aligned}
 S(r, R_s, R_c) &= 1 && \text{pour } r < R_s \\
 &= \frac{(R_c^2 - r^2)(R_c^2 + 2r^2 - 3R_s^2)}{(R_c^2 - R_s^2)^3} && \text{pour } R_s < r < R_c \\
 &= 0 && \text{pour } r > R_c
 \end{aligned}$$

avec $\left[\frac{dS}{dr} \right]_{R_s} = \left[\frac{dS}{dr} \right]_{R_c} = 0$ et $S(R_c) = 0$

R_c étant le rayon de coupure et R_s le rayon de *switch* telle que l'interaction soit amortie dans l'intervalle $[R_s, R_c]$.

Cette façon d'évaluer les interactions non liées est très simpliste. En fait, les interactions électrostatiques entre les groupes chargés ne sont pas négligeables, même à une distance au-delà de 20Å. Cependant, il est impossible de tenir compte dans les calculs d'un rayon de coupure de cet ordre de grandeur car le temps de calcul augmente proportionnellement avec le carré du nombre d'atomes et le cube du rayon de coupure. L'optimisation de tous ces paramètres est importante quant à l'évaluation des interactions à longue distance. Ceci peut avoir une grande influence sur la stabilité du comportement dynamique de la molécule.¹¹

D'autres méthodes sont envisagées pour évaluer les interactions non liées (interactions de Coulomb et London) notamment celle du double rayon de troncature ou *double cut off*.¹² Dans cette approche, toutes les interactions non liées de deux atomes, dont la distance est inférieure au premier rayon de coupure, sont estimées. Par contre, pour les atomes dont l'écart se situe entre les deux rayons de coupure, leurs interactions sont déterminées avec une fréquence plus grande.

Une autre méthode « *Cell multipole method* »,¹³ plus rigoureuse et plus efficace, divise le volume dans lequel est enfermée la molécule en cellule parentes. Dans chacune d'elles, la distribution des charges ponctuelles est remplacée par le développement en séries des multipoles : monopoles (q), dipôles (μ), quadrupoles, etc...

Le potentiel d'interaction ϕ des atomes de chaque cellule est défini comme la contribution ϕ_S des atomes des cellules avoisinantes (C_S) et la contribution ϕ_L de l'ensemble A des atomes des cellules lointaines (C_L), centrées en position (r_A).

$$\phi(r) = \phi_S(r) + \phi_L(r) = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \sum_{j \in C_S} \frac{q_j}{|r_j - r|} + \sum_{A \in C_L} \phi_q(r - r_A) + \phi_\mu(r - r_A)$$

Cette méthode est destinée aux systèmes moléculaires plus importants. Son avantage considérable par rapport à la méthode précédente réside dans le nombre plus réduit d'interactions à calculer qui est proportionnel à N et non plus à N².

c. Prise en compte du solvant

Les interactions dues au solvant jouent un rôle essentiel dans la détermination des conformations et des propriétés des macromolécules.¹⁴⁻¹⁶

Différentes méthodes permettant de tenir compte du solvant ont été mises au point. Aucune n'est réellement satisfaisante et ne permet de modéliser à la fois les propriétés physiques du solvant et d'un système macromoléculaire lors d'une même simulation.

Les simulations en présence de solvant explicite nécessitent un grand nombre de molécules de solvant, de façon à pouvoir inclure les interactions à longue distance. De fait, elles sont extrêmement coûteuses en temps de calculs.

Il se pose alors le problème du choix de la constante diélectrique ϵ selon que les calculs sont effectués dans le vide ou en présence de molécules de solvant.

(1). Solvant implicite

En raison de la difficulté de représenter le milieu environnant, la plupart des simulations sont effectuées dans le vide, en particulier lorsque l'on cherche à explorer l'espace conformationnel. On choisit alors une valeur de la constante diélectrique qui dépend de la distance $\epsilon = r_{ij}$.^{6,17}

Cette méthode présente deux avantages. Elle permet tout d'abord de mieux rendre compte des effets de polarisation dans les interactions attractives en donnant un poids plus important aux interactions à très courte distance. Elle permet ensuite de compenser l'absence de molécules de solvant en réduisant les interactions à longue distance plus que celles à courte distance simulant l'effet d'écran du solvant.

On a montré^{18,19} que les meilleurs résultats pour les peptides et les petites protéines en solution aqueuse sont obtenus avec une constante diélectrique $\epsilon_r(r) = 4r_{ij}$. Il n'y a pas réellement d'argument physique pour justifier ce choix.

Toutefois, l'absence de solvant ne permet pas de rendre compte des effets de solvation sur des groupes chargés. Une diminution de la charge ponctuelle du groupement chargé solvaté peut permettre de palier à ce problème.

(2). Solvant explicite

Dans le cas d'études cinétiques ou dynamiques dépendant du temps, il est primordial de représenter explicitement le solvant afin de tenir compte des effets de ralentissement dus aux forces de friction. Cela est également vrai lorsque l'on veut mettre en évidence une interaction particulière, par exemple entre une molécule d'eau et une protéine.

Etant à la fois donneur et accepteur de liaisons hydrogène, les molécules d'eau jouent un rôle très important dans la stabilisation de la structure locale des biomolécules, et dans la stabilisation des complexes protéines-ligands où une molécule d'eau peut intervenir par pontage.²⁰

Pour représenter les molécules de solvant, on peut soit utiliser une couche de solvant, soit plonger la molécule dans une boîte de solvant. Cette dernière méthode est la plus efficace car elle permet de limiter les problèmes de discontinuités des interactions en utilisant les conditions périodiques aux limites (Periodic Bound conditions, PBC).

Une image de la boîte centrale est répétée dans les trois directions de l'espace. Chaque molécule de solvant sortant de la boîte est remplacée par une molécule image, qui suivant la même trajectoire, va rentrer dans la boîte du côté opposé. Ainsi, chaque molécule est entourée de voisins, qu'ils soient réels ou qu'ils s'agissent de molécules images.

La valeur de la constante diélectrique sera alors choisie égale à une constante $\epsilon=1$. Une valeur de $\epsilon=78$ pour l'eau par exemple reviendrait en effet à prendre deux fois en compte l'effet du solvant.

A-2. Mécanique moléculaire

Une fois le champ de force choisi, le calcul le plus simple pour la recherche de la conformation de plus basse énergie potentielle et donc de la conformation la plus stable est la minimisation d'énergie.

Différentes méthodes sont accessibles, basées sur des algorithmes itératifs, qui à chaque étape, déterminent un point où la fonction énergie potentielle est plus faible que la précédente. Une recherche de minima ne conduira qu'à la détermination de minima locaux, correspondant à une conformation de la molécule proche de celle de départ.

Ces méthodes sont utilisées essentiellement pour:

- Supprimer les mauvais contacts interatomiques
- Affiner un modèle déterminé
- Comparer la stabilité relative de différents modèles

Il existe de nombreux algorithmes de minimisation plus ou moins efficaces et rapides. L'objectif de ces méthodes est, à partir d'une structure définie par les coordonnées de départ R_0 , de déterminer un vecteur r_n de déplacement des coordonnées, qui ramène la molécule dans l'endroit de l'espace conformationnel où le minimum de potentiel peut être atteint, c'est-à-dire $V(R_n + r_n) < V(R_n)$. La procédure est arrêtée après k itérations si $V(R_k) \leq V(R_{k-1})$.

a. Steepest descent

Dans la méthode de la plus grande pente ou *steepest descent*, la nouvelle géométrie est définie en suivant la plus grande pente de la surface d'énergie potentielle autour de la géométrie initiale. R_n s'écrit en fonction du gradient de potentiel (Figure A-3):²¹

$$R_n = -\alpha_n \Delta E(R)$$

Où α_n est un paramètre qui définit le pas de déplacement. Ce dernier évolue à chaque itération en fonction de l'énergie. Si cette dernière augmente, le pas sera plus petit à l'étape suivante. Dans le cas contraire, pour accélérer la convergence, il sera grand.

Cette méthode est surtout efficace dans le cas d'une minimisation préliminaire, visant l'élimination des mauvais contacts de van der Waals. Elle a cependant le désavantage de joindre le minimum le plus proche, sans pouvoir franchir les barrières de potentiel d'énergie élevées.

La convergence de cette procédure au voisinage du minimum n'est pas bonne (convergence trop lente, phénomène d'oscillations).

b. Conjugate gradient

Basé sur le même principe que la méthode précédente, cet algorithme^{22,23} utilise le résultat des itérations précédentes de façon à accélérer la convergence à l'approche du minimum. La première itération suit la direction opposée à celle du gradient, mais les itérations suivantes

suivent la direction donnée par une combinaison linéaire de l'opposé du gradient et des directions de recherches précédentes (figure A-3):

$$R_n = -\alpha \delta_n$$

$$\delta_n = [-\Delta_n E + \Delta_{n-1} \beta_n]$$

$$\beta_n = \frac{|\nabla_n E|^2}{|\nabla_{n-1} E|^2}$$

dans le cas de la méthode de Polak-Ribiere

$$\text{ou } \beta_n = \frac{\nabla_n^T E |\nabla_n E - \nabla_{n-1} E|}{|\nabla_{n-1} E|^2}$$

dans le cas de la méthode de Fletcher-Reeves

La convergence de cet algorithme est meilleure que celle de la méthode précédente. C'est une méthode de choix pour les systèmes larges.



Plus grande Pente



Gradients Conjugués

Figure A-3:

Evolution des itérations dans un puits d'énergie (contours) en fonction des algorithmes. Le point de départ est en a.

c. Newton-Raphston

Cette méthode permet de trouver le minimum d'une fonction en l'approchant par son développement de Taylor au 2^e ordre (développement quadratique). On évalue alors non seulement le gradient mais également le hessien de la fonction d'énergie:

$$E(R) = E(R_n + d) \approx E(R_n) + d \nabla E(R_n) + \frac{1}{2} d^T \nabla^2 E(R_n) d \text{ avec } d = R - R_n$$

Cette méthode est lourde en calculs car elle requiert un espace mémoire important mais bénéficie d'une excellente convergence. Elle se limite à des systèmes de petite taille.

d. Quasi Newton-Raphston

C'est une variation de la méthode précédente qui utilise un calcul numérique et non analytique de la dérivée seconde permettant une itération plus rapide.²⁴

La méthode est moins sensible aux structures instables mais conserve les limitations quant au nombre d'atomes. Par contre, le critère de fin de recherche est basé sur la minimisation des forces (dérivée seconde). Elle se révèle donc plus adaptée pour achever la minimisation quand la structure est déjà relativement proche du minimum.

A-3. Dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire permet de simuler le comportement dynamique d'une molécule. Elle permet aussi d'explorer tout l'espace conformationnel grâce à l'apport d'énergie cinétique qui autorise le franchissement des barrières de potentiel plus importantes que par minimisation.

Ce calcul permet de résoudre de manière numérique les équations du mouvement d'un ensemble de N atomes d'une molécule dont les interactions sont définies par sa fonction potentielle V . Après avoir opéré une première distribution aléatoire des vitesses atomiques à la température désirée, de nouvelles positions atomiques sont recalculées régulièrement afin de simuler l'évolution du système au cours du temps. La fréquence de calculs des nouvelles coordonnées doit être de l'ordre de grandeur des mouvements moléculaires de haute fréquence (10^{-15} s) pour une intégration correcte de la trajectoire. L'étude des mouvements lents (grande amplitude/ basse fréquence) tels que des réarrangements de structure tertiaire dans les protéines sont donc difficiles à étudier du fait du temps important de simulation demandé.

L'équation de Newton est l'équation du mouvement la plus couramment utilisée pour décrire la dynamique d'un système sur une échelle de temps allant de la femto à la nanoseconde.

Elle s'écrit comme suit:

$$F_{ij}(t) = m_i \frac{d^2 r_{ij}(t)}{dt^2} = m_i a_{ij}$$

où F_{ij} représente la composante suivant la direction j de la résultante des forces agissant à chaque instant sur l'atome i , et r_{ij} est la coordonnée j de l'atome i de masse m_i .

F_{ij} est relié à la fonction d'énergie potentielle précédemment décrite par:

$$F_{ij}(t) = -\nabla_{r_{ij}} V(r_i) = -\frac{\delta}{\delta r_i} V(r_1, r_2, \dots, r_N)$$

Pour une molécule de N atomes, on obtient alors un système de $3N$ équations indépendantes. Elles peuvent être résolues à condition que les forces soient calculées dans un laps de temps suffisamment court pour qu'elles puissent être considérées comme constantes.

Différents algorithmes permettent la résolution de l'équation newtonienne par leur intégration discrète en fonction du temps.

Ils sont tous basés sur le même principe, qui consiste en la détermination des grandeurs à l'instant $t + \delta t$ à partir d'informations connues à l'instant t , δt étant le pas d'intégration.

Ils utilisent un développement en série de Taylor au voisinage de t de la position pour l'algorithme de Verlet,²⁵ et un développement en série de Taylor au voisinage de t de la vitesse pour l'algorithme de Leap Frog.²⁶

a. Algorithmes d'intégration

(1). Algorithme de Verlet:

$$r_{ij}(t + \delta t) = r_{ij}(t) + \delta t v_{ij}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a_{ij}(t) + \frac{1}{3!} \frac{\delta a_{ij}}{\delta t} + \delta t^4 O(t)$$

$$r_{ij}(t - \delta t) = r_{ij}(t) - \delta t v_{ij}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a_{ij}(t) - \frac{1}{3!} \frac{\delta a_{ij}}{\delta t} + \delta t^4 O(t)$$

où v_{ij} et a_{ij} sont les composantes des vitesses et de l'accélération et r_{ij} est la coordonnée j de l'atome i de masse m_i d'où.

$$r_{ij}(t + \delta t) = 2r_{ij}(t) - r_{ij}(t - \delta t) + \delta t^2 a_{ij}(t) + \delta t^4 O(t)$$

r_{ij} est donc déterminé à partir de la position et de l'accélération du pas précédent. Le terme négligé est d'ordre 4. Cette expression n'inclut pas le calcul explicite des vitesses et ne permet pas, lors d'une simulation de dynamique moléculaire un contrôle de la température du système par ajustement des vitesses. Afin d'évaluer l'énergie cinétique, on peut calculer la vitesse par la relation suivante:

$$v_{ij}(t) = \frac{r_{ij}(t + \delta t) - r_{ij}(t - \delta t)}{2\delta t}$$

(2). Algorithme Leap-Frog

Par le développement limité de $v_{ij}(t + \frac{\delta t}{2})$ et de $v_{ij}(t - \frac{\delta t}{2})$, on obtient:

$$v_{ij}(t + \frac{\delta t}{2}) = v_{ij}(t - \frac{\delta t}{2}) + a_{ij}(t)\delta t + O(\delta t^3)$$

d'où:

$$r_{ij}(t + \delta t) = r_{ij}(t) + v_{ij}(t + \frac{\delta t}{2})\delta t + O(\delta t^3)$$

Cet algorithme permet d'effectuer des simulations de dynamique moléculaire avec un couplage à un bain thermique.

b. Contrôle des contraintes internes

Ces deux algorithmes requièrent la connaissance de la vitesse et de la position des atomes à t_0 , et nécessitent une variation régulière des vitesses et des positions.

Ils sont stables sur un nombre de pas d'intégration limité, ce qui implique de prendre un δt court, de l'ordre de 0.5 fs dans le cas des biomolécules.

L'application de contraintes internes (contraintes de longueur de liaison et d'angles de valence) permet d'accélérer les calculs en éliminant partiellement les vibrations des liaisons covalentes, ce qui permet de ramener l'incrément de temps à un ordre de 3 secondes.

L'algorithme SHAKE^{27,28} et sa version améliorée RATTLE²⁹ permettent d'appliquer cette approximation.

c. Contrôle des paramètres physiques

Les paramètres de température, de pression et de volume sont primordiaux dans la caractérisation des propriétés physiques ou biologiques. Les simulations de dynamique sont souvent effectuées sur des systèmes canoniques à nombre de particules, température et volumes constants le long de la trajectoire. Ce choix permet d'imposer au système une température désirée T_0 , laquelle est généralement autour de 298K pour l'étude des biomolécules.

Différentes méthodes sont disponibles:

(1). Rééchelonnement direct des trajectoires atomiques ("direct velocity scaling")

Cette méthode est basée sur l'évaluation à chaque étape du calcul de la température instantanée T_1 du système, et sur sa comparaison avec la température de référence T_0 . Dans le cas où elles sont différentes, les vitesses V_1 de chaque atome sont réajustées par un facteur $(T_0/T_1)^{1/2}$ dans l'itération suivante. La température de référence n'intervient donc pas directement dans les équations de Newton mais elle est appliquée comme condition supplémentaire.

En agissant directement sur la valeur de l'énergie cinétique (par le biais des vitesses), on change l'énergie du système atomique d'une manière aussi brusque qu'artificielle. Pour éviter toute perturbation, on utilise le ré-échantillonnage des vitesses lorsque la différence entre la température instantanée et la température de référence dépasse 5 à 10K.³⁰

En effet, lorsque cette technique est appliquée à long terme, elle peut entraîner des déséquilibres thermiques pour la molécule. De façon générale, elle n'est employée que dans la première partie de la simulation, durant une étape de thermalisation, afin d'augmenter progressivement la température du système jusqu'à la température de référence. Son utilisation est vivement déconseillée dans les étapes suivantes du calcul.

(2). Thermostat de Berendsen

Après avoir ramené la température du système à la valeur désirée dans l'étape de thermalisation, on peut appliquer une méthode plus souple de contrôle. La méthode couramment utilisée³¹ consiste à coupler le système à simuler avec un bain thermique externe, afin d'assurer un libre échange d'énergie thermique. Cette opération intervient directement au niveau des équations du mouvement, puisqu'à chaque pas du calcul toutes les vitesses sont multipliées par le facteur λ , défini de la façon suivante:

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\Delta t(T_i - T_o)}{\tau}}$$

Dans la formule ci-dessus, Δt représente le pas de temps d'intégration et τ est le temps de relaxation thermique (constante de couplage thermique). Ce dernier joue un rôle très important: dans le cas d'un couplage trop fort, on risque de modifier les propriétés dynamique de la molécule simulée, et si le couplage est trop faible, les propriétés thermodynamiques du système peuvent être altérées.

Dans la pratique, on utilise des valeurs comprises entre 0.02 ps (couplage fort) et 0.1 ps (couplage faible) pour les périodes d'équilibration et de production.

(3). Thermostat de Nosé-Hoover

Il s'agit d'une méthode assez récente du contrôle de la température. Elle consiste à introduire dans les équations du mouvement un degré de liberté fictif sous la forme d'une masse Q . Le système étendu (molécule + masse Q) est alors simulé dans les conditions de l'ensemble microcanonique (NVE). Ceci impose des conditions d'ensemble canonique (NVT) pour la dynamique du système non étendu. Le choix approprié de la masse fictive Q a évidemment des conséquences décisives pour l'efficacité de cette méthode. Il est conseillé d'utiliser une valeur de Q de l'ordre du produit $N_d kT$,^{32,33} où N_d est le nombre de degrés de liberté du système réel, T_0 est la température désirée et k est la constante de Boltzmann. Cette méthode nécessite l'application d'un incrément de temps très court (0.5 fs), ce qui rend difficile les longues simulations.

d. Introduction de données expérimentales

La possibilité d'introduire des données expérimentales dans les calculs de dynamique moléculaire permet de réduire l'espace conformationnel à explorer, et par conséquent de limiter le coût en calculs. On effectue alors une exploration de façon à déterminer les conformations qui respectent les données introduites, tout en présentant une géométrie covalente correcte. Les contraintes expérimentales sont introduites sous forme de pseudo-forces qui s'ajoutent aux termes du champ de force déjà connus.

Ces potentiels supplémentaires sont définis de la manière suivante:

- Soit le potentiel V_{dist} associé aux contraintes de distance

$$V_{dist} = k_u (r_{ij} - r_{ij}^u)^2 \text{ pour } r_{ij} \geq r_{ij}^u$$

$$\begin{aligned} &\text{pour } r_{ij} \geq r_{ij}^U \\ &k_L (r_{ij} - r_{ij}^L)^2 \text{ pour } r_{ij} \leq r_{ij}^L \end{aligned}$$

où k_L , k_U sont les constantes de force associées aux valeurs minimales r_{ij}^L et maximales r_{ij}^U des distances expérimentales.

- Soit le potentiel V_{dih} associé aux contraintes d'angles dièdres

$$V_{dih} = k_{dih} [1 - \cos(\phi - \phi_o)]$$

Où k_{dih} est une constante de force associée à la valeur expérimentale de l'angle dièdre ϕ_o .

Dans le cas des contraintes de distance, il est possible, en imposant des valeurs inégales pour les constantes k_L et k_U d'utiliser un potentiel V_{dist} de forme asymétrique. De même, la largeur du puits de ce potentiel peut être réglée par les valeurs des deux distances r_{ij}^L et r_{ij}^U .

Dans le cas extrême où elles sont égales, le potentiel V_{dist} est très restrictif; une grande rigidité conformationnelle est alors imposée à la molécule.

A-4. Les différentes méthodes de géométrie de distances (DG)

Une fois les contraintes géométriques introduites sous forme de termes énergétiques supplémentaires, on peut passer à des calculs de simulation moléculaire. Pour cela, il est nécessaire de disposer d'un jeu de coordonnées spatiales initiales.

Les méthodes de géométrie de distances, développées à l'origine par Crippen et coll.^{34,35} à partir de la théorie mathématique de Blumenthal,³⁶ permettent de générer un grand nombre de structures initiales respectant les contraintes RMN, et ceci dans un temps de calcul modéré.

a. Méthode de la matrice métrique (utilisant les coordonnées cartésiennes)

De nombreux programmes disponibles sont basés sur la méthode de la matrice métrique (DGEOM, DG-II³⁴, DISGEO,³⁷ DSPACE, EMBED, VEMBED, XPLOR/dg³⁸).

Les structures sont générées à partir des contraintes géométriques prises simultanément.

Une procédure de calcul matriciel "*embedding*" (changement d'espace) effectue ensuite la conversion des $N(N-1)$ coordonnées de distances en $3N$ coordonnées cartésiennes.

Le principe de cette méthode est de convertir la matrice des distances en coordonnées cartésiennes pour chacun des atomes de la molécule.

Pour une détermination de structures basées sur la connaissance de données expérimentales, on ne dispose évidemment pas de toutes les distances interatomiques. On dispose en fait:

- des distances entre atomes consécutifs, obtenues à partir des longueurs de liaisons
- des distances entre atomes séparés par deux liaisons, obtenues à partir des angles de valence
- des intervalles de distances interprotoniques déduites des NOE; les valeurs des bornes supérieures U_{ij} et inférieures L_{ij} des intervalles sont placées dans la matrice métrique respectivement au-dessus et en-dessous de la diagonale.

Concernant les distances inconnues, on prend un intervalle de distance compris entre 1.8Å (deux fois le rayon de van der Waals de l'atome d'hydrogène) et 999Å.

Une étape appelée "*bound smoothing*" va permettre de réduire l'écart entre les valeurs inférieures et supérieures à partir d'inégalités triangulaires ou quadrangulaires:

$$U_{ij} \leq U_{ik} + U_{kj}$$

$$L_{ij} = \sup(L_{ij}, L_{ik}-U_{kj}, L_{jk}-U_{ki})$$

Un tirage aléatoire des d_{ij} dans les intervalles $[L_{ij}, U_{ij}]$ permet d'échantillonner l'espace des solutions. L'étape d'*embedding* consiste ensuite à diagonaliser la matrice (G) ainsi construite. Et, étant donné l'imprécision due aux intervalles, pour les distances inconnues et pour les distances NOE, la matrice (G) va posséder plus de trois valeurs propres non nulles. Les structures géométriquement obtenues vont donc s'inscrire dans un espace de plus haute dimension que l'espace cartésien. Les trois plus grandes valeurs propres sont choisies pour déterminer les coordonnées cartésiennes des atomes de la molécule. Il en résulte une perte d'informations responsable en partie de la mauvaise qualité des contraintes structurales. Il faut ensuite passer à l'optimisation en minimisant la fonction objective E définie de la manière suivante:

$$E = 0 \text{ si } L_{ij} < D_{ij} < U_{ij}$$

$$E = \sum_{ij} K_{ij} (B_{ij}^2 - D_{ij}^2)^2 \text{ dans le cas contraire}$$

Où D_{ij} est la valeur calculée de la distance interatomique et B_{ij} la limite inférieure ou supérieure de l'intervalle des valeurs possibles.

Des termes supplémentaires peuvent être ajoutés pour tenir compte des informations COSY et pour fixer la chiralité des carbones asymétriques. Le degré de raffinement dépend du logiciel utilisé.

b. Méthode de la fonction cible (utilisant des coordonnées internes)

Cette méthode, développée par Braun,³⁹ permet de travailler directement dans l'espace des angles dièdres, et minimise une fonction cible en gardant constante la longueur des liaisons et les valeurs angulaires (les degrés de libertés sont les valeurs des angles dièdres).

On calcule ensuite une fonction cible définie de la manière suivante:

$$T = \sum_{i < j} (d_{ij} - U_{ij})\vartheta(d_{ij} - U_{ij}) + (L_{ij} - d_{ij})\vartheta(L_{ij} - d_{ij}) + (r_{ij} - d_{ij})\vartheta(r_{ij} - d_{ij})$$

où $\theta(x) = 0$ si $x \leq 0$

$\theta(x) = 1$ si $x > 0$

d_{ij} , U_{ij} et L_{ij} sont définis comme précédemment dans la méthode de la matrice métrique et r_{ij} représente la somme des rayons de van der Waals des atomes i et j .

Les données expérimentales sont introduites graduellement afin de réduire le risque de piéger la molécule dans un minimum local. L'optimisation de cette fonction permet de déterminer les jeux d'angles respectant à la fois les données RMN et les contraintes de van der Waals.

Cette méthode est utilisée dans les logiciels DISMAN^{39,40} et DYANA,⁴¹ que nous avons plus particulièrement utilisé dans cette étude.

A la différence de la version précédente DIANA,⁴² ce logiciel effectue un recuit simulé par dynamique moléculaire et utilise un algorithme récursif plus rapide pour intégrer les équations du mouvement.

Ces deux méthodes permettent de générer rapidement un grand nombre de structures dont certaines seront éliminées (nombre de violations NOE trop importants, etc...)

Cependant les potentiels sont très simplifiés et il est nécessaire de raffiner les structures obtenues par une optimisation par minimisation d'énergie et dynamique moléculaire à température ambiante en utilisant les fonctions potentielles classiques (CHARMM,⁸ AMBER,⁶ GROMOS,⁷ DISCOVER³).

c. Méthode du recuit simulé

Le recuit simulé est une méthode proche d'une dynamique moléculaire à température variable permettant une rapide exploration de l'espace conformationnel.

Une haute température et la réduction des constantes de force des différents termes énergétiques appliqués lors des premières étapes permettent d'éviter les minima locaux. (figure A-5)

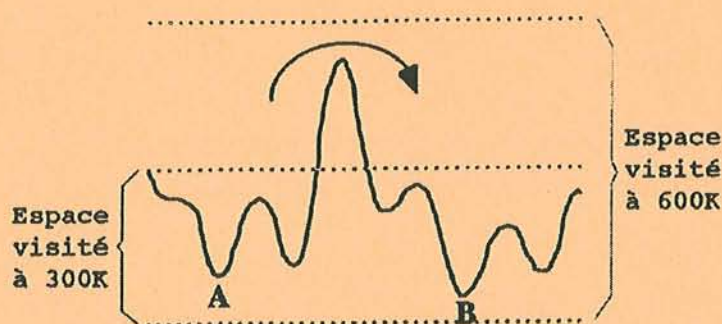


Figure A-4:

Franchissement d'une barrière d'énergie rendu possible par des simulations à haute température permettant plus sûrement de trouver le minimum d'énergie globale (B)

Cela revient schématiquement à évoluer loin au-dessus de l'hypersurface d'énergie, au-dessus des barrières de potentiels. Quand l'équilibre est atteint, la température est progressivement réduite de telle sorte que le système converge vers une conformation correspondant à un minimum d'énergie.

Une simulation effectuée à haute température n'a pas de sens physique, mais elle permet d'explorer un plus grand espace conformationnel et est tout à fait adaptée aux calculs de détermination de structures basés sur l'exploitation de données expérimentales.

d. Méthode dépendante du temps

Les distances interprotoniques déterminées à partir des contraintes RMN proviennent de la contribution de plusieurs conformations si bien que les simulations de dynamique moléculaire ne permettent pas de générer des structures respectant l'ensemble des contraintes imposées.

Pour remédier à ces problèmes, il est possible d'introduire des contraintes dépendantes du temps, ce qui n'oblige pas la molécule à satisfaire les contraintes à chaque étape mais en moyenne sur un intervalle de temps donné.^{43,44}

Cette méthode efficace conduit à un meilleur accord avec les données RMN que les méthodes classiques mais elle est très gourmande en espace disque. Par analogie, des simulations faisant intervenir des constantes de couplage 3J dépendantes du temps^{45,46} ont été également appliquées avec succès.

BIBLIOGRAPHIE

1. Burkert, U. & Allinger, N. L. *Molecular Mechanics* (, Washington, D.C., 1982).
2. Biosym Inc. User Guide, part 1. *San Diego, SA* (1992).
3. Biosym Technologies Inc. *Discover Manual Version 2.8* (, San Diego, SA, 1992).
4. Schleyer, P. V. R. *Encyclopedia of Computational chemistry* (eds. Wiley, J. & sons) (, New York, NY, 1995).
5. Momany, F. A., Mc Guire, R. F., Burgess, A. W. & Sheraga, H. A. Energy parameters in polypeptides. VII. Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interactions, hydrogen bond interactions, and intrinsic torsional potentials for the naturally occurring amino acids. *J. Phys. Chem.* **79**, 2361-2374 (1975).
6. Weiner, S. J., Kollman, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S. J. & Weiner, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765-784 (1984).
7. Van Gunsteren, W. F. & Berendsen, H. J. C. *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual* (, 1987).
8. Brooks, B. C., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D., Swaminathan, S. & Karplus, M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimisation, and dynamics calculations. *J. Comp. Chem.* **4**, 187-217 (1983).
9. Clark, M., Cramer, R. D. & Van Opdenbosch, N. Validation of the general purpose Tripos 5.2 forcefield. *J. Comp. Chem.* **10**, 982-1012 (1989).
10. Dinur, U. & Hagler, A. T. *Review of Computational Chemistry* (eds. Lipkowitz, K. B. & Boyd, D. B. E.) (, VCH, New York, USA, 1991).
11. Loncharich, R. J. & Brooks, B. R. The effects of truncating long-range forces on protein dynamics. *Proteins* **6**, 32-45 (1989).
12. Smith, P. E. & Van Gunsteren, W. F. *Computer Simulations of Biomolecular Systems. Theoretical and Experimental Applications* (ed. Van Gunsteren, W. F., Weiner, P.K. and Wilkinson, A.J.) (, ESCOM, Leiden, 1993).
13. Ding, H. Q., Karasawa, N. & Goddard III, W. A. Atomic levels simulation on a million particles: the cell multipole method for coulomb and London nonbond interactions. *J. Chem. Phys.* **97**, 4309-4315 (1992).
14. Sharp, K. A. *Inclusion of solvent effects in molecular mechanics force field*

Computer simulation of biomolecular systems: theoretical and experimental applications (ESCOM, Leiden, 1993).

15. Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R. & Straatsma, T. P. The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.* **91**, 6269-6271 (1987).
16. Warshel, A. & Aqvist, J. Electrostatic energy and macromolecular function. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 267 (1991).
17. Burt, S. K., MacKay, D. & Hagler, A. T. (, New York and Basel, 1989).
18. Wendolski, J. J. & Matthew, J. B. Molecular dynamics effects on protein electrostatics. *Proteins* **5**, 313-321 (1989).
19. Dagget, V., Kollman, P. A. & Kuntz, L. D. Molecular dynamics simulations of small peptides : dependence on dielectric model and pH. *Biopolymers* **31**, 285-304 (1991).
20. Mariuzza, R. A. & Poljak, R. The basics of binding : mechanisms of antigen recognition and mimicry by the antibodies. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 50-55 (1993).
21. Wiberg, K. B. A scheme for strain energy minimization. Application to the cycloalkanes. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1070-1078 (1965).
22. Fletcher, R. *Numerical methods for unconstrained optimization* (ed. Academic Press) (, London, 1972).
23. Powell, M. J. D. Restart procedures for the conjugate gradient method. *Math. Prog.* **12**, 241-257 (1977).
24. Fletcher, R. & Powell, M. J. D. A rapidly convergent descent method for minimization. *Comput. J.* **6**, 163 (1963).
25. Verlet, L. Computer experiments on classical fluids.
I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* **159**, 98-103 (1967).
26. Hockney, R. W. & Eastwood, J. W. *Computer simulations using particules* (ed. Mc Graw-Hill) (, New York, 1981).
27. Rysaert, J.-P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comp. Phys.* **23**, 327-341 (1977).
28. Van Gunsteren, W. F. & Berendsen, H. J. C. Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics. *Mol. Phys.* **34**, 1311-1327 (1977).
29. Andersen, H. C. RATTLE: a 'velocity' version of the SHAKE algorithm for molecular dynamics calculations. *J. Comp. Physics* **52**, 24-34 (1983).
30. Levitt, M. Protein folding by restrained energy minimization molecular dynamics. *J. Mol. Biol.* **170**, 723-764 (1983).

31. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., DiNola, A. & Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684-3690 (1984).
32. Nosé, S. Constant temperature molecular dynamics methods. *Prog. Theoret. Phys. supplement* **103**, 1-46 (1991).
33. Hoover, W. Canonical dynamics : Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev.* **A31**, 1695-1697 (1985).
34. Havel, T. F. An evaluation of computational strategies for use in the determination of protein structure from distances constraints obtained by nuclear magnetic resonance. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **56**, 43-78 (1991).
35. Crippen, G. M. A novel approach to calculation of conformation: distance geometry. *J. Comput. Phys.* **24**, 96-107 (1977).
36. Blumenthal, L. M. *Theory and Applications of distance Geometry* (, Chelsea, Bronx, New York, 1970).
37. Havel, T. F. & Wuthrich, K. A distance geometry program for determining the structures of small proteins and other macromolecules from Nuclear Magnetic Resonance Measurements of intramolecular ^1H - ^1H proximities in solution. *Bull. Math. Biol.* **46**, 673-698 (1984).
38. Kuszewski, J., Nilges, M. & Brunger, A. T. Sampling and efficiency of metric matrix distance geometry : a novel partial metrization algorithm. *J. Biomol. NMR* **2**, 33-56 (1992).
39. Braun, W. & Go, N. Calculation of proteins conformations by proton-proton distance constraints. A new efficient algorithm. *J. Mol. Biol.* **186**, 611-626 (1985).
40. Braun, W. Distance geometry and related methods for protein structure determination from NMR data. *Q. Rev. Biophys.* **19**, 115-157 (1987).
41. Guntert, P., Braun, W. & Wuthrich, K. Efficient computation of three dimensional structures in solution from Nuclear Magnetic Resonance Data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J. Mol. Biol.* **217**, 517-530 (1991).
42. Guntert, P., Mumenthaler, C. & Wuthrich, K. Torsion Angle Dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* **273**, 283-298 (1997).

43. Torda, E. A., Sheek, R. M. & Van Gunsteren, W. F. Time-Averaged nuclear Overhauser effect distance restraints applied to tendamistat. *J. Mol. Biol.* **214**, 223-235 (1990).
44. Bonvin, A. M., Boelens, R. & Kaptein, R. Time- and ensemble-averaged direct NOE restraints. *J. Biomol. NMR* **4**, 143-149 (1993).
45. Torda, E. A., Brunne, R. M., Huber, T., Kessler, H. & Van Gunsteren, W. F. Structure refinement using time-averaged J-coupling constant restraints. *J. Biomol. NMR* **3**, 55-66 (1993).
46. Mierke, D. F., Huber, T. & Kessler, H. Coupling constants again : experimental restraints in structure refinement. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **8**, 29-40 (1994).

ANNEXE B

PARTIE EXPERIMENTALE VIH

B. PARTIE EXPERIMENTALE

B-1. Test ELISA

a. Test ELISA indirect obtenu avec les sérums des patients

Les plaques de titration utilisées au cours de ces tests sont des plaques MaxiSorb NUNC (Roskilde, Danemark).

Le peptide lyophilisé est repris à raison d'une concentration de 1mg/mL avec une solution de 10% d'acide acétique. La solution obtenue est ensuite diluée avec une solution tampon de PBS pour aboutir à une concentration finale de 10µg/mL.

Les plaques de titration sont lavées trois fois entre chaque étape avec une solution de PBS-Tween 0.05%.

Dans un premier temps, les plaques sont mises à incuber durant 2 heures à 37°C avec 100µL/puits d'une solution de streptavidine à une concentration de 10µg/mL dans du PBS. 100µL/puits de la solution contenant le peptide sont ensuite déposés dans chaque puits. La plaque de titration est ensuite mise à incuber durant 2 heures à 37°C ou une nuit à 4°C. La passivation de la plaque est réalisée par l'addition de 200µL/puits d'une solution à 10% de sérum de chèvre dans du PBS-Tween 0.05%. Les sérums de patients, dilués au 1/100 (ou avec une dilution déterminée au préalable avec une courbe de saturation) dans la solution de passivation, sont alors ajoutés à raison de 100µL par puits et laissés à incuber durant 1 heure à 37°C.

La révélation se fait par addition d'un conjugué BIORAD de chèvre anti-IgG humaine marqué à la peroxydase. Ce conjugué est préalablement dilué au 1/10000 dans la solution de passivation. 100µL/puits sont ajoutés et laissés à incuber durant 1 heure à 37°C. La révélation colorimétrique proprement dite est faite par l'addition d'o-phénylènediamine (OPD) à raison de 100µL/puits. L'incubation est réalisée dans l'obscurité et est suivie visuellement afin d'éviter toute saturation colorimétrique. Un agent bloquant, dans ce cas précis de l'acide sulfurique 5N, est additionné (50µL/puits) et la lecture des densités optiques s'effectue à 492nm.

b. Test ELISA en présence de l'anticorps monoclonal anti-gp41

Les étapes décrites précédemment jusque l'addition des sérums sont identiques. Ensuite, le surnageant de l'hybridome, dilué au 1/10 dans la solution de passivation, est alors rajouté à raison de 100µL/puits et incubés durant 1 heure à 37°C.

La révélation se fait par addition d'un conjugué BIORAD de chèvre anti-IgG murine PAL. Ce conjugué est préalablement dilué au 1/2000 dans la solution de passivation. 100µL/puits de ce conjugué sont ensuite ajoutés et laissés à incuber durant 1 heure à 37°C. La révélation colorimétrique proprement dite est faite par l'addition de p-nitrophényl phosphate (PNPP) mélangé à une solution de diéthanol amine/HCl (DEA/HCl) à raison de 100µL/puits. L'incubation est réalisée dans l'obscurité durant 30 minutes et l'agent bloquant est dans ce cas de la soude 1N ajoutée à raison de 50µL/puits. La lecture des densités optiques s'effectue à 405 nm.

c. Test ELISA phase anticorps

Les plaques de titration sont mises à incuber durant une nuit à température ambiante en présence de 100µL/puits d'une solution de sérum de chèvre anti-IgG de souris (bioMérieux).

Cette solution est à une concentration de 5µg/µL en tampon bicarbonate 0.05 (pH = 9.6).

Les plaques sont ensuite saturées avec 100µL d'une solution de lait en poudre 1% dans du PBS durant une heure à 37°C.

Le surnageant de culture de l'hybridome dilué dans du PBS-Tween 0.05% est additionné à raison de 100µL/puits et mis à incuber pendant 1 heure à 37°C. Pour la révélation, 100µL de streptavidine-peroxydase (bioMérieux) dilué au 1/3000 en PBS sont ajoutés et mis à incuber 30 minutes à 37°C. 100µL d'OPD sont de nouveau ajoutés. La réaction de révélation colorimétrique est stoppée par addition de 100µL H₂SO₄ 5N. La lecture de densité optique s'effectue à 492 nm.

d. Test ELISA en présence des anticorps monoclonaux anti-parent

Les plaques de titration utilisées sont des plaques Falcon en chlorure de polyvinyle.

Elles sont lavées trois fois entre chaque étape avec une solution de PBS 220 mM contenant 0.05% de Tween 20 pH 7.4 (PBS-T). 200µL/puits de la solution contenant le peptide (2µM dans du tampon carbonate 50 mM pH 9.6) sont déposés dans chaque puits. Les sites résiduels libres du plastique sont ensuite bloqués avec une solution de PBS-T contenant 0.4% de sérum albumine bovine, préparée la veille. Le surnageant de l'hybridome, dilué dans du PBS-T SAB 0.4% est alors ajouté, à raison de 200µL/puits et laissé à incuber durant une heure à 37°C.

La révélation se fait par addition d'un conjugué anticorps couplé à la peroxydase dilué dans du PBS-T. Les dilutions dépendent des conjugués utilisés. 200µL/puits sont ajoutés et laissés à incuber pendant 30 minutes à 37°C. La révélation colorimétrique est faite par l'addition d'une solution stock TMB, H₂O₂, à raison de 150µL/puits. L'incubation est réalisée dans l'obscurité durant 15 minutes. Un agent bloquant (HCl 1M) est additionné (150µL/puits) et la lecture des densités optiques s'effectue à 450nm.

e. Tests complémentaires en présence de sérums de patients pour les analogues de type réduits

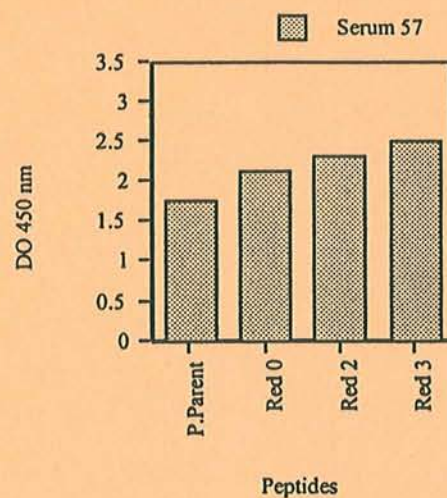
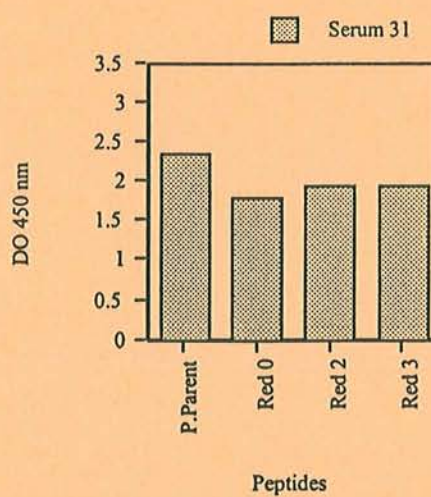
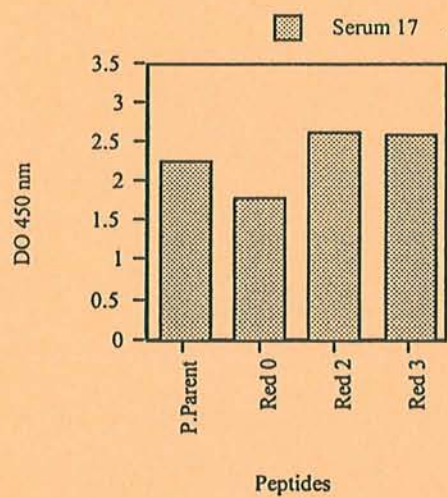
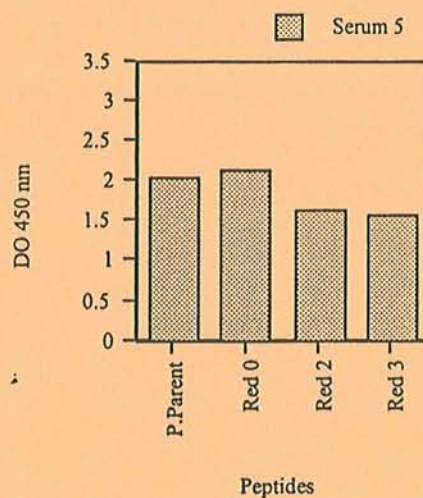
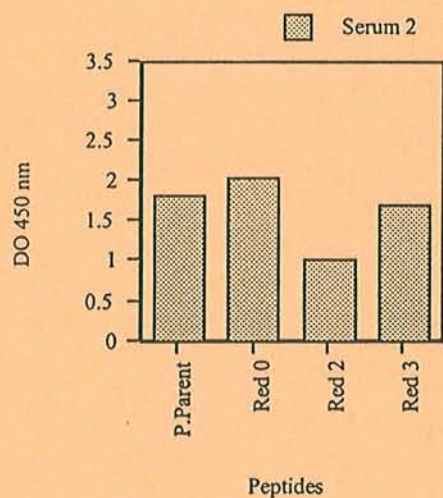
Les plaques de titration utilisées au cours de ces tests sont des plaques MaxiSorb NUNC (Roskilde, Danemark). Elles sont préactivées avec de la streptavidine, puis on ajoute 2mM de chaque peptide biotynilé. Après incubation à 37°C et lavage des plaques, on ajoute le sérum à tester dilué à 1/8000. La révélation colorimétrique est faite par l'addition d'une solution stock TMB, H₂O₂. L'incubation est réalisée dans l'obscurité durant 15 minutes. Un agent bloquant (HCl 1M) est additionné et la lecture des densités optiques s'effectue à 450nm.

Les graphes suivants montrent la réaction avec les analogues réduits de sérums d'individus séropositifs qui évoluent cliniquement de différentes manières, à savoir de manière rapide, classique ou lente (population dite « non progresseurs »). Des tests de sérums de personnes récemment infectées, et de partenaires séronégatifs de personnes infectées ont également été inclus.

La notation utilisée est la suivante : Red0 correspond à la nomenclature utilisée dans le chapitre I, à savoir Ψ7 = CysΨ[CH₂NH]Thr, Red1 à Ψ6 = IleΨ[CH₂NH]Cys, Red2 à Ψ5 = LeuΨ[CH₂NH]Ile, Red3 à Ψ4 = LysΨ[CH₂NH]Leu.

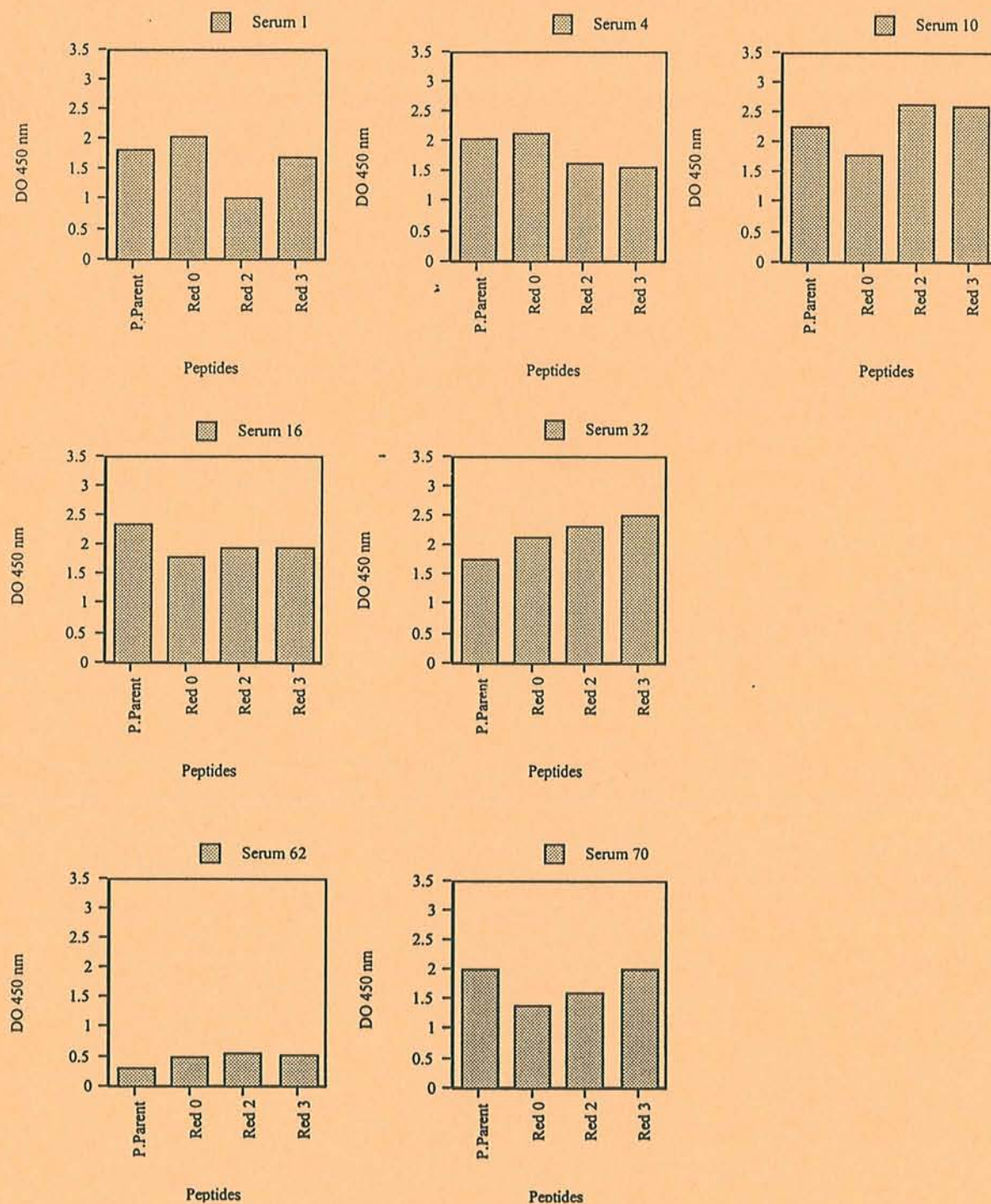
En général, les analogues réduits sont reconnus mais pas mieux que le peptide parent.

Serums TYPIQUES.

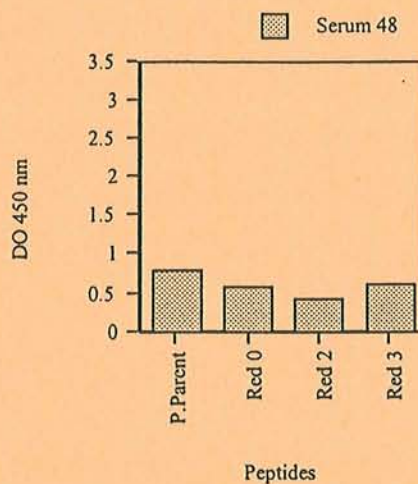
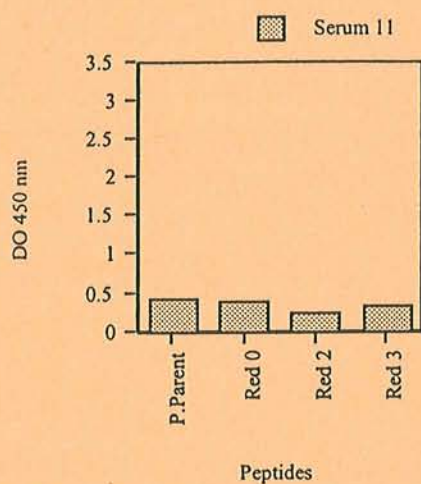
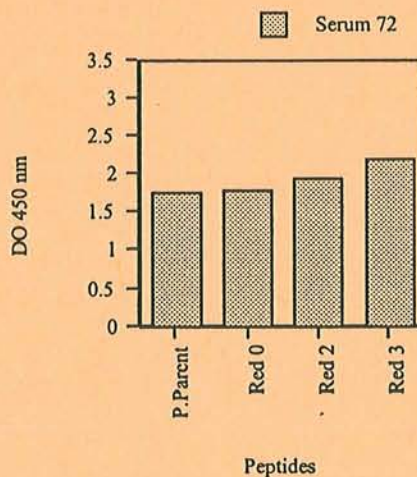
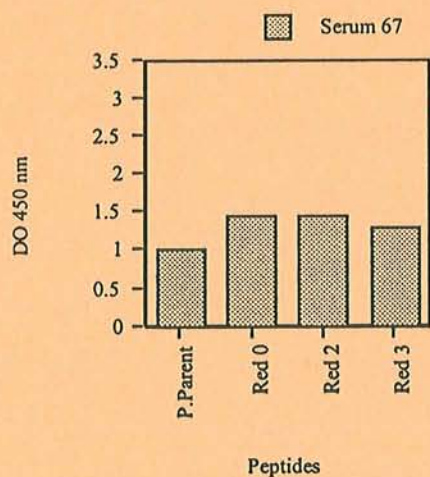
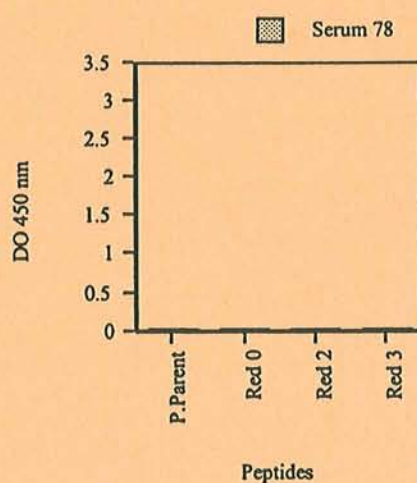
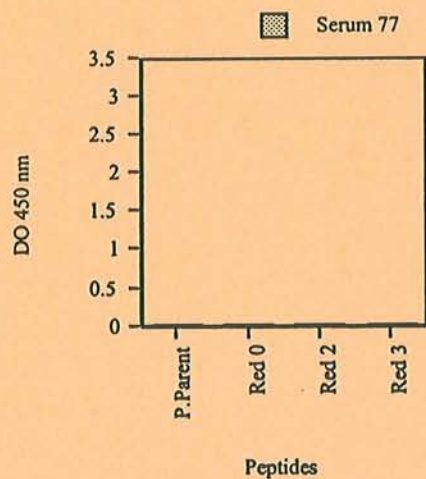


Sérums de patients séropositifs dilués à 1/8000, en présence du peptide parent et des analogues réduits à 2 μ M, sur plaque Maxi Sorb Nunc.

Serums RAPIDES.



Sérums de patients séropositifs dilués à 1/8000, en présence du peptide parent et des analogues réduits à 2 μ M, sur plaque Maxi Sorb Nunc.

Serums RECENTS.**Serums NON PROGRESSEURS.****Serums de Partenaires séronégatifs.**

Sérums de patients séropositifs dilués à 1/8000, en présence du peptide parent et des analogues réduits à 2 μ M, sur plaque Maxi Sorb Nunc.

f. Tests complémentaires en présence de sérums de patients pour les analogues substitués avec des acides β -aminés

Le protocole opératoire utilisé est le même que précédemment.

Les graphes suivants montrent la réaction avec les analogues substitués avec des acides β -aminés de sérums d'individus séropositifs qui évoluent cliniquement de différentes manières, à savoir de manière rapide, classique ou lente (population dite « non progresseurs »). Des tests de sérums de personnes récemment infectées, et de partenaires séronégatifs de personnes infectées ont également été inclus.

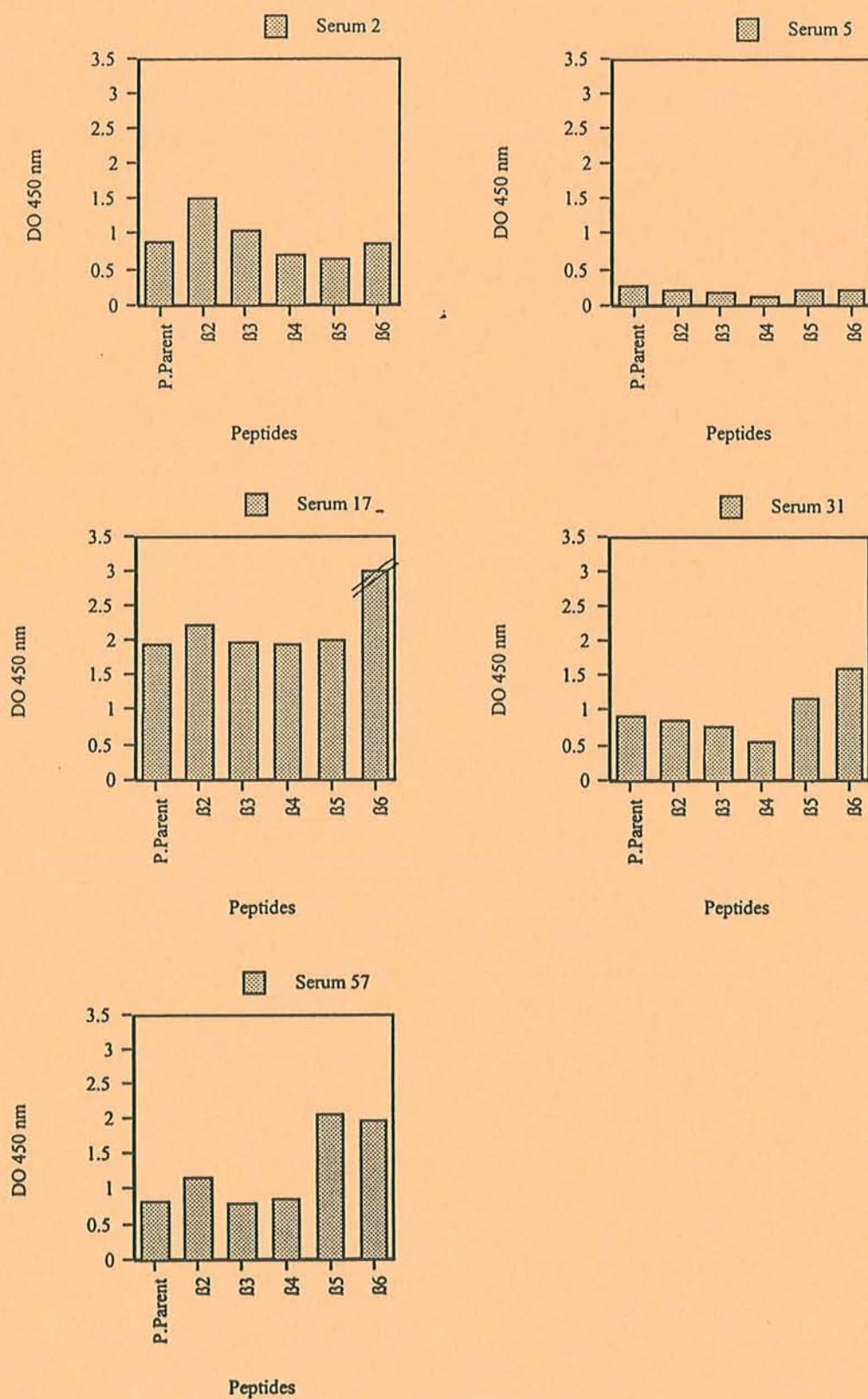
La notation utilisée est la suivante : $\beta 1$ correspond à la nomenclature utilisée dans le chapitre I, à savoir H_{Ile}₆₀₈, $\beta 2$ à H_{Leu}₆₀₇, $\beta 3$ à H_{Lys}₆₀₆, $\beta 4$ à H_{Gly}₆₀₅, $\beta 5$ à H_{Ser}₆₀₄ et $\beta 6$ à H_{Cys}₆₀₃.

Passer d'une valeur de DO de 1 à 2 par exemple ou de 2 à 3 est important et très significatif.

Les résultats présentés ont été confirmés dans 3 expériences indépendantes ; la manipulation est très représentative mais très similaires aux deux autres.

On constate que plusieurs sérums réagissent plus fortement en terme de densité optique (DO) avec certains analogues, notamment H_{Ser}₆₀₄ et H_{Cys}₆₀₃ qu'avec le peptide parent.

Serums TYPIQUES.



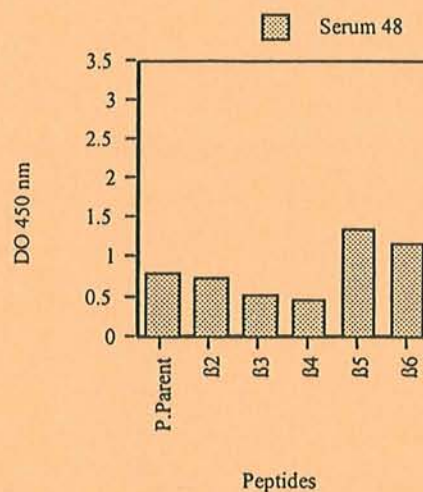
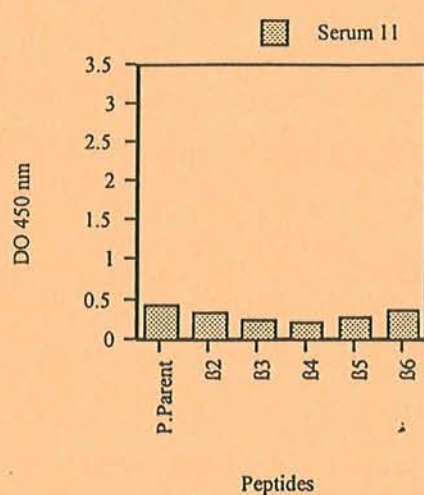
Sérums de patients séropositifs dilués à 1/8000, en présence du peptide parent et des analogues substitués avec des acides β -aminés à 2 μ M, sur plaque Maxi Sorb Nunc.

Serums RAPIDES.

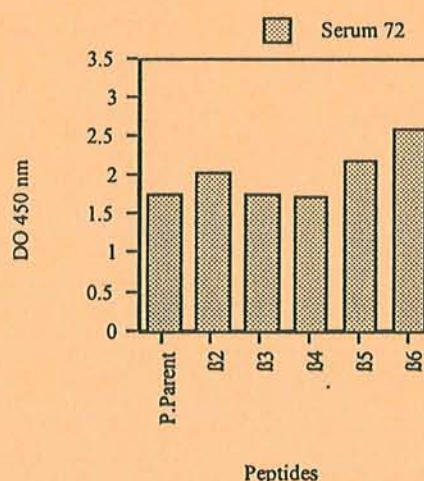
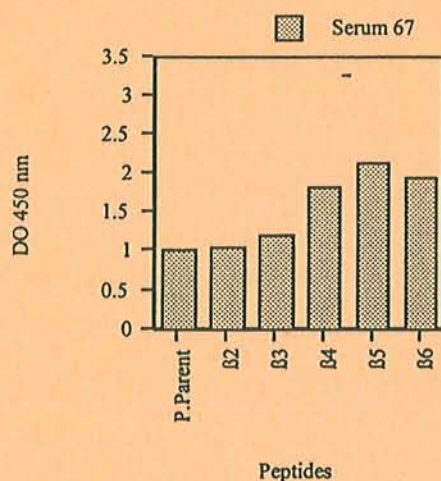


Sérums de patients séropositifs dilués à 1/8000, en présence du peptide parent et des analogues substitués avec des acides β -aminés à 2 μ M, sur plaque Maxi Sorb Nunc.

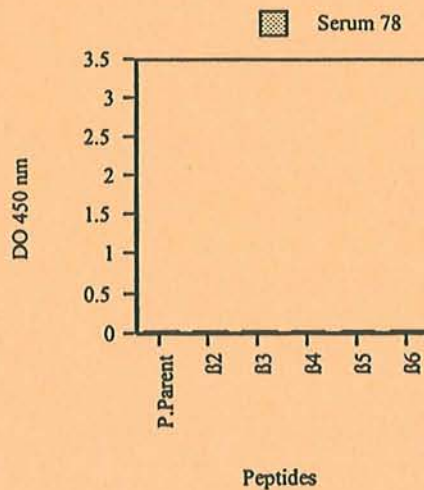
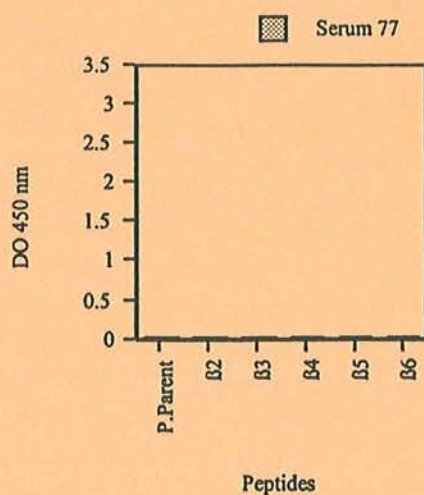
Serums RECENTS.



Serums NON PROGRESSEURS.



Serums de Partenaires séronégatifs.



Sérums de patients séropositifs dilués à 1/8000, en présence du peptide parent et des analogues substitués avec des acides β -aminés à 2 μ M, sur plaque Maxi Sorb Nunc.

B-2. Tableaux des déplacements chimiques

a. Peptide 600-612 N-acétylé

Séquence Ac-Ile-Trp-Gly-Cys-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys-Thr-Thr-Ala-OH

m / z ($M + H^+$)	HPLC t_R (min)	Pureté ^b (%)
1392.45	13.38 ^a	96%

^a Gradient linéaire de A (0.1% TFA dans H_2O) et B (0.08% TFA dans l'acétonitrile), 5-65% de B, 20 min ;

^b Pureté après purification HPLC préparative.

Conditions expérimentales

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DRX 400MHz et DRX 600MHz.

- En solution à une concentration de 4mM dans un tampon phosphate pH=5.7 (T=285K).
- En solution à une concentration de 4mM dans du DMSO deutéré (T=298K).

Déplacements chimiques, ppm (285K, H ₂ O)						
Résidus	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₂	8.14	4.08	1.74	1.24;1.24 γ _{CH₃} 1.06	0.80	
Trp ₃	8.33	4.76	3.28;3.39			7.29 (2H);7.63 (4H) 7.18 (5H) ;10.25 (N ₁ H) 7.53 (7H) ;7.26 (6H)
Gly ₄	8.32	3.90;3.90				
Cys ₅	8.33	4.80	3.05;3.29			
Ser ₆	8.54	4.40	3.93;3.93			
Gly ₇	8.78	3.84;4.09				
Lys ₈	8.03	4.46	1.81;1.93	1.79;1.79	1.46;1.46	
Leu ₉	8.30	4.29	1.64;1.75	1.42	0.91;0.98	
Ile ₁₀	7.91	4.24	1.87	0.90;0.90 γ _{CH₃} 1.17		
Cys ₁₁	8.75	4.88	3.05;3.17			
Thr ₁₂	8.41	4.50	4.30	γ _{CH₃} 1.23		
Thr ₁₃	8.26	4.37	4.25	γ _{CH₃} 1.24		
Ala ₁₄	8.33	4.27	1.40			

Déplacements chimiques, ppm (298K, dmso)						
Résidus	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₂	7.86	4.13	1.64	1.32;1.32 γ _{CH₃} 1.01	0.74	
Trp ₃	8.08	4.52	3.00;3.14			7.15 (2H);7.55 (4H) 6.96 (5H) ;10.83 (N ₁ H) 7.31 (7H) ;7.04 (6H)
Gly ₄	8.26	3.68;3.85				
Cys ₅	8.24	4.64	2.89;3.24			
Ser ₆	8.08	4.14	3.68;3.68			OH 5.03
Gly ₇	8.55	3.54;3.84				
Lys ₈	7.41 7.67	4.27	1.57;1.79	1.23;1.23	1.34;1.34	2.83;2.83
Leu ₉	8.15	4.10	1.54;1.54	1.52	0.83;0.91	
Ile ₁₀	7.14	4.20	1.67	1.44;1.44 γ _{CH₃} 1.04	0.82	
Cys ₁₁	8.60	4.65	2.87;3.07			
Thr ₁₂	7.73	4.44	4.02	γ _{CH₃} 1.03		OH 5.23
Thr ₁₃	7.76	4.20	4.05	γ _{CH₃} 1.04		
Ala ₁₄	8.00	4.20	1.26			

b. Analogue rétro-inverso du peptide 600-612 N-acétylé amide

Séquence Ace-DAla-DThr-DThr-D^[Cys-DIle-DLeu-DLys-Gly-DSer-DCys-Gly-DTrp-DIle-NH₂]

m / z (M + H ⁺)	HPLC <i>t_R</i> (min)	Pureté ^b (%)
1392.5	13.49 ^a	97%

^a Gradient linéaire de A (0.1% TFA dans H₂O) et B (0.08% TFA dans l'acétonitrile), 5-65% de B, 20 min ;

^b Pureté après purification HPLC préparative.

Conditions expérimentales

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DRX 400MHz et DRX 600MHz.

- En solution à une concentration de 2.5mM dans du DMSO deutéré (T=298K).

Déplacements chimiques, ppm (298K, dmso)						
Résidus	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₁₄	7.74	4.18	1.64	1.12;1.12	0.85	
Trp ₁₃	8.07	4.47	2.64;2.90	γ _{CH₃} 0.52		7.03 (2H);7.55 (4H) 6.65 (5H) ;10.76 (N ₁ H) 7.19 (7H) ;6.84 (6H)
Gly ₁₂	8.18	3.32;3.58				
Cys ₁₁	7.96	4.47	2.61;2.92			
Ser ₁₀	7.52	4.17	3.30;3.30			
Gly ₉	8.14	3.24;3.72				
Lys ₈	8.11	4.03	1.27;1.52	0.89;0.89	1.02;1.02	3.88;3.88
Leu ₇	7.40	4.17	1.42;1.42	1.21	0.55;0.55	
Ile ₆	7.88	4.05	1.76	1.10;1.10	0.84	
				γ _{CH₃} 0.51		
Cys ₅	8.20	4.37	2.73;2.73			
Thr ₄	7.69	4.04	3.78	γ _{CH₃} 0.73		
Thr ₃	7.82	4.14	3.82	γ _{CH₃} 0.73		
Ala ₂	8.15	4.18	0.90			

c. Analogue DDap du peptide 600-612 N-acétylé

Séquence Ac-Ile-Trp-Gly-Asp-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Dap-Thr-Thr-Ala-OH

m / z (M + H ⁺)	HPLC t _R (min)	Pureté ^b (%)
1372.4	13.49 ^a	98%

^a Gradient linéaire de A (0.1% TFA dans H₂O) et B (0.08% TFA dans l'acétonitrile), 5-65% de B, 20 min ;

^b Pureté après purification HPLC préparative.

Conditions expérimentales

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DRX 400MHz et DRX 600MHz.

- En solution à une concentration de 2mM dans du DMSO deutéré (T=298K).

Déplacements chimiques, ppm (298K, dmso)						
Résidus	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₂	7.83	4.11	1.63	1.30;1.30 γ _{CH₃} 1.00	0.73	
Trp ₃	7.98	4.54	2.97;3.13			7.13 (2H);7.55 (4H) 6.95 (5H) ;10.81 (N ₁ H) 7.30 (7H) ;7.04 (6H)
Gly ₄	8.18	3.70;3.70				
Asp ₅	8.18	4.64	2.53;2.68			
Ser ₆	8.11	4.96	3.65;4.06			
Gly ₇	8.63	3.52;3.80				
Lys ₈	7.59	4.22	1.80;1.80	1.25;1.25	1.52;1.52	2.81;2.81
Leu ₉	7.94	4.12	1.50;1.50		0.81;0.88	
Ile ₁₀	7.39	4.12	1.69	1.45;1.45 γ _{CH₃} 1.05	0.82	
Dap ₁₁	8.33 7.86	4.60	2.98;3.60			
Thr ₁₂	7.60	4.40	3.98	γ _{CH₃} 1.02		
Thr ₁₃	7.75	4.21	4.03	γ _{CH₃} 1.04		
Ala ₁₄	8.03	4.18	1.26			

d. Analogue DapD du peptide 600-612 N-acétylé

Séquence Ac-Ile-Trp-Gly-Dap-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Asp-Thr-Thr-Ala-OH

m / z (M + H ⁺)	HPLC t _R (min)	Pureté ^b (%)
1372.43	13.23 ^a	96%

^a Gradient linéaire de A (0.1% TFA dans H₂O) et B (0.08% TFA dans l'acétonitrile), 5-65% de B, 20 min ;

^b Pureté après purification HPLC préparative.

Conditions expérimentales

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DRX 400MHz et DRX 600MHz.

- En solution à une concentration de 4mM dans du DMSO deutéré (T=298K).

Résidus	Déplacements chimiques, ppm (298K, dmsO)					
	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₂	7.84	4.13	1.64	1.31;1.31 γ _{CH₃} 1.01	0.73	
Trp ₃	8.04	4.54	2.98;3.14			7.14 (2H);7.56 (4H) 6.95 (5H) ;10.80 (N ₁ H) 7.30 (7H) ;7.04 (6H)
Gly ₄	8.18	3.75;3.75				
Dap ₅	7.98 7.84	4.41	3.28;3.41			
Ser ₆	8.10	4.99	3.61;4.23			
Gly ₇	8.45	3.64;3.78				
Lys ₈	7.67	4.26	1.79;1.79	1.27;1.27	1.53;1.53	2.81;2.81
Leu ₉	8.01	4.08	1.59;1.59	1.48	0.82;0.89	
Ile ₁₀	7.36	4.06	1.75	1.39;1.39 γ _{CH₃} 1.08	0.81	
Asp ₁₁	8.13	4.76	2.39;2.61			
Thr ₁₂	7.57	4.38	4.01	γ _{CH₃} 1.02		
Thr ₁₃	7.72	4.21	4.04	γ _{CH₃} 1.04		
Ala ₁₄	8.00	4.20	1.27			

e. Analogue DTab du peptide 600-612 N-acétylé

Séquence Ac-Ile-Trp-Gly-Asp-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Dab-Thr-Thr-Ala-OH

m / z (M + H ⁺)	HPLC <i>t_R</i> (min)	Pureté ^b (%)
1386.67	13.27 ^a	95%

^a Gradient linéaire de A (0.1% TFA dans H₂O) et B (0.08% TFA dans l'acétonitrile), 5-65% de B, 20 min ;

^b Pureté après purification HPLC préparative.

Conditions expérimentales

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DRX 400MHz et DRX 600MHz.

- En solution à une concentration de 4mM dans du DMSO deutéré (T=298K).

Résidus	Déplacements chimiques, ppm (298K, dmsO)					
	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₂	7.88	4.12	1.65	1.32;1.32 γ _{CH₃} 1.01	0.73	
Trp ₃	8.07	4.53	2.99;3.14			7.16 (2H);7.56 (4H) 6.95 (5H) ;10.81 (N ₁ H) 7.32 (7H) ;7.04 (6H)
Gly ₄	8.30	3.73;3.73				
Asp ₅	8.33	4.68	2.47;2.76			
Ser ₆	8.01	4.07	3.70;3.70			
Gly ₇	8.62	3.56;3.81				
Lys ₈	7.49	4.15	1.78;1.78	1.21;1.32	1.51;1.51	2.81;2.81
Leu ₉	8.03	4.15	1.51;1.79	1.21	0.83;0.83	
Ile ₁₀	7.38	4.11	1.66	1.46;1.46 γ _{CH₃} 1.04	0.82	
Dab ₁₁	8.29 8.11	4.29	1.61;1.90	3.01;3.20		
Thr ₁₂	7.68	4.41	4.17	γ _{CH₃} 1.05		
Thr ₁₃	7.95	4.41	4.13	γ _{CH₃} 1.05		
Ala ₁₄	7.88	4.01	1.24			

f. Analogue DabD du peptide 600-612 N-acétylé

Séquence Ac-Ile-Trp-Gly-Dab-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Asp-Thr-Thr-Ala-OH

m / z (M + H ⁺)	HPLC <i>t_R</i> (min)	Pureté ^b (%)
	12.96 ^a	88%

^a Gradient linéaire de A (0.1% TFA dans H₂O) et B (0.08% TFA dans l'acétonitrile), 5-65% de B, 20 min ;

^b Pureté après purification HPLC préparative.

Conditions expérimentales

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DRX 400MHz et DRX 600MHz.

- En solution à une concentration de 3.5mM dans du DMSO deutéré (T=298K).

Résidus	Déplacements chimiques, ppm (298K, dmso)					
	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₂	7.85	4.11	1.63	1.29;1.29 γ _{CH₃} 1.02	0.73	
Trp ₃	8.03	4.50	2.97;3.12			7.14 (2H);7.54 (4H) 6.95 (5H) ;10.81 (N ₁ H) 7.30 (7H) ;7.04 (6H)
Gly ₄	8.19	3.71;3.71				
Dab ₅	8.06 7.93	4.33	1.62;1.90	3.05;3.05		
Ser ₆	8.00	4.14	3.62;3.62			
Gly ₇	8.52	3.62;3.78				
Lys ₈	7.69	4.18	1.53;1.69	1.22;1.22	1.34;1.34	2.78;2.86
Leu ₉	8.04	4.16	1.54;1.54	1.45	0.81;1.04	
Ile ₁₀	7.42	4.12	1.69	1.44;1.44 γ _{CH₃} 1.02	0.80	
Asp ₁₁	8.27	4.76	2.43;2.55			
Thr ₁₂	7.58	4.36	4.04	γ _{CH₃} 1.03		
Thr ₁₃	7.88	4.16	4.06	γ _{CH₃} 1.24		
Ala ₁₄	7.78	4.16	1.03			

g. Analogue EDap du peptide 600-612 N-acétylé

Séquence Ac-Ile-Trp-Gly-Glu-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Dap-Thr-Thr-Ala-OH

m / z ($M + H^+$)	HPLC t_R (min)	Pureté ^b (%)
1386.17	13.27 ^a	90%

^a Gradient linéaire de A (0.1% TFA dans H_2O) et B (0.08% TFA dans l'acétonitrile), 5-65% de B, 20 min ;

^b Pureté après purification HPLC préparative.

Conditions expérimentales

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DRX 400MHz et DRX 600MHz.

- En solution à une concentration de 4mM dans du DMSO deutéré (T=298K).

Résidus	Déplacements chimiques, ppm (298K, dmsO)					
	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₂	7.83	4.14	1.64	1.32;1.32 γ _{CH₃} 1.02	0.74	
Trp ₃	8.07	4.52	2.98;3.13			7.14 (2H);7.56 (4H) 6.97 (5H) 7.31 (7H);7.05 (6H)
Gly ₄	8.27	3.75;3.75				
Glu ₅	8.07	4.37	1.89;1.89	2.13;2.13		
Ser ₆	8.22	4.16	3.62;3.62			
Gly ₇	8.27	3.76;3.76				
Lys ₈	8.02	4.17	1.59;1.73	1.26;1.33	1.52;1.52	2.77;2.77
Leu ₉	7.68	4.17	1.59;1.59	1.51	0.82;0.91	
Ile ₁₀	7.46	4.06	1.79	1.43;1.43 γ _{CH₃} 1.07	0.82	
Dap ₁₁	7.87 7.74	4.45	3.17;3.59			
Thr ₁₂	7.64	4.35	4.09	γ _{CH₃} 1.05		
Thr ₁₃	7.75	4.16	4.09	γ _{CH₃} 1.05		
Ala ₁₄	7.81	4.03	1.24			

h. Analogue DapE du peptide 600-612 N-acétylé

Séquence Ac-Ile-Trp-Gly-Dap-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Glu-Thr-Thr-Ala-OH

m / z (M + H ⁺)	HPLC <i>t_R</i> (min)	Pureté ^b (%)
	13.26 ^a	65%

^a Gradient linéaire de A (0.1% TFA dans H₂O) et B (0.08% TFA dans l'acétonitrile), 5-65% de B, 20 min ;

^b Pureté après purification HPLC préparative.

Conditions expérimentales

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DRX 400MHz et DRX 600MHz.

- En solution à une concentration de 3mM dans du DMSO deutéré (T=298K).

Déplacements chimiques, ppm (298K, dmsO)						
Résidus	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₂	7.85	4.12	1.64	1.32;1.32 γ _{CH₃} 1.00	0.73	
Trp ₃	8.04	4.52	2.97;3.13			7.14 (2H);7.55 (4H) 6.95 (5H) 7.30 (7H) ;7.03 (6H)
Gly ₄	8.25	3.69;3.76				
Dap ₅	8.08 7.82	4.34	3.22;3.55			
Ser ₆	8.24	4.08	3.63;3.63			
Gly ₇	8.39	3.69;3.76				
Lys ₈	7.78	4.27	1.73;1.73	1.24;1.33	1.51;1.51	2.79; 2.79
Leu ₉	8.12	4.09	1.57;1.57	1.46	0.82;0.89	
Ile ₁₀	7.38	4.10	1.70	1.42;1.42 γ _{CH₃} 1.05	0.80	
Glu ₁₁	8.21	4.28	1.69;1.69	2.01;2.08		
Thr ₁₂	7.51	4.38	4.04	γ _{CH₃} 1.03		
Thr ₁₃	7.78	4.15	4.06	γ _{CH₃} 1.03		
Ala ₁₄	7.86	4.06	1.24			

i. Analogue EDab du peptide 600-612 N-acétylé

Séquence Ac-Ile-Trp-Gly-Glu-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Dab-Thr-Thr-Ala-OH

m / z (M + H ⁺)	HPLC <i>t_R</i> (min)	Pureté ^b (%)
1401.84	13.07 ^a	80%

^a Gradient linéaire de A (0.1% TFA dans H₂O) et B (0.08% TFA dans l'acétonitrile), 5-65% de B, 20 min ;

^b Pureté après purification HPLC préparative.

Conditions expérimentales

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DRX 400MHz et DRX 600MHz.

- En solution à une concentration de 3mM dans du DMSO deutéré (T=298K).

Résidus	Déplacements chimiques, ppm (298K, dmsO)					
	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₂	7.89	4.11	1.64	1.32;1.32 γ _{CH₃} 1.00	0.72	
Trp ₃	8.09	4.50	2.98;3.13			7.14 (2H);7.54 (4H) 6.95 (5H) 7.30 (7H) ;7.03 (6H)
Gly ₄	8.23	3.68;3.78				
Glu ₅	9.00	4.31	1.82;1.90	2.12;2.12		
Ser ₆	8.00	4.13	3.61;3.61			
Gly ₇	8.45	3.60;3.78				
Lys ₈	7.49	4.23	1.76;1.76	1.19;1.30	1.49;1.57	2.81;2.81
Leu ₉	7.83	4.13	1.56;1.63	1.49	0.82;0.89	
Ile ₁₀	7.25	4.17	1.65	1.43;1.43 γ _{CH₃} 1.01	0.81	
Dab ₁₁	8.40 7.91	4.34	1.53;1.85	3.02;3.09		
Thr ₁₂	7.76	4.40	4.11	γ _{CH₃} 1.05		
Thr ₁₃	7.80	4.39	4.08	γ _{CH₃} 1.02		
Ala ₁₄	-	-	-			

j. Analogue HSer₆ du peptide 600-612 N-acétylé

Séquence Ac-Ile-Trp-Gly-Cys-βSer-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys-Thr-Thr-Ala-OH

m / z (M + H ⁺)	HPLC <i>t_R</i> (min)	Pureté ^b (%)
1408.02	13.66 ^a	95%

^a Gradient linéaire de A (0.1% TFA dans H₂O) et B (0.08% TFA dans l'acétonitrile), 5-65% de B, 20 min ;

^b Pureté après purification HPLC préparative.

Conditions expérimentales

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DRX 400MHz et DRX 600MHz.

- En solution à une concentration de 4mM dans du DMSO deutéré (T=298K).

Résidus	Déplacements chimiques, ppm (298K, dmsO)					
	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₂	7.84	4.12	1.64	1.32;1.32 γCH ₃ 1.00	0.73	
Trp ₃	8.01	4.52	2.97;3.12			7.14 (2H);7.55 (4H) 6.95 (5H) 7.30 (7H) ;7.04 (6H)
Gly ₄	8.17	3.70;3.78				
Cys ₅	8.11	4.55	2.82;3.18			
βSer ₆	7.99	4.05	3.34;3.42			OH 4.83 2.39;2.46
Gly ₇	8.18	3.70;3.70				
Lys ₈	7.99 7.63	4.07	1.77;1.77	1.53;1.53	1.32;1.32	2.78;2.78
Leu ₉	7.88	4.22	1.48;1.58		0.82;0.89	
Ile ₁₀	7.47	4.17	1.74	1.43;1.43 γCH ₃ 1.04	0.79	
Cys ₁₁	8.43	4.68	2.92;3.13			
Thr ₁₂	7.74	4.44	4.00	γCH ₃ 1.03		OH 5.26
Thr ₁₃	7.76	4.21	4.04	γCH ₃ 1.05		OH 4.83
Ala ₁₄	8.01	4.18	1.26			

k. Analogue Hcys₅ du peptide 600-612 N-acétylé

Séquence Ac-Ile-Trp-Gly-βCys-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys-Thr-Thr-Ala-OH

m / z (M + H ⁺)	HPLC <i>t_R</i> (min)	Pureté ^b (%)
1407.41	13.84 ^a	97%

^a Gradient linéaire de A (0.1% TFA dans H₂O) et B (0.08% TFA dans l'acétonitrile), 5-65% de B, 20 min ;

^b Pureté après purification HPLC préparative.

Conditions expérimentales

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker DRX 400MHz et DRX 600MHz.

- En solution à une concentration de 3mM dans du DMSO deutéré (T=298K).

Résidus	Déplacements chimiques, ppm (298K, dmsO)					
	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	autres
Ile ₂	7.86	4.12	1.65	1.33;1.33 γ _{CH₃} 1.02	0.75	
Trp ₃	8.13	4.47	2.99;3.12			7.14 (2H);7.54 (4H) 6.95 (5H) 7.31 (7H) ;7.04 (6H)
Gly ₄	8.14	3.57;3.77				
βCys ₅	7.90	4.32	2.78;2.99			
Ser ₆	8.29	3.97	3.58;3.64			2.45; 2.67 OH 4.89
Gly ₇	8.59	3.46;3.81				
Lys ₈	7.55 7.59	4.26	1.59;1.77	1.36;1.36	1.21;1.21	2.79;2.79
Leu ₉	8.63	4.20	1.62;1.62	1.53	0.84;0.90	
Ile ₁₀	7.53	4.15	1.72	1.42;1.42 γ _{CH₃} 1.09	0.83	
Cys ₁₁	8.33	4.62	2.95;3.04			
Thr ₁₂	7.74	4.37	4.00	γ _{CH₃} 1.03		OH 5.16
Thr ₁₃	7.72	4.03	4.13	γ _{CH₃} 1.05		OH 4.82
Ala ₁₄	7.99	4.18	1.26			

B-3. Effets de température mesurés dans le DMSO

Peptides	Ile ₂	Trp ₃	Gly ₄	X ₅	Ser ₆	Gly ₇	Lys ₈	Leu ₉	Ile ₁₀	Y ₁₁	Thr ₁₂	Thr ₁₃	Ala ₁₄
Parent	-4.55	-6.09	-5.94	-4.00	-2.17	-6.25	0.60 -1.30 Nε	-3.34	-0.33	-5.60	-3.88	-4.50	-4.31
Rétro-inverso	-6.72	-3.41	-4.60	-5.35	-2.41	-4.66	-7.53	-1.74	-3.99	-2.39	-2.12	-5.91	-3.61
DDap	-4.37	-5.45	-5.17	-3.47	-3.12	-6.54	-0.98	-2.65	-0.95	-5.46	-3.29	-3.84	-4.16
DapD	-4.67	-	-5.42	-3.25	-4.47	-4.79	-1.56	-	-2.28	-	-0.14	-2.53	-5.74
DDab	-4.76	-2.96	-5.36	-5.44	-5.96	-5.63	0.70	-4.56	-0.94	-4.37	-2.16	-4.34	-
DabD	-4.55	-5.79	-5.35	-3.99	-2.53	-6.62	-0.70	-	-2.53	-4.85	-3.61	-3.24	-5.64
EDap	-4.21	-	-5.36	-	-5.06	-5.36	-	-	-4.04	-3.72	-4.18	-3.43	-3.25
DapE	-4.21	-5.28	-5.18	-0.85	-3.19	-4.72	-1.75	-2.94	-4.03	-5.53	-2.15	-4.10	-
EDab	-3.32	-2.22	-4.34	-3.43	-2.91	-5.05	-0.33	-3.75	-1.50	-4.47	-	-3.85	-3.04
βSer	-4.31	-5.68	-4.79	-3.13	-	-3.87	-	0.45	-3.65	-4.80	-3.37	-3.30	-6.02
βCys	-4.24	-6.60	-4.96	-3.54	-4.95	-5.58	0.09 Nε -1.05 -0.50 Nε	-2.73	-4.51	-2.28	-3.83	-3.44	-4.90

Coefficients thermiques $\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/K) relatifs aux résonances des protons amide des différents analogue de la boucle immunodominante de la glycoprotéine gp41 du VIH-1.

Les valeurs en caractères gras dénotent des protons protégés du solvant et susceptibles de participer à une liaison hydrogène.

B-4. Modélisation moléculaire

a. Caractéristiques angulaires des différents modèles obtenus pour chacun des peptides étudiés

Peptides Parent et rétro-inverso

Résidu	Angle	Parent	Rétro-inverso	
			Famille I	Famille II
Ile ₂	ϕ	*	148±5	154±6
	ψ	116±9	*	*
	χ_1	-164±3	178±80	170±3
Trp ₃	ϕ	-111±20	114±36	126±26
	ψ	90±24	-163±12	-175±16
	χ_1	64±105	-178±38	24±77
Gly ₄	ϕ	-154±68	-134±91	73±71
	ψ	111±72	93±109	-128±96
Cys ₅	ϕ	-91±12	133±35	132±19
	ψ	87±5	-117±57	-117±6
	χ_1	-60±53	-174±73	-16±66
Ser ₆	ϕ	-130±18	90±30	71±6
	ψ	87±5	0±50	47±19
	χ_1	-160±63	158±98	129±95
Gly ₇	ϕ	72±7	63±9	-106±6
	ψ	61±8	52±44	65±5
Lys ₈	ϕ	-150±3	157±5	60±5
	ψ	121±3	-137±10	-129±8
	χ_1	-67±4	174±5	120±46
Leu ₉	ϕ	-62±3	146±7	106±13
	ψ	-42±6	-90±9	-98±6
	χ_1	-131±84	-167±42	135±48
Ile ₁₀	ϕ	-104±11	79±30	99±12
	ψ	86±8	34±11	-36±18
	χ_1	-171±57	-77±52	-62±26
Cys ₁₁	ϕ	-109±17	124±23	93±8
	ψ	56±11	-101±10	-106±8
	χ_1	172±63	-13±53	175±17
Thr ₁₂	ϕ	-116±30	87±24	76±13
	ψ	106±19	37±70	59±10
	χ_1	-52±45	-7±56	-40±50
Thr ₁₃	ϕ	-123±24	105±30	97±30
	ψ	93±29	62±44	53±32
	χ_1	-29±67	72±92	148±95
Ala ₁₄	ϕ	-110±25	89±18	92±21
	ψ	*	-109±23	-112±24
	χ_1	-107±101	-15±68	103±95

Peptides comportant un pont lactame avec une liaison peptidique CO-NH

Résidu	Angle	DDap	DDab	Edap	EDab
Ile ₂	ϕ	-121±23	-83±13	-103±15	-139±18
	ψ	-66±13	114±7	139±12	103±14
	χ_1	108±66	-15±68	3±57	-155±19
Trp ₃	ϕ	-76±9	-101±26	-101±36	-133±23
	ψ	-55±7	34±51	100±75	102±16
	χ_1	-139±89	-31±70	16±59	-140±80
Gly ₄	ϕ	-176±76	163±47	142±86	-156±60
	ψ	-94±50	85±82	43±75	-78±104
X ₅	ϕ	-127±32	-123±29	-122±30	-134±20
	ψ	169±33	123±12	99±16	101±46
	χ_1	-170±7	-67±38	-162±52	-159±25
Ser ₆	ϕ	-87±31	-105±24	-136±30	-143±19
	ψ	-57±9	90±8	98±11	-175±55
	χ_1	136±95	-70±71	-173±77	54±42
Gly ₇	ϕ	97±16	133±20	118±27	153±59
	ψ	55±30	-88±8	-77±13	-131±99
Lys ₈	ϕ	-154±24	-85±3	-77±8	-97±37
	ψ	-70±5	105±9	135±8	-74±60
	χ_1	-173±65	-155±46	118±74	-160±91
Leu ₉	ϕ	-144±8	-88±9	-81±8	-99±33
	ψ	-70±5	81±7	43±42	-31±20
	χ_1	-161±66	-101±83	85±97	173±78
Ile ₁₀	ϕ	-90±11	-149±10	-135±20	-120±23
	ψ	113±8	72±15	87±19	102±16
	χ_1	-167±14	-175±62	-172±94	-158±76
X ₁₁	ϕ	-70±7	-132±42	-114±28	-94±61
	ψ	-49±16	49±49	25±66	17±73
	χ_1	-172±4	-73±6	-47±44	-163±11
Thr ₁₂	ϕ	-72±15	-109±34	-109±28	-112±33
	ψ	41±44	113±27	-64±48	113±99
	χ_1	-144±90	-55±79	-10±95	-77±84
Thr ₁₃	ϕ	-131±27	-95±23	-124±19	-127±25
	ψ	91±30	115±68	103±68	103±51
	χ_1	-105±81	104±67	29±78	-53±69
Ala ₁₄	ϕ	-112±31	-99±23	-114±33	-101±24
	χ_1	30±88	25±71	13±99	-37±92

Peptides comportant un pont lactame avec une liaison peptidique inversée NH-CO

Résidu	Angle	DapD	DabD	DapE
Ile ₂	ϕ	-97±22	-100±13	-120±12
	ψ	136±12	106±11	108±3
	χ_1	68±82	-48±24	-37±62
Trp ₃	ϕ	-120±35	-139±21	-112±25
	ψ	147±19	108±20	42±54
	χ_1	29±78	7±63	-55±48
Gly ₄	ϕ	-111±92	76±94	127±73
	ψ	173±64	77±103	79±64
X ₅	ϕ	-95±25	-147±20	-125±27
	ψ	100±7	124±2	122±18
	χ_1	-158±8	-155±9	14±70
Ser ₆	ϕ	-163±4	-122±20	-107±41
	ψ	127±11	80±54	125±12
	χ_1	87±93	-47±89	-148±75
Gly ₇	ϕ	180±11	126±53	94±8
	ψ	-94±6	-94±4	-76±6
Lys ₈	ϕ	-156±4	-154±8	-94±7
	ψ	-92±6	-70±5	97±6
	χ_1	-169±15	-170±36	-174±6
Leu ₉	ϕ	-89±6	-76±22	-77±7
	ψ	-33±10	-25±32	83±41
	χ_1	-132±86	77±92	-71±43
Ile ₁₀	ϕ	-108±13	-93±17	-136±19
	ψ	144±4	94±8	75±9
	χ_1	47±47	150±67	-171±6
X ₁₁	ϕ	-76±6	-127±9	-119±21
	ψ	-46±14	75±33	58±40
	χ_1	-178±5	-102±15	-63±63
Thr ₁₂	ϕ	-71±11	-118±32	-112±34
	ψ	105±11	-86±99	-62±62
	χ_1	138±64	136±79	-53±14
Thr ₁₃	ϕ	-125±23	-98±26	-125±24
	ψ	88±97	51±89	107±111
	χ_1	15±55	-128±102	-38±48
Ala ₁₄	ϕ	-99±22	-101±31	-101±26
	χ_1	128±83	144±77	-142±82

Peptides comportant des acides β -aminés

Résidu	Angle	HSer	HCys
Ile ₂	ϕ	-144±15	-116±24
	ψ	85±35	95±16
	χ_1	88±45	17±110
Trp ₃	ϕ	-117±37	-125±28
	ψ	126±44	111±60
	χ_1	-113±80	-54±63
Gly ₄	ϕ	-164±82	164±76
	ψ	-61±100	-82±112
Cys ₅	ϕ	-124±31	-106±16
	ψ	154±39	-80±15
	χ_1	-113±79	-62±46
Ser ₆	ϕ	-113±38	-78±8
	ψ	26±64	87±2
	χ_1	119±88	-178±2
Gly ₇	ϕ	-107±82	146±6
	ψ	94±80	-52±2
Lys ₈	ϕ	-79±12	-75±3
	ψ	57±9	-68±3
	χ_1	-88±75	-156±38
Leu ₉	ϕ	-152±21	-160±7
	ψ	-52±11	112±5
	χ_1	-175±30	-176±6
Ile ₁₀	ϕ	-156±7	-52±5
	ψ	104±11	129±12
	χ_1	-97±58	64±54
Cys ₁₁	ϕ	-97±10	-100±20
	ψ	32±9	84±13
	χ_1	-101±41	-14±70
Thr ₁₂	ϕ	-163±5	-120±26
	ψ	158±13	103±74
	χ_1	-146±30	65±45
Thr ₁₃	ϕ	-163±3	-120±26
	ψ	104±107	88±79
	χ_1	-45±53	26±47
Ala ₁₄	ϕ	-85±33	-104±25
	χ_1	8±84	-34±99

b. Comparaison entre les distances interprotoniques expérimentales (RMN) et calculées dans les structures moyennes issues de la MD

Peptide Parent

		Peptide Parent	
Protons		Distances (Å)	
		r_{nmr}	r_{MD}
Contraintes intra-résidus			
I ² -NH	I ² -C ^β H	2.80-3.80	2.75
I ² -NH	I ² -C ^γ H	3.80-5.50	4.57
I ² -NH	I ² -C ^δ H	3.80-5.50	4.91
I ² -C ^α H	I ² -C ^δ H	3.80-5.50	3.44
W ³ -NH	W ³ -C ^β H	2.80-3.80	2.70
W ³ -NH	W ³ -C ^δ H	3.80-5.50	5.26
W ³ -C ^α H	W ³ -C ^δ H	3.80-5.50	3.69
W ³ -C ^α H	W ³ -C ^ε H	3.80-5.50	3.50
G ⁴ -NH	G ⁴ -C ^α H	1.80-2.80	2.65
C ⁵ -NH	C ⁵ -C ^β H	2.80-3.80	2.96
S ⁶ -NH	S ⁶ -C ^α H	2.80-3.80	2.92
S ⁶ -NH	S ⁶ -C ^γ H	3.80-5.50	4.70
K ⁸ -NH	K ⁸ -C ^β H	2.80-3.80	3.27
K ⁸ -NH	K ⁸ -C ^γ H	3.80-5.50	3.91
K ⁸ -NH	K ⁸ -C ^δ H	3.80-5.50	5.13
K ⁸ -C ^α H	K ⁸ -C ^β H	2.80-3.80	2.66
K ⁸ -C ^α H	K ⁸ -C ^δ H	3.80-5.50	4.40
K ⁸ -C ^α H	K ⁸ -C ^ε H	3.80-5.50	4.98
K ⁸ -C ^β H	K ⁸ -C ^ε H	3.80-5.50	4.36
L ⁹ -NH	L ⁹ -C ^β H	1.80-2.80	2.48
L ⁹ -NH	L ⁹ -C ^δ H	3.80-5.50	4.99
L ⁹ -C ^α H	L ⁹ -C ^β H	1.80-2.80	2.71
L ⁹ -C ^α H	L ⁹ -C ^δ H	3.80-5.50	4.41
I ¹⁰ -NH	I ¹⁰ -C ^γ H	3.80-5.50	4.60
I ¹⁰ -NH	I ¹⁰ -C ^δ H	3.80-5.50	4.98
I ¹⁰ -C ^α H	I ¹⁰ -C ^δ H	3.80-5.50	4.16
C ¹¹ -NH	C ¹¹ -C ^β H	2.80-3.80	2.81
T ¹² -NH	T ¹² -C ^α H	2.80-3.80	2.95
T ¹² -NH	T ¹² -C ^β H	2.80-3.80	2.78
T ¹² -NH	T ¹² -C ^γ H	3.80-5.50	4.57
T ¹² -C ^α H	T ¹² -C ^β H	2.80-3.80	3.05
T ¹³ -NH	T ¹³ -C ^β H	2.80-3.80	3.01
T ¹³ -NH	T ¹³ -C ^γ H	3.80-5.50	4.57

Contraintes inter-résidus

I ² -NH W ³ -NH	3.80-5.50	4.17
I ² -C ^α H W ³ -NH	1.80-2.80	2.22
I ² -C ^β H W ³ -NH	3.80-5.50	4.57
I ² -C ^δ H W ³ -NH	3.80-5.50	3.82
I ² -C ^α H G ⁴ -NH	3.80-5.50	5.15
I ² -C ^δ H G ⁴ -NH	3.80-5.50	3.73
W ³ -C ^α H G ⁴ -NH	1.80-2.80	2.29
W ³ -C ^α H G ⁴ -C ^α H	3.80-5.50	4.36
W ³ -C ^β H G ⁴ -NH	3.80-5.50	4.32
W ³ -C ^δ H G ⁴ -NH	3.80-5.50	5.37
W ³ -C ^ε H G ⁴ -NH	3.80-5.50	5.47
G ⁴ -C ^α H C ⁵ -NH	1.80-2.80	2.79
G ⁴ -C ^α H C ⁵ -C ^α H	3.80-5.50	4.43
G ⁴ -NH S ⁶ -NH	3.80-5.50	5.48
G ⁴ -C ^α H S ⁶ -NH	3.80-5.50	4.79
C ⁵ -NH S ⁶ -NH	3.80-5.50	4.06
C ⁵ -C ^α H S ⁶ -NH	1.80-2.80	2.32
C ⁵ -C ^α H S ⁶ -C ^β H	3.80-5.50	4.82
C ⁵ -C ^β H S ⁶ -NH	3.80-5.50	4.23
S ⁶ -NH G ⁷ -NH	2.80-3.80	3.80
S ⁶ -C ^α H G ⁷ -NH	1.80-2.80	2.32
S ⁶ -NH K ⁸ -C ^α H	3.80-5.50	4.19
S ⁶ -C ^α H K ⁸ -NH	3.80-5.50	4.78
G ⁷ -NH K ⁸ -NH	2.80-3.80	2.80
G ⁷ -C ^α H K ⁸ -NH	2.80-3.80	3.04
K ⁸ -NH L ⁹ -NH	2.80-3.80	3.80
K ⁸ -C ^α H L ⁹ -NH	1.80-2.80	2.21
K ⁸ -C ^β H L ⁹ -NH	3.80-5.50	4.17
K ⁸ -C ^γ H L ⁹ -NH	3.80-5.50	4.65
K ⁸ -C ^α H I ¹⁰ -NH	2.80-3.80	3.40
K ⁸ -C ^β H I ¹⁰ -NH	2.80-3.80	3.80
L ⁹ -NH I ¹⁰ -NH	2.80-3.80	2.71
L ⁹ -C ^α H I ¹⁰ -NH	2.80-3.80	3.59
I ¹⁰ -NH C ¹¹ -NH	2.80-3.80	3.69
I ¹⁰ -C ^α H C ¹¹ -NH	1.80-2.80	2.42
I ¹⁰ -C ^β H C ¹¹ -NH	3.80-5.50	4.66
I ¹⁰ -C ^γ H C ¹¹ -NH	3.80-5.50	4.87
I ¹⁰ -C ^δ H C ¹¹ -NH	3.80-5.50	5.26
I ¹⁰ -C ^α H T ¹² -NH	2.80-3.80	3.47
I ¹⁰ -C ^δ H T ¹² -NH	3.80-5.50	4.39
C ¹¹ -NH T ¹² -NH	2.80-3.80	2.76
C ¹¹ -C ^α H T ¹² -NH	1.80-2.80	2.80
C ¹¹ -C ^β H T ¹² -NH	3.80-5.50	4.47
T ¹² -C ^α H T ¹³ -NH	1.80-2.80	2.16
T ¹³ -NH A ¹⁴ -NH	2.80-3.80	3.80
T ¹³ -C ^β H A ¹⁴ -NH	3.80-5.50	4.42
T ¹³ -C ^γ H A ¹⁴ -NH	3.80-5.50	4.64
T ¹² -C ^α H A ¹⁴ -NH	3.80-5.50	5.09

Peptide Rétro-inverso

Protons	Distances (Å)			
	Rétro-inverso Famille I		Rétro-inverso Famille II	
	r_{nmr}	R_{MD}	r_{nmr}	R_{MD}
Contraintes inter-résidus				
A ¹⁴ -NH T ¹³ -NH	3.80-5.50	4.16	3.80-5.50	4.38
A ¹⁴ -C ^α H T ¹³ -NH	1.80-2.80	2.30	1.80-2.80	2.19
T ¹³ -C ^α H T ¹² -NH	2.80-3.80	3.61	2.80-3.80	3.63
T ¹² -NH C ¹¹ -NH	2.80-3.80	2.73	2.80-3.80	2.78
T ¹² -C ^α H C ¹¹ -NH	2.20-3.80	3.63	2.20-3.80	3.63
T ¹² -C ^β H C ¹¹ -NH	2.80-3.80	3.44	2.80-3.80	2.98
T ¹² -C ^γ H C ¹¹ -NH	3.80-5.50	4.18	3.80-5.50	4.54
C ¹¹ -NH I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	3.49	3.80-5.50	3.56
C ¹¹ -NH I ¹⁰ -C ^γ H	3.80-5.50	3.97	3.80-5.50	4.61
C ¹¹ -C ^α H I ¹⁰ -NH	1.80-2.80	3.64	1.80-2.80	3.65
C ¹¹ -C ^β H I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	5.50	3.80-5.50	4.04
C ¹¹ -C ^α H L ⁹ -NH	3.80-5.50	3.25	3.80-5.50	3.57
C ¹¹ -C ^β H L ⁹ -NH	3.80-5.50	4.57	3.80-5.50	3.97
I ¹⁰ -NH L ⁹ -NH	1.80-2.80	1.92	1.80-2.80	2.81
I ¹⁰ -C ^α H L ⁹ -NH	2.80-3.80	3.61	2.80-3.80	3.01
I ¹⁰ -C ^β H L ⁹ -NH	3.80-5.50	4.01	3.80-5.50	4.50
L ⁹ -NH K ⁸ -NH	2.80-3.80	2.97	2.80-3.80	3.56
L ⁹ -C ^α H K ⁸ -NH	1.80-2.80	2.41	1.80-2.80	2.28
L ⁹ -C ^β H K ⁸ -NH	3.80-5.50	4.54	3.80-5.50	4.41
L ⁹ -C ^γ H K ⁸ -NH	3.80-5.50	4.35	3.80-5.50	4.37
L ⁹ -C ^δ H K ⁸ -NH	3.80-5.50	5.49	3.80-5.50	5.46
K ⁸ -C ^β H G ⁷ -NH	3.80-5.50	4.48	3.80-5.50	4.20
K ⁸ -C ^ε H G ⁷ -NH	3.80-5.50	5.47	3.80-5.50	4.49
K ⁸ -C ^β H S ⁶ -NH	3.80-5.50	4.17	3.80-5.50	5.49
G ⁷ -NH S ⁶ -NH	2.80-3.80	2.79	2.80-3.80	3.49
G ⁷ -C ^α H S ⁶ -NH	2.80-3.80	3.22	2.80-3.80	3.05
S ⁶ -NH C ⁵ -NH	2.80-3.80	3.27	2.80-3.80	2.70
S ⁶ -C ^α H C ⁵ -NH	2.80-3.80	2.79	2.80-3.80	3.45
C ⁵ -NH G ⁴ -NH	2.80-3.80	2.63	2.80-3.80	3.78
C ⁵ -C ^α H G ⁴ -NH	1.80-2.80	3.12	1.80-2.80	2.24
C ⁵ -C ^β H G ⁴ -NH	2.80-3.80	4.09	2.80-3.80	3.68
G ⁴ -C ^α H W ³ -NH	2.80-3.80	3.24	2.80-3.80	2.80
W ³ -C ^α H I ² -NH	2.80-3.80	2.61	2.80-3.80	2.81
W ³ -C ^β H I ² -NH	2.80-3.80	3.48	2.80-3.80	3.03
W ³ -C ^ε H I ² -NH	3.80-5.50	4.71	3.80-5.50	5.48
W ³ -C ^η H I ² -C ^α H	3.80-5.50	5.51	3.80-5.50	5.49

Analogue DDap

Protons	Lactame DDap	
	Distances (Å)	
	r_{nmr}	r_{MD}
Contraintes intra-résidus		
C ¹¹ -C ^α H C ¹¹ -C ^γ H	2.80-3.80	2.90
C ¹¹ -C ^β H C ¹¹ -C ^γ H	2.80-3.80	2.72
C ¹¹ -NH C ¹¹ -C ^γ H	3.80-4.80	4.65
Contraintes inter-résidus		
I ² -C ^α H W ³ -NH	2.80-3.80	3.58
I ² -C ^β H W ³ -NH	2.80-3.80	2.84
I ² -C ^δ H W ³ -NH	3.80-4.80	4.76
I ² -NH G ⁴ -NH	2.80-3.80	3.78
W ³ -NH G ⁴ -NH	2.80-3.80	2.80
W ³ -C ^α H G ⁴ -NH	2.80-3.80	3.65
W ³ -C ^β H G ⁴ -NH	2.80-3.80	3.29
W ³ -C ^δ H G ⁴ -NH	3.80-5.50	4.16
W ³ -C ^ε H G ⁴ -NH	3.80-5.50	3.80
C ⁵ -C ^α H S ⁶ -NH	2.80-3.80	2.63
C ⁵ -C ^β H S ⁶ -NH	2.80-3.80	3.46
C ⁵ -C ^β H C ¹¹ -C ^γ H	2.80-3.80	3.03
S ⁶ -NH G ⁷ -NH	2.80-3.80	2.86
S ⁶ -C ^β H G ⁷ -NH	2.80-3.80	2.80
S ⁶ -NH K ⁸ -NH	3.80-5.50	4.53
G ⁷ -NH K ⁸ -NH	1.80-2.80	1.90
G ⁷ -C ^α H K ⁸ -NH	2.80-3.80	3.15
K ⁸ -NH L ⁹ -NH	1.80-2.80	2.32
K ⁸ -C ^α H L ⁹ -NH	2.80-3.80	3.64
K ⁸ -C ^β H L ⁹ -NH	2.80-3.80	2.91
K ⁸ -C ^β H I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	4.50
L ⁹ -NH I ¹⁰ -NH	1.80-2.80	2.42
I ¹⁰ -NH C ¹¹ -NH	3.80-4.80	3.97
I ¹⁰ -C ^α H C ¹¹ -NH	1.80-2.80	2.24
I ¹⁰ -C ^β H C ¹¹ -NH	3.80-4.80	4.54
I ¹⁰ -C ^γ 2H C ¹¹ -NH	3.80-5.50	5.09
I ¹⁰ -C ^γ 1H C ¹¹ -NH	3.80-4.80	4.82
I ¹⁰ -C ^δ H C ¹¹ -NH	3.80-4.80	3.98
I ¹⁰ -C ^δ H T ¹² -NH	3.80-4.80	4.81
C ¹¹ -NH T ¹² -NH	2.80-3.80	2.74
C ¹¹ -C ^α H T ¹² -NH	2.80-3.80	3.65
C ¹¹ -C ^β H T ¹³ -NH	3.80-5.50	5.55
C ¹¹ -C ^β H T ¹² -NH	2.80-3.80	2.79
T ¹² -NH T ¹³ -NH	3.20-4.20	3.92
T ¹² -C ^α H T ¹³ -NH	2.20-3.20	2.44
T ¹³ -NH A ¹⁴ -NH	2.80-3.80	3.79
T ¹³ -C ^β H A ¹⁴ -NH	3.80-4.80	4.73
T ¹³ -C ^γ H A ¹⁴ -NH	3.80-5.50	4.51

Analogue DDab

Protons	Lactame DDab	
	Distances (Å)	
	r_{nmr}	r_{MD}
Contraintes intra-résidus		
I ² -NH I ² -C ^α H	1.80-2.80	2.94
I ² -NH I ² -C ^β H	2.80-3.80	3.33
W ³ -NH W ³ -C ^β H	2.80-3.80	3.47
G ⁴ -NH G ⁴ -C ^α H	2.80-3.80	2.54
C ⁵ -NH C ⁵ -C ^α H	2.20-3.20	2.99
C ⁵ -NH C ⁵ -C ^β H	2.50-3.50	2.80
S ⁶ -NH S ⁶ -C ^α H	1.80-2.80	2.91
S ⁶ -NH S ⁶ -C ^β H	2.80-3.80	2.95
G ⁷ -NH G ⁷ -C ^α H	1.80-2.80	2.49
K ⁸ -H K ⁸ -C ^α H	1.80-2.80	2.73
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^α H	2.40-3.40	2.81
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^β H	2.80-3.80	3.31
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^γ H	3.80-5.50	3.66
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^δ H	3.80-5.50	5.31
C ¹¹ -NH C ¹¹ -C ^α H	2.40-3.40	3.08
C ¹¹ -NH C ¹¹ -C ^β H	3.20-4.20	3.12
C ¹¹ -NH C ¹¹ -C ^γ H	3.80-5.50	4.24
T ¹² -NH T ¹² -C ^α H	1.80-2.80	2.79
T ¹² -NH T ¹² -C ^β H	2.80-3.80	2.77
T ¹² -NH T ¹² -C ^γ H	3.80-5.50	4.17
T ¹³ -NH T ¹³ -C ^α H	2.80-3.80	2.90
T ¹³ -NH T ¹³ -C ^β H	2.80-3.80	3.56
Contraintes inter-résidus		
I ² -NH W ³ -NH	4.50-5.50	4.47
I ² -C ^α H W ³ -NH	1.80-2.80	2.21
I ² -C ^β H W ³ -NH	3.80-5.50	3.90
I ² -C ^γ H W ³ -NH	3.80-5.50	5.19
I ² -C ^α H W ³ -C ^δ H	4.50-5.50	5.51
I ² -C ^δ H W ³ -NH	4.50-5.50	5.17
W ³ -NH G ⁴ -NH	2.80-3.80	2.76
W ³ -C ^α H G ⁴ -NH	2.20-3.20	2.78
W ³ -C ^α H G ⁴ -C ^α H	3.80-5.50	4.44
W ³ -C ^β H G ⁴ -NH	3.80-4.80	4.50
W ³ -C ^δ H G ⁴ -NH	4.50-5.50	5.44
W ³ -C ^ε H G ⁴ -NH	3.80-5.50	5.50
G ⁴ -C ^α H C ⁵ -NH	1.80-5.50	2.98
C ⁵ -NH S ⁶ -NH	2.80-4.80	4.28
C ⁵ -C ^α H S ⁶ -NH	1.80-2.80	2.19
C ⁵ -C ^α H S ⁶ -C ^α H	3.80-5.50	4.32
C ⁵ -C ^α H S ⁶ -C ^β H	4.50-5.50	5.09
C ⁵ -C ^α H G ⁷ -NH	3.80-5.50	4.72
C ⁵ -C ^β H G ⁷ -NH	3.80-5.50	4.57
C ⁵ -C ^β H C ¹¹ -C ^δ H	2.80-3.80	2.96
S ⁶ -NH G ⁷ -NH	2.80-3.80	3.81
S ⁶ -C ^α H G ⁷ -NH	1.80-2.80	2.41
S ⁶ -C ^β H G ⁷ -NH	3.80-5.50	4.33
G ⁷ -NH K ⁸ -NH	2.80-3.80	3.58
G ⁷ -C ^α H K ⁸ -NH	2.80-3.80	3.06
L ⁹ -C ^β H I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	4.38
L ⁹ -NH I ¹⁰ -NH	2.80-3.80	3.81
I ¹⁰ -NH C ¹¹ -NH	2.80-3.80	2.78
I ¹⁰ -C ^α H C ¹¹ -NH	1.80-2.80	2.31
I ¹⁰ -C ^γ 2H C ¹¹ -NH	4.80-5.50	4.94
I ¹⁰ -C ^γ 1H C ¹¹ -NH	4.80-5.50	4.91
I ¹⁰ -C ^δ H C ¹¹ -NH	4.80-5.50	4.78
I ¹⁰ -C ^δ H T ¹² -NH	3.80-5.50	3.80
C ¹¹ -NH T ¹² -NH	2.80-3.80	2.79

$C^{11}\text{-}C^{\alpha}H$ $T^{12}\text{-}NH$	2.80-3.80	2.84
$C^{11}\text{-}C^{\beta}H$ $T^{12}\text{-}NH$	3.50-4.50	4.35
$C^{11}\text{-}C^{\gamma}H$ $T^{12}\text{-}NH$	3.80-5.50	5.30
$T^{12}\text{-}NH$ $T^{13}\text{-}NH$	3.80-5.50	4.67

Analogue EDap

Protons	Lactame EDap	
	Distances (Å)	
	r_{nmr}	r_{MD}
Contraintes intra-résidus		
$I^2\text{-}NH$ $I^2\text{-}C^{\alpha}H$	2.80-3.80	2.91
$I^2\text{-}NH$ $I^2\text{-}C^{\beta}H$	2.80-3.80	3.77
$I^2\text{-}NH$ $I^2\text{-}C^{\gamma}H$	3.80-4.80	4.17
$I^2\text{-}NH$ $I^2\text{-}C^{\delta}H$	3.80-5.50	4.49
$W^3\text{-}NH$ $W^3\text{-}C^{\alpha}H$	2.80-3.80	2.88
$W^3\text{-}NH$ $W^3\text{-}C^{\beta}H$	2.80-3.80	3.54
$G^4\text{-}NH$ $G^4\text{-}C^{\alpha}H$	1.80-5.50	2.32
$C^5\text{-}NH$ $C^5\text{-}C^{\alpha}H$	2.80-3.80	2.87
$C^5\text{-}NH$ $C^5\text{-}C^{\gamma}H$	2.80-4.80	4.70
$C^5\text{-}NH$ $C^5\text{-}C^{\beta}H$	2.80-4.80	2.99
$G^7\text{-}NH$ $G^7\text{-}C^{\alpha}H$	1.80-5.50	2.59
$L^9\text{-}C^{\alpha}H$ $L^9\text{-}C^{\gamma}H$	2.80-4.20	4.24
$L^9\text{-}C^{\alpha}H$ $L^9\text{-}C^{\delta 1}H$	3.80-5.50	4.43
$L^9\text{-}C^{\alpha}H$ $L^9\text{-}C^{\delta 2}H$	3.80-5.50	4.12
$I^{10}\text{-}NH$ $I^{10}\text{-}C^{\alpha}H$	2.80-3.80	2.84
$I^{10}\text{-}NH$ $I^{10}\text{-}C^{\beta}H$	2.80-3.80	3.27
$I^{10}\text{-}NH$ $I^{10}\text{-}C^{\gamma}H$	3.20-5.50	3.53
$I^{10}\text{-}NH$ $I^{10}\text{-}C^{\delta}H$	3.80-5.50	5.25
$C^{11}\text{-}NH$ $C^{11}\text{-}C^{\alpha}H$	2.80-3.80	2.87
$C^{11}\text{-}NH$ $C^{11}\text{-}C^{\beta}H$	2.95-4.01	3.22
$T^{13}\text{-}NH$ $T^{13}\text{-}C^{\alpha}H$	2.80-3.80	2.93
$T^{13}\text{-}NH$ $T^{13}\text{-}C^{\beta}H$	2.80-3.80	3.76
$T^{13}\text{-}NH$ $T^{13}\text{-}C^{\gamma}H$	3.80-4.80	3.86
$A^{14}\text{-}NH$ $A^{14}\text{-}C^{\beta}H$	1.80-5.50	2.86
Contraintes inter-résidus		
$I^2\text{-}NH$ $W^3\text{-}NH$	3.50-4.50	4.30
$I^2\text{-}C^{\alpha}H$ $W^3\text{-}NH$	1.80-2.80	2.24
$I^2\text{-}C^{\alpha}H$ $W^3\text{-}C^{\delta}H$	4.80-5.50	5.14
$I^2\text{-}C^{\beta}H$ $W^3\text{-}NH$	2.80-3.80	3.14
$I^2\text{-}C^{\gamma}H$ $W^3\text{-}NH$	3.80-5.50	5.04
$I^2\text{-}C^{\delta}H$ $W^3\text{-}NH$	3.80-5.50	5.50
$I^2\text{-}C^{\delta}H$ $W^3\text{-}C^{\delta}H$	4.50-6.50	6.42
$W^3\text{-}NH$ $G^4\text{-}NH$	3.0-4.00	3.97
$W^3\text{-}C^{\alpha}H$ $G^4\text{-}NH$	2.20-3.20	2.21
$W^3\text{-}C^{\beta}H$ $G^4\text{-}NH$	2.80-3.80	3.78
$W^3\text{-}C^{\delta}H$ $G^4\text{-}NH$	3.80-5.50	5.38
$G^4\text{-}C^{\alpha}H$ $C^5\text{-}NH$	3.20-4.20	3.19
$C^5\text{-}C^{\alpha}H$ $S^6\text{-}NH$	1.80-2.80	2.24
$C^5\text{-}C^{\gamma}H$ $S^6\text{-}NH$	3.80-5.50	4.34
$C^5\text{-}C^{\beta}H$ $S^6\text{-}NH$	3.80-5.50	4.46
$C^5\text{-}C^{\beta}H$ $G^7\text{-}NH$	4.50-6.50	6.39
$C^5\text{-}C^{\gamma}H$ $G^7\text{-}NH$	4.50-5.50	4.94
$C^5\text{-}C^{\beta}H$ $C^{11}\text{-}C^{\gamma}H$	3.80-4.80	3.80
$C^5\text{-}C^{\gamma}H$ $C^{11}\text{-}C^{\alpha}H$	3.80-5.50	4.35
$C^5\text{-}C^{\gamma}H$ $C^{11}\text{-}C^{\beta}H$	3.80-5.50	5.53
$C^5\text{-}C^{\gamma}H$ $C^{11}\text{-}C^{\gamma}H$	2.50-3.50	2.50
$S^6\text{-}C^{\alpha}H$ $G^7\text{-}NH$	1.80-2.80	2.22
$S^6\text{-}C^{\beta}H$ $G^7\text{-}NH$	3.80-5.50	4.37
$G^7\text{-}NH$ $K^8\text{-}NH$	2.80-3.80	3.61
$G^7\text{-}C^{\alpha}H$ $K^8\text{-}NH$	2.80-5.50	2.95
$L^9\text{-}C^{\alpha}H$ $I^{10}\text{-}NH$	2.20-3.20	3.14

L ⁹ -C ^β H I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	4.47
L ⁹ -C ^γ H I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	5.24
I ¹⁰ -NH C ¹¹ -NH	2.80-3.80	2.80
I ¹⁰ -C ^α H C ¹¹ -NH	2.50-3.50	2.42
I ¹⁰ -C ^β H C ¹¹ -NH	3.50-4.50	4.62
I ¹⁰ -C ^γ H C ¹¹ -NH	4.80-5.50	4.95
I ¹⁰ -C ^δ H C ¹¹ -NH	3.80-5.50	5.10
I ¹⁰ -C ^δ H C ¹¹ -C ^γ H	5.50-6.50	6.53
I ¹⁰ -C ^δ H T ¹² -NH	5.50-6.50	5.46
C ¹¹ -NH T ¹² -NH	2.80-3.80	3.77
C ¹¹ -C ^α H T ¹² -NH	2.80-3.80	2.58
C ¹¹ -C ^β H T ¹² -NH	3.29-4.54	4.46
T ¹² -NH T ¹³ -NH	2.80-3.80	2.91
T ¹² -C ^α H T ¹³ -NH	2.80-3.80	3.61

Analogue EDab

Protons	Lactame EDab	
	Distances (Å)	
	r _{nmr}	r _{MD}
Contraintes intra-résidus		
I ² -NH I ² -C ^α H	2.80-3.80	2.81
I ² -NH I ² -C ^β H	2.80-3.80	3.22
I ² -NH I ² -C ^γ 2H	3.80-5.50	3.79
I ² -NH I ² -C ^γ 1H	4.80-5.50	4.90
I ² -NH I ² -C ^δ H	4.80-5.50	5.22
W ³ -NH W ³ -C ^α H	2.80-3.80	2.94
W ³ -NH W ³ -C ^β H	3.41-4.14	3.11
W ³ -NH W ³ -C ^δ H	4.80-5.50	5.53
W ³ -C ^ε H W ³ -C ^ζ H	4.80-5.50	5.06
W ³ -C ^ε H W ³ -C ^η H	3.80-5.50	4.34
G ⁴ -NH G ⁴ -C ^α H	2.77-3.77	2.67
C ⁵ -NH C ⁵ -C ^α H	2.80-3.80	2.90
C ⁵ -NH C ⁵ -C ^β H	2.98-3.98	2.85
C ⁵ -NH C ⁵ -C ^γ H	4.80-5.50	4.80
S ⁶ -NH S ⁶ -C ^α H	2.80-3.80	2.80
S ⁶ -NH S ⁶ -C ^β H	3.80-4.80	3.73
G ⁷ -NH G ⁷ -C ^α H	2.30-3.30	2.46
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^α H	2.80-3.80	2.81
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^β H	2.80-3.80	3.36
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^γ H	3.80-5.50	3.59
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^δ H	3.80-5.50	5.55
C ¹¹ -NH C ¹¹ -C ^α H	2.80-3.80	3.04
C ¹¹ -NH C ¹¹ -C ^γ H	3.80-5.50	4.98
C ¹¹ -NH C ¹¹ -C ^δ H	5.00-6.50	4.98
T ¹² -NH T ¹² -C ^α H	2.80-3.80	2.94
T ¹² -NH T ¹² -C ^β H	2.80-3.80	2.86
Contraintes inter-résidus		
I ² -NH W ³ -NH	3.80-5.50	3.81
I ² -C ^α H W ³ -NH	2.20-3.20	2.19
I ² -C ^β H W ³ -NH	3.80-4.80	4.60
I ² -C ^δ H W ³ -NH	4.80-5.50	4.82
W ³ -NH G ⁴ -NH	3.80-5.50	3.91
W ³ -C ^α H G ⁴ -NH	2.20-3.20	2.26
W ³ -C ^β H G ⁴ -NH	3.16-4.26	4.19
W ³ -C ^δ H G ⁴ -NH	4.80-5.50	5.54
W ³ -C ^ε H G ⁴ -NH	4.80-5.50	5.55
G ⁴ -C ^α H C ⁵ -NH	2.67-3.67	3.14
C ⁵ -C ^α H S ⁶ -NH	2.20-3.30	3.21
C ⁵ -C ^β H S ⁶ -NH	3.48-4.48	3.99

C ⁵ -C ^γ H	S ⁶ -NH	4.50-5.50	5.54
C ⁵ -C ^γ H	C ¹¹ -C ^δ H	2.80-3.80	2.52
C ⁵ -C ^β H	C ¹¹ -C ^δ	1.80-6.50	4.28
C ⁵ -C ^α H	C ¹¹ -C ^δ	1.80-6.50	3.08
S ⁶ -NH	G ⁷ -NH	3.80-5.50	4.32
S ⁶ -C ^α H	G ⁷ -NH	2.80-3.80	2.47
G ⁷ -NH	K ⁸ -NH	2.80-3.80	2.97
G ⁷ -C ^α H	K ⁸ -NH	2.80-3.80	3.20
L ⁹ -C ^γ H	I ¹⁰ -NH	2.80-3.80	3.76
I ¹⁰ -NH	C ¹¹ -NH	3.80-5.50	3.75
I ¹⁰ -C ^α H	C ¹¹ -NH	1.80-2.80	2.02
I ¹⁰ -C ^β H	C ¹¹ -NH	3.80-5.50	4.37
I ¹⁰ -C ^γ H	C ¹¹ -NH	4.80-5.50	4.79
I ¹⁰ -C ^δ H	C ¹¹ -NH	4.80-5.50	4.70
I ¹⁰ -C ^δ H	T ¹² -NH	4.80-5.50	5.60
C ¹¹ -NH	T ¹² -NH	2.80-3.80	3.24
C ¹¹ -C ^β H	T ¹² -NH	3.33-5.50	4.59
C ¹¹ -C ^γ H	T ¹² -NH	4.50-5.50	4.95
C ¹¹ -C ^δ H	T ¹² -NH	2.80-3.80	3.93

Analogue DapD

Lactame DapD			
Protons	Distances (Å)		
	r_{nmr}	r_{MD}	
Contraintes inter-résidus			
I ² -NH W ³ -NH	3.80-5.50	4.51	
I ² -C ^α H W ³ -NH	1.80-2.80	2.32	
I ² -C ^α H W ³ -C ^δ H	3.80-5.50	3.85	
I ² -C ^β H W ³ -NH	2.80-3.80	3.90	
I ² -C ^δ H W ³ -NH	3.80-5.50	4.59	
W ³ -NH G ⁴ -NH	3.80-5.50	3.96	
W ³ -C ^α H G ⁴ -NH	1.80-2.80	2.21	
W ³ -C ^α H G ⁴ -C ^α H	3.80-5.50	4.33	
W ³ -C ^β H G ⁴ -NH	2.80-3.80	3.83	
W ³ -C ^δ H G ⁴ -NH	3.80-5.50	5.74	
G ⁴ -NH C ⁵ -NH	3.80-5.50	4.31	
G ⁴ -C ^α H C ⁵ -C ^α H	3.80-5.50	4.37	
G ⁴ -C ^α H S ⁶ -NH	3.80-5.50	5.58	
C ⁵ -C ^α H S ⁶ -NH	1.80-2.80	2.17	
C ⁵ -C ^α H S ⁶ -C ^β H	3.80-5.50	4.88	
C ⁵ -C ^β H S ⁶ -NH	3.80-5.50	4.42	
C ⁵ -C ^γ H C ¹¹ -NH	3.80-5.50	4.34	
C ⁵ -C ^γ H C ¹¹ -C ^α H	1.80-2.80	2.26	
C ⁵ -C ^γ H C ¹¹ -C ^β H	2.80-3.80	2.88	
S ⁶ -NH G ⁷ -NH	3.80-4.80	4.01	
S ⁶ -C ^β H G ⁷ -NH	2.80-4.00	3.92	
S ⁶ -NH K ⁸ -NH	3.80-5.50	5.63	
G ⁷ -NH K ⁸ -NH	2.80-4.00	3.20	
G ⁷ -C ^α H K ⁸ -NH	2.80-3.80	2.90	
K ⁸ -NH L ⁹ -NH	2.80-3.80	3.14	
K ⁸ -C ^α H L ⁹ -NH	2.80-3.80	3.55	
K ⁸ -C ^β H L ⁹ -NH	2.80-3.80	2.66	
K ⁸ -C ^α H I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	4.69	
L ⁹ -NH I ¹⁰ -NH	1.80-2.80	2.16	
L ⁹ -C ^β H I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	3.51	
L ⁹ -C ^γ H I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	5.14	
I ¹⁰ -NH C ¹¹ -NH	3.80-4.80	4.38	
I ¹⁰ -C ^α H C ¹¹ -NH	1.80-2.80	2.15	
I ¹⁰ -C ^β H C ¹¹ -NH	2.80-3.80	3.03	
I ¹⁰ -C ^γ H C ¹¹ -NH	3.80-5.50	4.85	
I ¹⁰ -C ^δ H C ¹¹ -NH	3.80-5.50	5.36	
I ¹⁰ -C ^δ H T ¹² -NH	3.80-5.50	4.61	

C ¹¹ -NH T ¹² -NH	2.80-3.80	2.60
C ¹¹ -NH T ¹² -C ^γ H	3.80-5.50	4.75
C ¹¹ -C ^α H T ¹² -NH	2.80-3.80	3.61
C ¹¹ -C ^β H T ¹² -NH	2.80-3.80	3.26
T ¹² -C ^α H T ¹³ -NH	1.80-2.80	2.17
T ¹³ -NH A ¹⁴ -NH	2.80-3.80	3.66
T ¹³ -C ^γ H A ¹⁴ -NH	3.80-5.50	4.98

Analogue DapE

Lactame DapE		
Protons	Distances (Å)	
	r _{NMR}	r _{MD}
Contraintes intra-résidus		
I ² -NH I ² -C ^α H	2.80-3.80	2.93
I ² -NH I ² -C ^β H	2.80-3.80	2.71
I ² -NH I ² -C ^γ H	3.80-5.50	4.56
I ² -NH I ² -C ^δ H	3.80-5.50	3.60
I ² -NH I ² -C ^ε H	3.80-4.80	3.78
W ³ -NH W ³ -C ^α H	4.80-5.50	5.46
W ³ -NH W ³ -C ^β H	4.80-5.50	4.90
W ³ -NH W ³ -C ^γ H	2.80-3.80	2.94
W ³ -C ^ε H W ³ -C ^δ H	4.80-5.50	5.68
W ³ -C ^ε H W ³ -C ^η H	4.80-5.50	5.70
G ⁴ -NH G ⁴ -C ^α H	2.80-3.80	3.46
C ⁵ -NH C ⁵ -C ^α H	2.80-3.80	3.00
C ⁵ -NH C ⁵ -C ^β H	2.80-3.80	3.52
C ⁵ -NH C ⁵ -C ^γ H	3.80-5.50	4.00
S ⁶ -NH S ⁶ -C ^α H	2.80-3.80	2.91
G ⁷ -NH G ⁷ -C ^α H	2.20-3.20	2.49
K ⁸ -C ^α H K ⁸ -NH	2.80-3.80	2.93
K ⁸ -C ^β H K ⁸ -NH	1.80-5.50	2.53
K ⁸ -C ^γ H K ⁸ -NH	4.42-5.50	4.43
K ⁸ -C ^δ H K ⁸ -NH	3.80-5.50	5.54
K ⁸ -C ^ε H K ⁸ -NH	4.80-5.50	5.00
L ⁹ -C ^α H L ⁹ -NH	2.80-3.80	2.72
L ⁹ -C ^β H L ⁹ -NH	1.80-5.50	2.83
L ⁹ -C ^γ H L ⁹ -NH	2.80-3.80	2.77
L ⁹ -C ^δ H L ⁹ -NH	3.80-5.50	3.89
L ⁹ -NH L ⁹ -NH	1.80-5.50	4.10
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^α H	2.80-3.80	2.91
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^β H	2.80-3.80	3.24
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^γ H	3.80-5.50	4.68
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^δ H	4.80-5.50	5.36
C ¹¹ -NH C ¹¹ -C ^α H	2.80-3.80	2.89
C ¹¹ -NH C ¹¹ -C ^γ H	3.36-4.66	3.27
T ¹² -NH T ¹² -C ^α H	2.80-3.80	2.95
T ¹² -NH T ¹² -C ^β H	2.80-3.80	2.75
T ¹² -NH T ¹² -C ^γ H	4.80-5.50	4.51
T ¹³ -NH T ¹³ -C ^α H	2.80-3.80	2.89
T ¹³ -NH T ¹³ -C ^β H	2.80-3.80	3.13
T ¹³ -NH T ¹³ -C ^γ H	3.80-4.80	4.74
A ¹⁴ -C ^α H A ¹⁴ -NH	2.80-3.80	2.88
A ¹⁴ -C ^β H A ¹⁴ -NH	1.80-5.50	3.29
Contraintes inter-résidus		
I ² -NH W ³ -NH	1.80-2.80	2.26
I ² -C ^α H W ³ -NH	4.80-5.50	4.46
I ² -C ^β H W ³ -NH	4.80-5.50	4.70
I ² -C ^δ H W ³ -NH	3.80-4.80	4.57
W ³ -NH G ⁴ -NH	2.84-4.04	3.16
W ³ -C ^α H G ⁴ -NH	2.80-3.80	2.78
W ³ -C ^β H G ⁴ -NH	2.20-3.20	2.84

W ³ -C ^δ H	G ⁴ -NH	3.39-4.59	4.37
W ³ -C ^ε H	G ⁴ -NH	2.53-2.63	2.32
G ⁴ -C ^α H	C ⁵ -NH	2.45-3.48	2.82
C ⁵ -C ^α H	S ⁶ -NH	2.20-3.20	2.16
C ⁵ -C ^β H	S ⁶ -NH	3.55-4.63	3.87
C ⁵ -C ^γ H	S ⁶ -NH	3.80-4.80	4.94
C ⁵ -C ^γ H	C ¹¹ -C ^α H	2.80-4.80	3.95
C ⁵ -C ^γ H	C ¹¹ -C ^β H	1.80-5.50	4.38
C ⁵ -C ^γ H	C ¹¹ -C ^γ H	3.02-5.13	2.45
S ⁶ -NH	G ⁷ -NH	3.80-5.50	4.59
S ⁶ -C ^α H	G ⁷ -NH	2.20-3.20	2.35
S ⁶ -C ^β H	G ⁷ -NH	3.80-5.50	3.83
G ⁷ -NH	K ⁸ -NH	2.80-3.80	3.86
G ⁷ -C ^α H	K ⁸ -NH	2.80-3.80	2.98
K ⁸ -NH	L ⁹ -NH	2.80-3.80	4.31
K ⁸ -C ^α H	L ⁹ -NH	1.80-2.80	2.19
K ⁸ -C ^β H	L ⁹ -NH	3.80-5.50	4.37
K ⁸ -C ^α H	I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	4.96
L ⁹ -C ^β H	I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	4.34
L ⁹ -C ^γ H	I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	4.65
I ¹⁰ -NH	C ¹¹ -NH	2.80-3.80	3.01
I ¹⁰ -C ^α H	C ¹¹ -NH	1.80-2.80	2.56
I ¹⁰ -C ^γ H	C ¹¹ -NH	4.80-5.50	5.03
I ¹⁰ -C ^γ H	C ¹¹ -NH	4.80-5.50	5.00
I ¹⁰ -C ^δ H	C ¹¹ -NH	4.80-5.50	5.26
I ¹⁰ -C ^δ H	T ¹² -NH	4.80-5.50	4.55
C ¹¹ -NH	T ¹² -NH	2.80-3.80	3.40
C ¹¹ -C ^α H	T ¹² -NH	2.80-3.80	2.66
C ¹¹ -C ^β H	T ¹² -NH	3.80-5.50	4.39
C ¹¹ -C ^γ H	T ¹² -NH	3.80-5.50	5.61
T ¹² -NH	T ¹³ -NH	2.80-3.80	2.19
T ¹² -C ^α H	T ¹³ -NH	2.80-3.80	3.63

Analogue HSer

Protons		HSer	
		Distances (Å)	
		r_{nmr}	r_{MD}
Contraintes inter-résidus			
I ² -NH	I ² -C ^α H	2.80-3.80	2.93
I ² -NH	I ² -C ^β H	2.80-3.80	3.82
W ³ -NH	W ³ -C ^α H	2.80-3.80	2.82
W ³ -NH	W ³ -C ^β H	2.71-4.05	2.962
W ³ -NH	W ³ -C ^δ H	3.80-5.50	3.93
G ⁴ -NH	G ⁴ -C ^α H	2.05-3.95	2.66
C ⁵ -NH	C ⁵ -C ^α H	2.80-3.80	2.93
C ⁵ -NH	C ⁵ -C ^β H	2.58-3.83	3.00
S ⁶ -NH	S ⁶ -C ^β H	2.80-4.05	2.77
S ⁶ -NH	S ⁶ -C ^γ H	3.80-5.50	4.45
S ⁶ -NH	S ⁶ -C ^δ H	3.23-4.39	3.66
L ⁹ - C ^α H	L ⁹ -NH	2.80-3.80	2.83
L ⁹ - C ^β H	L ⁹ -NH	2.36-4.14	3.15
L ⁹ - C ^{δ1} H	L ⁹ -NH	4.80-6.53	5.56
L ⁹ - C ^{δ2} H	L ⁹ -NH	4.80-6.09	5.72
I ¹⁰ -NH	I ¹⁰ -C ^α H	2.80-3.80	2.89
I ¹⁰ -NH	I ¹⁰ -C ^β H	2.80-3.80	2.77
I ¹⁰ -NH	I ¹⁰ -C ^{γ2} H	3.80-5.50	4.44
I ¹⁰ -NH	I ¹⁰ -C ^{γ1} H	3.80-6.19	4.18
I ¹⁰ -NH	I ¹⁰ -C ^δ H	3.80-5.50	4.99
C ¹¹ -NH	C ¹¹ -C ^α H	2.80-3.80	2.90
C ¹¹ -NH	C ¹¹ -C ^β H	2.58-3.74	2.77
T ¹² -NH	T ¹² -C ^α H	1.80-2.80	2.87

T ¹² -NH	T ¹² -C ^β H	2.80-3.80	3.09
T ¹² -NH	T ¹² -C ^γ H	3.80-5.50	3.77
T ¹² -NH	T ¹² -C ^{γ1} H	3.80-5.50	4.50
T ¹³ -NH	T ¹³ -C ^α H	1.80-2.80	2.87
T ¹³ -NH	T ¹³ -C ^β H	2.80-3.80	3.06
T ¹³ -NH	T ¹³ -C ^γ H	3.80-5.50	4.76
T ¹³ -NH	T ¹³ -C ^{γ1} H	3.80-5.50	3.81
Contraintes inter-résidus			
I ² -C ^α H	W ³ -NH	1.80-2.80	2.78
I ² -C ^β H	W ³ -NH	3.80-5.50	4.56
I ² -C ^δ H	W ³ -NH	3.80-5.50	5.41
W ³ -C ^α H	G ⁴ -NH	1.80-2.80	2.39
W ³ -C ^β H	G ⁴ -NH	3.08-4.17	3.19
G ⁴ -C ^α H	C ⁵ -NH	2.80-3.80	3.16
G ⁴ -C ^α H	C ⁵ -C ^β H	3.80-5.50	5.50
C ⁵ -C ^α H	S ⁶ -NH	1.80-2.80	2.25
C ⁵ -C ^β H	S ⁶ -NH	2.80-3.80	3.19
C ⁵ -C ^β H	G ⁷ -C ^α H	3.80-5.66	4.94
C ⁵ -C ^β H	C ¹¹ -C ^α H	3.80-4.66	4.67
S ⁶ -C ^α H	G ⁷ -NH	2.80-3.80	3.85
S ⁶ -C ^β H	G ⁷ -NH	3.80-5.50	3.69
S ⁶ -C ^ε H	G ⁷ -NH	2.83-3.56	3.18
S ⁶ -C ^ε H	G ⁷ -C ^α H	4.80-6.38	4.73
S ⁶ -NH	C ¹¹ -C ^α H	3.80-5.50	5.52
G ⁷ -NH	K ⁸ -NH	2.80-3.80	3.82
G ⁷ -C ^α H	K ⁸ -NH	2.80-3.80	3.00
G ⁷ -C ^α H	K ⁸ -C ^β H	4.80-7.13	5.74
G ⁷ -C ^α H	K ⁸ -C ^δ H	4.80-7.25	7.17
G ⁷ -C ^α H	L ⁹ -NH	3.80-5.50	3.78
G ⁷ -C ^α H	L ⁹ -C ^β H	4.80-5.42	5.04
G ⁷ -C ^α H	L ⁹ -C ^δ H	4.80-7.40	7.02
G ⁷ -C ^α H	C ¹¹ -C ^α H	3.80-5.50	4.91
K ⁸ -NH	L ⁹ -NH	2.80-3.80	3.62
K ⁸ -C ^α H	L ⁹ -NH	1.80-2.80	2.60
K ⁸ -C ^β H	L ⁹ -NH	3.80-5.50	4.42
K ⁸ -NH	I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	4.80
L ⁹ -NH	I ¹⁰ -NH	1.80-2.80	1.89
L ⁹ -C ^α H	I ¹⁰ -NH	2.80-3.80	3.60
L ⁹ -C ^β H	I ¹⁰ -NH	2.89-4.17	3.29
I ¹⁰ -NH	C ¹¹ -NH	2.80-3.80	3.79
I ¹⁰ -C ^α H	C ¹¹ -NH	1.80-2.80	2.20
I ¹⁰ -C ^α H	C ¹¹ -C ^β H	3.70-4.98	4.97
I ¹⁰ -C ^β H	C ¹¹ -NH	3.80-5.50	4.63
I ¹⁰ -C ^{γ2} H	C ¹¹ -NH	3.80-6.00	4.22
I ¹⁰ -C ^{γ2} H	C ¹¹ -C ^α H	3.80-6.53	4.82
I ¹⁰ -C ^{γ1} H	C ¹¹ -NH	3.80-6.38	5.25
I ¹⁰ -C ^{δ1} H	C ¹¹ -NH	3.80-4.95	4.24
I ¹⁰ -C ^{δ1} H	C ¹¹ -C ^α H	3.80-6.53	6.54
I ¹⁰ -C ^δ H	T ¹² -NH	3.80-5.50	4.72
C ¹¹ -NH	T ¹² -NH	2.80-3.80	2.98
C ¹¹ -C ^α H	T ¹² -NH	2.80-3.80	2.91
C ¹¹ -C ^β H	T ¹² -NH	2.92-4.17	4.29
T ¹² -C ^α H	T ¹³ -NH	1.80-2.80	2.39
T ¹² -C ^γ H	T ¹³ -C ^γ H	3.80-5.50	5.51
T ¹² -C ^γ H	A ¹⁴ -NH	3.80-5.50	4.24
T ¹³ -C ^γ H	A ¹⁴ -NH	3.80-5.50	4.46
T ¹³ -NH	A ¹⁴ -NH	2.80-3.80	3.57

Analogue HCys

Protons	HCys	
	Distances (Å)	
	r_{nmr}	r_{MD}
Contraintes intra-résidus		
I ² -NH I ² -C ^α H	2.80-3.80	2.93
I ² -NH I ² -C ^β H	2.80-3.80	2.49
W ³ -NH W ³ -C ^α H	1.80-2.80	2.85
W ³ -NH W ³ -C ^β H	2.40-3.58	3.16
G ⁴ -NH G ⁴ -C ^α H	2.46-3.49	2.65
C ⁵ -NH C ⁵ -C ^α H	2.80-3.80	3.10
S ⁶ -NH S ⁶ -C ^α H	2.80-3.80	2.77
S ⁶ -NH S ⁶ -C ^β H	2.84-3.89	2.32
S ⁶ -NH S ⁶ -C ^γ H	3.80-5.50	4.40
G ⁷ -NH G ⁷ -C ^α H	2.30-3.49	2.66
K ⁸ -NH K ⁸ -C ^α H	2.80-3.80	2.89
L ⁹ -NH L ⁹ -C ^α H	2.80-3.80	2.93
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^α H	2.80-3.80	2.80
I ¹⁰ -NH I ¹⁰ -C ^β H	2.80-3.80	3.53
C ¹¹ -NH C ¹¹ -C ^α H	2.80-3.80	2.93
C ¹¹ -NH C ¹¹ -C ^β H	2.63-3.83	3.20
T ¹² -NH T ¹² -C ^α H	1.80-2.80	2.89
T ¹² -NH T ¹² -C ^β H	2.80-3.80	3.54
T ¹³ -NH T ¹³ -C ^α H	2.80-3.80	2.89
T ¹³ -NH T ¹³ -C ^β H	2.80-3.80	3.79
Contraintes inter-résidus		
I ² -NH W ³ -NH	2.90-3.80	2.99
I ² -C ^α H W ³ -NH	1.80-2.80	2.45
I ² -C ^α H W ³ -C ^δ H	3.80-5.50	5.49
I ² -C ^β H W ³ -NH	3.20-4.20	4.71
I ² -C ^β H W ³ -C ^δ H	3.80-5.50	4.87
I ² -C ^γ 2H W ³ -NH	3.80-8.00	4.66
I ² -C ^γ H W ³ -C ^δ H	3.80-8.00	4.42
I ² -C ^γ 1H W ³ -NH	3.80-8.00	5.26
I ² -C ^δ H W ³ -NH	3.80-5.50	5.69
I ² -C ^δ H W ³ -C ^δ H	3.80-8.00	7.53
W ³ -C ^α H G ⁴ -C ^α H	3.64-4.76	4.74
W ³ -C ^α H C ⁵ -NH	3.80-5.50	5.29
G ⁴ -NH C ⁵ -NH	2.80-3.80	2.78
G ⁴ -C ^α H C ⁵ -NH	2.56-3.49	2.89
G ⁴ -C ^α H C ⁵ -C ^α H	3.80-5.50	4.56
C ⁵ -NH S ⁶ -NH	3.80-5.50	5.29
C ⁵ -C ^α H S ⁶ -NH	2.80-3.80	4.26
C ⁵ -C ^γ H S ⁶ -NH	2.46-3.40	2.72
C ⁵ -C ^γ H S ⁶ -C ^α H	3.83-4.76	4.49
C ⁵ -C ^γ H S ⁶ -C ^β H	3.80-5.50	5.02
C ⁵ -C ^β H S ⁶ -NH	3.80-5.50	3.67
C ⁵ -C ^β H S ⁶ -C ^β H	3.80-5.50	5.33
C ⁵ -C ^γ H G ⁷ -NH	4.10-5.16	4.49
C ⁵ -C ^α H K ⁸ -C ^β H	2.80-3.80	5.48
C ⁵ -C ^γ H I ¹⁰ -C ^α H	3.80-5.50	5.12
C ⁵ -C ^α H C ¹¹ -C ^α H	3.80-5.50	5.40
C ⁵ -C ^β H C ¹¹ -NH	3.80-5.50	3.48
C ⁵ -C ^β H C ¹¹ -C ^α H	3.80-5.50	5.67
S ⁶ -NH G ⁷ -NH	2.80-3.80	3.98
S ⁶ -C ^α H G ⁷ -NH	1.80-2.80	2.44
S ⁶ -C ^α H G ⁷ -C ^α H	3.80-5.50	4.33
S ⁶ -C ^β H G ⁷ -NH	3.33-4.51	4.55
S ⁶ -C ^γ H G ⁷ -NH	3.80-5.50	5.37
S ⁶ -NH K ⁸ -NH	3.80-5.50	5.18
S ⁶ -C ^α H K ⁸ -NH	3.80-5.50	4.64
G ⁷ -NH K ⁸ -NH	1.80-2.80	2.38

G ⁷ -NH L ⁹ -NH	3.80-5.50	3.69
G ⁷ -NH L ⁹ -C ^β H	3.80-6.10	6.23
G ⁷ -C ^β H K ⁸ -NH	2.74-3.88	3.11
K ⁸ -NH L ⁹ -C ^β H	3.80-5.50	5.37
K ⁸ -C ^α H L ⁹ -NH	2.80-3.80	3.64
K ⁸ -C ^β H L ⁹ -NH	2.80-3.80	2.76
K ⁸ -C ^δ H L ⁹ -NH	3.80-6.38	5.46
L ⁹ -NH I ¹⁰ -NH	2.80-3.80	3.81
L ⁹ -C ^α H I ¹⁰ -NH	2.30-3.30	2.26
L ⁹ -C ^β H I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	4.49
L ⁹ -C ^γ H I ¹⁰ -NH	3.80-5.50	3.87
I ¹⁰ -NH C ¹¹ -NH	3.80-4.80	4.63
I ¹⁰ -C ^α H C ¹¹ -NH	1.80-2.80	2.24
I ¹⁰ -C ^α H C ¹¹ -C ^α H	3.80-5.50	4.31
I ¹⁰ -C ^α H C ¹¹ -C ^β H	3.59-5.16	5.09
I ¹⁰ -C ^β H C ¹¹ -NH	2.80-4.80	3.15
I ¹⁰ -C ^γ 2H C ¹¹ -NH	3.80-6.53	4.73
I ¹⁰ -C ^γ 1H C ¹¹ -NH	3.80-6.38	5.05
I ¹⁰ -C ^δ H C ¹¹ -NH	3.80-5.50	4.84
I ¹⁰ -C ^δ H C ¹¹ -C ^δ H	3.80-6.40	4.97
I ¹⁰ -C ^β H T ¹² -NH	3.80-5.50	4.46
I ¹⁰ -C ^δ H T ¹² -NH	3.80-5.69	3.79
I ¹⁰ -C ^δ H T ¹² -C ^γ H	2.80-6.53	5.52
C ¹¹ -NH T ¹² -NH	2.80-3.80	3.79
C ¹¹ -NH T ¹² -C ^γ H	3.80-6.22	5.03
C ¹¹ -C ^α H T ¹² -NH	1.80-2.80	2.38
C ¹¹ -C ^α H T ¹² -C ^γ H	3.80-6.22	4.93
C ¹¹ -C ^β H T ¹² -NH	3.12-5.50	4.24
T ¹² -C ^β H T ¹³ -NH	2.80-3.80	3.74
T ¹² -C ^γ 2H T ¹³ -NH	3.80-5.50	5.21
T ¹² -C ^γ 1H T ¹³ -NH	3.80-5.50	4.29
T ¹² -C ^γ 1H T ¹³ -C ^α H	3.80-5.50	3.97
T ¹² -C ^γ 1H T ¹³ -C ^γ 1H	3.80-5.50	4.90
T ¹² -C ^α H A ¹⁴ -NH	3.80-5.50	5.48
T ¹² -C ^γ 1H A ¹⁴ -NH	3.80-5.50	5.31
T ¹² -C ^γ 2H A ¹⁴ -NH	3.80-5.50	4.96
T ¹² -C ^γ 1H A ¹⁴ -NH	3.80-5.50	4.93
T ¹³ -NH A ¹⁴ -NH	2.80-3.80	3.90
T ¹³ -NH A ¹⁴ -C ^β H	3.80-6.53	5.87
T ¹³ -C ^β H A ¹⁴ -NH	2.80-3.80	3.88

ANNEXE C

PARTIE THEORIQUE SUR LE TRANSFERT NOE

C. MODELISATION MOLECULAIRE

Nous rapporterons dans cette annexe les équations théoriques essentielles qui permettent la meilleure exploitation expérimentale de la technique TR-NOESY.

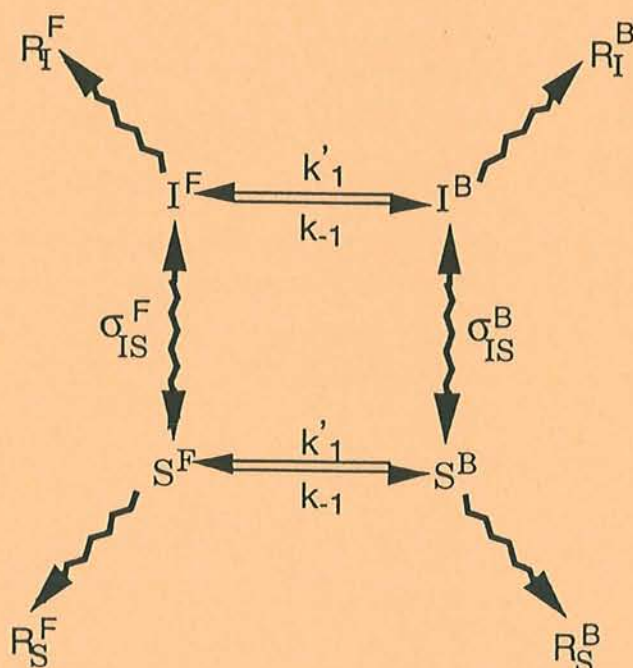


Figure C-1. Modèle d'un système d'échange concernant deux noyaux appartenant au même ligand, entre ses deux états libre et lié à un récepteur.

La figure C-1 illustre le système le plus simple de deux noyaux isolés I et S d'un ligand, représentant les deux sites d'échange correspondant aux deux états libre (I^F, S^F) et lié (I^B, S^B), à partir duquel on peut développer la théorie du TR-NOE.

Considérons l'interaction d'un ligand L avec une macromolécule E. L'équilibre d'échange s'écrit :



Avec E et L représentant respectivement la macromolécule et le ligand libre et EL représentant le complexe. Si k_1 et k_{-1} sont respectivement les constantes cinétiques

d'association et de dissociation de la réaction et si le système est en équilibre chimique, on peut écrire la relation suivante :

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[EL]}{[E][L]} \quad \text{et} \quad \frac{k_1[E]}{k_{-1}} = \frac{k'_1}{k_{-1}} = \frac{[EL]}{[L]}$$

La constante cinétique $k'_1 = k_1[E]$ est une constante de pseudo premier ordre.

Les deux noyaux I et S du ligand, lorsqu'ils sont proches dans l'espace, peuvent échanger de l'aimantation. Le transfert d'aimantation est déterminé par les constantes de vitesse de relaxation à l'état libre σ_{IS}^F et à l'état lié σ_{IS}^B . L'expérience TR-NOE est basée sur le fait que la constante de vitesse de relaxation croisée σ^B de l'état lié, correspondant à un mouvement lent, est généralement plus grande que la constante σ^F de l'état libre, correspondant à un mouvement rapide.

Dans le cas où l'échange chimique est lent par rapport à la relaxation dipolaire, l'information n'est pas transférée d'un état à l'autre, et le système atteint l'état d'équilibre avant que l'échange ne puisse avoir lieu. Les spectres obtenus sont identiques à ceux d'un système en absence d'échange chimique et on ne peut pas détecter des effets NOE provenant de la forme liée.

Dans les conditions d'un échange rapide par rapport à l'échelle de temps de la relaxation, le terme $\langle \sigma \rangle$ qui est représenté par $\langle \sigma_{IS} \rangle = N^F \sigma_{IS}^F + N^B \sigma_{IS}^B$ est majoritairement dû à σ^B , et le NOE observé renseigne directement sur la structure liée du ligand au sein du récepteur.

La condition pour que l'inégalité $|N^B \sigma_{IS}^B| \gg |N^F \sigma_{IS}^F|$ soit vérifiée dépend des cinétiques relatives des états libre et lié, des distances r_{IS} dans les deux états et de la constante d'affinité K de formation du complexe EL. Si le complexe est faiblement lié, N^B sera alors faible, et le TR-NOE disparaîtra simplement par le fait qu'il y a peu de ligand présent à l'état lié pour contribuer de façon significative à la totalité de la relaxation. En clair, la valeur minimale de K nécessaire pour l'observation du TR-NOE dépendra des valeurs relatives de σ_{IS}^B et σ_{IS}^F .

Le TR-NOE dépend aussi de la vitesse d'échange entre les états libre et lié, et ne devient exploitable que s'il s'établit un flux appréciable de transfert d'aimantation entre ces états. Plus précisément, si nous considérons une expérience dans laquelle le signal S^B (ou le signal moyenné S^{AV}) est saturé, la condition pour observer un transfert de saturation appréciable à partir du signal lié et exalté I^B vers le signal I^F doit satisfaire la condition suivante : $k_1[E] \gg R_f^I$ où R_f^I est la constante de relaxation longitudinale du noyau I dans l'état libre.

De façon similaire, si le signal S^F est irradié sélectivement, le transfert de saturation de S^F vers S^B est aussi une nécessité pour observer un transfert appréciable de NOE, et l'inégalité à appliquer est la suivante : $k_{-1} \gg R_s^B$ où R_s^B est la constante de relaxation longitudinale du noyau S dans l'état lié.

Ces inégalités montrent que l'intensité du TR-NOE dépend non seulement de la constante d'association K mais aussi de la constante de dissociation k_{-1} .

Parmi les différents paramètres dont le TR-NOE est dépendant, le rapport N^F/N^B est celui qui peut être varié le plus utilement et le plus facilement. Ce rapport est déterminé directement par la constante d'association K et les concentrations relatives du ligand et de la protéine dans la solution. Le choix est dicté par le respect de la condition $|N^B\sigma_{IS}^B| \gg |N^F\sigma_{IS}^F|$. Une valeur élevée de N^F/N^B est très bénéfique car, puisque la concentration totale de protéine est limitée, une concentration forte en ligand fournit des signaux plus intenses et ainsi une sensibilité accrue. L'intensité du TR-NOE croît avec le rapport N^F/N^B jusqu'au moment où l'inégalité précédente n'est plus vérifiée.

Afin d'obtenir des informations quantitatives sur la structure ou sur la dynamique moléculaire du ligand, il est préférable de déterminer la constante de vitesse de relaxation croisée plutôt que le NOE à l'équilibre. En ne considérant que le cas d'un échange chimique très rapide par rapport à l'échelle de temps du déplacement chimique et par rapport à la relaxation dipolaire, l'établissement du TR-NOE peut s'écrire de la façon suivante :

$$\frac{dI_Z}{dt} \langle \sigma_{IS} \rangle I_Z^0 = [N^F \sigma_{IS}^F + N^B \sigma_{IS}^B] I_Z^0$$

En tenant compte de l'inégalité précédente $|N^B\sigma_{IS}^B| \gg |N^F\sigma_{IS}^F|$, la constante de vitesse de relaxation croisée apparente $\langle \sigma_{IS} \rangle$ est dominée par la contribution du ligand lié et le build-up du TR-NOE s'écrit :

$$\frac{dI_Z}{dt} = \langle \sigma_{IS} \rangle I_Z^0 = \sigma_{IS}^B N^B I_Z^0$$

Cette expression montre un avantage très important du TR-NOE : la constante de vitesse de relaxation croisée apparente est celle du ligand lié, mais multipliée par la concentration fractionnaire N^B . Ainsi le "build-up" du TR-NOE est plus lent que pour un système ayant le même temps de corrélation en l'absence d'échange chimique. En plus, le temps que le peptide passe dans le site de liaison de la protéine est extrêmement court. Ceci permet d'utiliser des temps de mélange plus longs sans risque de diffusion de spin, et ceci malgré le temps de corrélation très long du complexe.

Mademoiselle PHAN CHAN DU Angélique

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I
en CHIMIE & PHYSICO-CHIMIE MOLECULAIRES

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 10 DEC. 2000 *m^c 441*

Le Président de l'Université



RESUME

Les peptides, agents naturels intervenant dans de nombreux processus biologiques, présentent un intérêt thérapeutique important. L'introduction de liaisons pseudopeptidiques dans des peptides antigéniques est devenue, au cours de ces dernières années, une stratégie des plus intéressantes afin d'améliorer leurs caractéristiques physico-chimiques propres et leur aptitude à interagir avec les effecteurs du système immunitaire.

Nous nous sommes intéressés à l'étude conformationnelle de peptides antigéniques, seuls ou en interaction avec des anticorps, par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et modélisation moléculaire (MM). Trois thèmes ont été abordés. Le premier concerne l'étude de la région 600-612 de la glycoprotéine gp41 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). La comparaison des propriétés conformationnelles du peptide correspondant à la séquence naturelle et de plusieurs analogues a permis d'expliquer les variations d'activité antigénique observées pour ces molécules. Parallèlement à cette étude, nous avons recherché à nous rapprocher de la géométrie de l'antigène peptidique en interaction avec un anticorps. Deux sujets ont été abordés dans cette optique : l'étude du fragment C-terminal de l'histone H3 et de ses analogues rétro-inverso, en interaction avec un anticorps monoclonal dirigé contre la séquence naturelle, et l'analyse du rôle fonctionnel et structural de la phosphorylation d'une tyrosine d'un fragment peptidique de la sous-unité β du récepteur de l'acétylcholine (RACH) impliqué dans une maladie auto-immune : la myasthénie. Pour ce faire, dans ces deux dernières études, nous avons utilisé la méthode du transfert des NOE.

Les résultats présentés dans cette thèse illustrent l'apport de la spectroscopie RMN et de la modélisation moléculaire dans la détermination de structures tridimensionnelles et notamment l'étude des relations structure/conformation/fonction.

ABSTRACT

The development of peptide-based drugs is strongly impaired by the high susceptibility of peptides to proteolysis, which limits their therapeutic use. For many years, intensive work has been focused on the synthesis of peptide analogues in looking for mimics with enhanced activity and biological half-lives. Modifications introduced in peptides, such as modifications of peptide bond or introduction of modified residues, provide pseudopeptides or pseudomimetics with a higher metabolic stability.

We report conformational studies of antigenic peptides, free or bound to antibodies, by nuclear magnetic resonance (NMR) and molecular modelling (MM). The aim was to determine a structure-conformation-activity relationship and to resolve the structure of peptides bound to an antibody. Mainly, three topics have been developed.

The first concerns the study of the 600-612 region of the human immunodeficiency virus (HIV) gp41 glycoprotein. Comparison of several pseudopeptide structures with the natural sequence allowed us to explain variations of antigenic activity observed for these molecules.

Then, we have considered the interactions between an antibody and an antigen. The 3D geometry of this system has been investigated for two specific cases. The C-terminal fragment of the H3 histone and its retro-inverso analogues, in interaction with a monoclonal antibody directed against the parent sequence has been considered. Finally, the functional and structural role of tyrosine residue phosphorylation for a fragment corresponding to the receptor of the acetylcholine (AChR) β -subunit has been analysed. In these last two studies, the TR-NOESY method was used with success.

The presented results illustrate the effectiveness of NMR spectroscopy and molecular modelling in the determination of 3D models and in the study of structure-conformation-activity relationship.